

Aus der Klinik für Innere Medizin II

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**Genotypische und phänotypische Analyse komplexer Mutationsmuster innerhalb der NS3-Protease des Hepatitis C Virus unter Erst- und Re-Therapie mit Proteaseinhibitoren**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von: Markus Zettler

geb. am: 21.09.1979 in Memmingen

Tag der Promotion: 22.06.2020

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Sarrazin

Prof. Dr. med. Sigrun Smola

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>12</b>
<b>1 Zusammenfassung / Abstract</b> .....	<b>14</b>
1.1 Zusammenfassung .....	14
1.2 Abstract .....	16
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>18</b>
2.1 Entdeckung des Hepatitis C Virus .....	18
2.2 Epidemiologie und Übertragung des Virus .....	18
2.3 Molekularbiologie des Hepatitis C Virus .....	19
2.4 Lebenszyklus des Hepatitis C Virus .....	26
2.5 Genotypen und Quasispezies .....	27
2.6 Die Hepatitis C Erkrankung aus immunologischer Sicht .....	28
2.6.1 Der Interferon-Signalweg .....	29
2.6.2 Eradikation des Virus versus Persistenz .....	30
2.6.3 Bedeutung des <i>IL28B (IFN lambda 3)</i> Gens .....	31
2.7 Klinischer Verlauf der Hepatitis C Erkrankung .....	32
2.8 Therapie der akuten Hepatitis C .....	33
2.9 Therapie der chronischen Hepatitis C .....	34
2.9.1 Kombinationstherapie aus Interferon und Ribavirin .....	34
2.9.2 Direkt antiviral aktive Agentien (DAA) .....	36
2.9.2.1 NS3/4A Proteaseinhibitoren .....	36
2.9.2.2 NS5A Inhibitoren .....	37
2.9.2.3 Nukleos(t)idische und nicht-nukleosidische NS5B Inhibitoren .....	37
2.9.2.4 Zelleigene Inhibitoren .....	37
2.9.3 Therapie mit den Proteaseinhibitoren der ersten Generation .....	38
2.9.3.1 Der Proteaseinhibitor Boceprevir (SCH 503034) .....	38
2.9.3.2 Therapiealgorithmen mit den Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir .....	39
2.9.4 Neuer Therapiestandard im Wandel der Zeit .....	42
2.10 Resistenzentwicklung unter Proteaseinhibitoren .....	44
2.11 Zellkultursysteme für das Hepatitis C Virus .....	46
2.12 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit .....	47
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>48</b>
3.1 Material .....	48
3.1.1 Geräte .....	48

3.1.2	Einwegmaterialien .....	49
3.1.3	Chemikalien .....	49
3.1.4	Reagenzien .....	50
3.1.4.1	Reagenzien-Sets .....	50
3.1.4.2	DNA-Längenstandard .....	51
3.1.4.3	Enzyme .....	51
3.1.4.4	Oligonukleotide .....	52
3.1.4.5	Primer für PCR zur Amplifikation und Sequenzierung .....	52
3.1.4.6	Primer für die Mutagenese-PCR .....	52
3.1.4.7	Primer und Sonde für quantitative real-time RT-PCR .....	52
3.1.4.8	Bakterien .....	52
3.1.4.9	Säugerzellen .....	53
3.1.4.10	Vektoren .....	53
3.1.4.11	Proteaseinhibitoren .....	54
3.1.5	Herstellung von Reagenzien .....	55
3.1.5.1	Bakterienmedium .....	55
3.1.5.2	Zellkulturmedium .....	55
3.1.5.3	Selektionsmedium .....	55
3.1.5.4	Einfrüermedium .....	55
3.1.5.5	TAE-Puffer .....	56
3.1.5.6	Agarose-Gel zur Auftrennung von DNA-Produkten .....	56
3.1.5.7	Agarose-Gel zur Auftrennung von RNA-Produkten .....	56
3.1.5.8	Cytomix für Transfektion der Zellkultur .....	56
3.1.5.9	MOPS-Acetat-Puffer (10x) .....	57
3.1.5.10	RNase freies Wasser (DMPC Wasser) .....	57
3.1.6	Software .....	57
3.1.7	Patienten .....	57
3.1.7.1	Patienten für den „multivariate a priori pattern mining approach“ .....	57
3.1.7.2	Patienten, die eine sequentielle Therapie mit Boceprevir und PEG-Interferon erhielten .....	57
3.2	Methoden .....	58
3.2.1	Isolierung der HCV-RNA aus Serum .....	58
3.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	59
3.2.2.1	Prinzip der PCR .....	59
3.2.2.2	Reverse Transkription .....	60
3.2.2.3	(Semi-) Nested-PCR .....	61
3.2.3	Elektrophorese .....	64
3.2.3.1	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA .....	64
3.2.3.2	RNA Formaldehyd Elektrophorese .....	64
3.2.4	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gel .....	65
3.2.5	Klonierung von DNA .....	65
3.2.6	Transformation von kompetenten Zellen .....	66

3.2.7	Herstellung von Flüssigkulturen für Einzelkolonien .....	66
3.2.8	Isolierung der Plasmid-DNA .....	67
3.2.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	67
3.2.10	Sequenzbestimmung der NS3-Protease .....	67
3.2.10.1	Sequenz-PCR nach der Kettenabbruch-Methode nach Sanger .....	67
3.2.10.2	Sequenzierung mit dem 3130xl Genetic Analyzer .....	68
3.2.11	Sequenzanalyse mit der Software <i>Mutation Surveyor V2.52</i> .....	68
3.2.12	Direktsequenzierung der Referenzsequenz .....	69
3.2.13	Mutagenese-PCR und Transformation .....	69
3.2.14	Transkription der Replikon-DNA .....	70
3.2.15	Kultivierung der Zelllinie Huh7-Lunet .....	71
3.2.16	Transfektion von Huh7-Lunet Zellen mit Replikon-RNA .....	71
3.2.17	HCV Replikon Assay .....	72
3.2.18	Isolation von Replikon-RNA aus Huh7-Lunet Zellen .....	73
3.2.19	Quantitative real-time RT-PCR .....	73
3.2.19.1	Grundlagen einer quantitativen real-time RT-PCR .....	73
3.2.19.2	Endogene Kontrolle .....	74
3.2.19.3	Reaktionsbedingungen der reversen Transkription und der quantitativen real-time RT-PCR .....	74
3.2.19.4	Relative Quantifizierung nach der $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ Methode .....	75
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>77</b>
4.1	Analyse der Minor-Varianten hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Resistenzentstehung .....	77
4.1.1	Phase Ib Studien mit den Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir .....	77
4.1.2	Varianten $\geq 5\%$ innerhalb der Quasispezies unter Therapie .....	77
4.1.3	„Multivariate a priori pattern mining approach“ .....	78
4.1.4	Identifizierung bekannter und potentiell neuer Resistenzmutationen .....	82
4.1.5	Phänotypische Charakterisierung der potentiell neuen Mutationen im Replikon-Modell .....	82
4.1.5.1	IC <sub>50</sub> Werte im Replikon für Boceprevir .....	82
4.1.5.2	IC <sub>50</sub> Werte der neuen Mutationen für Telaprevir .....	83
4.1.5.3	Kreuzresistenz zwischen Boceprevir und Telaprevir .....	84
4.1.5.4	IC <sub>50</sub> Werte der neuen Mutationen für makrozyklische Proteaseinhibitoren Faldaprevir, Simeprevir und Danoprevir .....	85
4.1.5.5	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	87
4.2	Kombinationstherapie als sequentielle Therapie mit Boceprevir und PEG-Interferon-alfa-2b .....	88
4.2.1	Sequenzanalyse .....	88
4.2.2	Mutationsanalyse .....	88
4.2.2.1	Mutationsanalyse vor Beginn der Therapie (Baseline) .....	89
4.2.2.2	Therapiesequenz Monotherapie - Kombinationstherapie .....	91
4.2.2.3	Therapiesequenz Kombinationstherapie – Monotherapie .....	98
4.2.2.4	Vergleichbares Resistenzspektrum unter beiden Therapiesequenzen .....	106

4.2.2.5	Divergierendes Resistenzspektrum unter beiden Therapiesequenzen .....	106
4.2.2.6	Patient 208 mit der Major-Variante V55A vor Therapie .....	107
4.2.3	Viruskinetik unter Therapie .....	107
4.2.3.1	Therapiesequenz Monotherapie – Kombinationstherapie.....	107
4.2.3.2	Therapiesequenz Kombinationstherapie – Monotherapie.....	109
4.2.3.3	Vergleich beider Therapiesequenzen .....	111
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>113</b>
5.1	Analyse komplexer Mutationsmuster unter Monotherapie mit Proteaseinhibitoren .....	114
5.1.1	Genotypische Sequenzanalyse nach Monotherapie mit Boceprevir.....	114
5.1.2	Identifizierung neuer Varianten durch ein sequenzanalytisches Modell und Phänotypisierung .....	115
5.1.3	<i>In silico</i> Strukturanalyse der neuen Mutationen .....	116
5.2	Genotypische Resistenzanalyse einer sequentiell durchgeführten Therapie mit Boceprevir.....	119
5.2.1	Genotypische Charakterisierung der Konsensussequenzen.....	120
5.2.2	Genotypische Charakterisierung nach Therapie und Re-Therapie mit dem gleichen Proteaseinhibitor.....	120
5.2.3	Virologisches Ansprechen auf die Erst- und Zweittherapie mit Boceprevir .....	125
5.2.4	Die präexistierende Major-Variante V55A.....	126
5.2.5	Zusammenfassung .....	128
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>145</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>147</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>148</b>

# Abkürzungsverzeichnis

3´NTR	nicht translatierte Region am 3´Ende
5´NTR	nicht translatierte Region am 5´Ende
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ARF	Alternate reading frame
ARFP	Alternate reading frame protein
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BID	bis in die (zweimal täglich)
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
c-terminal	carboxyterminal
DAA	Direkt antivirale Agentien
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2 $\alpha$	eukaryoter Initiationsfaktor 2 $\alpha$
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EU	Europäische Union
FDA	Food and Drug Administration (Behörde für Lebens- und Arzneimittel in den USA)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gt	Genotyp
h	Stunde(n)
HBs-Antigen	Hepatitis B surface-Antigen
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HCV <sub>cc</sub>	HCV in cell culture (Zellkulturmodell für Hepatitis C Virus)
HCV <sub>pp</sub>	Hepatitis C Virus Pseudopartikel
HIV	humanes Immundefizienz-Virus

---

HVR	hypervariable Region
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IFN	Interferon
IL28	Interleukin 28
IRES	Internal ribosome entry site (interne Ribosomenbindungsstelle)
IU	International units
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KOH	Kaliumhydroxid
LB	Luria Broth
M	Molar
mA	MilliAmpere
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
NaAc	Natriumacetat
NANBH	NonA-NonB Hepatitis
NaOH	Natriumhydroxid
NCR	non-coding region (nicht kodierende Region)
nm	Nanometer
NS	Nicht-Strukturprotein
n-terminal	aminoterminal
NTP	Nukleosidtriphosphat
ORF	Open reading frame (offener Leserahmen)
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
Peg	Polyethylenglykol
PKR	Proteinkinase R
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase mit anschließender PCR
s.c.	subkutan
SNP	Single nucleotide polymorphism
SVR	sustained virologic response (anhaltendes virologisches Ansprechen)



---

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TID	ter in die (dreimal täglich)
TNF	Tumornekrosefaktor
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Genomorganisation des Hepatitis C Virus .....	20
Abb. 2.2:	Sekundärstruktur der NS3 Serinprotease im Komplex mit dem NS4A Co-Faktor .....	24
Abb. 2.3:	Membranassoziation der HCV Proteine.....	26
Abb. 2.4:	Strukturformel von Boceprevir (SCH 503034).....	38
Abb. 2.5:	Therapiealgorithmus für Telaprevir zur Therapie der chronischen Hepatitis C Genotyp 1 .....	40
Abb. 2.6:	Therapiealgorithmus für Boceprevir zur Therapie der chronischen Hepatitis C Genotyp 1 .....	41
Abb. 2.7:	Aufbau eines HCV-Replikons.....	46
Abb. 3.1:	Aufbau des pCR <sup>®</sup> - XL - TOPO <sup>®</sup> Cloning Vektors .....	54
Abb. 4.1:	Graphische Darstellung der Ergebnisse des „multivariate a priori pattern mining approach“ nach Monotherapie mit Boceprevir .....	80
Abb. 4.2:	Graphische Darstellung der Ergebnisse des „multivariate a priori pattern mining approach“ nach Monotherapie mit Telaprevir .....	81
Abb. 4.3:	IC <sub>50</sub> Werte im Replikon für Boceprevir .....	83
Abb. 4.4:	Resistenzniveau der getesteten Mutationen im Replikon für Boceprevir .....	83
Abb. 4.5:	IC <sub>50</sub> Werte im Replikon für Telaprevir .....	84
Abb. 4.6:	Resistenzniveau der getesteten Mutationen im Replikon für Telaprevir .....	84
Abb. 4.7:	Resistenzspektrum von Boceprevir und Telaprevir .....	85
Abb. 4.8:	IC <sub>50</sub> Werte im Replikon für makrozyklische Proteaseinhibitoren Faldaprevir, Simeprevir und Danoprevir.....	86
Abb. 4.9:	Resistenzniveau der getesteten Mutationen im Replikon für Faldaprevir, Simeprevir und Danoprevir.....	86
Abb. 4.10:	Arbeitsdiagramm zur Identifizierung neuer Resistenzmutationen.....	87
Abb. 4.11:	Baseline aller Patienten mit dem Genotyp 1b im Vergleich zur Prototyp-Sequenz HCV-J 1b nach Kato.....	90
Abb. 4.12:	Baseline aller Patienten mit dem Genotyp 1a im Vergleich zur Prototyp-Sequenz des Genotyp 1a HCV-H77.....	90
Abb. 4.13:	Therapiesequenzen von Patient 201 .....	94
Abb. 4.14:	Therapiesequenzen von Patient 205.....	95
Abb. 4.15:	Therapiesequenzen von Patient 208.....	96
Abb. 4.16:	Therapiesequenzen von Patient 210.....	97
Abb. 4.17:	Therapiesequenzen von Patient 203.....	101

---

Abb. 4.18:	Therapiesequenzen von Patient 206.....	102
Abb. 4.19:	Therapiesequenzen von Patient 207.....	103
Abb. 4.20:	Therapiesequenzen von Patient 209.....	104
Abb. 4.21:	Therapiesequenzen von Patient 211.....	105
Abb. 4.22:	Therapiesequenz Monotherapie mit anschließender Kombinationstherapie.....	108
Abb. 4.23:	Therapiesequenz Monotherapie (a) mit anschließender Kombinationstherapie (b) in Einzeldarstellung .....	109
Abb. 4.24:	Therapiesequenz Kombinationstherapie mit anschließender Monotherapie.....	110
Abb. 4.25:	Therapiesequenz Kombinationstherapie (a) mit anschließender Monotherapie (b) in Einzeldarstellung .....	111
Abb. 5.1:	Ribbon Modell zur Struktur der NS3 Protease 20C8 der Proteindatenbank (RCSB PDB) mit Bindung des Proteaseinhibitors Boceprevir .....	118

# Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Grundbegriffe der Viruskinetik unter antiviraler Therapie nach Chang (Chang et al., 2012) und Sarrazin (Sarrazin et al., 2012) .....	39
Tab. 2.2:	Medikamente mit Zulassung in der Therapie der chronischen Hepatitis C .....	43
Tab. 2.3:	Resistenzprofile wichtiger Proteaseinhibitoren.....	45
Tab. 3.1:	Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der NS3-Protease .....	52
Tab. 3.2:	Primer für die Mutagenese-PCR.....	52
Tab. 3.3:	Primer und Sonde für quantitative real-time RT-PCR .....	52
Tab. 3.4:	Ausgangsstoffe mit Mengenangaben zur Herstellung eines 40 %-igen TAE-Puffers .....	56
Tab. 3.5:	RT-1 mit eingesetzten Reagenzien und Mengenangaben (exemplarisch für einen Ansatz) .....	60
Tab. 3.6:	RT-2 mit eingesetzten Reagenzien und Mengenangaben (exemplarisch für einen Ansatz) .....	61
Tab. 3.7:	Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der PCR I (Outer-PCR) einer Semi-Nested PCR (exemplarisch für eine Serumprobe Genotyp 1b).....	62
Tab. 3.8:	Programm für PCR I (Outer-PCR) einer Semi-Nested PCR.....	62
Tab. 3.9:	Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der PCR II (Inner-PCR) einer Semi-Nested PCR (exemplarisch für eine Serumprobe Genotyp I b) .....	62
Tab. 3.10:	Programm für PCR II (Inner-PCR) einer Semi-Nested PCR.....	62
Tab. 3.11:	Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der PCR I (Outer-PCR) einer Nested PCR (exemplarisch für eine Serumprobe Genotyp 1a).....	63
Tab. 3.12:	Programm für PCR I (Outer-PCR) einer Nested PCR .....	63
Tab. 3.13:	Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der PCR II (Inner-PCR) einer Nested PCR (exemplarisch für eine Serumprobe Genotyp I a).....	63
Tab. 3.14:	Programm für PCR II (Inner-PCR) einer Nested PCR .....	63
Tab. 3.15:	Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der Sequenz-PCR (exemplarisch für einen Bakterienklon) .....	68
Tab. 3.16:	Einstellungen der Sequenz-PCR .....	68
Tab. 3.17:	Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der Sequenz-PCR (exemplarisch für eine Serumprobe für Genotyp 1b) zur Direktsequenzierung der Referenzsequenz ..	69
Tab. 3.18:	Programm für Sequenz-PCR zur Direktsequenzierung der Referenzsequenz .....	69
Tab. 3.19:	Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der Mutagenese-PCR (exemplarisch für einen Reaktionsansatz) .....	70
Tab. 3.20:	Programm für Mutagenese-PCR.....	70

---

Tab. 3.21:	Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der Transkription (exemplarisch für einen Reaktionsansatz).....	71
Tab. 3.22:	Konzentrationen der linearen Proteaseinhibitoren im Replikon-Assay .....	72
Tab. 3.23:	Konzentrationen der makrozyklischen Proteaseinhibitoren im Replikon-Assay ...	73
Tab. 3.24:	Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der RT-PCR für den Nachweis von Replikon-RNA (exemplarisch für einen Reaktionsansatz) .....	75
Tab. 3.25:	Programm für die quantitative real-time RT-PCR .....	75
Tab. 3.26:	Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der RT-PCR für den Nachweis von GAPDH-mRNA (exemplarisch für einen Reaktionsansatz) .....	75
Tab. 3.27:	Programm für die quantitative real-time RT-PCR .....	75
Tab. 4.1:	Einteilung der Studienteilnehmer in die Therapiesequenzen .....	89
Tab. 4.2:	Resistenzspektrum der Patienten mit der Therapiesequenz Boceprevir Monotherapie – Kombinationstherapie .....	91
Tab. 4.3:	Resistenzspektrum der Patienten mit der Therapiesequenz Kombinationstherapie – Boceprevir Monotherapie.....	98

# 1 Zusammenfassung / Abstract

## 1.1 Zusammenfassung

**Einleitung:** Nach Schätzungen der WHO sind derzeit mind. 70 Mio. Menschen der Weltbevölkerung mit dem Hepatitis C Virus (HCV) infiziert. Eine Chronifizierung der Erkrankung kann eine progredient verlaufende Schädigung der Leber begünstigen und über fibrotische und zirrhotische Veränderungen der Leber zur Entstehung des hepatozellulären Karzinoms führen. Mit der langjährigen Standardtherapie aus Interferon und Ribavirin konnten jedoch nur 40 bis 50 % der Patienten, die an chronischer Hepatitis C mit dem Genotyp 1 erkrankt waren, geheilt werden. Klinische Studien mit direkt antiviral wirkenden Substanzen, die spezifisch gegen Proteine des Hepatitis C Virus gerichtet sind, erwiesen sich gegenüber der Therapie aus Interferon und Ribavirin als überlegen. Mit der Zulassung der Proteaseinhibitoren der ersten Generation im Jahr 2011, Boceprevir und Telaprevir, war es nun möglich, 70 bis 80 % der Patienten mit einer Genotyp 1 Infektion erfolgreich zu therapieren. Limitierend für den Therapieerfolg mit direkt antiviralen Medikamenten ist die Selektion resistenter Virusvarianten, was mit einem Therapieversagen assoziiert ist. In den Zulassungsstudien von Boceprevir und Telaprevir konnten in bis zu 77 % der nicht erfolgreich therapierten Patienten bekannte Resistenzen an wichtigen Positionen innerhalb der NS3 Protease (v.a. V36, T54, V55, R155, A156 und V170) nachgewiesen werden. Somit ist nicht jeder Wirkungsverlust des Proteaseinhibitors mit dem Nachweis bekannter Resistenzmutationen zu erklären. Weitere Virusvarianten unter Therapie mit einem Proteaseinhibitor könnten auf die Resistenzentwicklung Einfluss nehmen.

Durch die Verfügbarkeit von immer mehr direkt antiviral wirkenden Medikamenten steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass Patienten nach einem ersten Nichtansprechen mit einem weiteren direkt antiviralen Medikament re-therapiert werden. Ob initial selektionierte Resistenzvarianten hierbei re-selektioniert werden und somit eventuell Einfluss auf das weitere Therapieansprechen haben, sollte durch die Analyse von Patienten, nach Re-Therapie mit Boceprevir, geklärt werden.

**Methoden:** HCV Genotyp 1 infizierte Patienten (n=37) wurden im Rahmen von zwei Phase 1b Studien für jeweils zwei Wochen mit einer Boceprevir (n=22) bzw. Telaprevir (n=15) Monotherapie behandelt. Alle diese Patienten gingen als Non-Responder aus den Therapien hervor, weshalb eine klonale Sequenzanalyse des HCV NS3 Protease Gens direkt vor und nach der Therapie, sowie zwei Wochen nach Beendigung der Therapie durchgeführt wurde. Die Sequenzen vor Therapie der Boceprevir-behandelten Patienten wurden per Direktsequenzierung erhalten und dienten als Vergleichssequenzen bei der Auswertung der klonalen Daten. Um neue, noch nicht beschriebene Mutationsmuster, welche mit dem Versagen auf eine direkt antivirale Therapie

assoziiert sind, zu identifizieren, wurde ein multivariater Apriori Pattern Mining Ansatz angewendet, welcher Variationen in den Sequenzdaten extrahiert, die wiederholt gleichzeitig auftreten. Für jedes dieser gleichzeitig auftretenden Mutationsmuster wurde berechnet, wie groß die Veränderung der Quasispezies auf Nukleotidebene im Vergleich zu den vor Therapie, nach Therapie und Verlaufszeitpunkten ist. Die so identifizierten potentiellen neuen Resistenzvarianten wurden zur phänotypischen Charakterisierung in das Con1b-Replikon eingebaut. Über die Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes für jede Mutation sowie den Wildtyp wurde das Resistenzniveau der neuen Mutationen gegenüber Boceprevir und Telaprevir, sowie den makrozyklischen HCV NS3 Proteaseinhibitoren Danoprevir, Faldaprevir und Simeprevir ermittelt.

Zur Analyse der möglichen Re-Selektion resistenter Varianten wurde eine klonale Sequenzanalyse des HCV NS3 Protease Gens bei neun HCV Genotyp 1 infizierten Non-Responder Patienten nach sequentieller Therapie mit Boceprevir durchgeführt.

**Ergebnisse:** In der klonalen Sequenzanalyse konnten am Ende der zweiwöchigen Therapie mit Boceprevir bzw. Telaprevir als Monotherapie eine Vielzahl von Varianten mit einer Häufigkeit von  $\geq 5\%$  innerhalb der Quasispezies nachgewiesen werden. Die Anwendung der multivariaten Apriori Pattern Mining Methode konnte die Anzahl der relevanten Varianten deutlich reduzieren. Neben Virus Varianten an sechs Positionen (V36, T54, V55, R155, A156, V170) mit bereits beschriebener Resistenz gegenüber Proteaseinhibitoren, sowie drei Varianten mit bereits ausgeschlossener Resistenzwirkung (V48I, T72I, I153V) wurden vier weitere Varianten an den Positionen A87, R117, V132 und S174 von bisher unbekannter klinischer Bedeutung identifiziert. Für die Variante V132A konnte kein erhöhtes Resistenzniveau nachgewiesen werden. Die weiteren Varianten hingegen führten zu einer niedrigen bis mittleren Resistenzentwicklung gegenüber Boceprevir (A87T), Telaprevir (R117H und S174F) und Simeprevir (S174F) *in vitro*.

Die Analyse zur Re-Selektion resistenter Varianten nach sequentieller Therapie mit Boceprevir lieferte ein sehr heterogenes Ergebnis. Bei fünf Patienten fand sich ein unterschiedliches Mutationsmuster nach der ersten und zweiten Behandlung. Bei drei Patienten zeigten sich identische Varianten nach beiden Therapiezyklen und ein Patient wies bereits vor beiden Therapien eine resistente Variante (V55A) zu 100% in der Quasispezies auf, welche auch im weiteren Verlauf die dominante Variante an dieser Position blieb.

**Fazit:** Neben den bekannten Resistenzmutationen führten weitere neu identifizierte minore Varianten zu einem Wirkungsverlust einer Therapie gegenüber drei der bisher zugelassenen HCV NS3 Proteaseinhibitoren. Das Spektrum an Resistenzmutationen war somit komplexer als bisher bekannt.

Ein direkter Hinweis auf eine rasche Re-Selektion resistenter Varianten nach wiederholter direkt antiviraler Therapie konnte nicht gezeigt werden.

## 1.2 Abstract

**Introduction:** According to estimates of the World Health Organization more than 70 million people worldwide are infected with hepatitis C virus at present. A chronic course of the disease can promote progressive harm to the liver and lead to fibrotic and cirrhotic changes of the liver parenchyma. Long-standing chronic disease may also contribute to the emergence of a hepatocellular carcinoma. With former standard of care consisting of interferon and ribavirin only 40 to 50 % of patients suffering from a chronic hepatitis C genotype 1 infection could be treated successfully. In clinical trials direct acting antiviral agents targeting hepatitis C virus related proteins were proved to be superior to the combination of interferon and ribavirin alone. With the approval of first generation protease inhibitors boceprevir and telaprevir in 2011 the sustained virologic response rate in hepatitis C genotype 1 infected patients increased significantly up to 70 to 80 %. However, the emergence of drug-resistant variants is a limiting factor for a successful therapy with direct acting antiviral agents. In boceprevir and telaprevir phase III clinical trials already well described resistance associated variants within *NS3* protease sequence (especially at positions V36, T54, V55, R155, A156, and V170) could be identified in up to 77 % of therapy failure. Therefore not every therapy failure can be explained by the emergence of these variants alone. It can be assumed that further resistance-associated variants not identified so far emerge during therapy with a protease inhibitor.

As an increasing number of direct acting antiviral agents (DAA) are available on the market, the likelihood increases to retreat non-responder patients with a further specifically targeted antiviral therapy. The impact of resistance associated variants on treatment response to a second regime with a direct antiviral agent needs to be determined. Therefore patients were treated sequentially with the protease inhibitor boceprevir and a clonal analysis was performed.

**Methods:** HCV genotype 1 infected patients (n=37) were treated in two phase 1b studies with boceprevir (n=22) or telaprevir (n=15) as a monotherapy for 14 days. All patients were non-responders to the protease inhibitor based therapy. Clonal sequence analysis of the HCV *NS3* protease gene was performed before therapy, at the end of therapy and two weeks after the end of therapy. In the boceprevir group however, the consensus sequence for each patient was generated by population sequencing and used as a reference sequence for further genotypic analysis. To identify new mutational patterns associated with DAA therapy failure and not described so far, a multivariate a priori pattern mining approach was applied. This sequence analysis aimed at extracting mutation pattern which appear concurrently and repeatedly within the sequence data. For each of these co-occurring variations the mutational shift of the quasispecies away from the baseline was calculated before starting therapy and at post-therapy time points. New resistance variant candidates were tested in the con1b replicon system for phenotypic characterization. Resistance level was calculated by  $IC_{50}$  determination for each variant and wildtype for boceprevir



and telaprevir in the replicon system. In the same way resistance levels were also calculated for the macrocyclic HCV NS3 protease inhibitors danoprevir, faldaprevir and the meanwhile approved antiviral agent simeprevir.

Nine HCV genotype 1 infected patients, non-responders to former standard of care, were treated sequentially with boceprevir. To identify possible re-selection of resistant variants, clonal sequence analysis of HCV NS3 protease gene was performed.

**Results:** At the end of two weeks therapy with boceprevir or telaprevir as monotherapy many variants with  $\geq 5$  % frequency within quasispecies could be detected by clonal analysis. Application of a multivariate a priori pattern mining approach could reduce the number of possible resistance candidates. Already well described therapy associated mutations with increased resistance level against either protease inhibitor at six positions (V36, T54, V55, R155, A156, V170) and three known variants (V48I, T72I, I153V) conferring no resistance could be identified. Remaining variants at positions A87, R117, V132 and S174 appeared as variants with unknown clinical significance so far. While for the V132A variant no increased resistance level could be demonstrated, remaining variant candidates confer a low to medium level of resistance for boceprevir (A87T), telaprevir (R117H and S174F) and simeprevir (S174F).

Study data after sequential therapy with boceprevir yielded heterogenous results. The spectrum of resistance variants after the first and second therapy was different in five patients and within three patients resistance mutations were re-selected during the second therapy. One patient had the V55A variant in 100 % of sequences within quasispecies at pretreatment time point and remained the dominant variant during therapy.

**Conclusion:** In addition to the already known resistance mutations minor variants could be identified which contribute to loss of antiviral efficacy during treatment with three of the HCV NS3 protease inhibitors approved for therapy so far. The extent of resistance mutations is much more complex than expected so far.

In the present study investigating a sequential direct antiviral therapy with the same protease inhibitor, results were inconclusive and no evidence for rapid re-selection of resistant variants could be demonstrated.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Entdeckung des Hepatitis C Virus**

Bis Ende der 1980er Jahre wurde eine Hepatitis, der kein bis dahin bekannter Erreger zugeordnet werden konnte, als Non-A, Non-B (NANB) Hepatitis bezeichnet. Hepatitiden waren in dieser Zeit oftmals Folge von Bluttransfusionen. In Patienten, die an einer sog. Posttransfusionshepatitis erkrankt waren, war oftmals weder Antigen noch Antikörper gegen die bis dahin bekannten Hepatitis A und B Viren nachzuweisen. Auch ein Zusammenhang mit anderen hepatotropen Viren wie dem Cytomegalievirus oder Epstein-Barr Virus konnte nicht nachgewiesen werden (Feinstone et al., 1975). Erst im Jahr 1989 ist es Choo und Kollegen gelungen, ein bisher nicht bekanntes Virus aus infizierten Schimpansen als eigenständigen Erreger mit der Bezeichnung Hepatitis C Virus nachzuweisen (Choo et al., 1989). In etwa 80 % der Non-A, Non-B Hepatitiden (NANBH), die aus einer Übertragung von Blutprodukten resultierten, konnten spezifische Antikörper gegen das neu entdeckte Hepatitis C Virus nachgewiesen werden (Kuo et al., 1989). Das Hepatitis C Virus, welches Ähnlichkeiten in der Ausrichtung des Genoms sowie der Aminosäuresequenz mit Flaviviren und Pestiviren besitzt (Miller et al., 1990), wird als eigenständiges Virus in der Gattung der Hepaciviren aus der Familie der Flaviviridae geführt.

### **2.2 Epidemiologie und Übertragung des Virus**

Gegenwärtig sind weltweit mindestens 70 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C Virus (HCV) infiziert (Polaris Observatory, 2017). Vom geographischen Standpunkt aus zeichnen sich die Endemie Gebiete durch eine teils erhebliche Divergenz hinsichtlich der Prävalenz der Hepatitis C Infektion als auch der Verteilung der Genotypen aus. In Europa ist ein Nord-Süd-Gefälle der Infektionserkrankung erkennbar mit einer Prävalenz zwischen 0,1 % und 3,5 % (Shepard et al., 2005), in den U.S.A. liegt sie bei 1,8 %. Die Prävalenz der Hepatitis C Infektionen, bezogen auf den serologischen Nachweis von anti-HCV Antikörpern, liegt in Deutschland bei 0,4 % - 0,6 % (Palitzsch et al., 1999; Thierfelder et al., 2001) und gehört somit zu den Ländern mit der niedrigsten Seroprävalenz (Shepard et al., 2005). Eine an zwei Universitätskliniken deutscher Großstädte durchgeführte Studie ergab hingegen eine Seroprävalenz von 2,6 %, was vor allem auf eine Überrepräsentation von Risikogruppen in Ballungszentren im Vergleich zu ländlichen Regionen zurückgeführt wurde (Vermehren et al., 2012a). Die höchste Prävalenz mit einem Anteil von 15-20 % der Bevölkerung wurde aus Ägypten berichtet (Alter, 2007). Gemäß den Angaben des Robert-Koch-Instituts liegt die Inzidenz der Hepatitis C Infektionen in Deutschland derzeit bei etwas mehr als 5000 Personen pro Jahr. Die tatsächliche Anzahl neuerkrankter Patienten dürfte sicherlich unterschätzt werden aufgrund eines häufig

inapparenten Verlaufes der Erkrankung sowie persistierend normwertigen Transaminasen in ca. 30 % der Fälle (Hoofnagle, 2002).

Die Übertragung des Virus erfolgt parenteral durch direkten Kontakt mit kontaminiertem Blut. Während noch vor der Entdeckung des Hepatitis C Virus durch Choo und Kollegen als Ursache der Non-A, Non-B Hepatitis eine Transfusion von Blut bzw. Blutprodukten in bis zu 10 % der Fälle eine Viruserkrankung zur Folge hatte (Kuo et al., 1989), konnte dieses Risiko seither durch zunehmend verbesserte Screening-Verfahren um mehr als 80 % reduziert werden (Alter, 2007). Heute steht insbesondere die gemeinsame intravenöse Applikation von Spritzenmaterial unter Drogenkonsumenten im Vordergrund. Anhand des Nachweises von Antikörpern gegen das Hepatitis C Virus nimmt diese Personengruppe einen Anteil von bis zu 90 % der Hepatitis C Infektionen ein. Mit zunehmender Dauer des intravenösen Drogenkonsums steigt auch die Wahrscheinlichkeit, sich mit dem Virus zu infizieren (Esteban et al., 2008). Auch unsachgemäß durchgeführte Injektionen zu medizinisch-therapeutischen Zwecken, insbesondere unter nicht sterilen Bedingungen, werden ebenfalls als eine der wichtigsten Quellen der Virusübertragung beschrieben. Dies wird allerdings vermehrt in den Entwicklungsländern gesehen (Shepard et al., 2005). Kontaminierte Kanülen können im Falle einer Nadelstichverletzung in etwa 0,3 % der Fälle zu einer Infektion führen (Chung et al., 2003). Angaben des Robert-Koch-Instituts zu Folge ist eine vertikale Transmission von Mutter auf Kind von der Viruslast abhängig und wird mit einem Risiko von 1-6 % angegeben. Epidemiologische Untersuchungen erwiesen auch sexuelle Aktivität als einen Risikofaktor hinsichtlich der Virusübertragung, steht aber wie die perinatale Transmission nicht im Vordergrund (Alter, 2007). Das Risiko der Übertragung liegt hier bei 0-1,8 % pro Jahr (Terrault, 2002; Terrault et al., 2013). Bei ca. 20 % der Patienten lässt sich dennoch keine Infektionsquelle für ihre Erkrankung zuordnen (Herrine, 2002; Huppe et al., 2008).

## 2.3 Molekularbiologie des Hepatitis C Virus

Elektronenmikroskopisch ist das Hepatitis C Virus ein etwa 50 nm im Durchmesser großes RNA Virus (Wakita et al., 2005). Sein Genom, welches von Hüllproteinen umgeben wird, stellt einen einfachen positiv ausgerichteten RNA-Strang mit einer Länge von etwa 9600 Nukleotiden dar. Es trägt einen offenen Leserahmen (single open reading frame, ORF), der sowohl am 5`- als auch am 3`-Ende von nichtkodierenden Regionen (NCR) flankiert wird. Der ORF kodiert für ein Vorläufer Polyprotein aus etwa 3000 Aminosäuren (AS), welches in Analogie zur Familie der Flaviviridae sowohl während als auch nach der Translation der viralen RNA durch wirtseigene und virale Proteinasen in einzelne Proteine gespalten wird (Takamizawa et al., 1991). In der folgenden Abbildung ist die Organisation des Genoms des Hepatitis C Virus wiedergegeben.

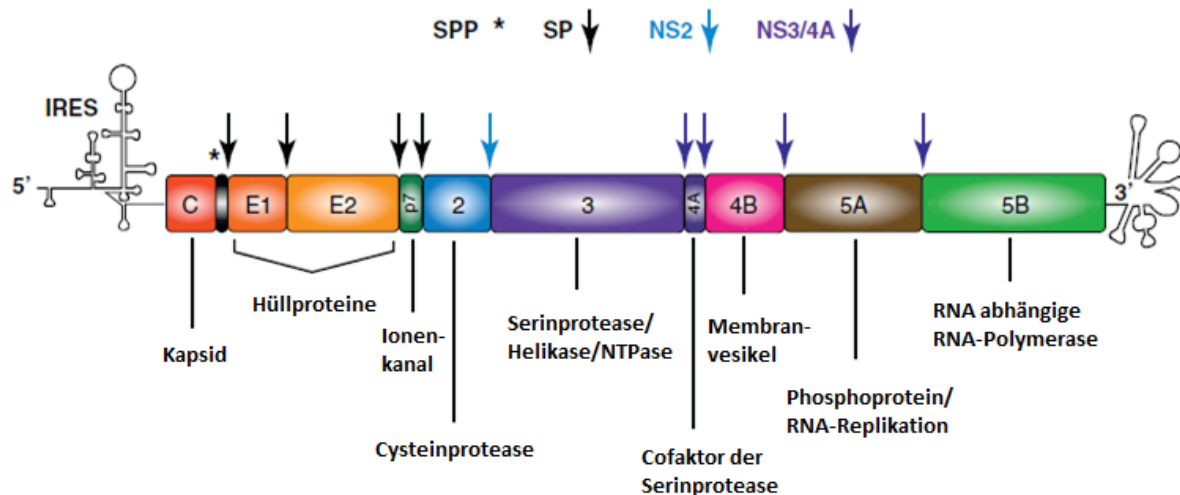


Abb.2.1: Genomorganisation des Hepatitis C Virus

Abgebildet ist ein schematischer Aufbau des Genoms des Hepatitis C Virus bestehend aus Struktur- und Nichtstrukturproteinen. Am 5'- und 3'- Ende sind die NTR's in ihrer Sekundärstruktur dargestellt. Oberhalb des Genoms sind die Proteasen aufgeführt, die an der Prozessierung des Polyproteins beteiligt sind. Ihre Schnittstellen innerhalb des Polyproteins sind in Form von Pfeilen kenntlich gemacht. Unterhalb des Genoms sind die Funktionen der einzelnen Proteine innerhalb des Replikationszyklus aufgeführt. Sie werden im Text näher beschrieben. IRES: interne Ribosomenbindungsstelle, SPP: Signalpeptidpeptidase, SP: Signalpeptidase. Abbildung entnommen aus (Bartenschlager et al., 2011).

Das Polyprotein ist wie folgt organisiert: NH<sub>2</sub>-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (Grakoui et al., 1993). C (Core), E1 und E2 bilden die Strukturproteine, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B die Nichtstrukturproteine. Hinweise für die Existenz eines den ORF überlappenden alternativen Leserahmens (alternative reading frame, ARF) ergaben sich aus besonders stark konservierten Nukleotiden innerhalb der Sequenz des Core Proteins. Dieser kommt durch einen Frameshift während der Translation zustande. Mit Hilfe von Western Blots konnte nachgewiesen werden, dass Serum von chronischen Hepatitis C Patienten positiv mit so genannten „alternate reading frame proteins“ (ARFP) reagiert und eine Korrelation der Hepatitis C Infektion und der Expression von ARFP besteht (Walewski et al., 2001). Jedoch scheinen die vom ARF kodierten Proteine für die Replikation des viralen Genoms *in vivo* nicht notwendig zu sein (McMullan et al., 2007). Die Funktionen dieser Proteine sind Gegenstand der Forschung. Eine Bedeutung in der Pathogenese des HCC wird diskutiert, da ARFP in dieser Patientengruppe vermehrt exprimiert werden (Branch et al., 2005) und aufgrund ihres zellulären Verteilungsmusters Wechselwirkungen mit zur Tumorentstehung beitragenden Signalkaskaden anzunehmen sind (Ratinier et al., 2009).

Am 5' Ende befindet sich eine hochkonservierte NCR mit einer Länge von 341 Nukleotiden (Han et al., 1991), welche in vier Domänen (I-IV) gegliedert wird. Sie beinhaltet eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES), über welche die Initiation der cap-unabhängigen Translation des viralen Genoms kontrolliert wird (Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Charakteristisch ist, dass die

Ribosomenbindungsstelle die ersten 12-30 Nukleotide der für das Polyprotein kodierenden Sequenz einschließt. Sie sollen an der Ausbildung von Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen der 5' NCR mitbeteiligt sein und somit eine korrekte Anlagerung der ribosomalen Untereinheiten an eine Bindungstasche im Bereich des Startkodons AUG ermöglichen (Reynolds et al., 1995). Die nichtkodierende Region enthält neben regulatorischen Elementen für die Translation auch solche, welche die Replikation des Genoms modulieren. In Replikon-Modellen wurden die 5' terminalen 125 Nukleotide als ausreichend für virale Replikation identifiziert (Friebe et al., 2001) und ein Zusammenhang zwischen viraler RNA Replikation bzw. Translation in Abhängigkeit vom Zellzyklus aufgedeckt (Pietschmann et al., 2001). Nach heutigem Stand sind eine Vielzahl sowohl an zellulären als auch viralen Faktoren identifiziert worden, die Einfluss auf die Aktivität der IRES ausüben können (She et al., 2009).

Eine weitere nichtkodierende Sequenz befindet sich am 3' Ende des viralen Genoms unmittelbar nach dem für das Polyprotein kodierenden Stopkodon im ORF. Sie besteht aus einem variablen Abschnitt, gefolgt von einem Poly-Pyrimidin-Trakt (poly U/UC), und endet mit einer hochkonservierten, 98 Nukleotide umfassenden Sequenz (X-Region) (Kolykhalov et al., 1996; Tanaka et al., 1996). In einem tierexperimentellen Versuch stellte sich die X-Region als essentiell für die Replikation des viralen Genoms heraus (Kolykhalov et al., 2000). Für regulierende Eigenschaften auf die Replikation und Translation, welche der 3' NCR zugeschrieben werden, ist die Sekundärstruktur der nichtkodierenden Region von Bedeutung. Auch eine RNA-RNA Interaktion zwischen dieser und der für NS5B kodierenden 3' terminalen Sequenz scheint für die Replikation essentiell zu sein (Friebe et al., 2005).

Das Core Protein, das als Strukturprotein am N-terminalen Ende des viralen Genoms kodiert wird, bildet zusammen mit der RNA das Nukleokapsid des Hepatitis C Virus. Seine Sequenz mit einem basischen N-Terminus und hydrophoben C-Terminus liegt innerhalb der verschiedenen Genotypen in einer hochkonservierten Form vor (Bukh et al., 1994). Dieses Protein aus 191 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 23 kDa wird durch eine zelluläre Signal-Peptidase an der cytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) generiert. Ein hydrophober Bereich um die AS 174-191 wirkt als Signalsequenz für die Verankerung am ER (Santolini et al., 1994). Erst nach Abspaltung dieser Signalsequenz durch eine Signal-Peptid-Peptidase entsteht das reife Core Protein von 21 kDa, das am Aufbau des Nukleokapsids beteiligt ist (Yasui et al., 1998). Diesem zweiten proteolytischen Schritt soll eine bedeutende Funktion in der Frühphase der Virusproduktion zukommen (Targett-Adams et al., 2008). Neben der Ausbildung des Nukleokapsids ist das Core Protein mit einer Vielzahl an Interaktionen auf molekularer Ebene in Verbindung gebracht worden. Nachdem *in vitro* Untersuchungen Bindungsaktivitäten des basischen Anteils des Core Proteins an Ribosomen und RNA aufzeigten (Santolini et al., 1994), konnten in weiteren Studien spezifische Bindungsstellen in der 5' und 3' NCR identifiziert und dem Core Protein eine Funktion in der Kontrolle der Replikation und Translation zugeschrieben werden (Tanaka et al., 2000; Yu et al., 2009). In tierexperimentellen Versuchen konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenz elektronenmikroskopisch Ablagerungen von Core Proteinen auf der Oberfläche so genannter Lipid-droplets dargestellt werden und ein Zusammenhang

mit der Pathogenese der Steatosis hepatis aufgedeckt werden (Barba et al., 1997), welche in mehr als 50 % der Patienten mit chronischer Hepatitis C zu finden ist (Roingeard et al., 2008). Die Lipid-droplets sollen zudem für die Morphogenese der Hepatitis C Viren von Bedeutung sein (Shavinskaya et al., 2007). Signalkaskaden ausgehend von Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptoren (LT $\beta$ R) oder TNF $\alpha$ -Rezeptoren, welche immunmodulierende Mechanismen induzieren, können durch das Core Protein sowohl auf der Ebene der Genregulation als auch durch direkte Interaktion mit zellulären Proteinen blockiert werden. Dies könnte zur Persistenz der Viren und zur Pathogenese der Hepatitis C Erkrankung beitragen (Matsumoto et al., 1997; Saito et al., 2006). Neben Interaktionen mit dem Immunsystem, Lipidstoffwechsel und Apoptose, wurden für das Core Protein auch cancerogene Eigenschaften beschrieben (McLauchlan, 2000).

Die Hüllproteine E1 und E2 sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 35 kDa bzw. 70 kDa. Nach Abspaltung vom Polyprotein durch eine zelluläre Protease unterliegen sie einem Reifungsprozess, an welchem das Chaperon Calnexin am ER beteiligt ist. E1 und E2 bilden Heterodimere über nicht-kovalente Bindungen und repräsentieren die funktionellen Untereinheiten der Hüllmembran. Erst in jüngerer Vergangenheit konnte nachgewiesen werden, dass die Proteine E1 und E2 als große Komplexbildungen auf der Hüllmembran der Virionen vorzufinden sind, welche über Disulfidbrücken verbunden sind (Vieyres et al., 2010). Das Glykoprotein E2 besitzt in seiner Sequenz zwei hypervariable Regionen (HVR1/2), was zur Ausbildung variabler Epitope auf der Hüllmembran führt (Weiner et al., 1992). Die ersten 27 Aminosäuren des Proteins E2 bilden dabei die HVR1. Dies wird als ein Mechanismus des Hepatitis C Virus angesehen, sich der Immunantwort des Wirts zu entziehen. Als Oberflächenprotein der Hüllmembran stellte sich E2 als der verantwortliche Bestandteil des Virus für die Interaktion mit der Zellmembran des Hepatozyten heraus (Rosa et al., 1996). Die Funktion des Glykoproteins E1 ist nicht eindeutig gesichert. Es soll am Fusionsprozess zwischen Virus und Zielzelle beteiligt sein (Flint et al., 1999). Weiterhin soll das Hüllprotein E2 *in vitro* daran beteiligt sein, der durch Interferon induzierten Proteinkinase R (PKR) entgegenzuwirken und so in Abhängigkeit vom viralen Genotyp zur Interferon-Resistenz des Virus beizutragen (Hofmann et al., 2005). PKR bewirkt über eine Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF2 $\alpha$  eine Hemmung der Proteinsynthese. Über eine Interaktion von E2 mit PKR wird diese inhibierende Wirkung aufgehoben (Taylor et al., 1999).

Das Protein p7 ist ein hydrophobes Molekül, welches in der Membran des ER durch eine zelluläre Signal-Peptidase generiert wird. Die genaue Bedeutung von p7 ist bisher nicht bekannt. Im Replikationsmodell konnte nachgewiesen werden, dass dieses Protein keine Auswirkungen auf die Replikationseffizienz des viralen Genoms hat (Lohmann et al., 1999). *In vitro* Experimente zeigten, dass dieses Protein Oligomere mit der Funktion von Ionenkanälen bildet. Sie sollen für den Zusammenbau funktionstüchtiger Viren und deren Freisetzung aus der Zelle essentiell sein (Griffin et al., 2003; Steinmann et al., 2007). Hierfür sollen Genotyp-spezifische Interaktionen von HCV-p7 mit RNA/Proteinen von Bedeutung sein (Sakai et al., 2003) und ein Zusammenhang zur Replikationskapazität, welche vom viralen Genotyp abhängt, bestehen (Steinmann et al., 2007).

NS2 mit einem Molekulargewicht von 21 kDa bildet im Verbund mit dem N-Terminus von NS3 als Co-Faktor eine Autoprotease (NS2/3 Protease), welche in einem zinkabhängigen intramolekularen Prozess die Spaltung zwischen NS2 und NS3 innerhalb des Polypeptids bewirkt (Hijikata et al., 1993). Über einen hydrophoben N-Terminus in der Membran des ER verankert, ist NS2 per se neben den Strukturproteinen nicht für die Replikation notwendig (Lohmann et al., 1999), seine Spaltung von NS3 ist hierfür jedoch essentiell (Kolykhalov et al., 2000). Analysen von Replikationskinetik und Effizienz hinsichtlich der Virusbildung / Virusfreisetzung intergenotypischer sowie intragenotypischer HCV Chimeras in Zellkultur zeigten, dass neben den Strukturproteinen auch NS2 diese Prozesse modulieren kann. Eine Interaktion der ersten Transmembrandomäne von NS2 mit Strukturproteinen und/oder p7 bzw. von NS2 mit dem Replikasekomplex könnte einen stimulierenden Effekt auf diese Prozesse ausüben (Pietschmann et al., 2006). Bekräftigt wird dies durch eine nachgewiesene Interaktion von NS2 mit NS3 (Kiiver et al., 2006). Dabei erwies sich die NS2 Protease Domäne, jedoch nicht ihre katalytische Komponente, als essentiell für die Morphogenese infektiöser Viren (Jones et al., 2007). Effiziente Virusbildung soll ebenso durch Phosphorylierung von Ser-168 innerhalb von NS2 beeinflussbar sein (Jirasko et al., 2008). Für das Immunsuppressivum Cyclosporin A und seine Derivate wurde eine Interaktion mit NS2 identifiziert, welche vermutlich über eine Beeinträchtigung der NS2/3 Spaltung eine Herabsetzung der Replikationseffizienz und Virusbildung erzielt (Ciesek et al., 2009).

Das NS3 Protein mit einem Molekulargewicht von 70 kDa ist an mehreren Prozessen beteiligt. Neben der bereits erwähnten Funktion als Co-Faktor für NS2 findet sich im N-Terminus eine Serin-Protease. Aktivitäten einer NTPase/Helikase sind in den C-terminalen Abschnitten von NS3 lokalisiert. Sequenzvergleiche mit Flaviviren und Pestiviren deckten hochkonservierte Aminosäuren His-1083, Asp-1107 sowie Ser-1165 innerhalb des NS3 Proteins auf und identifizierten sie als katalytische Triade der Serin-Protease, welche für die katalytische Spaltung von NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A sowie NS5A/5B zur Freisetzung der Proteine in ihrer reifen Form aus dem Polyprotein notwendig ist (Bartenschlager et al., 1993). Die Effizienz der proteolytischen Aktivität von NS3 wird in einer Komplexbildung mit NS4A als Co-Faktor gesteigert und für die Spaltung von NS4B/5A als essentiell angesehen (Failla et al., 1994). Dabei interagiert ein Abschnitt von 12 Aminosäuren im Zentrum von NS4A mit den N-terminalen 28 Aminosäuren der NS3 Protease, was zur Stabilität von NS3 sowie zur Optimierung der geometrischen Ausrichtung der katalytischen Triade beiträgt (Failla et al., 1995; Bartenschlager et al., 2000). In der Darstellung der kristallinen Struktur wird die Bedeutung von NS4A als integraler Bestandteil der aktiven Form der Serin-Protease ersichtlich (Kim et al., 1996). Für die Stabilität der Konfiguration und damit der proteolytischen Komponente von NS3 ist eine Interaktion mit Zink von Bedeutung (Clarke, 1997). Die für virale Replikation notwendige Aktivität der Helikase bewirkt ein Entwinden von Doppelstrang-RNA und ausgeprägten Sekundärstrukturen einzelsträngiger RNA beginnend am 3' Ende des viralen Genoms. Dieser Prozess verläuft dabei nicht kontinuierlich und zeigt eine Abhängigkeit von ATP, dessen Hydrolyse durch eine NTPase die erforderliche Energie für das Entwinden durch die Helikase liefert (Dumont et al., 2006). Die Aktivität

der Helikase ist von einer intakten NS3 Protease und NS4A abhängig. Mit etwa 8 kDa das kleinste der NS-Proteine, sorgt NS4A weiterhin über seinen hydrophoben N-Terminus als Transmembran Abschnitt für eine Verankerung und Ausrichtung des NS3/4A Komplexes in der Membran des ER (Wolk et al., 2000). Hinsichtlich der in diesem Kompartiment der Zelle erfolgenden Prozessierung des Polyproteins wird somit die Enzym/Substrat Konzentration erhöht. Da die proteolytische Aktivität von NS3 essentiell für Replikation *in vivo* ist (Kolykhalov et al., 2000), wurden spezifische Inhibitoren für dieses Enzym entwickelt, um diesen Prozessen pharmakologisch entgegenzuwirken. Weiterhin hat die NS3 Protease eine inhibierende Wirkung auf die angeborene Immunabwehr (siehe Kap. 2.6.2).

Die Bedeutung des Proteins NS4B für das Hepatitis C Virus ist von allen Proteinen am wenigsten gesichert. Charakteristisch für RNA-Viren positiver Polarität ist die Replikation ihres Genoms unter Ausbildung eines Replikations-Komplexes in Assoziation mit neu strukturierten zellulären Membranen (Egger et al., 2002), was auch für HCV gegeben ist. NS4B, ein kleines hydrophobes Molekül von 27 kDa, findet sich als integrales Membranprotein am ER verankert (Lundin et al., 2003). Durch Umstrukturierungen von Membranen des ER induziert NS4B die Ausbildung neuer Kompartimente, welche elektronenmikroskopisch als „membranous webs“ sichtbar werden und Ort der viralen Replikation sind (Egger et al., 2002). NS4B wird eine modulierende Wirkung auf die Replikationseffizienz zugeschrieben. Der Mechanismus jedoch, welcher der Neuformierung der Membranen durch NS4B zugrunde liegt, ist noch nicht identifiziert. NS4B-Oligomere sowie Interaktionen auf zellulärer Ebene werden hierfür diskutiert (Jones et al., 2009).

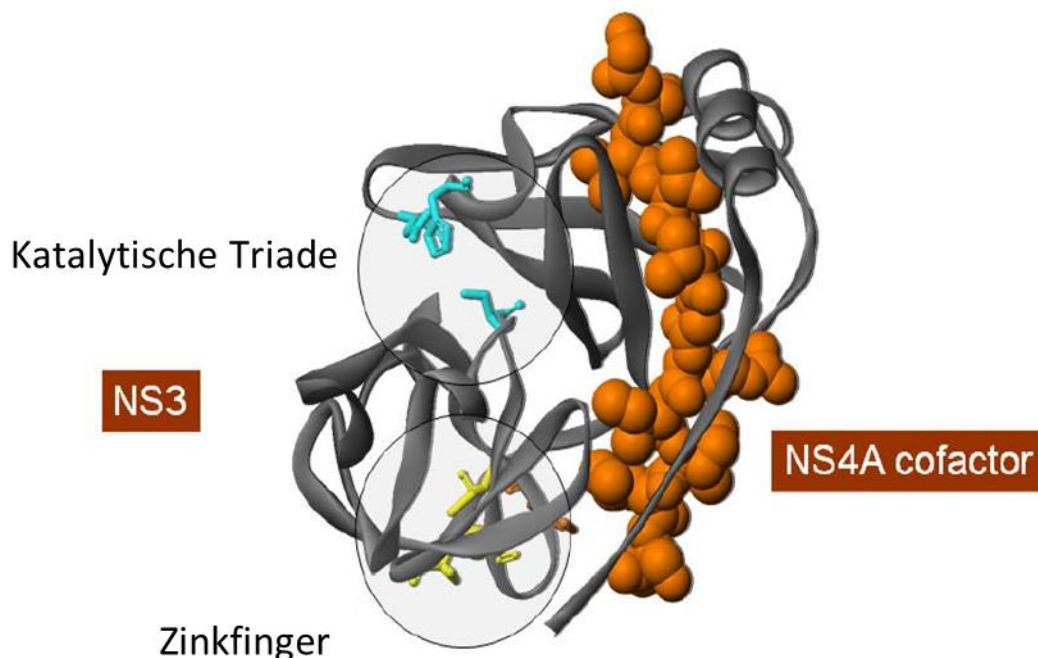


Abb.2.2: Sekundärstruktur der NS3 Serinprotease im Komplex mit dem NS4A Cofaktor

Die katalytische Triade des aktiven Zentrums der NS3 Serinprotease ist in Blau dargestellt. In Gelber Farbe ist die Ausrichtung der Zinkfingerstruktur abgebildet und in Orange die Komplexbildung mit dem NS4A Cofaktor. (Abbildung entnommen aus <http://www.flyingpublisher.com/images/9002images/image047.jpg>).



Als Bestandteil des Replikasekomplexes (Lohmann et al., 1999) findet sich das hydrophile Phosphoprotein NS5A über eine N-terminale  $\alpha$ -Helix in der Membran des ER verankert. In Abhängigkeit vom Grad der Phosphorylierung liegt NS5A in einer basal phosphorylierten (56 kDa) und hyperphosphorylierten (58 kDa) Form als Protein p56 bzw. p58 vor. Für die Phosphorylierung zu p58 sind neben Threonin insbesondere die Serin-Residuen S<sub>2197, 2201, 2204</sub> in zentraler Lokalisation von NS5A von Bedeutung (Tanji et al., 1995), welches von der  $\alpha$ -Isoform der Casein-Kinase I (CKI) katalysiert wird. Aufgrund des Nachweises eines entsprechenden Phosphorylierungsmusters in analogen Proteinen entfernt verwandter Viren aus der Familie der Flaviviridae, wurde für dieses konservierte Charakteristikum eine gemeinsame Funktion postuliert (Reed et al., 1998). Mutationsanalysen ließen eine inverse Korrelation zwischen dem Grad der Phosphorylierung von NS5A und der Effizienz viraler Replikation erkennen (Evans et al., 2004). Das Protein NS5A selbst wird in die Domänen I bis III gegliedert. Hierbei erwiesen sich die Domänen I und II als essentiell für die Replikation des Hepatitis C Virus (Tellinghuisen et al., 2008), wohingegen Domäne III mit ihrem C-terminalen Anteil für den Zusammenbau infektiöser Viruspartikel von Bedeutung ist (Appel et al., 2008). Weiterhin soll NS5A mit der antiviralen Wirkung von Interferon interagieren. In Sequenzanalysen wurde von Enomoto und Kollegen eine 40 AS (AS 2209-2248) umfassende Region im C-terminalen Abschnitt von NS5A, die „Interferon Sensitivity Determining Region“ (ISDR), identifiziert und Mutationen in diesem Abschnitt in Bezug auf die Prototyp-Sequenz von HCV-J mit unterschiedlichem Ansprechen auf eine Interferon-basierte Therapie in Verbindung gebracht (Enomoto et al., 1995). Die Bindung und Inaktivierung einer durch Interferon induzierten Doppelstrang-RNA-aktivierten Proteinkinase R (PKR) innerhalb der ISDR trägt zur Interferonresistenz bei, wobei für die Bindung der PKR weitere 26 AS am C-Terminus von NS5A notwendig sein sollen (Gale et al., 1998).

Die NS5B-Region im viralen Genom kodiert für die RNA-abhängige RNA-Polymerase. Dieses Protein mit einem Molekulargewicht von 66 kDa katalysiert über die Ausbildung eines intermediären negativ ausgerichteten Stranges die Neusynthese von RNA-Strängen positiver Polarität. Die kristalline Struktur des Proteins ähnelt dem Motiv einer rechten Hand, bestehend aus „finger, palm and thumb“ Subdomänen (Lesburg et al., 1999). Wechselwirkungen zwischen den Subdomänen lassen ein von allen Seiten umgebenes aktives Zentrum entstehen (Moradpour et al., 2007). Das aktive Zentrum selbst liegt innerhalb der verschiedenen Genotypen in hochkonservierter Form vor und ist in der „palm“ Subdomäne gelegen. Wie vielen anderen RNA-Viren fehlt auch der RNA-Polymerase des Hepatitis C Virus eine Korrekturfunktion, ein sog. „proof-reading“. Der Einbau nicht-komplementärer Nukleotide mit einer Häufigkeit von etwa  $1,5-2 \times 10^{-3}$  Mutationen pro Nukleotidposition und Jahr während der Replikation (Bukh et al., 1995) erklärt die Heterogenität der Viruspopulation innerhalb eines infizierten Individuums (siehe Kap. 2.5). In Abbildung 2.3 ist die Ausrichtung der einzelnen Proteine des Hepatitis C Virus entlang zellulärer Membranen innerhalb der Zelle dargestellt.

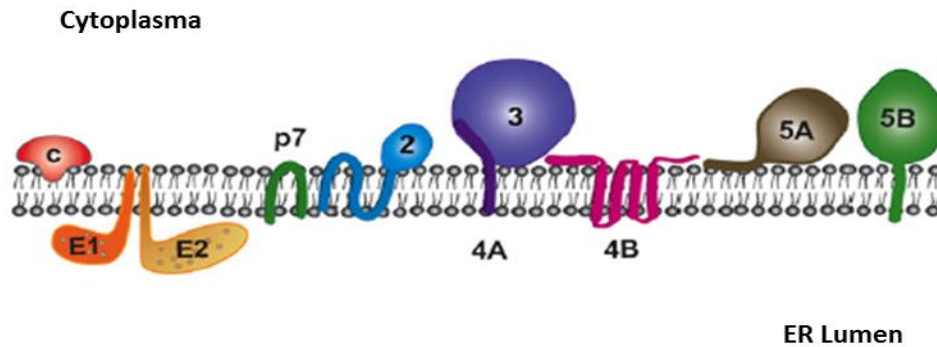


Abb.2.3: Membranassoziation der HCV Proteine

Dargestellt ist eine schematische Ausrichtung der Struktur- und Nichtstrukturproteine des Hepatitis C Virus innerhalb der Lipiddoppelschicht des Endoplasmatischen Retikulums zur cytoplasmatischen oder endoluminalen Seite. ER: endoplasmatisches Retikulum. Abbildung entnommen aus (Bartenschlager et al., 2010).

## 2.4 Lebenszyklus des Hepatitis C Virus

Nach heutigem Stand ist die Virus-Rezeptor-Interaktion, die zur Aufnahme des Virus in die Zielzelle führt, ein multiphasisches Geschehen, an welchem mehrere Rezeptoren und Co-Rezeptoren des Hepatozyten beteiligt sind. Neben dem CD81-Molekül, das an der Oberfläche der Zielzellen exprimiert wird und die Bindung von E2 ermöglicht (Pileri et al., 1998), sind für die Aufnahme des Virus Interaktionen mit weiteren membranständigen Rezeptoren essentiell wie Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1 (SR-B1) (Scarselli et al., 2002), Claudin 1 (Evans et al., 2007) und Occludin (Ploss et al., 2009). In jüngster Vergangenheit konnten weitere Proteine nachgewiesen werden, welche als Rezeptoren für die Endozytose des Virus in die Zielzelle notwendig sein sollen. Hierzu zählen zwei Rezeptor-Tyrosinkinasen, EGFR (Epidermal growth factor receptor) und EphA2 (Ephrin receptor A2), welche Interaktionen zwischen Claudin 1 und CD81 modulieren sollen, sowie NPCL1L1 (Niemann-Pick C1-like1 cholesterol uptake receptor) (Kim et al., 2013). Da das Hepatitis C Virus im Serum teils an Lipoproteine gebunden zirkuliert, scheinen Membranbestandteile des Hepatozyten wie Glykosaminoglykane, Lectine und der LDL-Rezeptoren an der initialen Kontaktaufnahme beteiligt zu sein oder sogar einen alternativen Weg zur Infektion der Zelle zu vermitteln (Burlone et al., 2009). Nachdem das Virus über rezeptorvermittelte Endozytose in das Zellinnere aufgenommen und das Genom in einem pH-abhängigen Prozess aus dem Endosom freigesetzt wurde (Moradpour et al., 2007), steht dieses unmittelbar der Replikation zur Verfügung. Am rauen endoplasmatischen Retikulum erfolgt die cap-unabhängige Translation der (+) RNA in ein Polyprotein, welches sowohl während als auch nach der Translation durch zelluläre und virale Proteasen in seine Struktur- und Nichtstrukturproteine gespalten wird. Durch Umstrukturierung von Membranen des endoplasmatischen Retikulums entstehen neue Kompartimente, sog. „membranous webs“, in welchen sich die viralen Proteine anreichern und als Replikationskomplexe vorliegen (Egger et al., 2002;

Gosert et al., 2003). In diesen Kompartimenten findet die virale Replikation statt. Dabei wird die positiv ausgerichtete RNA in einen Strang negativer Polarität umgeschrieben, der wiederum als Matrize für die Synthese neuer (+) RNA-Moleküle dient. Diese können anschließend zur Proteinbiosynthese viraler Proteine herangezogen werden, zur Replikation oder zusammen mit Strukturproteinen neue Viruspartikel bilden. Es wird vermutet, dass eine Interaktion des Core-Proteins mit der RNA das Signal zur Zusammensetzung neuer Viruspartikel auslöst. Nach Knospung der neugebildeten Viruspartikel in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums und weiterer Reifungsprozesse erfolgt ihre Freisetzung über Exozytose aus den Hepatozyten, wo sie als Virionen in freier Form oder an LDL (low density lipoproteins) bzw. VLDL (very low density lipoproteins) gebunden in der Blutbahn zirkulieren (Moradpour et al., 2007). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Produktion infektiöser Viruspartikel an den Lipidmetabolismus der Leber geknüpft ist (Huang et al., 2007).

## 2.5 Genotypen und Quasispezies

Bereits sehr früh nach der Erstbeschreibung des Hepatitis C Virus im Jahr 1989 erwies sich das virale Genom in Sequenzanalysen verschiedener Isolate aus Japan (HCV-J) verglichen mit der Prototypsequenz (HCV-US) aus den USA als ausgesprochen heterogen. Aufgrund einer Abweichung von ca. 22 % auf Ebene der Nukleinsäuren und 15 % in der Aminosäuresequenz wurde zu damaligem Zeitpunkt die Existenz von mindestens zwei Subtypen postuliert (Enomoto et al., 1990; Kato et al., 1990).

Grundlage für die Heterogenität des viralen Genoms ist die fehlende Korrekturfunktion der RNA-Polymerase, die bereits in Kap. 2.3 vorgestellt wurde. Bei einer täglichen Neubildung von etwa  $10^{12}$  Virionen mit kurzer Halbwertszeit von ca. 2,7 Stunden (Neumann et al., 1998) entsteht auf diese Weise innerhalb eines infizierten Individuums eine Population von Virusvarianten, die sich innerhalb ihrer Sequenzen in etwa 1-5 % der Nukleotide unterscheiden (Hoofnagle, 2002) und als Quasispezies bezeichnet werden (Martell et al., 1992). Das Ausmaß der Sequenzvariabilität ist dabei nicht einheitlich über das Genom verteilt. So wurden hochkonservierte Abschnitte beschrieben wie auch hypervariable Regionen (Bukh et al., 1995). Eine Konsensussequenz ergibt sich, indem für jede Position im Genom das Nukleotid mit der höchsten Frequenz unter allen Isolaten herangezogen wird. Während des Erkrankungsverlaufes ändert sich die Konsensussequenz (Bukh et al., 1995). Sie soll die repräsentative Sequenz des Hepatitis C Virus innerhalb des Individuums darstellen.

Aus den Ergebnissen phylogenetischer Analysen von NS-3, NS-5, Core-Protein sowie 5'-NCR erfolgte die Einteilung der Isolate in Genotypen und Subtypen. Die Zuordnung zu einem Genotyp erfolgt bei einer Sequenzhomologie von 67-69 % der NS-5 Region in Bezug zur Referenzsequenz, 75-80 % identischer Nukleotide lassen auf den Subtyp eines Genotyps schließen (Simmonds et al., 2005). Nach dieser Klassifikation sind derzeit sieben Genotypen mit einer unterschiedlichen Anzahl näher

verwandter Subtypen gelistet. Genotypen werden dabei mit arabischen Zahlen, Subtypen mit kleinen lateinischen Buchstaben kenntlich gemacht. Mitte der 90er Jahre wurden Virusvarianten aus Südostasien isoliert, die sich keinem der sechs bis dahin bekannten Genotypen zuordnen ließen und entsprechend als Genotyp 7 bis 11 geführt wurden (Tokita et al., 1996). Die Ergebnisse phylogenetischer Analysen ließen diese jedoch als Subtypen bereits bekannter Genotypen einordnen (Mizokami et al., 1996; Simmonds et al., 2005). Die Prävalenz einzelner Genotypen zeigt eine unterschiedliche geographische Verteilung, wobei das Hepatitis C Virus mit den Genotypen 1 und 2 weltweit verbreitet ist (Webster et al., 2000). In Deutschland überwiegt derzeit der Genotyp 1 (1b > 1a), gefolgt von den Genotypen 3 und 2. Die Genotypen 4, 5 und 6 treten mit geringer Prävalenz in Erscheinung (Berg et al., 1997; Huppe et al., 2008). In den USA findet sich ein ähnliches Verteilungsmuster, jedoch mit höherer Prävalenz des Genotyps 1a im Vergleich zu 1b, gefolgt von den Genotypen 2 und 3 (Alter et al., 1999). Der Genotyp 3 findet sich vor allem in Indien, wohingegen der Genotyp 4 in Afrika und im mittleren Osten und Genotyp 5 in Südafrika dominiert. Patienten mit Genotyp 6 stammen zumeist aus südostasiatischen Ländern (Hoofnagle, 2002). In Zentralafrika konnte in jüngster Vergangenheit der Genotyp 7 isoliert werden (Murphy et al., 2015). Diese Häufigkeitsverteilungen unterliegen allerdings dynamischen Veränderungen. So wird derzeit in Deutschland eine prozentuale Abnahme des Genotyps 1 zugunsten der Genotypen 2 und 3 beobachtet (Huppe et al., 2008), was auf die Assoziation bestimmter Risikogruppen für eine Hepatitis C Infektion mit Genotypen bzw. Subtypen zurückzuführen ist (Pawlotsky et al., 1995; Huppe et al., 2008). Abgesehen von epidemiologischen Untersuchungen ist die Bestimmung des Genotyp für die Prognose des Therapieansprechens und somit für die Planung der antiviralen Therapie von Bedeutung (Martinot-Peignoux et al., 1995).

## 2.6 Die Hepatitis C Erkrankung aus immunologischer Sicht

Das Hepatitis C Virus ist ein hepatotropes Virus, welches jedoch auch in B- und T-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Epithelzellen des Verdauungstraktes sowie im Neuroepithel nachgewiesen werden konnte (Post et al., 2009). Bereits innerhalb der ersten Tage nach Infektion mit dem Virus kann ein rascher Anstieg der Viruslast im Serum beobachtet werden. Hierbei können Konzentrationen viraler RNA im Bereich  $> 10^6$  IU/ml gemessen werden. Über endogene Interferone vom Typ I (Interferon  $\alpha$  und  $\beta$ ) und Typ III (Interferon  $\lambda$ ) soll die Vermehrung und Ausbreitung der Viren kontrolliert und möglichst eingedämmt werden. Nach etwa 4-8 Wochen (Frühphase der akuten Infektion) stellt sich ein langsamer Abfall der Viruslast durch endogene Sekretion von Interferon  $\gamma$  ein. Dieser geht einher mit einer Anreicherung von HCV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten in der Leber und dem Beginn einer Entzündungsreaktion, was mit einem Anstieg der Transaminasen verbunden ist (Heim, 2013). Neben den T-Lymphozyten sind die B-Lymphozyten, dendritische Zellen, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK) an der Kontrolle der Virusinfektion beteiligt.

Neben den zellulären Komponenten des Immunsystems ist auch das humorale Immunsystem für die Pathogenese der Hepatitis C Infektion von Bedeutung. Im Verlauf der Erkrankung können Antikörper sowohl gegen Strukturproteine als auch Nicht-Strukturproteine im Serum infizierter Patienten nachgewiesen werden, von welchen sog. neutralisierende Antikörper hinsichtlich Eradikation des Virus von Bedeutung zu sein scheinen. Neutralisierende Antikörper, welche erstmals 1994 von Farci und Kollegen in Untersuchungen an experimentell mit HCV infizierten Schimpansen nachgewiesen wurden, können die Bindung bzw. den Eintritt des Virus in die Zelle verhindern (Thimme et al., 2012) und sind v.a. gegen das Strukturprotein E2 gerichtet. Dennoch tritt in der akuten Phase der Hepatitis C Infektion nur in der Minderheit der Patienten eine spontane Eradikation des Virus ein und eine persistierende Virämie mit chronischem Verlauf der Hepatitis C Erkrankung wird bei 50 – 80 % der Patienten beobachtet. Mehrere Ansätze beschreiben Interaktionen zwischen Virus und Wirt auf immunologischer Ebene und tragen zum Verständnis der Chronifizierung der Erkrankung bzw. der spontanen Heilung bei. Warum die Infektion mit dem Hepatitis C Virus jedoch in der Mehrheit der Patienten einen chronischen Verlauf annimmt, kann heute noch nicht endgültig erklärt werden.

### **2.6.1 Der Interferon-Signalweg**

Die RNA des Hepatitis C Virus enthält sog. pathogen-associated molecular pattern (PAMP), welche von Sensormolekülen des Hepatozyten erkannt werden und daraufhin eine wirtseigene angeborene Immunantwort initiieren. Zu diesen PAMP's gehört die dsRNA, welche als Intermediärprodukt während der Replikation des Virus gebildet wird. Die positiv ausgerichtete ssRNA des Virus selbst erscheint nur schwach immunogen zu wirken. Verschiedene Sensormoleküle (RIG-I, MDA5, TLR 3) erkennen und binden an virale 5'- Triphosphat-Gruppen der dsRNA (Heim, 2013). Eine Interaktion mit den Proteinen MAVS (ehemals Cardif) bzw. TRIF führt zu einer Aktivierung von Kinasen, welche wiederum zur Phosphorylierung und Aktivierung von IRF 3 und IRF 7 (IFN regulatory factor 3 und 7) sowie NF-kappaB führen (Meurs et al., 2007; Bellecave et al., 2010). Diese Proteine stimulieren im Zellkern die Expression von Typ I und Typ III Interferonen, proinflammatorischen Cytokinen und Chemokinen. Die Interferonwirkung selbst kommt über eine autokrine und parakrine Bindung an den membranständigen Interferonrezeptoren zustande. Über diese Interaktion wird daraufhin eine Signalkaskade über den JAK-STAT-Pathway ausgelöst. Kinasen der Janus-Kinase (JAK) Familie phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren STAT-1 und STAT-2, welche wiederum mit IRF 9 einen Komplex, den sog. ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3), bilden. Dieser stimuliert im Zellkern die Expression von ISGs (IFN stimulated genes). Mehr als 300 durch Interferon exprimierter Gene sind beschrieben, deren Effektorproteine antiproliferative, antivirale und immunmodulierende Eigenschaften besitzen (Meurs et al., 2007).

## 2.6.2 Eradikation des Virus versus Persistenz

Eine Vielzahl von Interaktionen zwischen Immunsystem und Virus auf molekularer Ebene wurde beobachtet, die als Erklärungsmodelle hinsichtlich spontaner Eradikation oder Persistenz des Virus beitragen. So konnten *in-vitro*-Experimente aus dem Jahr 2003 einen inhibierenden Einfluss der NS3/4A Serin-Protease auf die Signalkaskade, welche zur Aktivierung von IRF3 und somit zur Bildung von Interferon führt, belegen (Meurs et al., 2007). In den folgenden Jahren konnte im Zellkulturmodell nachgewiesen werden, dass dieses Enzym die an der Signaltransduktion beteiligten Proteine TRIF und MAVS proteolytisch spaltet und somit inaktiviert (Heim, 2013). In Untersuchungen an Leberbiopsien war bei ca. 50 % der Patienten mit chronischer Hepatitis C inaktives MAVS in unterschiedlichem Ausmaß nachzuweisen. Hier konnte *in vivo* eine inverse Korrelation zwischen inaktivem MAVS und der Aktivität des endogenen Interferonsystems bestätigt werden (Bellecave et al., 2010). Neben den Interferonen sind auch Wechselwirkungen des Virus mit zellulären Elementen des Immunsystems für den Verlauf der Erkrankung von Bedeutung. So haben sich HCV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten als Effektorzellen in Kooperation mit CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten als entscheidend für die virale Eradikation von Bedeutung erwiesen. Auch die Ausbildung einer bestimmten viralen Quasispezies im Individuum kann zur Persistenz des Virus beitragen. Hier können im Bereich der Epitope sog. Escape-Mutationen entstehen, welche sich der Erkennung durch das zelluläre und humorale Immunsystem entziehen. Diese Mutationen, die beispielsweise die Assoziation des Antigens mit dem MHC-Protein verhindern, wurden nur selten in Patienten mit selbstlimitierendem Verlauf der Erkrankung gesehen (Heim, 2013). Zwei Abschnitte in der Sequenz des Hüllproteins E2 zeichnen sich durch erhöhte genetische Variabilität innerhalb der Quasispezies eines Individuums sowie innerhalb verschiedener Genotypen aus, welche als hypervariable Regionen bezeichnet werden (HVR1 und HVR 2). HVR 1 ist ein Ziel neutralisierender Antikörper. Aufgrund der erhöhten Sequenzvariabilität in diesem Abschnitt und der daraus resultierenden variablen Konformation der Oberflächenmoleküle kommt es zum Wirkverlust der Antikörper (Post et al., 2009; Fafi-Kremer et al., 2012). Eine Untersuchung konnte einen Zusammenhang darstellen zwischen dem Vorliegen neutralisierender Antikörper in der akuten Phase der HCV Infektion und der Eradikation des Virus (Pestka et al., 2007). Weitere Erklärungen für das Versagen der humoralen Immunität sind Glykosylierungen am Strukturprotein E2, wodurch die Immunogenität herabgesetzt und die Bindung neutralisierender Antikörper beeinflusst wird, sowie interferierende Antikörper. Weiterhin können sich die Viren den neutralisierenden Antikörpern durch eine direkte Zell-zu-Zell-Übertragung entziehen (Fafi-Kremer et al., 2012). Escape-Mutationen, wie sie eben beschrieben wurden, können auch zu einer beeinträchtigten Interaktion mit HCV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten führen. Dies wird mit einer Chronifizierung der Erkrankung in Verbindung gebracht.

Auch die Interferon-induzierte Proteinkinase R (PKR) scheint an der Ausbildung einer viralen Persistenz beteiligt zu sein, wobei es widersprüchliche Studienergebnisse gibt. Die Suppression der

PKR durch die viralen Proteine E2 und NS5A wird *in vitro* mit einer Interferon-Resistenz in Verbindung gebracht (Taylor et al., 1999). Für das Hüllprotein E2 wurde eine 12 Aminosäuren umfassende Sequenz beschrieben, welche zum Ort der Phosphorylierung der PKR und des eIF2 $\alpha$  homolog sein soll. Über eine Interaktion der als „PKR/eIF2 $\alpha$  phosphorylation homology domain“ (PePHD) bezeichneten Sequenz des Proteins E2 mit der Proteinkinase R konnte *in vitro* für Hepatitis C Virus Genotyp 1a/b eine Aktivitätsminderung der Kinase und somit Steigerung der Proteinbiosynthese nachgewiesen werden (Taylor et al., 1999). Dieser Effekt war bei den Genotypen 2 und 3 nicht zu beobachten und könnte somit zu vermehrter Interferon-Resistenz bei Genotyp 1 beitragen. Es wurde jedoch auch beschrieben, dass die aktive Form der PKR über die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  zur verminderten Translation zelleigener mRNA und Proteinbiosynthese führt. Die Translation der HCV-RNA ist davon jedoch nicht beeinträchtigt, da sie unabhängig von eIF2 $\alpha$  erfolgt. Allerdings werden nicht nur wirtseigene Proteine mit stimulierender Wirkung auf die Replikation des Hepatitis C Virus supprimiert, sondern auch die antiviral wirkenden Interferone vermindert ausgebildet. Warum das Virus allerdings inhibierend wirkende Faktoren bildet wie die Proteine E2 und NS5A ist nicht bekannt.

### 2.6.3 Bedeutung des *IL28B* (*IFN lambda 3*) Gens

Für eine Vielzahl von Erkrankungen wurden bereits genetische Faktoren des Individuums als Prognoseparameter für den Krankheitsverlauf identifiziert. Auch für die Hepatitis C konnte eine Assoziation zwischen der Merkmalsausprägung bestimmter Gene und dem Verlauf der Erkrankung gefunden werden. So werden die HL-Antigene HLA-A3, HLA-B27 und HLA-B57 mit einer Ausheilung der Erkrankung in Verbindung gebracht (Thimme et al., 2012). In jüngster Vergangenheit konnten im Rahmen genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) Variabilitäten innerhalb des Genoms mit dem Verlauf der Hepatitis C Erkrankung sowie ihrem Ansprechen auf eine antivirale Therapie mit pegIFN/Ribavirin in Verbindung gebracht werden. Hierbei haben sich angrenzende Abschnitte um das *IL28B*-Gen auf Chromosom 19q13.13, welches für das antivirale Cytokin Interferon  $\lambda$ 3 kodiert, als hotspot für Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) herausgestellt. Diese Polymorphismen sind als prognostischer Marker für Patienten mit den Genotypen 1 und 4 wertvoll, hingegen für den Genotyp 2 und 3 von untergeordneter Bedeutung. Einer der Polymorphismen ist SNP rs12979860 (C: Major-Allel; T: Minor-Allel). Homozygote und heterozygote Patienten für das Minor-Allel (Genotyp T/T und C/T) tragen ein höheres Risiko für einen chronischen Verlauf der Erkrankung sowie einer verminderten Wahrscheinlichkeit für spontane bzw. Interferon-basierte Eradikation des Virus gegenüber Patienten mit dem prognostisch günstigen Genotyp C/C. Der *IL28B* Polymorphismus trägt auch zur Erklärung bei, weshalb die Behandlungserfolge bei Patienten unterschiedlicher ethnischer Herkunft divergieren. So findet sich beispielsweise in Europäern, die im Vergleich zu Afroamerikanern bessere Therapieerfolge erzielen, in höherer Frequenz das günstige C-Allel (Ge et al., 2009). Auch in der Kombination des Proteaseinhibitors Boceprevir mit pegIFN/Ribavirin ist

rs12979860 C/C im Vergleich zu den ungünstigeren Genotypen C/T bzw. T/T sowohl bei behandlungsnaiven als auch vorbehandelten Patienten stärker als andere Baseline-Faktoren mit einem anhaltenden virologischen Ansprechen assoziiert. Ein Abfall der Viruslast um  $\geq 1 \log_{10}$  Stufe in Bezug zur Baseline nach vier Wochen Therapie ist jedoch der stärkste positive Prädiktor für einen Therapieerfolg. Hier verliert der günstige *IL28B* Genotyp C/C seine Bedeutung (Poordad et al., 2012). Auch der *IL28B* rs8099917 Genotyp T/T geht im Vergleich mit den ungünstigeren Genotypen G/T bzw. G/G mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer spontanen Viruselimination einher und begünstigt ein anhaltendes virologisches Ansprechen. Die zugrundeliegende molekulare Verbindung zwischen den Polymorphismen, die nahe dem *IL28B*-Gen auf Chromosom 19q13.13 gelegen sind, und dem Ansprechen auf antivirale Therapie, ist heute noch Gegenstand der Forschung. Es hat sich jedoch eine Abhängigkeit der IFN- $\lambda$ 3 mRNA Expression von der Ausprägung der SNPs herausgestellt, wonach bei günstigem Genotyp das *IL28B*-Gen vermehrt exprimiert wird (Horner et al., 2013). Dies unterstreicht die Bedeutung des angeborenen Immunsystems in der Viruselimination. Für das Auftreten von Resistenzmutationen innerhalb des NS3- sowie NS5B-Proteins unter Berücksichtigung des *IL28B*-Genotyps konnte kein Zusammenhang hergestellt werden. Jedoch korreliert die Y93H Variante des NS5A-Proteins mit dem günstigen *IL28B* Genotyp C/C (Peiffer et al., 2016).

## 2.7 Klinischer Verlauf der Hepatitis C Erkrankung

Die akute Hepatitis C verläuft bei den meisten Patienten asymptomatisch. Nach einer Inkubationszeit von etwa acht Wochen mit Extremwerten zwischen zwei und 26 Wochen (Lauer et al., 2001) berichten symptomatische Patienten zumeist über unspezifische Beschwerden wie etwa Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Muskelschmerzen, Bauchbeschwerden oder Pruritus. Ein Ikterus tritt in etwa 30 % der Fälle in Erscheinung (Hoofnagle, 1997). Ein bis zwei Wochen nach Infektion ist erstmals HCV-RNA im Serum nachweisbar mit einem oftmals fluktuierendem Verlauf der RNA-Konzentration (Hoofnagle, 2002). Eine Serokonversion wird meist vier bis sechs Wochen nach Infektion beobachtet, gefolgt von einem Anstieg der Transaminasen (Cox et al., 2005). Mehrere Faktoren wirken sich günstig auf den Verlauf des akuten Stadiums aus und erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Eradikation des Virus. Hierzu zählen das weibliche Geschlecht, ein symptomatischer Verlauf der Erkrankung sowie Polymorphismen nahe des *IL28B*-Gens (C/C-Genotyp). Mit dem Nachweis von RNA über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten nach Transmission des Virus wird die Diagnose einer chronischen Hepatitis C gestellt, welche in bis zu 80 % der Fälle auf das akute Stadium folgt (Hoofnagle, 2002). Die Viruslast stabilisiert sich in der chronischen Phase und unterliegt einer Schwankungsbreite von etwa einer log-Stufe. Aus den Ergebnissen einer großangelegten prospektiven Kohorten Studie geht hervor, dass die chronische Hepatitis C in etwa 30 % der Fälle asymptomatisch verläuft (Huppe et al., 2008) und bei Auftreten von Beschwerden diese meist eher mild und unspezifisch sind. Zudem haben ca. 30 % der Patienten normwertige Transaminasen, so dass die Diagnose oftmals zufällig gestellt wird. Patienten



mit chronischer Hepatitis C haben ein erhöhtes Risiko für schwerwiegende Lebererkrankungen. Das Risiko, in den nächsten 10-20 Jahren eine Leberzirrhose zu entwickeln, liegt bei ca. 30 % und bis zu 5 % dieser Patienten wiederum entwickeln pro Jahr ein hepatozelluläres Karzinom (Hoofnagle, 1997). Für Patienten mit einer durch das Hepatitis C Virus induzierten Leberzirrhose wird von einer jährlichen Mortalität von bis zu 4 % berichtet, wohingegen diese nach Diagnose eines hepatozellulären Karzinoms auf etwa 31 % ansteigt (Sangiovanni et al., 2006). Die häufigste Indikation für eine Lebertransplantation ist in der heutigen Zeit die Leberzirrhose, welche sich als Folge einer Hepatitis C Erkrankung manifestiert. Epidemiologische Untersuchungen konnten Risikofaktoren identifizieren, welche einen rascheren Progress der durch das Hepatitis C Virus bedingten Lebererkrankung und ihre Folgen begünstigen. Hierzu werden insbesondere das männliche Geschlecht, ein fortgeschrittenes Alter zum Zeitpunkt der Infektion erwähnt sowie Adipositas, Co-Infektion mit Hepatitis B / HIV und Alkoholkonsum (Shepard et al., 2005). Die fulminant verlaufende Form der Hepatitis C Erkrankung ist ein sehr seltenes Ereignis (Deterding et al., 2009). Der Informationsgewinn über den natürlichen Verlauf dieser Infektionserkrankung ist jedoch aufgrund häufig vorliegender Begleitumstände erheblich reduziert, wozu einerseits der oftmals symptomlose langjährige Verlauf dieser Erkrankung als auch begleitende Infektionen mit HBV und/oder HIV beitragen (Seeff, 2002). Die Unterscheidung zwischen akuter und chronischer Hepatitis C ist meist sehr schwierig, da ein positiver Antikörpernachweis nicht zwischen beiden Stadien unterscheiden kann. Für die Bestätigung einer akuten Hepatitis C Infektion ist bis zum Zeitpunkt der Serokonversion der Nachweis von RNA über einen sensitiven qualitativen oder quantitativen PCR-Assay notwendig (Strader et al., 2004).

## 2.8 Therapie der akuten Hepatitis C

Gegenwärtig ist für die akute Hepatitis C PEG-IFN- $\alpha$ 2a (180  $\mu$ g/Woche) oder PEG-IFN- $\alpha$ 2b (1,5  $\mu$ g/kg/Woche) als Monotherapie über einen Zeitraum von 24 Wochen zugelassen. Jedoch wird in etwa 30 – 50 % der Patienten innerhalb der ersten sechs Monate ab dem Zeitpunkt der Infektion ein selbstlimitierender Verlauf der Erkrankung beobachtet. Ein Therapiebeginn unmittelbar zum Zeitpunkt der Infektion bzw. Diagnosestellung der akuten Hepatitis C hätte eine unnötige Exposition dieser Patientengruppe gegenüber der antiviralen Therapie mit den zum Teil nicht unerheblichen Nebenwirkungen zur Folge. Eine abwartende Haltung von zwei bis drei Monaten erscheint gerechtfertigt, da nach Studienlage in mehr als 90 % der Patienten ein anhaltendes virologisches Ansprechen unter einer Monotherapie mit PEG-Interferon unabhängig vom Genotyp erreicht werden kann (Kamal et al., 2006; Wiegand et al., 2006). Dies unterstreicht die enorme Bedeutung einer frühzeitigen Erkennung dieser Erkrankung. Die Einleitung einer antiviralen Therapie zu einem späteren Zeitpunkt wiederum reduziert die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolges (Kamal et al., 2006). Jedoch ist der optimale Zeitpunkt für einen Therapiebeginn nicht definiert, worauf eine aktuelle Studie hinweist (Deuffic-Burban et al., 2012). Demnach wäre ein Therapieerfolg innerhalb der ersten acht Wochen nach Infektion am höchsten, wohingegen die Wahrscheinlichkeit einer spontanen

Eradikation des Virus in diesem Zeitraum selten ist und erst nach drei Monaten ansteigt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen einer multizentrischen Phase III Studie, wobei der Beginn einer antiviralen Therapie mit PEG-Interferon nach 12 Wochen bei ausreichender Compliance der Patienten dem frühzeitigen Therapiebeginn nicht unterlegen war (Deterding et al., 2013). Der Stellenwert einer Kombinationstherapie mit Ribavirin ist derzeit nicht gesichert (Ghany et al., 2009), hat sich jedoch zur Behandlung der akuten Hepatitis C in der Kombinationstherapie mit PEG-Interferon 2 $\alpha$  als nicht überlegen erwiesen (Deterding et al., 2013). Gegenwärtig werden mehrere direkt antivirale Kombinationstherapien über 4 bis 8 Wochen zur Behandlung der akuten Hepatitis C untersucht. Eine Therapie mit Sofosbuvir und Ledipasvir über sechs Wochen erreichte einen SVR von 100 % bei Patienten, die an akuter Hepatitis C mit Genotyp 1 als Monoinfektion erkrankt waren (Deterding et al., 2017). Trotz fehlender Zulassung wird auf der Grundlage dieser und weiterer Arbeiten in der aktuellen deutschen Leitlinie bei Patienten mit einer Indikation zur Behandlung eine direkt antivirale Therapie der akuten Hepatitis C und nicht mehr die Gabe von Interferon-alfa empfohlen (Sarrazin et al., 2018).

## 2.9 Therapie der chronischen Hepatitis C

Das Ziel in der Behandlung der chronischen Hepatitis C ist der fehlende Nachweis von Hepatitis C Virus RNA im Serum 12 Wochen nach Beendigung der Therapie, was als anhaltendes Therapieansprechen oder auch „sustained virological response“ (SVR) bezeichnet wird (Sarrazin et al., 2018). Dies entspricht einer Ausheilung des Virusinfektes, wobei jedoch in weniger als einem Prozent der Fälle nach erfolgreicher Therapie ein Wiederanstieg der HCV-RNA beobachtet werden kann (Swain et al., 2010).

### 2.9.1 Kombinationstherapie aus Interferon und Ribavirin

Die Hepatitis C Virus Infektion konnte erstmals mit Interferon- $\alpha$  erfolgreich behandelt werden. Die Studienergebnisse, welche unter dieser Therapie über einen Zeitraum von 48 Wochen erzielt werden konnten, waren jedoch nicht zufriedenstellend, da lediglich bei 15-20 % der Patienten ein Abfall der Transaminasen bzw. eine dauerhafte Elimination des Hepatitis C Virus erreicht werden konnte (Farrell, 1997; Poynard et al., 1998). Zudem wurde in bis zu 50 % der Patienten mit nicht nachweisbarer HCV-RNA unter Therapie nach Beendigung ein Wiederanstieg der RNA beobachtet (McHutchison et al., 1998). Insbesondere der in Europa und den USA mit der höchsten Prävalenz vorgefundene Genotyp 1 zeigte ein vermindertes Ansprechen auf die Therapie, wonach bei weniger als 10 % der Patienten ein sustained virologic response erzielt werden konnte (Zeuzem et al., 2000). Studienergebnisse erwiesen eine Kombinationstherapie mit Ribavirin gegenüber der Monotherapie mit Interferon- $\alpha$  als überlegen und konnten einen anhaltenden Therapieerfolg bei ca. 40 % der Patienten sowie eine Abnahme an Relapsen belegen (McHutchison et al., 1998; Poynard et al., 1998). Unter Ribavirin, einem Guanosin-Analogon mit breitem Wirkspektrum gegen DNA- und RNA-Viren, wurde

in der Monotherapie ein Abfall der Transaminasen mit anschließendem Relapse nach Beendigung der Therapie beobachtet, jedoch keine anhaltende signifikante Wirkung auf die Viruslast (Dusheiko et al., 1996). Sein Wirkmechanismus ist nicht eindeutig geklärt, jedoch werden eine Hemmung der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase sowie immunmodulierende Eigenschaften diskutiert. Weiterhin übt es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mutagene Auswirkungen auf das virale Genom aus (Hofmann et al., 2007). Durch den therapeutischen Einsatz von PEG(Polyethylenglykol)-Interferon- $\alpha$ 2a/2b war eine weitere Steigerung des virologischen Ansprechens zu erzielen. Die kovalente Knüpfung eines 40 kDa verzweigten Polyethylenglykols (PEG-Interferon- $\alpha$ 2a) bzw. eines 12 kDa linearen Polyethylenglykols (PEG-Interferon- $\alpha$ 2b) an Interferon- $\alpha$  hat günstigere pharmakokinetische Wirkungen im Vergleich zu Interferon- $\alpha$  in der Therapie der chronischen Hepatitis C zur Folge. Eine Verminderung der renalen Clearance und eine Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit (HWZ) macht eine nur noch einmal wöchentliche subkutane Applikation erforderlich, wohingegen Interferon dreimal wöchentlich verabreicht werden musste. Somit kann ein kontinuierlich im wirksamen Bereich gelegener Spiegel im Plasma aufrechterhalten werden, was aufgrund einer kurzen HWZ von Interferon und der daraus resultierenden fluktuierenden antiviralen Wirkung nicht gegeben war (Wang et al., 2002). Bereits 24 Stunden nach einmaliger subkutaner Gabe war Interferon nicht mehr im Plasma nachzuweisen. Mit der im Jahr 2001/2002 zugelassenen Kombinationstherapie mit Ribavirin war den PEG-Interferonen eine Überlegenheit gegenüber den bisher erwähnten Therapien nachzuweisen. Hier war ein anhaltendes Therapieansprechen 24 Wochen nach Therapieende bei 54 - 56 % der Patienten zu beobachten (Manns et al., 2001; Fried et al., 2002), wobei insbesondere Patienten mit dem ungünstig zu behandelnden Genotyp 1 profitierten (Fried et al., 2002; McHutchison et al., 2009). Patienten mit den therapeutisch günstigeren Genotypen 2 bzw. 3 zeigten ein deutlich besseres Ansprechen auf die Kombinationstherapie. Ein therapeutischer Erfolg stellt sich bei ca. 80 % der Patienten nach einer Therapie über 24 Wochen ein (Manns et al., 2001). Auch der Anteil an Relapsen konnte im Vergleich zum Standardinterferon auf etwa 20 % reduziert werden. Die duale Kombinationstherapie geht jedoch mit einem ungünstigen Nebenwirkungsprofil einher. Unter Interferon werden häufig Grippe-ähnliche Symptome sowie Veränderungen des Blutbildes beobachtet. Auch psychiatrische Krankheitsbilder gehen mit einer Interferon-basierten Therapie einher. Ribavirin hingegen wirkt teratogen und führt zu einer Dosis-abhängigen reversiblen hämolytischen Anämie. Etwa 4 bis 8 Wochen nach Therapieende normalisiert sich das Blutbild wieder auf das Ausgangsniveau vor Therapie (Poynard et al., 1998). Bei Auftreten von Nebenwirkungen ist in bis zu 40 % der Patienten eine Anpassung der Dosierung notwendig (Manns et al., 2001), in 10-14 % der Fälle sogar eine vorzeitige Beendigung der Therapie. Der häufigste Grund hierfür sind psychiatrische Krankheitsbilder, insbesondere die Depression (Manns et al., 2001; Fried et al., 2002).

## 2.9.2 Direkt antiviral aktive Agentien (DAA)

Spezifische Inhibitoren des Hepatitis C Virus interferieren gezielt mit Enzymen des Virus oder zellulären Elementen, die für die Replikation des Hepatitis C Virus notwendig sind. Sie werden in ihrer Gesamtheit als DAA (direkt antivirale Agentien) bezeichnet. Angriffspunkte sind insbesondere als virale Proteine die NS3/4A Serinprotease, das NS5A Phosphoprotein und die NS5B RNA-Polymerase. Als wirtseigene Faktoren haben sich Cyclophilin A und miRNA122 als bedeutend für die Replikation des Virus herausgestellt. Im Folgenden werden Substanzklassen aufgeführt, die in der Therapie der chronischen Hepatitis C von besonderer Bedeutung sind. Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Betrachtung der NS3/4A Inhibitoren.

### 2.9.2.1 NS3/4A Proteaseinhibitoren

Proteaseinhibitoren werden aufgrund ihrer chemischen Struktur in lineare und makrozyklische Inhibitoren eingeteilt. Sie zeichnen sich im Allgemeinen durch eine gute antivirale Wirksamkeit aus, haben jedoch eine geringe genetische Barriere. Bereits die Mutation einer Aminosäure innerhalb der Sequenz der NS3 Protease kann zu Änderungen der Konformation führen, welche die Wirksamkeit des Proteaseinhibitors herabsetzen. Mit Ciluprevir (BILN 2061) wurde der erste Proteaseinhibitor in klinischen Studien erprobt. Bereits nach zwei Tagen konnte bei Patienten mit HCV-Genotyp 1 (200 mg BILN 2061 zweimal täglich) ein Abfall der Viruslast um 2-3  $\log_{10}$  Stufen bei allen Patienten beobachtet und somit eine antivirale Wirksamkeit *in vivo* bewiesen werden (Lamarre et al., 2003). Aufgrund einer Kardiotoxizität im Tiermodell wurde die weitere Entwicklung von Ciluprevir jedoch eingestellt (Reiser et al., 2005). Mit Telaprevir und Boceprevir wurden zwei lineare Proteaseinhibitoren der ersten Generation als erste direkt antiviral wirkende Substanzen in Kombination mit pegIFN/Ribavirin im Jahr 2011 von der European Medicines Agency (EMA) zur Therapie von Patienten mit chronischer Hepatitis C Genotyp 1 zugelassen. In klinischen Phase III Studien (SPRINT-2 und RESPOND-2 für Boceprevir sowie ADVANCE, ILLUMINATE und REALIZE für Telaprevir) konnten sie zusammen mit pegIFN/Ribavirin in Form einer Triple-Therapie gegenüber der bisherigen Standardtherapie sowohl bei behandlungsnaiven als auch vorbehandelten Patienten mit HCV-Genotyp 1 eine Überlegenheit nachweisen. Bei einer bisherigen Heilungsrate von unter 50 % war unter einer Kombinationstherapie mit Boceprevir ein weiterer Anstieg des dauerhaften virologischen Ansprechens um etwa 20 % zu erreichen (Bacon et al., 2011; Poordad et al., 2011). Ein Therapieerfolg ist jedoch weiterhin von pegIFN/Ribavirin abhängig, da eine Monotherapie mit einem Proteaseinhibitor nach initial raschem Abfall der HCV-RNA oftmals mit der Selektion resistenter Varianten verbunden ist, was zu einem Wiederanstieg der Viruslast unter Therapie führt (Sarrazin et al., 2007a). Grundsätzlich unterscheidet sich das Resistenzspektrum zwischen linearen und makrozyklischen Proteaseinhibitoren erheblich. Tabelle 2.3 auf Seite 45 gibt eine Übersicht über wichtige Vertreter aus beiden Gruppen. Ein Vergleich zwischen Telaprevir und Boceprevir zeigt, dass sich ihr Resistenzspektrum in weiten Bereichen überschneidet. Insbesondere Mutationen der Aminosäure Arginin an Position 155 vermitteln eine Kreuzresistenz gegen nahezu alle hier

aufgeführten linearen und makrozyklischen Proteaseinhibitoren der ersten und zweiten Generation. Relevante Mutationen der Aminosäuren Q80 und D168 sind bisher nur für Vertreter der makrozyklischen Inhibitoren beschrieben worden. Vorzüge der neueren Proteaseinhibitoren finden sich insbesondere in einem relativ breiten genotypischen Wirkspektrum (z.B. Simeprevir, Grazoprevir, Paritaprevir, Glecaprevir, Voxilaprevir), einem günstigeren Resistenzspektrum (Voxilaprevir, Glecaprevir) und vereinfachtem Dosierschema (z.B. einmal tägliche Einnahme von Simeprevir) (Sarrazin et al., 2018).

### **2.9.2.2 NS5A Inhibitoren**

Eine gute antivirale Aktivität bei minimalen Wirkstoffkonzentrationen und minimalen Medikamenten-Interaktionen, jedoch eine geringere genetische Barriere, kennzeichnen die NS5A-Inhibitoren. Bisher sind als NS5A-Inhibitoren Ombitasvir (ABT-267), Ledipasvir (GS-5885), Daclatasvir (BMS-790052), Elbasvir (MK-8742), Velpatasvir (GS-5816) und Pibrentasvir (ABT 530) als Bestandteil von Kombinationstherapien zugelassen (Sarrazin et al., 2018).

### **2.9.2.3 Nukleos(t)idische und nicht-nukleosidische NS5B Inhibitoren**

Inhibitoren der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (NS5B) werden in zwei Kategorien eingeteilt. Die nukleos(t)idischen Inhibitoren (NI) bewirken als Substrat-Analoga der RNA-Polymerase einen Abbruch der RNA-Replikation und üben somit ihre Funktion am aktiven Zentrum des Enzyms aus, welches unter den verschiedenen Genotypen hochkonserviert ist. Sie sind daher durch eine breite genotypische Wirksamkeit sowie hohe genetische Barriere gekennzeichnet. Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist der nukleotidische Inhibitor Sofosbuvir (GS-7977), der in der Mono- und Kombinationstherapie zugelassen ist (Sarrazin et al., 2018). Nicht-nukleosidische Polymerase-Inhibitoren (NNI) entfalten ihre Wirkung an mindestens vier allosterischen Zentren des Enzyms und bewirken über ihre Bindung eine Konformationsänderung der Polymerase, welche in der Folge eine herabgesetzte Wirkung entfaltet. Wie Inhibitoren der NS3/4A Protease haben auch sie eine geringe genetische Barriere sowie unterschiedliche Wirksamkeit innerhalb der verschiedenen Genotypen. Als einziger bisher zugelassener nicht-nukleosidischer NS5B-Polymerase Inhibitor soll Dasabuvir hier erwähnt werden (Sarrazin et al., 2018).

### **2.9.2.4 Zelleigene Inhibitoren**

Die zelleigenen Cyclophiline haben eine wichtige Bedeutung in der Replikation des Hepatitis C Virus. Die Weiterentwicklung eines vielversprechenden Inhibitors, Alisporivir (Debio-025), ist aufgrund vereinzelter schwerer Verläufe von Pankreatitiden derzeit eingestellt. Wie Alisporivir so hat auch Miravirsen, welche als antisense-RNA die Funktion der Leber-spezifischen miRNA122 inhibiert, ein breites genotypisches Wirkspektrum.

## 2.9.3 Therapie mit den Proteaseinhibitoren der ersten Generation

Im Folgenden werden die Therapiealgorithmen der Proteaseinhibitoren der ersten Generation, Boceprevir und Telaprevir, vorgestellt. Da ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Anwendung von Boceprevir beruht, soll dieser zunächst näher charakterisiert werden.

### 2.9.3.1 Der Proteaseinhibitor Boceprevir (SCH 503034)

Boceprevir (SCH 503034) ist ein oral verfügbarer linearer peptidomimetischer NS3 Protease Inhibitor der ersten Generation, der von der Firma Schering-Plough (Kenilworth, N.J. USA) synthetisiert wurde. Auf eine rasche nicht-kovalente Bindung von Boceprevir mit dem aktiven Zentrum folgt eine langsame Formation einer kovalenten und reversiblen Bindung. Diese erfolgt über das  $\alpha$ -Ketoamid des Proteaseinhibitors mit der Aminosäure Serin des aktiven Zentrums (S139) der NS3/4A Serinprotease, welches sich selbst in einer flachen Substratbindungstasche innerhalb des Enzyms wiederfindet (Malcolm et al., 2006).

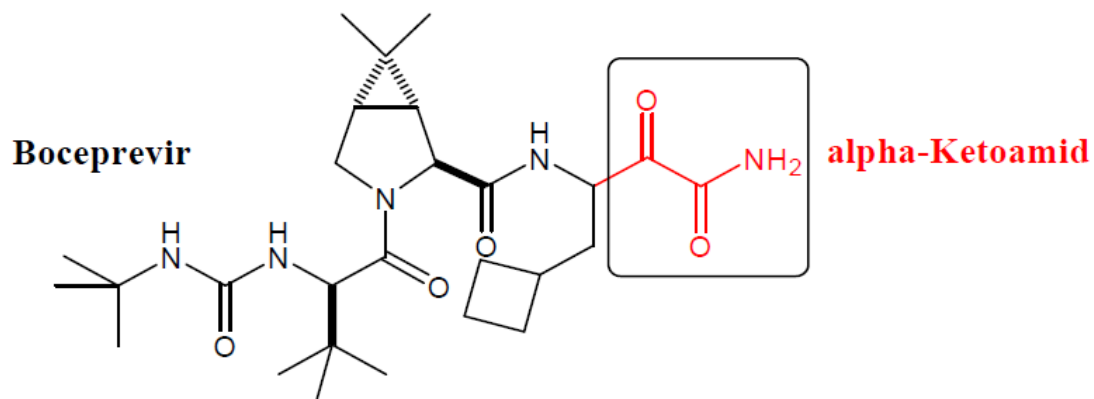


Abb.2.4: Strukturformel von Boceprevir (SCH 503034)

Das  $\alpha$ -Ketoamid von Boceprevir ist in Roter Farbe hervorgehoben und umrandet. Über diese Seitenkette erfolgt die kovalente Bindung mit Ser-139 der NS3 Protease.

Die kompetitive Bindung des Proteaseinhibitors am aktiven Zentrum führt zu einer herabgesetzten Prozessierung des Polyproteins und somit zu einer verminderten Replikation der Virus-RNA. So konnten Untersuchungen am Replikon-Modell bei ausbleibender Toxizität einen Abfall der RNA-Konzentration in der Größenordnung von 1,5 bis 2  $\log_{10}$  Stufen belegen, eine längere Exposition der Replikon-Zellen gegenüber Boceprevir von zwei Wochen sogar bis zu 4  $\log_{10}$  Stufen (Malcolm et al., 2006). Weiterführende phänotypische Untersuchungen in enzymatischen Assays konnten die Mutationen T54A, A156S und V170A innerhalb der Sequenz der NS3 Protease als Resistenzen mit niedrigem (low-level resistance) bis mittlerem Resistenzniveau (medium-level resistance) identifizieren. Die höchste Resistenz (high-level resistance) in Form von A156V/T wurde unter höherer Dosierung von Boceprevir selektioniert. Die Sensitivität resistenter Replikon-Zellen

gegenüber Interferon war jedoch unverändert, was in Kombination mit Boceprevir einen stärker supprimierenden Effekt der RNA zur Folge hatte (Tong et al., 2006). Die günstigen antiviralen Eigenschaften *in vitro* erwiesen Boceprevir folglich als geeigneten Kandidaten für die Aufnahme in weiterführende klinische Studien. In einer klinischen Phase Ib Studie wurde die antivirale Wirkung von Boceprevir bestätigt. Als Monotherapie führte Boceprevir zu einem mittleren Abfall der Virus-RNA um  $1,6 \log_{10}$  Stufen, in der Kombination mit pegIFN hingegen zu einer maximalen Reduzierung um durchschnittlich  $2,88 \log_{10}$  Stufen (Sarrazin et al., 2007b).

### 2.9.3.2 Therapiealgorithmen mit den Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir

Die Therapie für Patienten mit chronischer Hepatitis C und Genotyp 1, die bisher nicht therapiert wurden oder als Non-Responder (Relapse, partielle Response oder Null-Response) aus einer vorangegangenen dualen Therapie mit Interferon- $\alpha$  und Ribavirin herausgegangen sind, sieht unter Einsatz des Proteaseinhibitors Boceprevir (Victrelis<sup>®</sup>) oder Telaprevir (Incivo<sup>®</sup>) eine Dreifach-Kombinationstherapie vor. Dabei kann die bisherige duale Standardtherapie bestehend aus PEG-Interferon- $\alpha$ 2a (180  $\mu$ g/Woche) und Ribavirin (1000 - 1200 mg/Tag) bzw. PEG-Interferon- $\alpha$ 2b (1,5  $\mu$ g/kg/Woche) und Ribavirin (800 – 1400 mg/Tag) mit den Proteaseinhibitoren Telaprevir (750 mg dreimal täglich) oder Boceprevir (800 mg dreimal täglich) kombiniert werden. Die Behandlungs-Algorithmen der Protease-Inhibitor basierten Triple-Therapien divergieren basierend auf den Ergebnissen klinischer Studien. Das Therapie-Schema ist dabei sowohl von der Auswahl des Protease-Inhibitors selbst, vom Ansprechen auf eine vorangegangene duale Kombinationstherapie als auch von der Viruskinetik unter der Dreifach-Therapie abhängig. Für das Verständnis der Algorithmen sind die wichtigsten Grundbegriffe zur viralen Kinetik in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tab.2.1: Grundbegriffe der Viruskinetik unter antiviraler Therapie nach Chang (Chang et al., 2012) und Sarrazin (Sarrazin et al., 2012)

Begriff	Bedeutung
SVR (sustained virologic response)	Fehlende Nachweisbarkeit der HCV-RNA 12 Wochen nach Therapieende
RVR (rapid virologic response)	Fehlende Nachweisbarkeit der HCV-RNA zu Therapiewoche 4
EVR (early virologic response)	Fehlende Nachweisbarkeit der HCV-RNA zu Therapiewoche 12
Null-Response	Abfall der HCV-RNA $< 2\log_{10}$ Stufen bis Therapiewoche 12
Non-Response	HCV-RNA während der gesamten Therapie nachweisbar
Partial Response	Abfall der HCV-RNA um $\geq 2\log_{10}$ Stufen zu Woche 12, jedoch nachweisbar zu Woche 24
Breakthrough	HCV-RNA negativ im Therapieverlauf mit Wiederanstieg unter Therapie ( $> 100$ IU/ml bzw. $> 1\log_{10}$ )
Relapse	HCV-RNA negativ zum Therapieende mit Rückfall im Verlauf

Die Therapie erfolgt über einen Zeitraum von 24 – 48 Wochen und beginnt im Gegensatz zu Telaprevir bei Boceprevir mit einer vierwöchigen Einleitungsphase (lead-in) aus PEG-Interferon und Ribavirin. Während Boceprevir über mindestens 24 Wochen verabreicht werden muss, erfolgt die Therapie mit Telaprevir über lediglich 12 Wochen. Bis zu 2/3 aller behandlungsnaiven Patienten mit Genotyp 1 können bei günstigem therapeutischem Verlauf eine kürzere Therapie erhalten, ohne eine Minderung der Heilungsraten in Kauf nehmen zu müssen. Patienten unter einer Therapie mit Telaprevir qualifizieren sich für eine Therapie über 24 Wochen bei negativem Nachweis von HCV-RNA zu Woche 4 und 12 (eRVR). Ein fehlender Nachweis von RNA zu Woche 8 und 24 (eRVR) auf der Grundlage einer Boceprevir basierten Triple-Therapie ermöglicht eine Verkürzung der Therapie auf 28 Wochen. Unvorbehandelte Patienten mit Genotyp 1 können unter günstigen Vorbedingungen (Erreichen eines RVR und Ausgangsviruslast  $< 800.000$  IU/ml) während der „lead-in Phase“ bei gleichen Heilungschancen alternativ mit einer dualen Therapie unter Verzicht auf einen Protease-Inhibitor über 24 Wochen (Sarrazin et al., 2012) behandelt werden.

Die Wahrscheinlichkeit für ein anhaltendes Therapieansprechen auf die Triple-Therapie bei vorbehandelten Patienten ist abhängig vom Ansprechen auf die Kombination aus PEG-Interferon und Ribavirin. So haben Relapser höhere Heilungschancen als Null-Responder (Sarrazin et al., 2012). Die Therapiealgorithmen mit Telaprevir bzw. Boceprevir sind in den folgenden beiden Abbildungen 2.5 und 2.6 graphisch dargestellt.

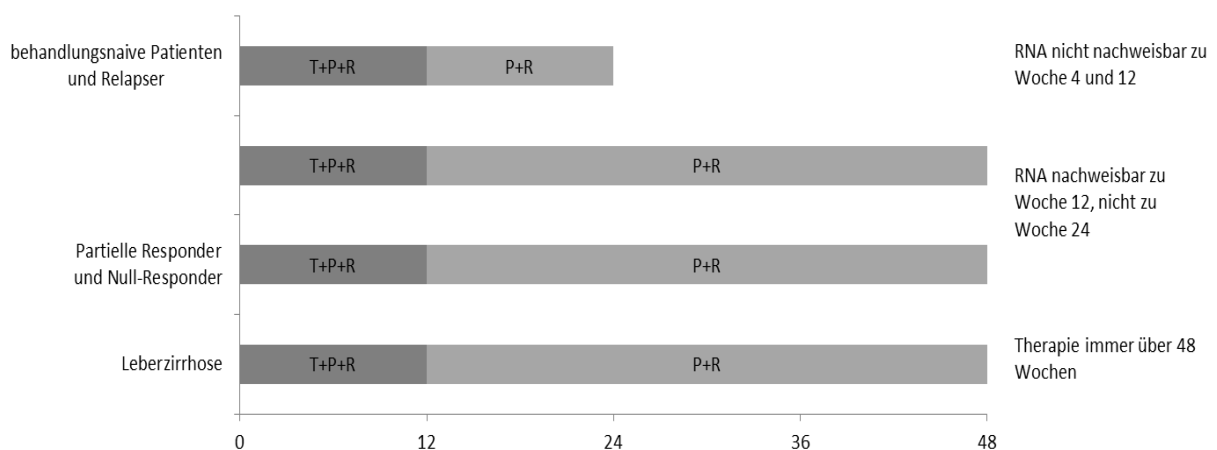


Abb.2.5: Therapiealgorithmus für Telaprevir zur Therapie der chronischen Hepatitis C Genotyp 1

Aufgeführt ist der Therapiealgorithmus für den Proteaseinhibitor Telaprevir entsprechend der Patientengruppen sowie dem Ansprechen auf die Therapie. P = PEG-Interferon, R = Ribavirin, T = Telaprevir. Abbildung nach (Barritt et al., 2012; Sarrazin et al., 2012)



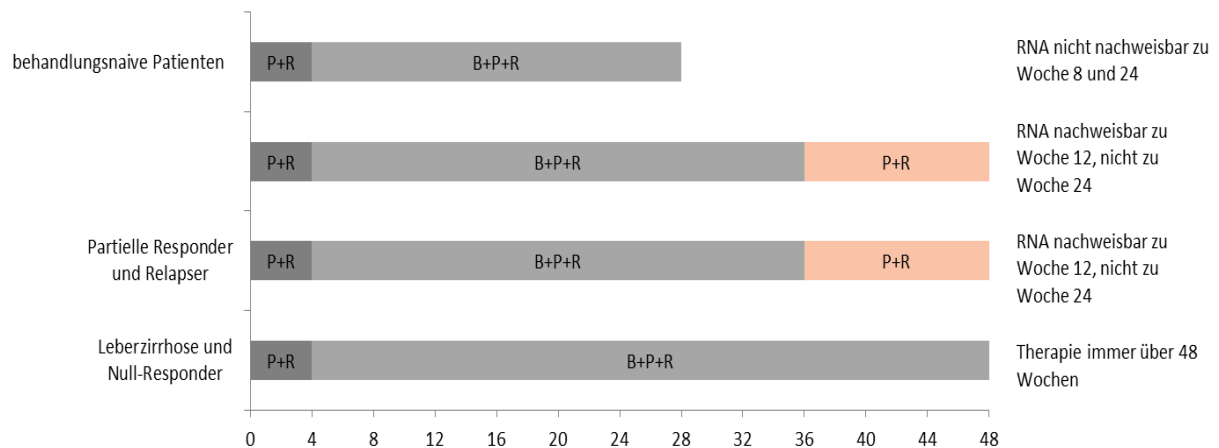


Abb.2. 6: Therapiealgorithmus für Boceprevir zur Therapie der chronischen Hepatitis C Genotyp 1

Aufgeführt ist der Therapiealgorithmus für den Proteaseinhibitor Boceprevir entsprechend der Patientengruppen sowie dem Ansprechen auf die Therapie. P = PEG-Interferon, R = Ribavirin, B = Boceprevir. Abbildung nach (Barritt et al., 2012; Sarrazin et al., 2012)

Bei geringer Wahrscheinlichkeit für ein anhaltendes virologisches Ansprechen sehen die Algorithmen mit Telaprevir einen Therapieabbruch vor, wenn nach vier bzw. 12 Wochen die Viruslast  $> 1000$  IU/ml beträgt. In der Kombinationstherapie mit Boceprevir wird bei einer RNA-Konzentration  $\geq 100$  IU/ml nach 12 Wochen (Woche 8 der Triple-Therapie) bzw. nachweisbarer RNA nach 24 Wochen (Woche 20 der Triple-Therapie) ein vorzeitiges Absetzen der Therapie empfohlen. Generell ist bei einem positiven Virusnachweis nach 24 Wochen die Therapie vorzeitig zu beenden (Barritt et al., 2012). Bei fehlendem virologischem Ansprechen sollte das frühzeitige Absetzen des Protease-Inhibitors bzw. die Beendigung der Therapie entsprechend den Stopregeln erwogen werden, um dem erhöhtem Risiko viraler Resistenzentwicklung vorzubeugen. Durch den therapeutischen Einsatz von Proteaseinhibitoren in der Kombinationstherapie konnten die Heilungsraten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C und Genotyp 1 auf mehr als 70 % erhöht werden. Ein vermindertes Ansprechen auf Interferon mindert die Wahrscheinlichkeit für ein dauerhaftes virologisches Ansprechen erheblich. Auch Ribavirin hat sich in der Therapie trotz fehlender signifikanter Wirkung auf die Viruslast in der Monotherapie als günstiges Medikament erwiesen, indem es die Wahrscheinlichkeit sowohl für einen Breakthrough mit Resistenzentwicklung unter Therapie als auch für einen Relapse nach Therapie reduziert und somit die Heilungsraten signifikant erhöht (McHutchison et al., 1998; Hezode et al., 2009). Ein Therapieversagen gegenüber Interferon und Ribavirin ist mit einer Selektion von resistenten Virusvarianten unter der Einwirkung der Proteaseinhibitoren verbunden (Sarrazin et al., 2018). Gegenwärtig ist die Kombinationstherapie mit Boceprevir bzw. Telaprevir aufgrund neuer Therapiemöglichkeiten mit höheren Heilungschancen nicht mehr als Standardtherapie verfügbar.

### 2.9.4 Neuer Therapiestandard im Wandel der Zeit

Kombinationen verschiedener direkt antiviral wirkender Medikamente mit bzw. ohne Anwendung der konventionellen Therapie (PEG-Interferon, Ribavirin) haben sich in klinischen Phase II und III Studien als überlegen erwiesen und die bisherige interferonbasierte Triple-Therapie mit Boceprevir bzw. Telaprevir als Standardtherapie der Genotyp 1 Infektion abgelöst. Die Leitlinien empfehlen derzeit unterschiedliche Therapie-Regime in Abhängigkeit vom vorliegenden Genotyp bzw. Subtyp, dem Vortherapiestatus, dem Ansprechen auf eine vorangegangene antivirale Therapie, dem Ausmaß an fibrotischen bzw. zirrhotischen Veränderungen der Leber sowie potentiell zu erwartenden Medikamenteninteraktionen (European Association for the Study of the Liver. Electronic address et al., 2018; Sarrazin et al., 2018). Eine Übersicht über die derzeit für die Therapie der chronischen Hepatitis C zugelassenen Medikamente ist in Tab. 2.2 auf S. 43 dargestellt. Alle Therapiekombinationen verzichten auf Interferon alfa und zeichnen sich durch ein günstigeres Nebenwirkungsprofil und bessere Verträglichkeit aus. Zudem ist es mit den neuen Kombinationstherapien möglich, höhere Heilungsraten bei kürzerer Therapiedauer zu erzielen. Exemplarisch soll hier die Kombination aus dem NS5A Inhibitor Ledipasvir und NS5B Inhibitors Sofosbuvir mit bzw. ohne Ribavirin über eine Therapiedauer von 12 bzw. 24 Wochen erwähnt werden, wonach in klinischen Phase III Studien in der Behandlung der Genotyp 1 Infektion bisher unbehandelter Patienten SVR Raten zwischen 97 und 99 % erzielt werden konnten (Afdhal et al., 2014). Für therapienaive Patienten ohne Leberzirrhose und geringer Ausgangsviruslast (< 6.000.000 IU/ml) bzw. weibliche Patienten ohne Leberzirrhose war sogar eine Verkürzung der Therapiedauer auf 8 Wochen möglich, ohne die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolges signifikant zu reduzieren (Kowdley et al., 2014).

Bereits im Januar 2016 wurde von der FDA die Kombinationstherapie aus dem NS3/4A Protease Inhibitor Grazoprevir und dem NS5A Inhibitor Elbasvir zur Therapie von Hepatitis C Patienten mit Genotyp 1 bzw. 4 zugelassen. Die Kombination zeichnet sich durch eine besonders gute Wirksamkeit gegenüber schwer zu therapierende Gruppen aus (u.a. Patienten mit Leberzirrhose, Null-Responder gegenüber einer vorangegangenen Therapie aus PEG-Interferon und Ribavirin). Die europäische Zulassung ist erfolgt. Jüngste Ergebnisse weiterer Phase II/III Studien haben die pangenotypisch wirksame Kombination aus Sofosbuvir/Velpatasvir ± Voxilaprevir als erfolgversprechende Therapie bestätigt. Hohe SVR12 Raten bis 100 % auch in den schwer zu therapierenden Gruppen (u.a. Genotyp 3, Versagen auf eine vorangegangene DAA-Therapie, Leberzirrhose) konnten bestätigt werden. Zulassung ist in 2016 erfolgt. In der jüngsten Vergangenheit wurde die pangenotypisch wirksame Kombinationstherapie aus Glecaprevir (ABT-493) und Pibrentasvir (ABT-530) in mehreren Phase II und III Studien mit einer Wirksamkeit von bis zu 100 % auch schwer zu behandelnder Subgruppen (u.a. Patienten mit kompensierter Leberzirrhose, Genotyp 3, Niereninsuffizienz, Dialyse-Pflichtigkeit) bestätigt und im Juli 2017 in Deutschland zugelassen. So konnten in Phase III Studien beispielsweise Patienten mit Genotyp 1 bzw. 3 nach einer Therapie mit Glecaprevir und Pibrentasvir über acht

Wochen ein anhaltendes virologisches Ansprechen 12 Wochen nach Beendigung der Therapie von 99 % bzw. 95 % erreichen (Zeuzem et al., 2018).

Tab. 2.2: *Medikamente mit Zulassung in der Therapie der chronischen Hepatitis C*

<b>Medikamentengruppe</b>	<b>Medikamente</b>
<b>Konventionelle Therapie</b>	PEG-Interferon- $\alpha$ 2a PEG-Interferon- $\alpha$ 2b Ribavirin
<b>NS3/4A Protease Inhibitoren</b>	Boceprevir Telaprevir Simeprevir Paritaprevir Asunaprevir Grazoprevir Glecaprevir Voxilaprevir
<b>NS5A Inhibitoren</b>	Daclatasvir Ledipasvir Ombitasvir Elbasvir Velpatasvir Pibrentasvir
<b>Nicht nukleosidische Polymerase (NS5B) Inhibitoren</b>	Dasabuvir
<b>Nukleos(t)idische Polymerase (NS5B) Inhibitoren</b>	Sofosbuvir

Eine Vielzahl an Patienten, die sich vor dem Jahr 1992 über eine Bluttransfusion oder Verabreichung von Blutprodukten mit Hepatitis C infiziert haben, dürfte möglicherweise erst in naher Zukunft Symptome ihrer Lebererkrankung entwickeln. Eine alternde und multimorbide Gesellschaft als Folge des demographischen Wandels lässt demnach Patienten erwarten, die einer Therapie ihrer Lebererkrankung bedürfen, sei es im Sinne einer Heilung oder der Risikoreduktion möglicher Komplikationen bei zugleich vorliegenden schweren Begleiterkrankungen. Seit jüngster Vergangenheit stehen zunehmend neue Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der chronischen Hepatitis C für verschiedene Patientengruppen zur Verfügung und weitere werden erwartet. Einen limitierenden Faktor für die Wahl einer Therapie bildet beispielsweise die Interaktion der neuen HCV-Medikation mit der Begleitmedikation des Patienten, was die Aussicht auf Heilung dieser Patienten möglicherweise mindert (Sarrazin et al., 2018).

## 2.10 Resistenzentwicklung unter Proteaseinhibitoren

Trotz der höheren Heilungsraten unter einer Triple-Therapie mit einem Proteaseinhibitor bildet das Ansprechen auf Interferon und Ribavirin die Grundlage einer erfolgreichen Therapie (Kwo et al., 2010). Ein vermindertes Ansprechen auf Interferon und Ribavirin erhöht die Wahrscheinlichkeit der Selektion präexistenter resistenter Virusvarianten, die unter dem Selektionsdruck des Proteaseinhibitors einen Replikationsvorteil gegenüber dem Wildtyp aufweisen und unter Therapie die dominierende Viruspopulation ausbilden können. Dies begünstigt ein Therapieversagen (Sarrazin et al., 2007a). Verschiedene Faktoren konnten in Studien identifiziert werden, welche die Wahrscheinlichkeit für ein dauerhaftes Therapieansprechen auf die Kombinationstherapie aus pegIFN/Ribavirin mindern. Hierzu werden die Genotypen 1 und 4 gerechnet sowie eine hohe Viruslast vor Einleitung einer Therapie ( $> 600.000-800.000$  IU/ml), eine fortgeschrittene Leberfibrose bzw. Zirrhose, begleitende Infektionen mit Hepatitis B bzw. HIV, ethnische Zugehörigkeit, ungünstiger *IL28B*-Genotyp (CT/TT), Alter  $> 40$  Jahre, männliches Geschlecht sowie Insulinresistenz (Kau et al., 2008). Bei einem täglichen Umsatz von etwa  $10^{12}$  Virionen (Neumann et al., 1998) sowie dem fehlenden „proof-reading“ der RNA-Polymerase findet sich bereits in  $< 1\%$  behandlungsnaiver Patienten eine präexistente dominante resistente Subpopulation innerhalb der Quasispezies (Kuntzen et al., 2008), dabei etwas häufiger bei Patienten mit Genotyp 1a als Genotyp 1b. Während beim Genotyp 1b zwei Nukleotidsubstitutionen notwendig sind, um als Variante mit der zentralen Mutation R155K Resistenz gegenüber einem Proteaseinhibitor zu vermitteln, genügt beim Genotyp 1a bereits der Austausch eines Nukleotids (Lange et al., 2013). Diese höhere genetische Barriere bei Genotyp 1b-Patienten begünstigt auch ihr besseres Ansprechen auf eine Therapie mit Proteaseinhibitoren. Die Notwendigkeit einer Substitution mehrerer Aminosäuren zur Ausbildung einer vollständigen Resistenz spiegelt eine höhere genetische Barriere wieder. Ein weiterer entscheidender Faktor für virale Resistenzentwicklung ist die Fitness dieser Varianten, also ihre Fähigkeit zur Replikation bzw. Bildung infektiöser Virionen. *In vitro* und *in vivo* wurde für sie eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte replikative Fitness nachgewiesen, wobei kompensatorische Mutationen unter fortgesetzter Therapie einen günstigen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit therapieresistenter Varianten nehmen können (Sarrazin et al., 2007a). Eine hohe antivirale Potenz des Proteaseinhibitors sowie Compliance des Patienten in der Einnahme der Medikation zur Aufrechterhaltung eines Wirkspiegels im Plasma mindern die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung unter antiviraler Therapie (Halfon et al., 2011). In der Therapie der HIV-Infektion wird einem Aufkommen von viralen Resistenzen durch Kombination mehrerer antiviraler Substanzen mit unterschiedlichen Angriffspunkten und somit unterschiedlichem Resistenzprofil erfolgreich begegnet, was auf die Therapie der chronischen Hepatitis C übertragen derzeit in zahlreichen klinischen Studien angewandt wird. Tabelle 2.3 auf S. 45 stellt eine Zusammenfassung von Resistenzprofilen wichtiger Protease Inhibitoren nach Lange und Sarrazin dar (Lange et al., 2011; Sarrazin et al., 2012; Sarrazin, 2016).

Tab.2.3: Resistenzprofile wichtiger Protease Inhibitoren

Generation	Typ	Substanz	V36A/C/G/M	Q41R	F43S/L I/V	T54S/A	V55A	Q80R/K	R155K/T/Q	A156F/G/S	V158I	D168A/I/V/ T/H/Y	V170A/T	
1.	Linear	Boceprevir (SCH 503034)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
		Telaprevir (VX-950)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
		Faldaprevir (BI-201335)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
	Makrozyklisch	Danoprevir (ITMN 191)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
		Vaniprevir (MK-7009)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
		Simeprevir (TM/C435)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
		Asunaprevir (BMS-650032)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
		Paritaprevir (ABT-450)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
		Vedroprevir (GS-9451)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
		Sovaprevir (ACH-1625)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
2.	Makrozyklisch	Grazoprevir (MK-5172)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	

Neben den zugelassenen linearen Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir sind in dieser Tabelle Resistenzprofile weiterer Proteaseinhibitoren aufgeführt, von denen einige für die Therapie der Hepatitis C Zulassung erhalten haben. Mit einem blauen Kästchen werden Mutationen den linearen Proteaseinhibitoren der ersten Generation zugeordnet, mit einem grünen Kästchen makrozyklischen Proteaseinhibitoren der ersten Generation. Resistenzmutationen gegenüber dem makrozyklischen Proteaseinhibitor der zweiten Generation MK-5172 sind braun markiert. Mutationen *in vivo* und *in vitro* nach (Lange et al., 2011; Sarrazin et al., 2012; Sarrazin, 2016)

\*) Mutationen selektiert *in vitro*

## 2.11 Zellkultursysteme für das Hepatitis C Virus

Erstmals wurde im Jahr 1999 durch Volker Lohmann und Kollegen ein Zellkultursystem vorgestellt, welches *in vitro* Untersuchungen der Replikation und Proteinexpression des Hepatitis C Virus ermöglichte. Auf der Grundlage viraler RNA eines mit Hepatitis C Genotyp 1b infizierten Patienten erwies sich ein modifiziertes Konstrukt aus den Sequenzen der nicht strukturellen Proteine nach Transfektion humaner Hepatomazellen (Huh-7 Zellen) als autonom stabil replizierend (Lohmann et al., 1999). Dieses subgenomische Replikon setzt sich aus einem Neomycin Phosphotransferase-Gen (*neo*), welches Resistenz gegenüber dem Antibiotikum G418 vermittelt, sowie der Konsensussequenz für die nicht strukturellen Proteine NS3 – NS5B zusammen. Das Protein NS2, welches lediglich die eigene Abspaltung vom Polyprotein katalysiert, erwies sich wie die Strukturproteine für die Replikation selbst als nicht notwendig und waren somit keine Bestandteile des Replikons. Die flankierenden 5'NTR und 3'NTR sind essentiell für virale Replikation und finden sich somit unverändert an entsprechender Position innerhalb des Replikons. Die interne Ribosomenbindungsstelle (IRES), die sich innerhalb der 5'NTR findet, benötigt für die Ausübung ihrer Funktion die Sequenz der ersten 12 Aminosäuren des Core Proteins, welche entsprechend in 3'-Richtung folgt. Die Translation der nicht strukturellen Proteine NS3 – NS5B wird durch die IRES des Enzephalomyokarditis Virus reguliert. In der folgenden Abbildung 2.7 ist schematisch der Aufbau eines HCV-Replikons dargestellt. Seit der Erstbeschreibung selbst replizierender subgenomischer Hepatitis C Virus RNA basierend auf dem Genotyp 1b durch Lohmann und Kollegen im Jahr 1999 (Lohmann et al., 1999), stehen gegenwärtig subgenomische Replikons für jeden Genotypen des Hepatitis C Virus zur Verfügung. Für den Genotyp 6a sowie Genotyp 5a stehen diese jedoch erst seit der jüngeren Vergangenheit zur Verfügung (Wose Kinge et al., 2014; Yu et al., 2014).

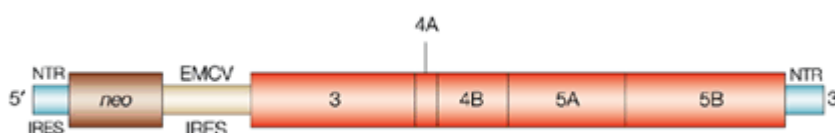


Abb. 2.7: Aufbau eines HCV-Replikons

Am 5'- und 3'- Ende sind in blauer Farbe die NTR's dargestellt. Das Neomycin-Phosphotransferase-Gen (*neo*) ist vor der IRES des Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) gelegen, auf welche wiederum die nicht strukturellen Proteine NS3 bis NS5B folgen. Abbildung entnommen aus (Bartenschlager, 2002).

Eine Steigerung der Replikationsfähigkeit des Replikons konnte für mehrere adaptive Mutationen innerhalb der nicht-strukturellen Proteine belegt werden (Krieger et al., 2001). Eine weitere Entwicklung waren sogenannte infektiöse Pseudopartikel (HCVpp), welche Untersuchungen zur Neutralisierung der Viruspartikel sowie dem Viruseintritt in die Zelle ermöglichten. Die Pseudopartikel werden durch Integration der Glykoproteine E1 und E2 in retrovirales Core-Protein des murinen Leukämievirus gebildet (Bartosch et al., 2003). Hier wurde die Fähigkeit von Retroviren

genutzt, fremde Glykoproteine innerhalb ihres Genoms zu inkorporieren. Im Jahr 2005 war es erstmals gelungen, den Lebenszyklus des Hepatitis C Virus einschließlich der Bildung infektiöser Partikel (HCVcc) auf Grundlage eines Isolates des Genotyps 2a (Isolat JFH-1) eines Patienten mit fulminanter Hepatitis C in Zellkultur zu reproduzieren (Wakita et al., 2005) und somit ein weiteres *in vitro* Modell für die Grundlagenforschung zu etablieren. Auf Grundlage dieses besonders gut replizierenden Isolates stehen heute Zellkultur-Modelle für rekombinante Volllängenkonstrukte zur Verfügung, die sich aus dem Replikasekomplex (NS3 – NS5B) von JFH-1 und einer Genotyp-spezifischen Sequenz von Core – NS2 zusammensetzen.

## 2.12 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Untersuchungen im Zellkulturmodell konnten bereits eine Vielzahl an Mutationen innerhalb der Sequenz der katalytischen Domäne der NS3-Protease nachweisen, welche unter *in vitro* Bedingungen mit einer verminderten Wirksamkeit von Proteaseinhibitoren assoziiert sind. In Sequenzierungsstudien der NS3-Protease unter Therapie mit einem Proteaseinhibitor wird die Komplexität der viralen Quasispezies ersichtlich. Neben bereits bekannten Resistenzmutationen wird unter dem Einfluss eines direkt antiviral wirkenden Medikamentes eine Vielzahl an minoren Varianten selektioniert, welche die Kriterien für Resistenzmutation (Sarrazin et al., 2007a) nicht vollständig erfüllen. Ihre Bedeutung für die Resistenzentwicklung ist nicht ausreichend bekannt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Fragestellungen. Im ersten Abschnitt werden minore Varianten unter dem Einfluss der Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir auf ihre Bedeutung der Resistenzentwicklung geprüft. Da in den Zulassungsstudien der beiden Proteaseinhibitoren in bis zu 77 % der nicht erfolgreich therapierten Patienten keine der bisher bekannten Resistenzen nachzuweisen waren, sind weitere in der Literatur bisher nicht beschriebene Virusvarianten für ein Therapieversagen ursächlich anzunehmen. Für Patienten mit einem Therapieversagen unter Therapie mit einer direkt antiviral wirkenden Medikation gibt es derzeit keine eindeutigen Empfehlungen, mit welcher Kombination an Medikamenten eine erneute Therapie idealerweise durchgeführt werden sollte. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse einer sequentiell verabreichten Therapie mit dem Proteaseinhibitor Boceprevir vorgestellt. Der Schwerpunkt liegt hierbei in der Beantwortung der Frage, welche Auswirkungen die Selektion von resistenten Mutationen unter Ersttherapie auf eine Zweittherapie mit dem gleichen Medikament bzw. gegenüber der gleichen Wirkstoffklasse haben.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Agarose-Gelkammer	Biometra/Life Tech.
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Systec, Linden
Bakterienbrutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Chemikalienwaage	Sartorius, Göttingen
Elektrophorese-Transformator, ST 606	Gibco BRL, Karlsruhe
Gene Pulser <sup>®</sup> II Electroporation System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kühlzentrifuge Micro 22R	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Rotanta TRC	Hettich, Tuttlingen
Mikroskop	Zeiss Axiovert
Mikrowelle	Hettachi, Eschborn
Molecular Imager Gel Doc XR System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
pH-Messgerät	Mettler Toledo
Präzisionswaage TE64	Sartorius, Göttingen
Rotilab <sup>®</sup> -Mini Zentrifuge	Roth, Karlsruhe
Schüttelinkubator	Certomat U, B. Braun, Berlin
Sequenzer 3130XL	Applied Biosystems, Weiterstadt
Spectrophotometer DU 800	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
StepOne <sup>™</sup> Plus Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Sterilarbeitsbank	Heraeus, Hanau



Thermocycler 9700	Appl. Biosystems
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417c	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge sigma 1-13	B. Braun, Melsungen
UV-Lampe FluoLink	Biometra, Göttingen
Variomag <sup>®</sup> Elektronikrührer	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Vortex REAX 2000	Heidolph, Kehlheim
Wasserbad	Heraeus, Hanau
Zellbrutschrank	Thermo Scientific
Zentrifuge, Varifuge 3.0 RS	Heraeus, Hanau

### 3.1.2 Einwegmaterialien

Einwegskalpell	B. Braun, Melsungen
Eppendorf Reaktionsgefäße 1.5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
MultiScreen <sup>®</sup> -HV Filterplatten	Millipore, Ireland
PCR-Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischale (Ø 10cm)	Falcon, Heidelberg
Pipettenspitzen (10 µl, 20µl, 200 µl, 1ml)	Starlab, Ahrensburg
Reaktionsgefäße 0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml	Perkin Elmer, Weiterstadt
Stripetten 5ml, 10ml, 20ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen	Nalge Company, New York, USA
96 Multiply <sup>®</sup> PCR Platte natur	Sarstedt, Nümbrecht
96 Well Multiply <sup>®</sup> PCR Plate	Sarstedt, Nümbrecht

### 3.1.3 Chemikalien

Agar	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Agarose peqGOLD Universal	PeqLab, Erlangen
Antibiotic Antimycotic Solution 1%	Sigma, Taufkirchen
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen

Dimethylpyrocarbonat (DMPC)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen/Roth
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco®/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
dNTP Set 100mM	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethanol (absolut)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem
Fetal Bovine Serum	Sigma
Formaldehyd 37 %	AppliChem, Darmstadt
Formamid	Roth, Karlsruhe
G418 Sulphate	Gibco®/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glutamin 2%	Sigma
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Luria-Broth (Bakterienmedium)	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) 25mM	Roche, Mannheim
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
PCR reaction buffer	Roche, Mannheim
Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
RNase freies Wasser	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Sephadex® G-50 Dextran-Gel	Sigma, Taufkirchen
Tris-Puffer	United States Biochemical, Cleveland, Ohio, USA
2 x RNA Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot

### 3.1.4 Reagenzien

#### 3.1.4.1 Reagenzien-Sets

BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
---	-------------------------------

Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim
QIAamp <sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange <sup>®</sup> II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Assay GAPDH	Applied Biosystems, Darmstadt
TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
TaqMan <sup>®</sup> Fast Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
TOPO <sup>®</sup> XL PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

#### 3.1.4.2 DNA-Längenstandard

λDNA/Eco 130 (StyI) Marker (421-19329 bp)	Fermentas, St. Leon-Rot
---	-------------------------

#### 3.1.4.3 Enzyme

Superscript II (Reverse Transkriptase)	Invitrogen, Karlsruhe
Expand Enzyme Mix (DNA-Polymerase)	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen:	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
- AseI	
- DpnI	
- ScaI	
BSA	Promega GmbH, Mannheim
RNAsin	Promega GmbH, Mannheim
DNase	Promega GmbH, Mannheim
T7 RNA Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
AmpliTaq Gold <sup>®</sup> DNA Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
RNase Out (40u/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Sigma/Lonza
Pwo DNA Polymerase (5u/μl)	Roche, Mannheim

### 3.1.4.4 Oligonukleotide

Random Hexamere

Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.4.5 Primer für PCR zur Amplifikation und Sequenzierung

Tab.3.1: Primer zur Amplifikation und Sequenzierung der NS3-Protease

Primer	Sequenz	Genotyp
NS3-1b-1s	5'-GGCGTGTGGGGACATCATC-3'	1b
NS3-1b-3a	5'-GGTGGAGTACGTGATGGGGC-3'	1b
NS3-1b-4a	5'-CATATACGCTCCAAAGCCCA-3'	1b
NS3-1a-1s	5'-CCGGGAGATACTGCTCGGAC-3'	1a
NS3-1a-2s	5'-CCGATGGAATGGTCTCCAAGG-3'	1a
NS3-1a-1a	5'-GCTCTGGGGCACTGCTG-3'	1a
NS3-1a-2a	5'-GAGAGGAGTTGTCCGTGAACAC-3'	1a
M13forward	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	
M13reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	

### 3.1.4.6 Primer für die Mutagenese-PCR

Tab.3.2: Primer für die Mutagenese-PCR

Primer	Sequenz
sMutA87T	5'-C GTC GGC TGG CAA ACG CCC CCC GGG GC-3'
asMutA87T	5'-GC CCC GGG GGG CGT TTG CCA GCC GAC G-3'
sMutR117H	5'-GAT GTC ATT CCG GTG CAC CGG CGG GGC GAC AG-3'
asMutR117H	5'-CT GTC GCC CCG CCG GTG CAC CGG AAT GAC ATC-3'
sMutV132A	5'-CTC TCC CCC AGG CCC GCC TCC TAC TTG AAG G-3'
asMutV132A	5'-C CTT CAA GTA GGA GGC GGG CCT GGG GGA GAG-3'
sMutS174F	5'-GTA CCC GTC GAG TTT ATG GGA ACC ACT ATG-3'
asMutS174F	5'-CAT AGT GGT TCC CAT AAA CTC GAC GGG TAC-3'

### 3.1.4.7 Primer und Sonde für quantitative real-time RT-PCR

Tab.3.3: Primer und Sonde für quantitative real-time RT-PCR

Primer	Sequenz
HCV-sense	5'-ACGCAGAAAGCGTCTAGCCAT-3'
HCV-antisense	5'-TACTCACCGGTTCCGCAGA-3'
HCV-Sonde	5'-6FAM-TCCTGGAGGCTGCACGACACTCA-TAMRA-3'

### 3.1.4.8 Bakterien

Zur Klonierung wurden chemisch kompetente E.coli Bakterien des Stammes TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe) mit folgendem Genotyp eingesetzt:

F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 araD139  $\Delta$ (araleu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

Weitere eingesetzte Bakterien: XL10-Gold<sup>®</sup> mit folgendem Genotyp:

Tet<sup>R</sup>  $\Delta$ (mcrA) 183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1

lac Hte [F<sup>-</sup> proAB lacI<sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>R</sup>]

### 3.1.4.9 Säugerzellen

Huh-7 Lunet Zellen: humane Hepatoma Zelllinie

#### 3.1.4.10 Vektoren

Als Vektor für die Integration von DNA diente pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Karlsruhe), welcher bereits in linearer Form mit einer Länge von 3519 Nukleotiden vorlag. Somit war kein enzymatischer Einsatz einer Ligase zum Schneiden von DNA notwendig. Die Insertionsstelle für PCR-Produkte trägt einen Überhang an Thymin. Weiterhin finden sich im Vektor spezifische Sequenzen, welche als Bindungsstellen für die Primer M13 Forward sowie M13 Reverse fungieren sowie eine Sequenz, deren Produkt Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin vermittelt. Abbildung 3.1 zeigt den Vektor mit der Insertionsstelle für das PCR-Produkt.

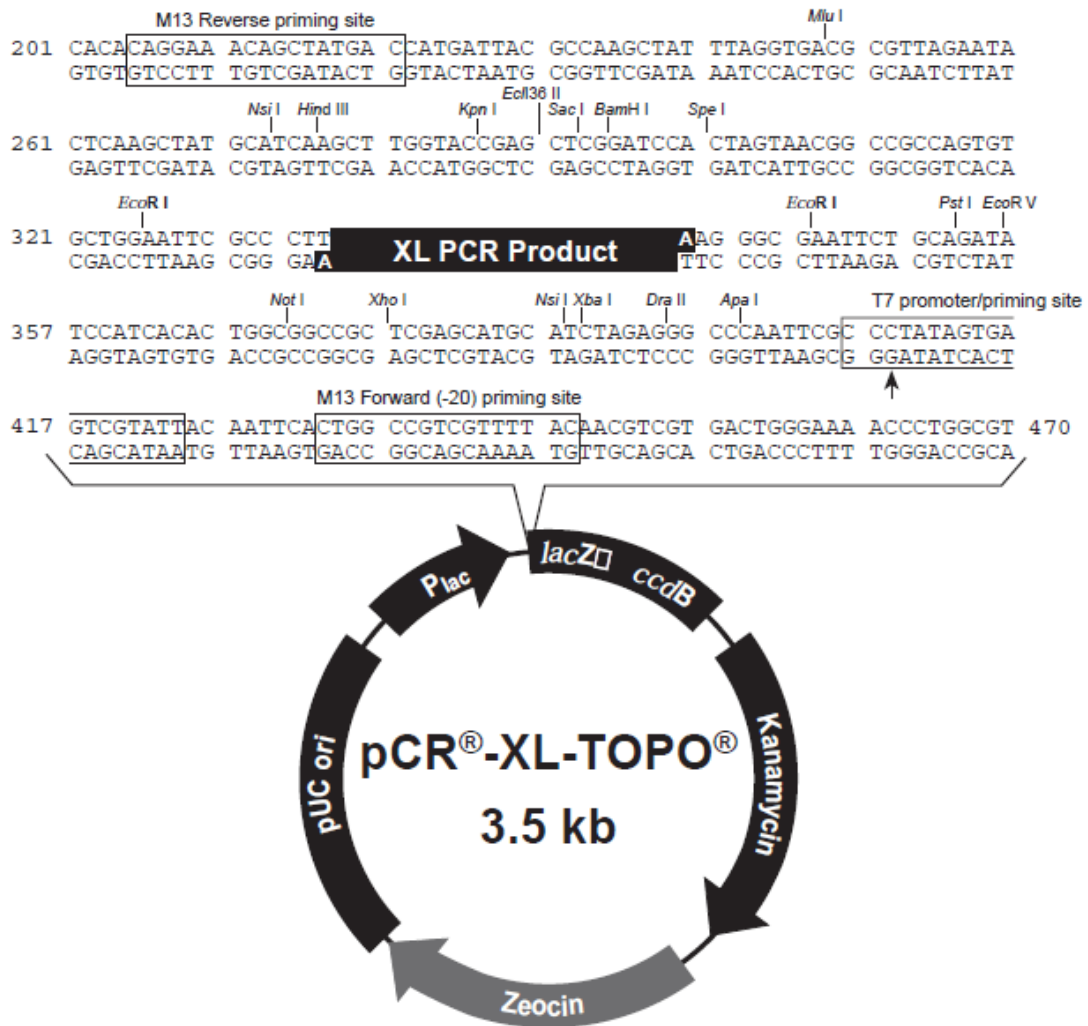


Abb.3.1: Aufbau des pCR<sup>®</sup> - XL - TOPO<sup>®</sup> Cloning Vektors

Weitere Vektoren:

pFK-I389neo/NS3-3'/ET

pFK-I389neo/NS3-3'/Δ5B

Beide Vektoren wurden freundlicherweise bereitgestellt von Dr. Volker Lohmann, Abteilung für molekulare Virologie des Universitätsklinikums Heidelberg.

### 3.1.4.11 Proteaseinhibitoren

SCH 503034 (Boceprevir) wurde von der Schering-Plough Corporation (Kenilworth, NJ, USA) hergestellt. In einer Konzentration von 19 mM wurde es in DMSO gelöst bei einer Temperatur von 4° C gelagert.

VX-950 (Telaprevir) wurde vom European Network of Excellence for Viral Resistance in Hepatitis C (viRgil, Drugpharm, Dr. Johan Neyts) zur Verfügung gestellt. Es wurde in einer Konzentration von 6,6 mM in DMSO gelöst und bei einer Temperatur von 4° C gelagert.

Folgende makrozyklische Proteaseinhibitoren wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet: Der Proteaseinhibitor ITMN-191/R7227 (Danoprevir) wurde von InterMune, Inc., zur Verfügung gestellt (10 mM), TMC435 (Simeprevir) von Janssen Cilag GmbH (12,8 mM) und BI201335 (Faldaprevir) von Boehringer Ingelheim Pharma GmbH und Co. KG (11,5 mM). Alle Proteaseinhibitoren wurden in DMSO gelöst und bei einer Temperatur von 4° C gelagert.

### **3.1.5 Herstellung von Reagenzien**

#### **3.1.5.1 Bakterienmedium**

Als Nährmedium zur Züchtung der Bakterien diente Luria Broth (Sigma, Taufkirchen). Hierfür wurden 25 g dieses Mediums in einem Liter deionisierten Wassers in Lösung gebracht. Nach Autoklavierung (1.3 bar über 20 Minuten) und Abkühlung auf 50 °C erfolgte der Zusatz von 1 ml Kanamycin (50 µg/ml) zum Flüssigmedium. Über selbige Arbeitsschritte erfolgte auch die Herstellung eines Festmediums für die Bakterien, jedoch unter Hinzugabe von Agar (Fluka, Buchs, Schweiz) mit einer Konzentration von 15 g/l zum Flüssigmedium. Nach der Hinzugabe des Antibiotikums nach Autoklavierung konnte es in Petrischalen ausgegossen werden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Aufgrund der Antibiotikaresistenz, welche im Plasmid kodiert vorliegt, war eine Selektion der Bakterien möglich.

#### **3.1.5.2 Zellkulturmedium**

Als Zellkulturmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit einem Zusatz von L-Glutamin sowie Glucose in der Konzentration 4,5 g/L. Weiterhin wurden 10 % Fetal Bovine Serum (Sigma), 2 % Glutamin (Sigma) sowie eine 1 % Antibiotic Antimycotic Solution (100x) (Sigma-Aldrich) hinzugefügt.

#### **3.1.5.3 Selektionsmedium**

Für die Herstellung eines Selektionsmediums wurde dem Zellkulturmedium als Antibiotikum G418 (G418 Sulphate) in der Konzentration 0,25-1 mg/L hinzugefügt.

#### **3.1.5.4 Einfriermedium**

Für die Herstellung eines Einfriermediums wurde zu DMEM 10 % DMSO hinzugefügt.

### 3.1.5.5 TAE-Puffer

Zur Herstellung des Agarose-Gels sowie als Laufpuffer für die Elektrophorese diente der TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer, welcher zunächst in einer Konzentration von 40 % als Ausgangssubstanz angesetzt wurde und in dieser Form als Vorratslösung diente. Hierfür wurden die in Tabelle 3.4 angegebenen Chemikalien mit 800 ml destilliertem Wasser in Lösung gebracht. Anschließend wurde unter Hinzugabe von Essigsäure ein pH von 8.3 titriert und die Lösung auf einen Liter mit Wasser aufgefüllt.

Tab.3.4: Ausgangsstoffe mit Mengenangaben zur Herstellung eines 40 %-igen TAE-Puffers

Substrat	Gewicht (g)
Tris	193,82
NaAcetat	65,62
EDTA	29,78

Verwendet wurde der TAE-Puffer in 1%-iger Form. Dabei wurden 25 ml der Vorratslösung auf einen Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

### 3.1.5.6 Agarose-Gel zur Auftrennung von DNA-Produkten

Für die Elektrophorese wurde 1 %-iges Agarose-Gel verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde 1 g Goldagarose in 100 ml TAE-Puffer (1 %) gelöst und in der Mikrowelle aufgekocht, bis eine klare Flüssigkeit zu sehen war. Nach einer kurzen Phase des Abkühlens erfolgte die Hinzugabe von 1.5 µl Ethidiumbromid (230 µg/ml). Das Gel wurde anschließend in eine vorbereitete Gießkammer gegossen. Nach ca. 30 Minuten war es im Festzustand für die Elektrophorese vorbereitet.

### 3.1.5.7 Agarose-Gel zur Auftrennung von RNA-Produkten

Für die Herstellung des Agarose-Gels war es unabdingbar, mit RNase-freiem Material zu arbeiten. Hierfür wurde zunächst 1g Agarose in 10 ml MOPS-Acetat Puffer (10x) und 75 ml RNase freiem Wasser (DMPC Wasser) gelöst. Nach Aufkochen und Abkühlen der Lösung erfolgte der Zusatz von 10 ml Formaldehyd, um einer Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNA-Moleküle entgegenzuwirken. Das Gel konnte nun in eine vorbereitete Gießkammer gegossen werden.

### 3.1.5.8 Cytomix für Transfektion der Zellkultur

Folgende Chemikalien wurden zusammengefügt und mit KOH auf einen pH von 7.6 titriert: KCl (120 mM), CaCl<sub>2</sub> (0,15 mM) und Kaliumphosphatpuffer (10 mM). Weiterhin zugegeben wurden HEPES (25 mM; pH 7,6), EGTA (2 mM; pH 7,6) sowie MgCl<sub>2</sub> (5 mM). Unmittelbar vor Verwendung der Lösung erfolgte der Zusatz von ATP (2 mM; pH 7,6) und Glutathion (5 mM).



### 3.1.5.9 MOPS-Acetat-Puffer (10x)

Zur Herstellung eines 10x MOPS-Acetat-Puffers wurden 0,2 M MOPS (pH 7), 1 M NaAc sowie 0,5 M EDTA (pH 8) verwendet.

### 3.1.5.10 RNase freies Wasser (DMPC Wasser)

Für das Arbeiten mit RNA war es notwendig, RNase freies Wasser zu verwenden, um einen vorzeitigen Abbau der Nukleinsäuren durch RNAsen zu vermeiden. Zur Herstellung dieser Lösung wurde zu 1 L Aqua dest. 1 ml DMPC hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei Raumtemperatur wurde entsprechender Ansatz autoklaviert.

## 3.1.6 Software

Mutation Surveyor V2.52

SoftGenetics, State College, PA  
16803, USA

MATLAB

MathWorks Inc., Natick, MA, USA

## 3.1.7 Patienten

### 3.1.7.1 Patienten für den „multivariate a priori pattern mining approach“

Sequenzen von insgesamt 37 Patienten, die an chronischer Hepatitis C Genotyp 1 erkrankt waren, wurden für den “multivariate a priori pattern mining approach” dem Max-Planck-Institut in Saarbrücken zur analytischen Bearbeitung zur Verfügung gestellt. Diese Patienten wurden in zwei Phase Ib Studien entweder mit dem Proteaseinhibitor Boceprevir (SCH 503034) als Monotherapie (n=17) oder Telaprevir (VX-950) als Monotherapie (n=20) über jeweils zwei Wochen therapiert. Patienten der Boceprevir-Studie erhielten zweimal oder dreimal täglich 400 mg Boceprevir, in die Auswertung dieser Studie gingen nur Ergebnisse der höheren Dosierung mit Boceprevir ein. Die Therapie mit Telaprevir erfolgte mit dreimal täglich 450 mg, dreimal täglich 750 mg oder zweimal täglich 1250 mg Telaprevir. Beiden Studien lag eine klonale Sequenzanalyse bei Beendigung der zweiwöchigen Monotherapie sowie zwei Wochen nach Therapieende zugrunde. Die klonalen Sequenzen von beiden Studien wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle Probanden gaben Ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie entsprechend den Richtlinien der im Jahr 1975 verfassten Deklaration von Helsinki.

### 3.1.7.2 Patienten, die eine sequentielle Therapie mit Boceprevir und PEG-Interferon erhielten

An einer klinischen Phase Ib-Studie nahmen insgesamt 26 Patienten mit chronischer Hepatitis C Genotyp 1b bzw. 1a Infektion teil, welche aus einer vorausgegangenen Therapie mit pegIFN- $\alpha$ 2b  $\pm$  Ribavirin als Nonresponder (Abfall der Viruslast  $< 2 \log_{10}$ -Stufen nach einer Therapie über mind.

12 Wochen mit pegIFN- $\alpha$ 2b in der Dosierung 1,5  $\mu$ g/kg/Woche) hervorgegangen sind. Neben verschiedenen klinischen und laborchemischen Aspekten waren weitere Einschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie eine Viruslast vor Beginn der Therapie  $\geq 100.000$  IU/ml RNA und der fehlende Nachweis von anti-HIV Antikörpern sowie HBs-Antigen. Diese Studie wurde als multizentrisch (drei medizinische Zentren in Europa), open-label, crossover sowie randomisiert bezogen auf die Therapiearme durchgeführt. Die Probanden erhielten sequentiell den Proteaseinhibitor Boceprevir in einer Dosierung von 200 mg (n=14) bzw. 400 mg (n=12) TID als Monotherapie über eine Woche, pegIFN- $\alpha$ 2b in einer Dosierung von 1,5  $\mu$ g/kg s.c. einmal wöchentlich über einen Zeitraum von zwei Wochen als Monotherapie und eine Kombinationstherapie aus beiden Medikamenten über zwei Wochen. Die Therapiesequenzen erfolgten dabei in unterschiedlicher Reihenfolge – Computer-basiert wurden die Probanden einer von sechs möglichen Therapiesequenzen zugeteilt. Auf jede Behandlungsperiode folgte eine washout-Phase über eine Dauer von zwei Wochen, um Überhangeffekte der Behandlung auf die nachfolgende Therapiesequenz zu verhindern. Auf die letzte Behandlungsperiode folgte eine zweiwöchige Nachbeobachtungsphase (follow-up). Alle Probanden gaben Ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie entsprechend der Deklaration von Helsinki aus dem Jahr 1975. Von den 26 Probanden haben 22 die Studie abgeschlossen. Im Rahmen dieser Dissertation werden die Ergebnisse einer Gruppe aus neun Studienteilnehmern aufgeführt, welche im Folgenden vorgestellt werden. Diese neun Probanden erhielten dabei Boceprevir 400 mg TID. In Tabelle 4.1 (S.89) sind die Studienteilnehmer sowie ihre Zuordnung zu den Therapiesequenzen aufgeführt. Wie oben bereits erwähnt, wurde den Studienteilnehmern in unterschiedlicher Reihenfolge eine Monotherapie über sieben Tage mit Boceprevir 400 mg TID (Mono PI), eine Monotherapie über 14 Tage mit pegIFN- $\alpha$ 2b 1,5  $\mu$ g/kg/Woche (Mono PEG) sowie eine Kombinationstherapie über 14 Tage aus beiden Medikamenten (Combo) zugeführt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Isolierung der HCV-RNA aus Serum

Das Serum der Patienten wurde in Form von Aliquots bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Die einzelnen Arbeitsschritte orientierten sich standardisiert am Protokoll des QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) zur Isolation von RNA aus Serum und wurden bei Raumtemperatur unter einer Sterilbank ausgeführt. Zunächst galt es, das Serum auf Raumtemperatur zu bringen. Anschließend wurden die Hepatitis C Viren durch Zugabe von 560  $\mu$ l Lysis-Puffer AVL (+ Carrier RNA) zu 140  $\mu$ l Serum lysiert. Carrier-RNA soll hierbei die Bindung der HCV-RNA an die Säulchenmembran verbessern und die RNase-Aktivität von möglicherweise nicht durch Puffer AVL inaktivierten RNasen reduzieren. Anschließendes

Vortexen über 15 Sekunden ermöglicht eine homogene Lösung und damit eine effiziente Lyse der HCV-Partikel. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur über 10 Minuten und kurzem Abzentrifugieren wurden 560 µl Ethanol (96-100 %) in die Lösung pipettiert, gefolgt von 15 Sekunden Vortexen und Abzentrifugieren. 630 µl dieser Lösung wurden auf eine QIAamp Säule pipettiert und bei 8000 upm über eine Minute zentrifugiert. Eine Silicagel-Membran absorbiert dabei die Nukleinsäuren. Dieser Arbeitsschritt wurde mit den verbliebenen 630 µl wiederholt, wobei das Filtrat jeweils zu verwerfen war. Zwei Ethanol-Waschpuffer AW1 und AW2 zu je 500 µl wurden nacheinander auf die Säule pipettiert und dabei für eine Minute bei 8000 upm (AW1) bzw. für drei Minuten bei 14000 upm (AW2) zentrifugiert. Ein nochmaliges Zentrifugieren über eine Minute bei 14000 upm soll verbliebenen Puffer AW2 entfernen, welcher enzymatische Reaktionen in der PCR negativ beeinflussen könnte. Mit 60 µl Elutionspuffer AVE wurde nach einer Inkubationszeit von einer Minute die RNA durch Zentrifugieren bei 8000 upm über eine Minute eluiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA bei -20 °C gelagert.

## 3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 3.2.2.1 Prinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine enzymatische Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz, welche in repetitiven Zyklen abläuft. Ein Primer-Paar bindet an homologe Sequenzabschnitte beider DNA-Stränge und flankiert somit die Zielsequenz. Diese neugebildeten doppelsträngigen Abschnitte dienen als Ausgangspunkt für eine hitzestabile DNA-Polymerase zur Synthese des Komplementärstranges. Durch dieses *in vitro* Verfahren ist der Nachweis kleinster Mengen DNA möglich. Drei fundamentale Schritte sind für einen PCR-Zyklus notwendig: Denaturierung der doppelsträngigen DNA, sequenzspezifische Bindung der Oligonukleotid-Primer an die Template-DNA (Annealing) sowie enzymatische Elongation der Primer zur Ausbildung eines Komplementärstranges. Die neu entstandene DNA dient wiederum als Template für den nächsten Zyklus, wonach im Idealfall eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenz gegeben ist. Die Vervielfältigung der DNA wird durch folgende Formel wiedergegeben:

$$Y = X (\text{Effizienzfaktor})^n$$

( X = Anzahl der DNA-Kopien zu Beginn der PCR, Y = Anzahl der DNA-Kopien nach PCR, n = Anzahl der PCR-Zyklen, Effizienzfaktor mit Maximalwert von 1 )

Dieser Idealvorstellung sind in der Realität jedoch Grenzen gesetzt, so dass eine beliebige Zunahme der PCR-Zyklen nicht in einer exponentiellen Vermehrung der Produkte resultiert. Verantwortlich hierfür ist ein Plateau-Effekt während der Spätphase der PCR: Degradation der Nukleotide und Enzyme, kompetitives Verhalten der spezifischen und unspezifischen Amplifikate für Enzymbindung sowie Verbrauch von Substraten, um Beispiele für

die Abnahme exponentieller Amplifikation zu nennen. Die Denaturierung der DNA findet in einem Temperaturbereich um 94-96 °C statt. Die Wahl einer optimalen Annealing-Temperatur ist für die Spezifität der Reaktion verantwortlich, um eine Bindung des Primers an Sequenzen, welche nicht dem Target entsprechen, möglichst zu vermeiden. In dieser Arbeit wurden hierfür Temperaturen von 53 °C bzw. 54 °C gewählt. Im Allgemeinen besteht ein Primer aus etwa 15-25 Nukleotiden mit einem Anteil von Guanin und Cytosin von etwa 50-60 %. Über eine Ausbildung von drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Guanin und Cytosin wird eine stabilere Bindung des Primers an die DNA ermöglicht. Für die Elongation des Komplementärstranges in 5' → 3'-Richtung ist eine hitzestabile DNA-Polymerase notwendig.

Bei der Arbeit mit Nukleinsäuren ist auf Kontaminationen zu achten, da die PCR ein möglicherweise negatives Ergebnis in ein falsch positives Ergebnis konvertieren kann. Im Folgenden werden die Verfahren näher beschrieben, welche, ausgehend von RNA bis zur Amplifikation von DNA, zur Anwendung kamen. Die PCR-Protokolle sind in Form von Tabellen wiedergegeben, wobei sich die Mengenangaben der Substanzen auf die Aufarbeitung einer Serumprobe beziehen. Alle eingesetzten Chemikalien wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht, die Enzyme dabei auf Eis gelagert. Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis.

### 3.2.2.2 Reverse Transkription

Das Genom des Hepatitis C Virus liegt in Form einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität vor. Da viele Polymerasen RNA nicht als Template verwenden können, war es zunächst notwendig, HCV-RNA durch reverse Transkription in cDNA umzuschreiben. In einer RT-PCR erfolgen reverse Transkription und nachfolgende PCR in einem Ansatz. Dieses Verfahren kam zur Anwendung. Alle hierfür verwendeten Chemikalien mit Mengenangaben sind exemplarisch für eine Serumprobe in den beiden folgenden Tabellen wiedergegeben. In einem ersten Reaktionsansatz (RT-1) wurden zur Virus-RNA unspezifische Primer (Random Hexamers) hinzugefügt. Dieser Reaktionsansatz wurde auf Eis vorbereitet und anschließend im Thermocycler über einen Zeitraum von 10 Minuten bei 65 °C inkubiert, woraufhin eine Bindung der Primer an die RNA erfolgen konnte.

Tab.3.5: RT-1 mit eingesetzten Reagenzien und Mengenangaben (exemplarisch für einen Ansatz)

Reagenzien	Mengenangaben (µl)
HCV-RNA	3
Random Hexamers	1
aqua RNase-frei	1
Σ	5

Tab.3.6: RT-2 mit eingesetzten Reagenzien und Mengenangaben (exemplarisch für einen Ansatz)

Reagenzien	Mengenangaben (µl)
aqua RNase-frei	5
10 x PCR-Puffer + MgCl <sub>2</sub>	2
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4
10mM dNTPs	4
RNase Out 40 U/µl	0,5
Superscript II Invitrogen	0,3
Volumen RT-2	15,8
$\Sigma$	20,8

Während dieser Zeit wurde ein zweiter Reaktionsansatz (RT-2) ebenfalls auf Eis vorbe-reitet. Nach Bindung der unspezifischen Primer an die RNA wurde der Ansatz aus RT-2 hinzugefügt. Die reverse Transkription erfolgte im Thermocycler bei 42 °C über einen Zeitraum von 60 Minuten. Danach wurden die Samples bis zur weiteren Verarbeitung umgehend auf Eis gebracht.

### 3.2.2.3 (Semi-) Nested-PCR

Die Nested-PCR ist eine Variante der PCR, welche zwei sequentiell ablaufende Reaktionen beschreibt. In einer ersten PCR, der sog. Outer-PCR, wird ein bestimmter DNA-Abschnitt wie in einer Standard-PCR amplifiziert. In der sog. Inner-PCR bindet dann ein zweites Primer-Paar, die sog. nested primer, an homologe Sequenzabschnitte innerhalb des ersten Reaktionsproduktes, was in der Folge ein kürzeres Amplifikat entstehen lässt. Der Vorteil der Nested-PCR liegt in einer Erhöhung der Sensitivität. Die Wahrscheinlichkeit ist sehr gering, dass unspezifische PCR-Produkte aus einer ersten Reaktion, beispielsweise als Folge von Kontaminationen, zugleich homologe Bindungsstellen für ein zweites Paar von Primern besitzen und in einer zweiten PCR erneut amplifiziert werden. Bei der Semi-Nested PCR wird für die Inner-PCR ein Primer aus dem vorangegangenen Reaktionsansatz beibehalten und lediglich ein neuer Primer eingesetzt. In dieser Arbeit wurden für die Proben, welche dem Genotyp 1a angehören, eine Nested-PCR, für Genotyp 1b eine Semi-Nested PCR durchgeführt. Jedoch ließen sich mit den folgenden Protokollen für PCR I (Outer-PCR) und PCR II (Inner-PCR) nicht alle Serumproben amplifizieren, so dass insgesamt für drei Patienten sequenzspezifische Primer mit Bindungsregionen außerhalb der Standardprimer angefertigt werden mussten. Im Folgenden sind die Protokolle einer Nested-PCR exemplarisch für eine Serumprobe eines Patienten mit Genotyp 1b wiedergegeben.

Tab.3.7: Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der PCR I (Outer-PCR) einer Semi-Nested PCR (exemplarisch für eine Serumprobe Genotyp 1b)

Reagenzien	Mengenangaben (µl)
aqua RNase-frei	27,75
10mM dNTPs	5
NS3-1b-1s	1,5
NS3-1b-3a	1,5
10 x Expand PCR buffer 3	5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5
DMSO	1
Expand Enzyme Mix 5 U/µl	0,75
RT-2 (cDNA)	6
$\Sigma$	50

Tab.3.8: Programm für PCR I (Outer-PCR) einer Semi-Nested PCR

Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	94	120	1
Denaturierung	94	10	35
Annealing	53	30	
Elongation	68	120	
Elongation	68	420	1
Abkühlung	4		

Tab.3.9: Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der PCR II (Inner-PCR) einer Semi-Nested PCR (exemplarisch für eine Serumprobe Genotyp 1b)

Reagenzien	Mengenangaben (µl)
aqua RNase-frei	28,75
10mM dNTPs	5
NS3-1b-1s	1,5
NS3-1b-4a	1,5
10 x Expand PCR buffer 3	5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5
DMSO	1
Expand Enzyme Mix 5 U/µl	0,75
PCR I	5
$\Sigma$	50

Tab.3.10: Programm für PCR II (Inner-PCR) einer Semi-Nested PCR

Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	94	120	1
Denaturierung	94	10	35
Annealing	54	30	
Elongation	68	120	
Elongation	68	420	1
Abkühlung	4		

Nun folgen die Reaktionsansätze sowie die Einstellungen des Thermocyclers für die PCR I und II einer Nested-PCR, beispielhaft für einen Patienten mit Genotyp 1a erneut in tabellarischer Form.

Tab.3.11: Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der PCR I (Outer-PCR) einer Nested PCR (exemplarisch für eine Serumprobe Genotyp 1a)

Reagenzien	Mengenangaben (µl)
aqua RNase-frei	27,75
10mM dNTPs	5
NS3-1a-1s	1,5
NS3-1a-1a	1,5
10 x Expand PCR buffer 3	5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5
DMSO	1
Expand Enzyme Mix 5 U/µl	0,75
RT-2 (cDNA)	6
$\Sigma$	50

Tab.3.12: Programm für PCR I (Outer-PCR) einer Nested PCR

Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	94	180	1
Denaturierung	94	10	35
Annealing	53	30	
Elongation	68	120	
Elongation	68	420	1
Abkühlung	4		

Tab.3.13: Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der PCR II (Inner-PCR) einer Nested PCR (exemplarisch für eine Serumprobe Genotyp 1a)

Reagenzien	Mengenangaben (µl)
aqua RNase-frei	28,75
10mM dNTPs	5
NS3-1a-2s	1,5
NS3-1a-2a	1,5
10 x Expand PCR buffer 3	5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5
DMSO	1
Expand Enzyme Mix 5 U/µl	0,75
PCR I	5
$\Sigma$	50

Tab.3.14: Programm für PCR II (Inner-PCR) einer Nested PCR

Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	94	180	1
Denaturierung	94	10	35
Annealing	54	30	
Elongation	68	120	
Elongation	68	420	1
Abkühlung	4		

### 3.2.3 Elektrophorese

#### 3.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren, in welchem sich Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe, Form und Ladung in einem elektrischen Feld trennen lassen. DNA ist aufgrund ihrer Phosphatreste ein negativ geladenes Polyanion und wandert im Gel in Richtung der positiv geladenen Anode. Eine Trennung aufgrund der Größe von Nukleinsäuren ist möglich, da das Gel Poren ausbildet und somit kleineren Fragmenten eine schnellere Wanderung zur Anode gestattet. Dieses Verfahren wurde sowohl zu analytischen als auch präparativen Zwecken eingesetzt. Durch den Vergleich mit einem geeigneten Marker lässt sich die Größe der DNA-Banden abschätzen. In dieser Arbeit wurde 1% iges Agarose-Gel verwendet. Zur Vorbereitung des Gels wurde 1g Agarose-Pulver in 100 ml 1x-TAE-Puffer gegeben und in einer Mikrowelle erhitzt, bis die Lösung homogen erschien. Nach kurzem Abkühlen wurde dieser 1,5 µl Ethidiumbromid (230µg/ml) hinzugefügt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in DNA-Doppelstränge und ist notwendig, um DNA-Banden bei späterer Betrachtung unter UV-Licht sichtbar zu machen. Das Gel wurde in eine vorbereitete Gießkammer gegossen und konnte nach ca. 30 Minuten im festen Zustand in der mit 1x TAE-Puffer gefüllten Horizontal-Gelapparatur ausgebreitet werden. Zu analytischen Zwecken wurden je 5µl DNA mit 1µl Ladepuffer (Bromphenolblau) vermischt und in die Taschen pipettiert. Als Molekulargewichtsmarker mit bekannten Fragmentgrößen diente der λDNA/Eco 130 (Fermentas, St. Leon-Rot), um die Größe der DNA-Banden beurteilen zu können. In einem Gleichspannungsfeld bei maximal 110 V und einem Gleichstrom von 500 mA wurde die DNA entsprechend Ladung und Größe über einen Zeitraum von ca. 35 Minuten getrennt. Das Ergebnis der Elektrophorese wurde anschließend mit dem Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) unter UV-Licht analysiert und als Fotodokumentation gespeichert.

#### 3.2.3.2 RNA Formaldehyd Elektrophorese

Als einzelsträngiges Molekül neigt RNA über intramolekulare Basenpaarungen zur Ausbildung von Sekundärstrukturen, was die Auftrennung innerhalb des Gels nach Molekülgröße beeinflussen und verfälschen kann. Um einem vorzeitigen Verdau von RNA durch RNase vorzubeugen, ist das Arbeiten mit RNase freiem Material Voraussetzung. Aus diesem Grund unterscheidet sich eine RNA Elektrophorese grundlegend von der in Kapitel 3.2.3.1 beschriebenen Elektrophorese zur Auftrennung von DNA-Molekülen. Zur Herstellung des Agarose-Gels wird auf Kapitel 3.1.5.7 verwiesen. Nun werden 5 µl RNA mit 5 µl Ladepuffer vermischt und 10 Min. bei einer Temperatur von 70 °C erhitzt. Nach Hinzufügen von 0,6 ml EtBr wird die RNA in eine präparierte Tasche des Gels pipettiert. Bei 50 mA wurde die RNA über einen Zeitraum von ca. 2,5 h getrennt. Das Ergebnis der Elektrophorese wurde mit dem Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) unter UV-Licht analysiert und als Fotodokumentation gespeichert.



### 3.2.4 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gel

Die Arbeitsschritte und eingesetzten Chemikalien, die zur Eluierung von DNA aus Agarose-Gel notwendig waren, erfolgten standardisiert nach dem QIAquick Gel Extraction Kit Protocol des QIAquick® Spin Handbook (Qiagen, Hilden, Deutschland). Im Falle eines positiven Ergebnisses im analytischen Gel wurde das wie folgt beschriebene Verfahren angewendet, um DNA für die weitere Verarbeitung, z.B. Direktsequenzierung oder Klonierung, zu gewinnen. Für das präparative Gel wurde 1%iges Agarose-Gel verwendet. Die gesamte DNA einer Probe (45µl) wurde zusammen mit 5µl Ladepuffer in eine Tasche des Agarose-Gels pipettiert. Die physikalischen Parameter zur Trennung von DNA-Fragmenten entsprachen denen des analytischen Gels (siehe Kapitel 3.2.3). Unter UV-Licht wurde anschließend die gesuchte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Zu je 100 mg Gel wurde die dreifache Menge (300µl) an Puffer QG hinzugefügt, für 10 Minuten bei 50 °C in einem Thermoblock zur Lösung der DNA aus dem Gel erhitzt und anschließend in eine Säule pipettiert. Nach einer Zentrifugation bei 13000 upm über eine Minute wurden 750 µl Waschpuffer PE hinzugefügt und zweimal über eine Minute bei selber Drehzahl zentrifugiert. Mit 50µl Puffer EB wurde die DNA eluiert. Der Qualitätssicherung diene eine Elektrophorese mit der aufgereinigten DNA, um sicherzustellen, dass die richtige Bande bzw. keine zusätzlichen unerwünschten Fragmente aus dem Gel geschnitten wurden. Hierfür wurden je Probe 2µl DNA mit 3µl H<sub>2</sub>O sowie 1µl Ladepuffer gemischt und in eine Geltasche pipettiert.

### 3.2.5 Klonierung von DNA

Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte mittels TOPO® XL PCR Cloning Kit (Invitro-gen, Karlsruhe, Deutschland) in den linearen Vektor pCR®-XL-TOPO®. Diese Reaktion besteht aus einer Topoisomerase-vermittelten Ligation eines PCR-Produktes mit Einzel-3'-Deoxyadenosin-Überhang (dA) in einen Vektor mit Einzel-3'-Deoxythymidin-Überhang (dT). Dies ermöglicht PCR-Produkten eine effiziente Ligation in den Vektor. Die Stelle der Insertion befindet sich im Leseraster für das letale Gen *ccdB* von *E.coli*, welches mit dem C-Terminus des *LacZα*-Fragments fusioniert ist. Die Ligation eines langen PCR-Produktes unterbricht die Expression der *LacZα*-*ccdB*-Genfusion und gestattet somit nur positiven Rekombinanten das Überleben nach der Transformation. Der für die Klonierung benötigte A-Überhang am PCR-Produkt wird während der PCR durch die Taq-Polymerase an die DNA angefügt, da dieses Enzym über eine Template-unabhängige terminale Transferase-Aktivität verfügt. Die Effizienz der Klonierung ist abhängig vom 3'-Deoxyadenosin-Überhang, der durch Taq-Polymerase vermittelt wird. Auch andere Deoxynukleotide können durch dieses Enzym an das 3'-Ende eingefügt werden und die Häufigkeit für das Auftreten von dA ist abhängig von der endständigen Base am 3'-Ende der PCR-DNA sowie den benachbarten Basen. Für den Ligationsansatz wurden 4µl der aufgereinigten DNA und 1µl pCR®-XL-TOPO® Vektor mit der Pipette kurz gemischt und bei Raumtemperatur 5 Minuten

inkubiert. Anschließend wurde 1µl 6xTOPO<sup>®</sup> Cloning Stop Solution zugefügt und nochmals kurz gemischt. Unmittelbar nach der Ligation wurden die kompetenten Zellen transformiert.

### 3.2.6 Transformation von kompetenten Zellen

Transformation allgemein beschreibt das Einbringen von DNA in eine lebende Zelle. In dieser Arbeit wurden kompetente E.coli (One Shot<sup>®</sup> Top10) mit rekombinanter DNA in Form eines Plasmids transformiert. Unter normalen Umständen nehmen E.coli nur eine begrenzte Menge DNA auf. Da es unwahrscheinlich ist, dass eine Zelle mehr als ein rekombinantes DNA-Molekül aufnimmt, resultiert hieraus letztlich durch Zellteilung eine Bakterienkolonie, ein sog. Klon, mit identischen DNA-Molekülen. In Abhängigkeit des aufgenommenen PCR-Produktes können die Klone untereinander in der Zielsequenz variieren. Es ist zu berücksichtigen, dass nicht nur rekombinante DNA mit der Zielsequenz transformiert werden kann, sondern auch rekombinante DNA mit in der PCR amplifizierten unspezifischen Sequenzen. Dies wurde in der späteren Sequenzanalyse sichtbar. Um E.coli effizient zu transformieren, wurden sie einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt. Dabei wurde die Bakterienmembran kurzfristig destabilisiert und die Plasmid-DNA in das Bakterium eingeschleust. Mit der Transformation der rekombinanten DNA wird auch Kanamycin-Resistenz auf das Bakterium übertragen. Dies gestattet lediglich transformierten Bakterien ein Wachstum auf selektiven Nährmedien (Kanamycin), da das Genom von E.coli nicht für eine Resistenz gegenüber Kanamycin kodiert. Vor der Transformation wurde die Bakteriensuspension zunächst auf Eis aufgetaut. Es wurden 2µl des Klonierungsproduktes hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C wurden die Zellen für 2 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine 60 minütige Inkubation in Vollmedium (250µl S.O.C.-Medium) bei 37 °C im Thermoblock bei 350 upm. Diese Zeit ist notwendig um den Resistenzmarker zu exprimieren. Ansonsten würde bei der Kultivierung auf Kanamycin-haltigen Agarplatten die Exposition gegenüber dem Antibiotikum zu einem Absterben, bzw. Inhibierung des Wachstums der Bakterien führen. Nach einer Zentrifugation bei 6000 upm über zwei Minuten wurde der Überstand verworfen. Je 150µl der Bakteriensuspension wurde nun auf einer vorgewärmten selektiven Agarplatte ausgestrichen. Der verbliebene Rest wurde auf einer weiteren Platte verteilt. Für ca. 12 Stunden wurden diese in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert, um den Bakterienkolonien ausreichend Zeit zum Wachstum zu geben. In Abhängigkeit vom Wachstum der Kolonien wurden die Agarplatten bis zu 16 Stunden im Brutschrank belassen.

### 3.2.7 Herstellung von Flüssigkulturen für Einzelkolonien

Nachdem auf den Agarplatten ausreichend Bakterienkolonien gezüchtet werden konnten, zielte der nächste Arbeitsschritt darauf ab, einzelne Bakterienklone selektiv in Flüssigmedium zu inkubieren.

Hierfür wurde jeweils eine einzelne Kolonie der Agarplatte mit einer sterilen Pipette gepickt und in 4 ml LB-Medium, welches einen Zusatz von Kanamycin (50 µg/µl) enthielt, in einem Brutschüttler bei 37 °C unter 150 upm für ca. 12 Stunden kultiviert.

### 3.2.8 Isolierung der Plasmid-DNA

Die Arbeitsschritte zur Isolierung der Plasmid-DNA aus E.coli erfolgten mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers. Nach Zentrifugieren der in Flüssigkulturen gezüchteten Einzelkolonien (siehe Kap. 3.2.7) bei 4000 upm über 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und das verbliebene Bakterienpellet am Boden der Röhre in 250µl Puffer P1 resuspendiert, bis das Pellet vollständig in Lösung gegangen war. Nach Zugabe von 250µl Lysispuffer P2 sowie 350µl Neutralisationspuffer N3 erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 upm über 10 Minuten. Der Überstand wurde auf eine Säulchenmembran übertragen und für eine weitere Minute zentrifugiert. Nach Zugabe von 750µl Waschpuffer PE und zweimaligem Zentrifugieren konnte die DNA mit 50µl Elutionspuffer EB eluiert werden.

### 3.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren wurde der Spectrophotometer DU 800 verwendet.

### 3.2.10 Sequenzbestimmung der NS3-Protease

#### 3.2.10.1 Sequenz-PCR nach der Kettenabbruch-Methode nach Sanger

Für die Sequenzbestimmung der NS3-Protease kam die Kettenabbruch-Methode nach Sanger zur Anwendung. In einer PCR hybridisiert ein kurzer Oligonukleotid-Primer mit dem Template unter Ausbildung eines kurzen RNA-DNA-Hybrids, was von der DNA-Polymerase als Startpunkt für die Kettenverlängerung erkannt wird. Diese verlängert den Komplementärstrang jedoch nicht nur mit den vier bekannten dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Entscheidend für die Kettenabbruch-Methode ist, dass der Ansatz auch farbstoffmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) enthält. Deren Einbau führt zum Abbruch der Polymerisation, da die fehlende OH-Gruppe an 3'-Position der Ribose eine Phosphodiesterbindung mit einem weiteren Nukleotid unmöglich macht. Als Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die immer mit einem ddNTP enden. Als Primer für die Sequenz-PCR wurde M13 Forward verwendet, der an eine spezifische Sequenz innerhalb des Plasmids bindet. Für die Sequenz-PCR wurde der BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. In den folgenden beiden Tabellen sind exemplarisch für einen Bakterienklon die Reaktionsbedingungen einer Sequenz-PCR wiedergegeben:

Tab.3.15: Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der Sequenz-PCR (exemplarisch für einen Bakterienklon)

Reagenzien	Mengenangaben (µl)
Sequenzier-Kit (BigDyes)	2
Primer Sense (M13 Forward)	0,5
Wasser	7
Plasmid-DNA	0,5
$\Sigma$	10

Tab.3.16: Einstellungen der Sequenz-PCR

Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	96	120	1
Denaturierung	96	10	35
Annealing	45	15	
Elongation	60	240	
Elongation	72	600	1
Abkühlung	4		

Im Anschluss an die Sequenz-PCR wurden die PCR-Produkte über eine Gelfiltration aufgereinigt. Dies ist insbesondere zur Entfernung von nichtgebundenen ddNTPs notwendig, welche in der späteren Sequenzanalyse durch ihren Farbstoff ein falsch positives Signal aussenden würden und das Ergebnis der Analyse negativ beeinflussen könnten. Als Material zur Vorbereitung der Gelsäulen wurde Sephadex<sup>®</sup> G-50 (Sigma) verwendet, welches hinsichtlich der umfangreichen Probenmenge auf MultiScreen<sup>®</sup> 96-Well Plates (Millipore, Ireland) aufgetragen wurde. Nachdem das Produkt der Sequenz-PCR auf die Gelsäulen übertragen wurde, erfolgte eine Zentrifugation bei 910 x g über fünf Minuten. Die aufgereinigte DNA konnte anschließend direkt zur Sequenzbestimmung herangezogen werden.

### 3.2.10.2 Sequenzierung mit dem 3130xl Genetic Analyzer

Zur Analyse der Nukleotidsequenz der NS3-Protease wurde der 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. In der Sequenz-PCR sind in Abhängigkeit von der Position des eingebauten ddNTP unterschiedlich lange DNA-Produkte entstanden. Diese wurden zunächst in einer Kapillarelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Da jedes der vier farbstoffmarkierten ddNTPs nach Anregung durch einen Laser Licht spezifischer Wellenlänge entsendet, kann von dem Genetic Analyzer sowohl die Art des Nukleotids als auch seine Position erkannt und somit die Sequenz abgeleitet werden.

### 3.2.11 Sequenzanalyse mit der Software *Mutation Surveyor V2.52*

Die Analyse der Nukleotidsequenzen der NS3-Protease erfolgte mit der Software *Mutation Surveyor V2.52* (SoftGenetics, State College, PA). Die Nukleotidsequenzen wurden in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt und mit der zugehörigen Referenzsequenz auf

Mutationen analysiert. Die einzelnen Elektropherogramme und daraus abgeleitete Nukleotidsequenzen wurden zudem manuell auf Fehler untersucht.

### 3.2.12 Direktsequenzierung der Referenzsequenz

Die Referenzsequenz, die für jeden Patienten als Vergleichssequenz für die Mutationsanalyse diente, wurde aus Patientenserum vor Beginn einer antiviralen Therapie durch eine Direktsequenzierung der NS3 Protease erstellt. Die Isolierung von RNA aus Serum, Polymerase-Kettenreaktion, Gelelektrophorese sowie Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gel wurden wie bereits beschrieben (Kapitel 3.2.1 bis 3.2.4) durchgeführt. Im Folgenden sind die Reaktionsbedingungen der Sequenz-PCR zur Direktsequenzierung der Referenzsequenz wiedergegeben:

Tab.3.17: Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der Sequenz-PCR (exemplarisch für eine Serumprobe für Genotyp 1b) zur Direktsequenzierung der Referenzsequenz

Reagenzien	Mengenangaben (µl)
Sequenzier-Kit (BigDyes)	4
Primer NS3-1b-1s	0,5
Wasser	3
Produkt aus PCR II	2,5
$\Sigma$	10

Tab.3.18: Programm für Sequenz-PCR zur Direktsequenzierung der Referenzsequenz

Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	96	120	1
Denaturierung	96	10	35
Annealing	45	15	
Elongation	60	240	
Elongation	72	600	1
Abkühlung	4		

### 3.2.13 Mutagenese-PCR und Transformation

Punktmutationen wurden an definierten Positionen innerhalb der Sequenz der NS3-Protease standardisiert mit dem QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) eingefügt. Hierfür kamen spezielle Mutagenese-Primer (siehe Kapitel 3.1.4.6) zur Anwendung, welche sich im Idealfall aus einer komplementären Sequenz aus 25 bis 45 Basen zusammensetzen, die angestrebte Mutation innerhalb dieser Sequenz beinhalten und somit zum angestrebten Aminosäureaustausch führen. Der Ansatz für eine Mutagenese-PCR ist im Folgenden dargestellt:

Tab.3.19: Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der Mutagenese-PCR (exemplarisch für einen Reaktionsansatz)

Reagenzien	Mengenangaben (µl)
10x Reaktionspuffer	5
dNTP Mix	1
QuikSolution™	3
Replikon Plasmid	1
Mutageneseprimer sense	1,5
Mutageneseprimer antisense	1,5
Wasser	36
PfuUltra™ HF DNA Polymerase (2,5 U/µl)	1
$\Sigma$	50

Tab.3.20: Programm für Mutagenese-PCR

Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	50	
Annealing	60	50	
Elongation	68	660	18
Elongation	68	420	1
Abkühlung	4		

Anschließend wurde dem PCR Produkt 1µl des Enzyms Dpn I (Endonuklease-Aktivität) hinzugefügt, mit der Pipette vermennt und bei 37 °C über eine Stunde inkubiert. Während dieser Zeit wurde methylierte DNA durch das Enzym abgebaut. Neu synthetisierte DNA mit der eingefügten Punktmutation hingegen wurde durch Dpn I nicht attackiert.

Der erfolgreiche Aminosäureaustausch wurde zunächst in einer Sequenz-PCR geprüft.

Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte die Transformation von XL10-Gold® ultrakompetenter Zellen. Hierfür wurden die Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Zu 45 µl der kompetenten Zellen wurden 2 µl β-ME (Mercaptoethanol) Mix gegeben. Die Zellen wurden anschließend für 10 Minuten auf Eis gelegt und alle zwei Minuten vorsichtig geschüttelt. Aus dem mit Dpn I vorbehandelten Reaktionsansatz wurden nun 2 µl entnommen und in XL10-Gold® ultrakompetente Zellen transformiert.

### 3.2.14 Transkription der Replikon-DNA

Der im vorherigen Kapitel beschriebenen Mutagenese lag das Plasmid pFK-I<sub>389</sub>neo/NS3-3'/ET zugrunde. Der Wildtyp dieses Plasmids beruht auf der Sequenz des subgenomischen Replikons I<sub>389</sub>/NS3-3'UTR und leitet sich vom Genotyp 1b ab. Im Gegensatz dazu enthält das hier eingesetzte Plasmid adaptive Mutationen innerhalb der Sequenz der NS-Proteine, welche *in vitro* die Replikationseffizienz steigern. Vor der Transkription war es notwendig, das Plasmid durch das Restriktionsenzym AseI in eine lineare Form zu bringen. Anschließend erfolgte die Spaltung der Plasmid-DNA am T7 Promotor durch das Enzym ScaI. Vor der weiteren Verarbeitung der DNA

wurde diese zunächst mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 49,5: 49,5: 1) aufgereinigt und durch Präzipitation mit Ethanol wiedergewonnen. Anschließend erfolgte die Transkription von Replikon-RNA durch eine T7-RNA-Polymerase.

Tab.3.21: *Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der Transkription (exemplarisch für einen Reaktionsansatz)*

Reagenzien	Mengenangaben (µl)
5x Transkriptionspuffer	20
25 mM rNTPs	6
100 mM DTT	10
RNasin (40 U/µl)	2,5
RNase freies Wasser	9
T7 RNA Polymerase	2,5
DNA	50
$\Sigma$	100

Dieser Reaktionsansatz wird für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Daraufhin werden nochmals 2µl T7 RNA Polymerase zum Ansatz hinzugegeben und wiederum über einen Zeitraum von zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wird der Abbau von DNA durch Hinzugabe von 7,5 µl DNase (1 U/µl) bei gleichbleibender Temperatur für eine Dauer von 30 Minuten angesetzt.

### 3.2.15 Kultivierung der Zelllinie Huh7-Lunet

Arbeiten in Zellkultur wurden mit humanen Hepatomazellen der Zelllinie Huh7-Lunet durchgeführt. Diese Zellen ermöglichen im Gegensatz zu Huh7 Zellen für das subgenomische Replikon einen gesteigerten Replikationsumsatz. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) gezüchtet und wöchentlich bis zu zweimal einem Wechsel des Mediums unterworfen. Dem Nährmedium war 10% iges fötales Kälberserum, 2 % Glutamin sowie 1 % Antibiotic Antimycotic Solution zugefügt. Die Kultivierung der Huh7-Lunet Zellen erfolgte im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 90 % und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Für eine spätere Aufarbeitung wurden Zellen in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert. Als Medium diente DMEM mit Zusatz von 10 % DMSO.

### 3.2.16 Transfektion von Huh7-Lunet Zellen mit Replikon-RNA

Vor Transfektion der Huh7-Lunet Zellen mit Replikon-RNA mussten die Zellen zunächst durch Trypsin vom Gefäß gelöst, danach mit PBS gewaschen und in einer Neubauerkammer gezählt werden. Die Resuspension der Zellen erfolgte in Cytomix in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml. Zu 400 µl der Zellsuspension wurde 1 µg der transkribierten RNA hinzugegeben. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser II in Küvetten mit einem Durchmesser von 4 mm bei 975 µF und 270 V. Anschließend wurden die Zellen zu 8 ml DMEM hinzugefügt und auf 10 cm

Platten verteilt. Die RNA-Moleküle enthielten das neo-Gen für Resistenz gegenüber Geneticin. Nach einer Kultivierung der Zellen in DMEM über 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und durch ein Selektionsmedium mit Zusatz von 750 µg/ml des Antibiotikums G418 zu DMEM ersetzt. Auf diese Weise war ein Überleben nur denjenigen Replikon-Zellen gestattet, welche erfolgreich transfiziert wurden und durch effiziente Replikation das Resistenz vermittelnde Phosphotransferase-Gen exprimieren konnten. Neben der Transfektion von Replikon-RNA mit Mutationen innerhalb der NS3-Protease wurden auch Negativ-Kontrollen transfiziert. Die Replikon RNA dieser Zellen hatte eine Deletion in der Sequenz der NS5B-Polymerase, sie war somit nicht zur autonomen Replikation fähig. Dennoch waren auch diese Zellen eine gewisse Zeit unter Einfluss des Selektionsmediums überlebensfähig, da in Abhängigkeit von der Menge an RNA auch funktionsfähiges neo-Gen in die Zelle transfiziert wurde. Da die Zellen der Negativ-Kontrollen keine Replikation der Replikon-RNA unterstützten, führte erst der Abbau der RNA zu einem Nachlassen der Resistenzwirkung und schließlich zum Absterben der Zellen.

### 3.2.17 HCV Replikon Assay

Über eine Mutagenese-PCR (siehe Kap. 3.2.13) wurden potentiell neue Resistenzmutationen in die für das NS3 Protein kodierende Sequenz eingefügt. Mit Hilfe des HCV Replikon Assay konnte nun der Einfluss verschiedener Konzentrationen der eingesetzten Proteaseinhibitoren auf die Replikationsfähigkeit der subgenomischen Replikons untersucht und somit das Resistenzniveau jeder Mutation bestimmt werden. Auf einer 24-well Platte wurden hierfür zunächst Replikonzellen in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen in 500 µl DMEM pro well kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Mediums zugunsten eines Selektionsmediums mit G418 (750 µg/ml). Dem Selektionsmedium wurden unterschiedliche Konzentrationen der Proteaseinhibitoren zugesetzt, anschließend erfolgte eine Kultivierung des Zellansatzes über 48 Stunden. In den Tabellen 3.22 bzw. 3.23 sind die Konzentrationen der linearen bzw. der makrozyklischen Proteaseinhibitoren aufgeführt, die in dieser Arbeit zur Ermittlung des Resistenzniveaus für potentielle neue Mutationen unter Einsatz entsprechender Proteaseinhibitoren zur Anwendung kamen.

Tab.3.22: Konzentrationen der linearen Proteaseinhibitoren im Replikon-Assay

Boceprevir	Telaprevir
0 µM	0 µM
0,15 µM	0,2 µM
0,5 µM	0,35 µM
1 µM	1 µM
5 µM	2,5 µM
7,5 µM	5 µM



Tab.3.23: Konzentrationen der makrozyklischen Proteaseinhibitoren im Replikon-Assay

Danoprevir	Simeprevir	Faldaprevir
0 nM	0 nM	0 nM
0,1 nM	0,25 nM	0,25 nM
0,2 nM	0,5 nM	0,5 nM
0,25 nM	1 nM	1 nM
0,3 nM	2,5 nM	2,5 nM
0,5 nM	5 nM	5 nM
0,75 nM		
1 nM		
5 nM		
7,5 nM		
10 nM		
30 nM		
50 nM		
100 nM		
150 nM		

Als Negativkontrolle wurde anstelle des Proteaseinhibitors DMSO hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde ebenfalls über 48 Stunden kultiviert.

### 3.2.18 Isolation von Replikon-RNA aus Huh7-Lunet Zellen

Nach dem Ernten der Zellen erfolgte die Isolation von Replikon-RNA aus Huh7-Lunet Zellen standardisiert nach Herstellerangaben mit dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen, Hilden).

Zunächst wurden Huh7-Lunet Zellen durch Hinzufügen von 350 µl des Puffers RLT lysiert. Zellpellets wurden durch vortexen bzw. schütteln aufgelöst. Daraufhin wurden 350 µl Ethanol (70 %) hinzugefügt und mit der Pipette vermischt, um eine selektive Bindung der RNA an eine Silika-Membran zu ermöglichen. Nach einer Zentrifugation über 15 s bei 10000 upm konnte das Filtrat verworfen werden. Nach einem Waschvorgang mit 700 µl des Puffers RW1 folgten zwei weitere Zentrifugationen mit jeweils 500 µl des Puffers RPE (ausgeführt bei jeweils 10000 upm). Nach Zentrifugation über eine Minute bei 10000 upm konnte nun mit 30 µl RNase freiem Wasser die aufgereinigte RNA eluiert werden.

### 3.2.19 Quantitative real-time RT-PCR

#### 3.2.19.1 Grundlagen einer quantitativen real-time RT-PCR

Der Nachweis der zuvor aufgereinigten Replikon-RNA erfolgte quantitativ über eine real-time RT-PCR. Bei dieser Form der PCR wird in Echtzeit die Menge an RNA über Detektion der Fluoreszenz bestimmt. Eine Variante der quantitativen PCR, die sog. TaqMan<sup>™</sup> PCR, nutzt die

Intensität fluorogener Emission von farbstoffmarkierten Sonden zum quantitativen Nachweis von PCR-Produkten. Das Grundgerüst dieser Sonden besteht aus einem Oligonukleotid, die am 5'-Ende mit einem fluorogenen Farbstoff, dem sog. Reporter (z.B. FAM), markiert sind. Am 3'-Ende findet sich ein Quencher-Farbstoff (z.B. TAMRA), welcher bei intakter Sonde die Fluoreszenzemission des Reporters inhibiert. Die Sonden sind an ihrem 3'-OH Ende mit einem Phosphat modifiziert um eine Extension der Sonde während der PCR zu verhindern. Idealerweise hybridisiert die Sonde innerhalb des Amplikons sequenzspezifisch zwischen beiden PCR Primern mit relativer Nähe zum 3'-Ende eines Primers. Nach Anregung der intakten Sonde mit einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm ist die gemessene Emission sehr gering, da aufgrund der räumlichen Nähe von Reporter und Quencher die Fluoreszenz in Form eines Energietransfers auf den Quencher übertragen wird (Fluoreszenz Resonanz Energietransfer). Während der Extensionsphase der Zielsequenz trifft die TaqMan DNA Polymerase auf die Sonde und baut diese mit ihrer 5'-3'-Exonuklease Aktivität ab. Die räumliche Trennung von Reporter und Quencher führt zur Emission der Fluoreszenz und kann mit dem StepOnePlus™ PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) gemessen werden. Die Intensität des Fluoreszenzsignals steigt proportional mit der Menge an synthetisierten PCR Produkten an, welche wiederum abhängig von der Menge an RNA im Ausgangsmaterial zu Beginn der PCR ist. Die Quantifizierung der RNA während der Polymerase-Kettenreaktion erfolgt während der Phase des exponentiellen Anstieges an PCR-Produkten zum Zeitpunkt des CT-Wertes (threshold cycle). Dieser Wert definiert denjenigen Zyklus der RT-PCR, bei welcher die gemessene Fluoreszenz den Schwellenwert eines festgelegten Fluoreszenzniveaus übersteigt.

### **3.2.19.2 Endogene Kontrolle**

Um Messungenauigkeiten bei der Quantifizierung von RNA sowie Effizienzunterschiede der PCR zu berücksichtigen, wird die Expression des Zielgens gegenüber einer endogenen Kontrolle normalisiert. Messfehler können beispielsweise auf der Verwendung einer unterschiedlichen Anzahl an Zellen im Ausgangsmaterial beruhen. Als endogene Kontrolle wurde aus jeder Probe zusätzlich ein Housekeeping-Gen amplifiziert, welches im Idealfall konstant exprimiert wird, ohne internen bzw. externen, also auch keinen medikamentös regulierenden Einflüssen unterworfen zu sein. In dieser Arbeit wurde hierfür das Gen für GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet.

### **3.2.19.3 Reaktionsbedingungen der reversen Transkription und der quantitativen real-time RT-PCR**

Die reverse Transkription wurde wie auf Seite 60f. beschrieben ausgeführt. Im Folgenden sind der Reaktionsansatz und Einstellungen der quantitativen real-time RT-PCR zum Nachweis von Replikon-RNA aufgeführt:

Tab.3.24: Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der RT-PCR für den Nachweis von Replikon-RNA (exemplarisch für einen Reaktionsansatz)

Reagenzien	Mengenangaben (µl)
Primer HCV-sense	1,35
Primer HCV-antisense	1,35
HCV Sonde	0,3
Wasser	3
TaqMan Master Mix	7,5
cDNA	1,5
$\Sigma$	15

Tab.3.25: Programm für die quantitative real-time RT-PCR

Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
	50	120	1
Denaturierung/Aktivierung der DNA-Polymerase	95	600	1
Denaturierung	95	15	40
Annealing/Amplifikation	60	60	

In den beiden folgenden Tabellen sind nun die Reaktionsbedingungen und Einstellungen der quantitativen real-time PCR zum Nachweis von GAPDH als endogene Kontrolle dargestellt:

Tab.3.26: Eingesetzte Reagenzien und Mengenangaben der RT-PCR für den Nachweis von GAPDH-mRNA (exemplarisch für einen Reaktionsansatz)

Reagenzien	Mengenangaben (µl)
Assay	0,75
Wasser	5,25
TaqMan Master Mix	7,5
cDNA	1,5
$\Sigma$	15

Tab.3.27: Programm für die quantitative real-time RT-PCR

Reaktion	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
	50	120	1
Denaturierung/Aktivierung der DNA-Polymerase	95	600	1
Denaturierung	95	15	40
Annealing/Amplifikation	60	60	

### 3.2.19.4 Relative Quantifizierung nach der $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ Methode

Die relative Quantifizierung beschreibt eine Methodik, wonach die Genexpression des Zielgens gegenüber einer endogenen Kontrolle normalisiert wird. Die Bestimmung absoluter Zahlenwerte, wie z.B. eine Konzentration oder die Viruslast, erfordern andere mathematische Modelle und sind mit hoher Fehleranfälligkeit behaftet. Für die relative Quantifizierung sind die CT-Werte der Proben und Kontrolle von Bedeutung (siehe Kapitel 3.2.19.1). Den Wert für  $\Delta CT$  erhält man durch Subtraktion des CT-Wertes der endogenen Kontrolle vom CT-Wert der Probe. Die Differenz aus  $\Delta CT$  und einer unbehandelten Kalibrator-Probe liefert den Wert für  $\Delta\Delta CT$ , welcher nach Einfügen in die Formel  $2^{-\Delta\Delta CT}$  die n-fache Expression des Zielgens gegenüber dem unbehandelten Kalibrator

angibt. Diese Berechnung geht vom Idealfall einer real-time PCR aus, wonach sich nach jedem Zyklus die Menge an DNA verdoppelt, die Effizienz der PCR also 100 % beträgt. Mit Hilfe der Software MATLAB wurden Schwankungen der Messergebnisse korrigiert und darüber die  $IC_{50}$  Werte bestimmt. Für jede Mutation wurde der  $IC_{50}$  Wert als Mittelwert aus zwei Messungen gebildet.

Das Resistenzniveau einer Mutation wurde bestimmt, indem der  $IC_{50}$  Wert einer Mutation in Bezug auf den  $IC_{50}$  Wert des Wildtyps als n-facher Wert angegeben wird:

- keine Resistenz ( $n = 0 - 1,9$ )
- niedriges bis mittleres Resistenzniveau ( $n = 2 - 15$ )
- hohes Resistenzniveau ( $n > 15$ )

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Analyse der Minor-Varianten hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Resistenzentstehung**

#### **4.1.1 Phase Ib Studien mit den Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir**

Wichtige Resistenzmutationen unter Therapie mit Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir innerhalb der Sequenz der NS3 Protease (Positionen 36, 54, 55, 155, 156 und 170) sind hinreichend charakterisiert und mit einem Therapieversagen assoziiert. Die Bedeutung der Minor-Varianten unter Therapie mit einer direkt antiviralen Medikation ist bisher nicht ausreichend bekannt.

Insgesamt wurden 37 Patienten, die an chronischer Hepatitis C mit dem Genotyp 1 erkrankt waren, in zwei Phase Ib Studien entweder mit dem Proteaseinhibitor Boceprevir (SCH 503034) als Monotherapie (n=17) oder Telaprevir (VX-950) als Monotherapie (n=20) über jeweils zwei Wochen therapiert.

#### **4.1.2 Varianten $\geq 5$ % innerhalb der Quasispezies unter Therapie**

Neben den bereits charakterisierten Varianten, welche ein erhöhtes Resistenzniveau gegenüber Boceprevir vermitteln, findet sich eine Vielzahl an Varianten, deren Bedeutung für die Resistenzentwicklung noch nicht vollständig geklärt ist. Um den Einfluss eines Selektionsdruckes von Boceprevir auf die Zusammensetzung der Quasispezies näher hervorzuheben, erfolgte eine Fokussierung auf Varianten, welche den Wildtyp zu einem bestimmten prozentualen Anteil unter Therapie ersetzen. Alle Positionen innerhalb der NS3 Sequenz, an denen eine Aminosäure mit einer Häufigkeit von mindestens 5 % in Bezug zur entsprechenden Position der Baseline ersetzt worden ist, wurden in die weitere Auswertung aufgenommen und als potentielle Virusvarianten mit erhöhtem Resistenzniveau gegenüber Boceprevir in Betracht gezogen. Mutationen einer Virusvariante hin zur Wildtypsequenz wurden dabei ebenfalls berücksichtigt. Unter diesen Kriterien konnten im Patientenkollektiv Substitutionen an insgesamt 51 Positionen innerhalb der NS3 Protease (AS 1-181) beobachtet werden, die teilweise bei mehreren Patienten nachweisbar waren und an folgenden Positionen innerhalb der NS3 Protease nachgewiesen werden konnten: 7, 8, 13, 14, 18, 29, 30, 33, 36, 42, 46, 48, 49, 54, 55, 56, 61, 67, 71, 72, 80, 86, 87, 89, 91, 92, 94, 95, 107, 114, 117, 119, 120, 122, 127, 131, 132, 146, 147, 149, 150, 153, 155, 156, 159, 162, 170, 174, 175, 176 und 179. Für Mutationen an Positionen 36, 54, 55, 155, 156 und 170 sind bereits Resistenz-Mutationen gegenüber Boceprevir hinreichend beschrieben.

Unter Monotherapie mit Telaprevir konnten Varianten mit einer Häufigkeit von mindestens 5 % an 31 identischen Aminosäurepositionen innerhalb der Sequenz der NS3 Protease identifiziert werden: 14, 24, 28, 29, 36, 40, 48, 49, 54, 55, 56, 57, 61, 67, 68, 72, 77, 86, 87, 89, 95, 100, 107, 117, 122, 127, 132, 155, 156, 168, 170 und 174.

### 4.1.3 „Multivariate a priori pattern mining approach“

Wie im vorangegangenen Kapitel 4.1.2 beschrieben, konnten unter Therapie mit Boceprevir an 51 Positionen innerhalb der NS3 Protease Varianten mit einer Häufigkeit von mindestens 5 % innerhalb der Quasispezies selektioniert werden, im Rahmen der Telaprevir-Studie Varianten an 31 identischen Positionen. Abgesehen der bekannten Resistenzmutationen ist die Bedeutung dieser Vielzahl an Minor-Varianten, die teilweise bei mehreren Patienten nachzuweisen waren, bisher nur unzureichend bekannt. In Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Informatik in Saarbrücken wurden in einem sequenzanalytischen Modell die Sequenzen beider Phase I Studien auf charakteristische wiederkehrende Muster an Veränderungen innerhalb der Nukleinsäuresequenz unter Therapie analysiert. Diese Sequenzstudien wurden am Max-Planck-Institut unter der Annahme durchgeführt, dass unter Therapie Resistenzmutationen selektioniert werden, welche von vornherein („a priori“) weitere Änderungen der Nukleinsäuresequenz bedingen und somit charakteristische Muster an Mutationen entstehen lassen. Der „multivariate a priori pattern mining approach“ verfolgte das Ziel, wiederkehrende Muster an Sequenzvariationen zu detektieren und somit mögliche neue Resistenzmutationen zu identifizieren.

In den folgenden Abbildungen 4.1 und 4.2 sind die Ergebnisse des „multivariate a priori pattern mining approach“ graphisch dargestellt. Abbildung 4.1 bezieht sich auf die Sequenzanalyse unter Therapie mit Boceprevir, Abbildung 4.2 hingegen auf Telaprevir. Beide Grafiken berücksichtigen eine Gruppierung der Patienten entsprechend ihrem virologischen Ansprechen auf die vorangegangene Monotherapie mit dem Proteaseinhibitor: Kriterium für eine erfolgreiche Therapie war ein Abfall der Viruslast um mindestens 2 log<sub>10</sub> Stufen (therapy success), wohingegen bei geringerem Abfall der Viruslast die Patienten als nicht erfolgreich therapiert eingestuft wurden (therapy failure). Am linken Bildrand sind jeweils von oben nach unten die Positionen der Aminosäuren innerhalb der NS3 Protease aufgeführt, an welchen unter Therapie mit Boceprevir u./o. Telaprevir Varianten zu mindestens 5 % innerhalb der Quasispezies detektiert werden konnten. Verknüpfungen mit einem Unterstrich zwischen zwei Positionen (z.B. 36\_155) berücksichtigt ein gekoppeltes Vorliegen von Mutationen an entsprechenden Positionen. Für jede Mutation, die wiederholt detektiert werden konnte, wurde das Ausmaß der Quasispezieskonversion von der Baseline bestimmt. Hierfür wurden Nukleotidsubstitutionen als Abweichungen von der Baseline über das Genom erfasst, die zu entsprechender Mutation geführt haben. Dies erfolgte jeweils zu den Zeitpunkten Therapieende und zwei Wochen nach Beendigung der Therapie. In den

Grafiken wird für jede Einzel- bzw. kombiniert auftretende Mutation das Ausmaß der Quasispezieskonversion prozentual als sog. delta-( $\delta$ ) Wert dargestellt. Dieser bildet ein Maß für den prozentualen Anteil an Nukleotidsubstitutionen über das Genom bezogen auf die Patientenpopulation. Graphisch wird dies in Form horizontal verlaufender Balken dargestellt. Der  $\delta$ -Wert entspricht bei Zunahme an Nukleotidsubstitutionen weg von der Baseline einem positiven Wert, bei Abnahme an Nukleotidsubstitutionen hingegen nimmt er einen negativen Wert an. Hierbei entspricht exemplarisch der  $\delta$ -Wert einer beliebigen Mutation von +0.02 einer Substitution von 2 % der Nukleotide über das Genom bezogen auf die Patientenpopulation, die zu entsprechender Mutation geführt hat. Die Farbkodierung der Balken ermöglicht eine Zuordnung der Mutationen zu den einzelnen Patienten, die jeweils am rechten Bildrand der Abbildungen 4.1 und 4.2 in Form eines Zahlenkodes aufgeführt sind.

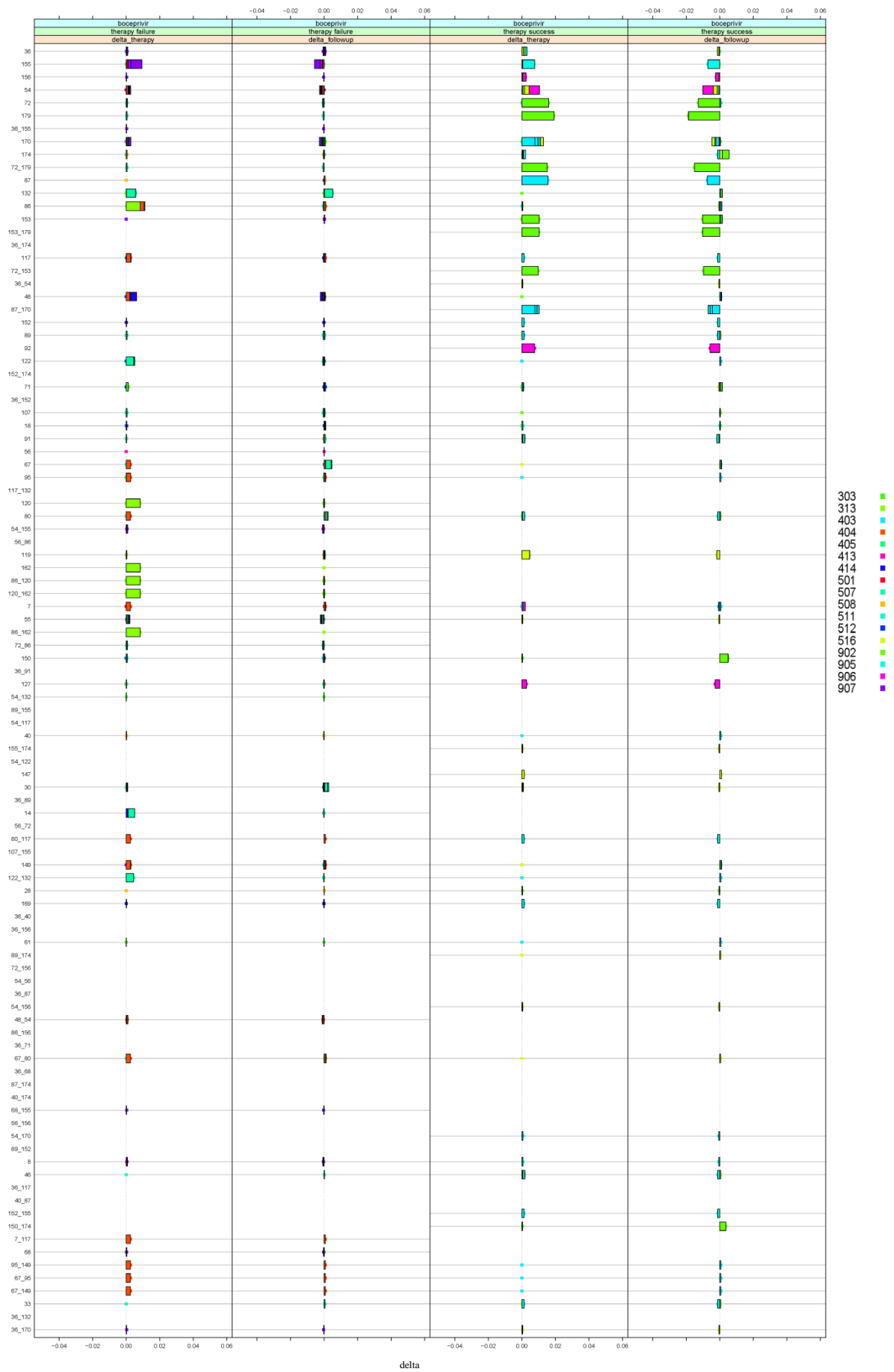


Abb. 4.1: Graphische Darstellung der Ergebnisse des „multivariate a priori pattern mining approach“ nach Monotherapie mit Boceprevir. Die Zahlen am rechten Bildrand entsprechen den Patienten-Nummern



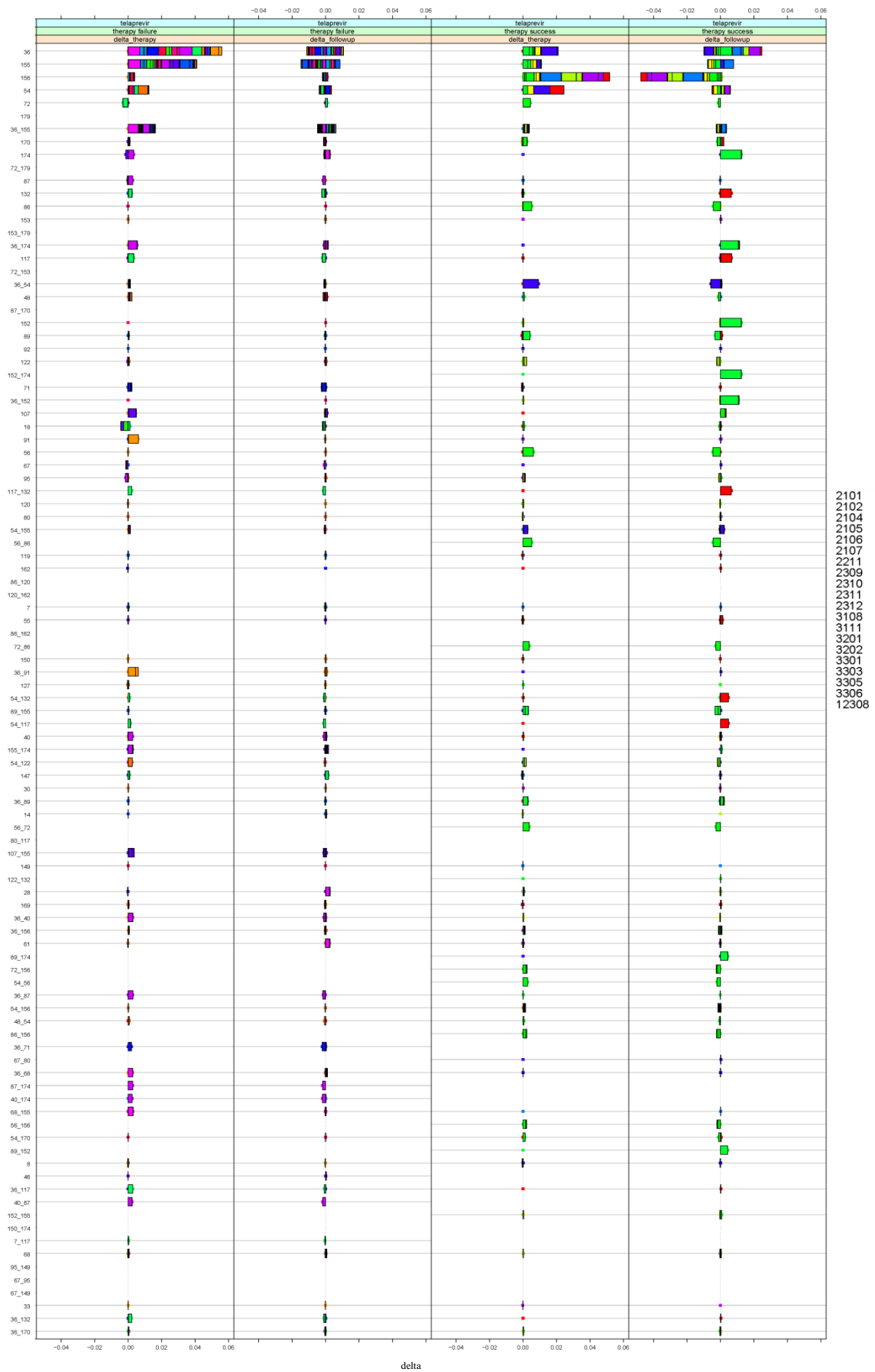


Abb. 4.2: Graphische Darstellung der Ergebnisse des „multivariate a priori pattern mining approach“ nach Monotherapie mit Telaprevir. Die Zahlen am rechten Bildrand entsprechen den Patienten-Nummern

#### 4.1.4 Identifizierung bekannter und potentiell neuer Resistenzmutationen

Potentielle Resistenzmutationen wurden innerhalb dieser Studie am symmetrischen Verlauf ihrer Balken identifiziert, d.h. der  $\delta$ -Wert sollte nach Therapie einen positiven Wert und zwei Wochen nach Therapieende einen negativen Wert annehmen. Anhand dieses Kriteriums konnten 13 Positionen aus den Ergebnissen dieser Analyse identifiziert werden: 36, 48, 54, 55, 72, 87, 117, 132, 153, 155, 156, 170 und 174.

Für sechs dieser Positionen (36, 54, 55, 155, 156 und 170) sind bereits Mutationen mit unterschiedlichem Resistenzniveau vorbekannt. Drei weitere Varianten (48, 72 und 153), welche die eben genannten Kriterien erfüllen, sind ebenfalls bereits vorbeschrieben (Susser et al., 2009). Sie vermitteln jedoch weder gegenüber Boceprevir noch gegenüber Telaprevir Resistenz. Für Virusvarianten an den Positionen 87, 117, 132 sowie 174 ist der Einfluss auf eine Resistenzentwicklung unter Therapie mit einem Proteaseinhibitor bisher nicht bekannt.

#### 4.1.5 Phänotypische Charakterisierung der potentiell neuen Mutationen im Replikon-Modell

Vier potentiell neue Resistenzmutationen an den Positionen 87, 117, 132 und 174 der NS3 Protease konnten über das Modell des „multivariate a priori pattern mining approach“ identifiziert werden. Um ihr Resistenzniveau unter *in vitro* Bedingungen gegenüber einem Proteaseinhibitor zu bestimmen, wurden die Mutationen im Replikon-Assay untersucht. Als Grundlage hierfür diente das con1b Replikon basierend auf dem HCV 1b Subtyp. Für jede Mutation wurden die  $IC_{50}$  Werte für die Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir im Vergleich zur Wildtyp-Variante bestimmt. Kriterium für Resistenz war eine mindestens 2-fache  $IC_{50}$  im Vergleich zum Wildtyp.

##### 4.1.5.1 $IC_{50}$ Werte im Replikon für Boceprevir

Die Ergebnisse der  $IC_{50}$  Werte der neuen Mutationen für Boceprevir im Replikon-Assay sind in Abbildung 4.3 dargestellt, ihr Resistenzniveau im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp in Abbildung 4.4.

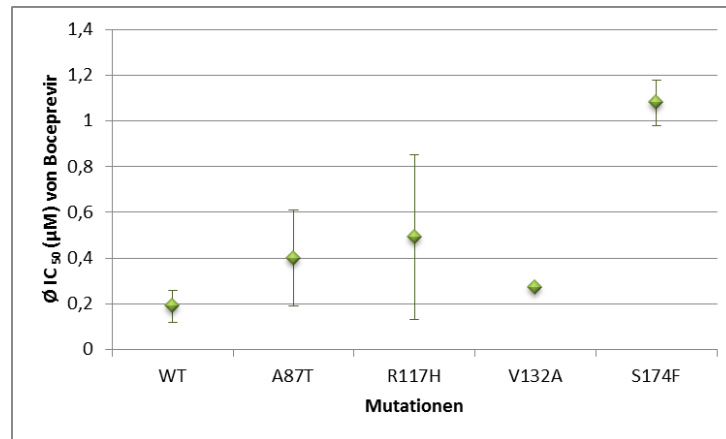


Abb. 4.3: IC<sub>50</sub> Werte im Replikon für Boceprevir

In der Abbildung sind die gemittelten IC<sub>50</sub> Werte für den Wildtyp und die getesteten Mutationen dargestellt: WT 0,19 µM; A87T 0,40 µM; R117H 0,49 µM; V132A 0,27 µM; S174F 1,08 µM. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an. WT=Wildtyp

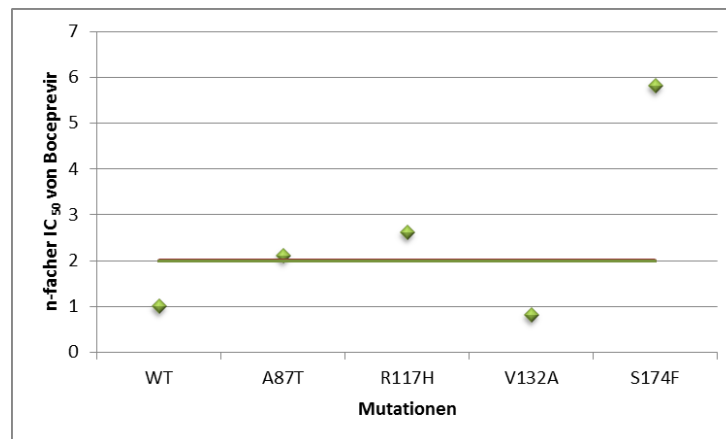


Abb. 4.4: Resistenzniveau der getesteten Mutationen im Replikon für Boceprevir

Dargestellt ist das Resistenzniveau der getesteten Mutationen im Vergleich zum Wildtyp als n-facher Anstieg:

A87T 2,1-fach; R117H 2,6-fach; V132A 0,8-fach; S174F 5,8-fach

Mutationen mit Werten oberhalb der grünen Linie (Markierung einer 2-fachen Resistenz) sind mit Resistenz verbunden. WT=Wildtyp

Aus den Abbildungen wird ersichtlich, dass drei der getesteten Varianten Resistenz gegenüber Boceprevir vermitteln. A87T, R117H und S174F konnten im Replikon als neue Resistenzmutationen mit niedrigem bis mittlerem Resistenzniveau (2,1 - 5,8-fache Erhöhung des IC<sub>50</sub>) charakterisiert werden. Die Variante V132A hingegen ist mit keiner Resistenzentwicklung gegenüber Boceprevir verbunden (0,8-facher IC<sub>50</sub> im Vergleich zum Wildtyp).

#### 4.1.5.2 IC<sub>50</sub> Werte der neuen Mutationen für Telaprevir

Die neuen Varianten wurden auch auf Resistenz gegenüber dem Proteaseinhibitor Telaprevir im Replikon untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.5 und 4.6 dargestellt.

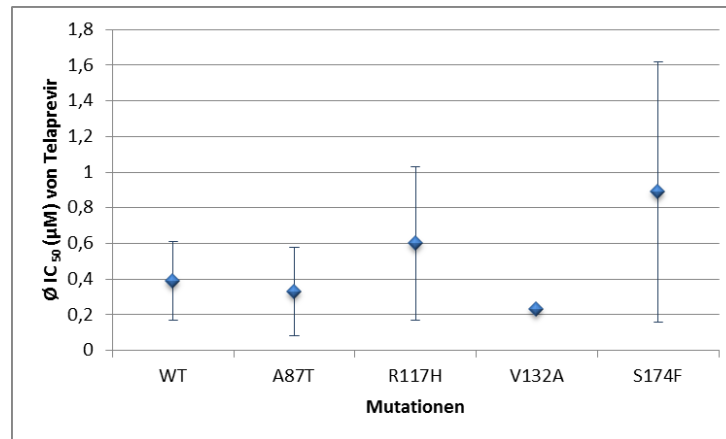


Abb. 4.5: IC<sub>50</sub> Werte im Replikon für Telaprevir

In der Abbildung sind die gemittelten IC<sub>50</sub> Werte für den Wildtyp und die getesteten Mutationen dargestellt: WT 0,39 µM; A87T 0,33 µM; R117H 0,60 µM; V132A 0,23 µM; S174F 0,89 µM  
Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an. WT=Wildtyp

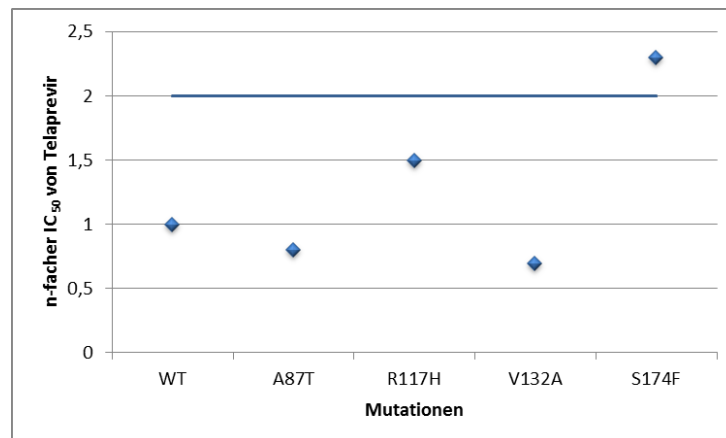


Abb. 4.6: Resistenzniveau der getesteten Mutationen im Replikon für Telaprevir

Dargestellt ist das Resistenzniveau der getesteten Mutationen im Vergleich zum Wildtyp als n-facher Anstieg:

A87T 0,8-fach; R117H 1,5-fach; V132A 0,7-fach; S174F 2,3-fach

Mutationen mit Werten oberhalb der blauen Linie (Markierung einer 2-fachen Resistenz) sind mit Resistenz verbunden. WT=Wildtyp

Aus den Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen verursacht lediglich die Variante S174F ein niedrig erhöhtes Resistenzniveau (2,3-fach erhöhter IC<sub>50</sub>) gegenüber Telaprevir. Die IC<sub>50</sub> Werte von A87T, R117H und V132A sind nur gering vom Wildtyp abweichend (0,7 – 1,5-facher IC<sub>50</sub>) und verursachen somit keine Resistenz.

#### 4.1.5.3 Kreuzresistenz zwischen Boceprevir und Telaprevir

In Abbildung 4.7 ist eine Gegenüberstellung der nach phänotypischer Charakterisierung im Replikon erstellten Resistenzprofile von Boceprevir und Telaprevir gezeigt.

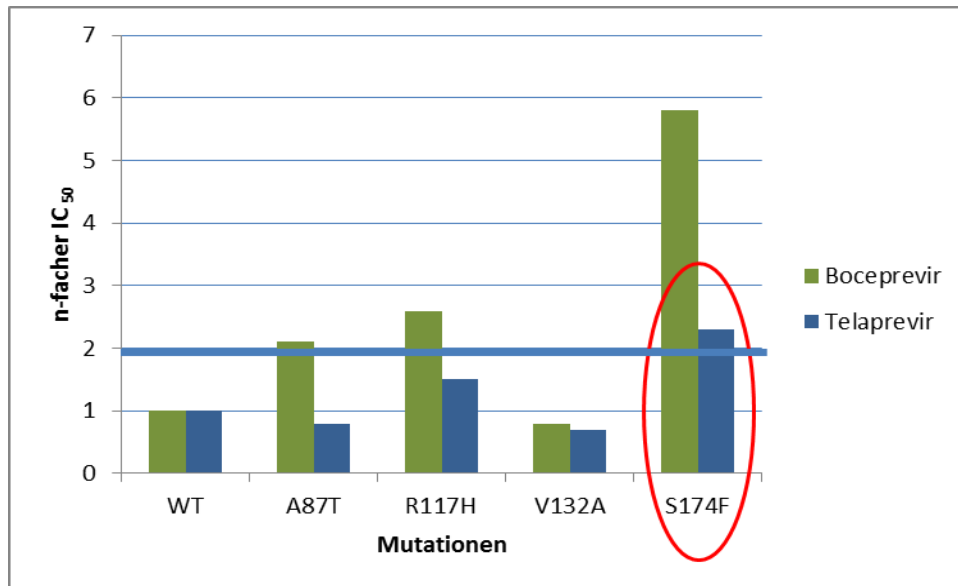


Abb. 4.7: Resistenzspektrum von Boceprevir und Telaprevir

Dargestellt ist das Resistenzniveau der neuen Varianten von Boceprevir und Telaprevir im Vergleich. Die in roter Farbe umrandete Mutation vermittelt Kreuzresistenz zwischen beiden Proteaseinhibitoren.

Aus der Abbildung 4.7 wird ersichtlich, dass von den neuen im Replikon charakterisierten Mutationen lediglich die Variante S174F mit einer Resistenzentwicklung gegenüber Boceprevir (5,8-fach erhöhter IC<sub>50</sub>) und Telaprevir (2,3-fach erhöhter IC<sub>50</sub>) einhergeht, also zu einer Kreuzresistenz zwischen beiden Proteaseinhibitoren führt.

#### 4.1.5.4 IC<sub>50</sub> Werte der neuen Mutationen für makrozyklische Proteaseinhibitoren Faldaprevir, Simeprevir und Danoprevir

Im Weiteren wurden die neuen Minor-Varianten auch auf Resistenz gegenüber den makrozyklischen Proteaseinhibitoren Faldaprevir, Simeprevir und Danoprevir geprüft. Entsprechende IC<sub>50</sub> Werte aus den Replikon-Assays sind zusammengefasst für alle drei Proteaseinhibitoren in Abbildung 4.8 dargestellt, das entsprechende Resistenzniveau in Bezug auf den Wildtyp hingegen in Abbildung 4.9.

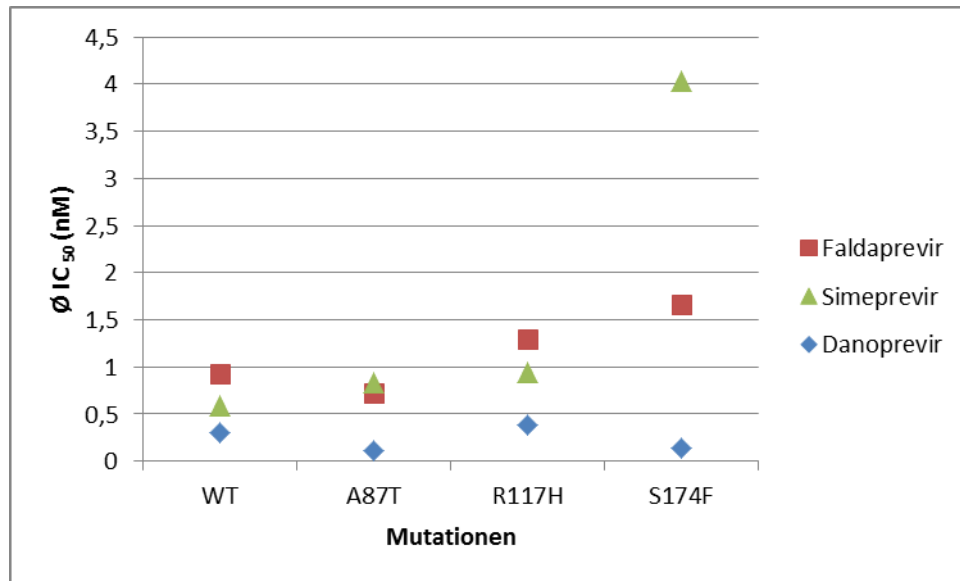


Abb. 4.8:  $IC_{50}$  Werte im Replikon für makrozyklische Proteaseinhibitoren Faldaprevir, Simeprevir und Danoprevir:

Danoprevir: WT 0,3  $\mu$ M; A87T 0,11  $\mu$ M; R117H 0,38  $\mu$ M; S174F 0,14  $\mu$ M.

Simeprevir: WT 0,59  $\mu$ M; A87T 0,83  $\mu$ M; R117H 0,94  $\mu$ M; S174F 4,03  $\mu$ M.

Faldaprevir: WT 0,93  $\mu$ M; A87T 0,72  $\mu$ M; R117H 1,29  $\mu$ M; S174F 1,66  $\mu$ M.

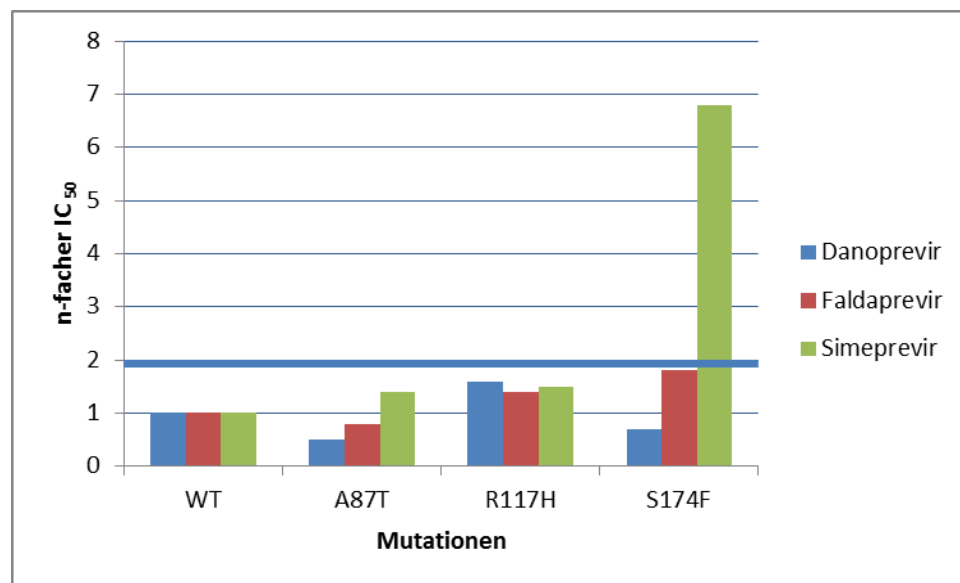


Abb. 4.9: Resistenzniveau der getesteten Mutationen im Replikon für Faldaprevir, Simeprevir und Danoprevir

Dargestellt ist das Resistenzniveau der getesteten Mutationen im Vergleich zum Wildtyp für die makrozyklischen Proteaseinhibitoren Danoprevir, Faldaprevir und Simeprevir. Mutationen mit Werten oberhalb der blauen Linie (Markierung einer 2-fachen Resistenz) sind mit Resistenz verbunden. WT=Wildtyp

Danoprevir: A87T 0,5-fach; R117H 1,6-fach; S174F 0,7-fach

Faldaprevir: A87T 0,8-fach; R117H 1,4-fach; S174F 1,8-fach

Simeprevir: A87T 1,4-fach; R117H 1,5-fach; S174F 6,8-fach

Lediglich die S174F Variante führt unter Therapie mit dem Proteaseinhibitor Simeprevir im Replikon zu einem 6,8-fachen Anstieg des  $IC_{50}$  Wertes im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp und verursacht somit ein mittleres Resistenzniveau gegenüber Simeprevir. Die übrigen getesteten Minor-Varianten tragen *in vitro* zu keiner relevanten Resistenzentwicklung unter Behandlung mit den makrozyklischen Proteaseinhibitoren Danoprevir, Faldaprevir und Simeprevir bei.

#### 4.1.5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Eine Quasispeziesanalyse nach Klonierung und Sequenzierung konnte zeigen, dass eine zweiwöchige Monotherapie mit den Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir eine Selektion einer Vielzahl an Varianten in einer Häufigkeit von  $\geq 5\%$  innerhalb der Quasispezies begünstigt (51 Varianten unter Boceprevir, 31 Varianten unter Telaprevir). Um die Vielzahl der Varianten hinsichtlich ihrer Bedeutung für eine potentielle Resistenzentwicklung weiter einzuschränken, wurde in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Informatik in Saarbrücken mit Ergebnissen der klonalen Sequenzanalysen beider Phase Ib Studien ein „multivariate a priori pattern mining approach“ durchgeführt: über eine Analyse der Quasispezieskonversion komplexer wiederkehrender Muster an Sequenzvariationen konnte das Spektrum möglicher neuer Resistenzen reduziert und über ihre phänotypische Charakterisierung im Replikon-Modell ihre Bedeutung zur Resistenzbildung bestimmt werden. Hierüber konnten die Varianten A87T, R117H und S174F als neue Resistenzmutationen von niedrigem bis mittlerem Resistenzniveau identifiziert werden. In Abbildung 4.10 ist ein Flussdiagramm dargestellt, welches die einzelnen Arbeitsschritte zusammenfasst.

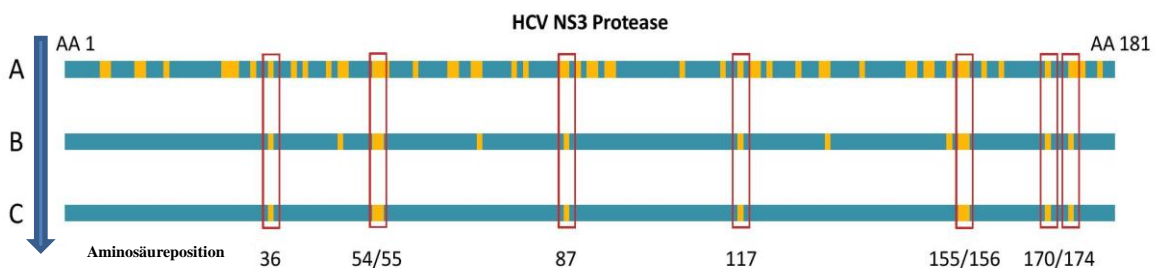


Abb. 4.10: Arbeitsdiagramm zur Identifizierung neuer Resistenzmutationen

Die blauen Balken repräsentieren die Aminosäuresequenz der NS3-Protease von Aminosäure 1 (AA 1) bis Aminosäure 181 (AA 181). In gelber Farbe sind Mutationen innerhalb der Sequenz kenntlich gemacht.

- A: alle Varianten nach klonaler Sequenzanalyse  $\geq 5\%$  in der Quasispezies nach Therapie
- B: potentielle Resistenzmutationen nach „multivariate a priori pattern mining approach“
- C: im Replikon identifizierte Mutationen mit erhöhtem Resistenzniveau

## 4.2 Kombinationstherapie als sequentielle Therapie mit Boceprevir und PEG-Interferon-alfa-2b

### 4.2.1 Sequenzanalyse

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde den Studienteilnehmern Serum entnommen, welches zur genotypischen Analyse der NS3 Protease aufgearbeitet wurde. Die einzelnen Arbeitsschritte von der Gewinnung des Serums bis zur Sequenzanalyse entsprechen denen unter Kapitel 3 „Material und Methoden“ aufgeführten Abläufen. Serum wurde vor Beginn der ersten Therapiesequenz (Baseline) entnommen, vor jeder weiteren erstmaligen Gabe nach Therapiewechsel, zum Ende einer jeden Therapiesequenz sowie vierzehn Tage nach Therapieende (follow-up). In Bezug auf alle neun Patienten und alle Zeitpunkte wurden insgesamt 1681 Klone amplifiziert und sequenziert. Aus durchschnittlich 30 klonalen Sequenzen wurde für jeden Studienteilnehmer eine Konsensussequenz vor Therapiebeginn (Baseline) erstellt und wie in der vorherigen Studie die N-terminalen 181 Aminosäuren der NS3 Protease der erstellten Sequenzen unter Therapiebedingungen mit der zugehörigen Baseline des Patienten auf Mutationen untersucht.

### 4.2.2 Mutationsanalyse

In dieser Studie erhielten alle neun Patienten zwei Therapiesequenzen mit dem Proteaseinhibitor Boceprevir. Dieser wurde entweder primär als Monotherapie über sieben Tage mit anschließender 14-tägiger Kombinationstherapie verabreicht, oder entsprechend in umgekehrter Reihenfolge. Bestandteil der Studie war zudem eine variabel verabreichte 14-tägige Monotherapie mit PEG-Interferon pegIFN. Aus Tabelle 4.1 ist ersichtlich, dass einzelne Patienten diese Studie mit der pegIFN-Monotherapie begannen oder beendeten. Drei Patienten wurden zwischen beiden Boceprevir-Sequenzen pegIFN als Monotherapie verabreicht. Im Rahmen dieser Studie erhielten vier Patienten zuerst die Monotherapie mit Boceprevir 400 mg TID (Patienten 201, 205, 208 und 210) und fünf Patienten zunächst die Kombinationstherapie mit Boceprevir 400 mg TID und pegIFN- $\alpha$ 2b (Patienten 203, 206, 207, 209 und 211).



Tab.4.1: Einteilung der Studienteilnehmer in die Therapiesequenzen

Patienten ID-Nummer (Gt)	1.Therapiesequenz	2.Therapiesequenz	3.Therapiesequenz
<b>201 (1a)</b>	Mono PEG	Mono PI	Combo
<b>203 (1a)</b>	Combo	Mono PEG	Mono PI
<b>205 (1b)</b>	Mono PI	Combo	Mono PEG
<b>206 (1b)</b>	Combo	Mono PI	Mono PEG
<b>207 (1b)</b>	Combo	Mono PI	Mono PEG
<b>208 (1b)</b>	Mono PI	Mono PEG	Combo
<b>209 (1b)</b>	Mono PEG	Combo	Mono PI
<b>210 (1b)</b>	Mono PI	Combo	Mono PEG
<b>211 (1a)</b>	Combo	Mono PEG	Mono PI

*Mono PEG = Monotherapie mit PEG-Interferon; Mono PI = Monotherapie mit Boceprevir ; Combo = Kombinationstherapie Boceprevir und PEG-Interferon; Gt = Genotyp*

#### 4.2.2.1 Mutationsanalyse vor Beginn der Therapie (Baseline)

In der analytischen Betrachtung der Quasispezies konnte bei einem Patienten (Patient 208) an Position V55 die Substitution V55A mit einer Häufigkeit von 100 % beobachtet und als präexistierende Variante gewertet werden. Eine nähere phänotypische Charakterisierung dieser Mutation konnte im Replikon-Modell einen 6,9-fachen  $IC_{50}$  im Vergleich zum Wildtyp für Boceprevir nachweisen. Jedoch trat die V55A Variante in allen Sequenzen kombiniert mit der S174F Variante auf, welche als neue Minor-Variante von niedrigem bis mittlerem Resistenzniveau (5,8-facher  $IC_{50}$  für Boceprevir) identifiziert werden konnte. Als Minor-Variante innerhalb der Quasispezies konnte bei Patient 207 die Mutation R117H nachgewiesen werden, welche mit einer Frequenz von 7 % aufgetreten war. Insgesamt fand sich der Wildtyp als Major-Variante der Quasispezies innerhalb des Studienkollektivs bei acht von neun Patienten. In der folgenden Abbildung werden alle Konsensussequenzen in Abhängigkeit vom Genotyp der entsprechenden Prototyp-Sequenz gegenübergestellt (HCV-H77 für Genotyp 1a, HCV-J für Genotyp 1b).



#### 4.2.2.2 Therapiesequenz Monotherapie - Kombinationstherapie

Vier Patienten (201, 205, 208 und 210) erhielten zunächst eine Monotherapie mit Boceprevir in der Dosierung 400 mg TID über sieben Tage, anschließend die Kombination aus Boceprevir 400 mg TID und pegIFN- $\alpha$ 2b in der Dosierung 1,5  $\mu$ g/kg/Woche über einen Zeitraum von zwei Wochen. In der folgenden Tabelle 4.2 ist das Resistenzspektrum dieser vier Patienten aufgeführt.

Tab.4.2: Resistenzspektrum der Patienten mit der Therapiesequenz Boceprevir Monotherapie – Kombinationstherapie

Patient ID	1. Sequenz	→	2. Sequenz	→	3. Sequenz	→	Follow-up
<b>201</b>	<b>Mono PEG</b>		<b>Mono-PI</b>		<b>Combo</b>		
	-		V36M 7 % R155T 3 %		-		V36M 3 % R155T 6 % D168G 3 %
<b>205</b>	<b>Mono PI</b>		<b>Combo</b>		<b>Mono PEG</b>		
	T54A 3 % V55A 3 % Q80R 3 % R155Q 3 %		V36A 3 %		-		T54A 3 %
<b>208</b>	<b>Mono PI</b>		<b>Mono PEG</b>		<b>Combo</b>		
	V55A+S174F 100 % Q41K/R 5 % / 7 % R117H 3 %		V55A+S174F 100 %		V55A+S174F 100 % D168G 4 %		V55A+S174F 100 %
<b>210</b>	<b>Mono PI</b>		<b>Combo</b>		<b>Mono PEG</b>		
	Q41R 5 % F43S 5 %		F43L 5 % Q80R 5 % R117H 5 %		-		-

*Mono PEG = Monotherapie mit PEG-Interferon alpha 2b; Mono PI = Monotherapie mit Boceprevir ;*

*Combo = Kombinationstherapie Boceprevir und PEG-Interferon alpha 2b*

Im Folgenden werden die in Tabelle 4.2 aufgeführten Patienten, die zunächst mit dem Proteaseinhibitor Boceprevir als Monotherapie behandelt wurden und erst im weiteren Verlauf die Kombinationstherapie mit pegIFN erhielten, einzeln besprochen. Hierbei erfolgt die Betrachtung des Resistenzspektrums nach einer Ersttherapie bzw. einer Zweittherapie mit Boceprevir. Auswirkungen auf die Viruskinetik werden zu späterem Zeitpunkt aufgeführt.

Patient 201 (siehe Abb. 4.13)

Bei Patient 201 fanden sich mit einer Häufigkeit von 7 % und 3 % die Varianten V36M bzw. R155T nach Beendigung der Monotherapie. Vor Beginn der zweiten Therapiesequenz wurden diese Varianten wieder durch den Wildtyp ersetzt. Nach Beendigung der zweiten Therapie mit Boceprevir als Kombinationstherapie war eine Re-Selektion der Mutationen an den Positionen V36 und R155 zum Zeitpunkt follow-up zu beobachten. Sie wurden zu gleichen prozentualen Anteilen innerhalb der Quasispezies selektioniert wie bereits nach Ersttherapie. Die pegIFN Monotherapie erfolgte als erste Therapiesequenz. Hier wurde auf eine genotypische Sequenzanalyse verzichtet.

Patient 205 (siehe Abb. 4.14)

Zu jeweils 3 % konnten nach der ersten Sequenz die Mutationen T54A, V55A und Q80R bei Patient 205 beobachtet werden. Nach der darauf folgenden wash-out Phase waren zu Beginn der Kombinationstherapie bis auf die Variante V55A die zuvor beschriebenen Resistenzen nicht mehr nachzuweisen. Zusätzlich konnte jetzt eine R155Q Variante als kleine Subpopulation mit einem Anteil von 3 % innerhalb der Quasispezies detektiert werden. Sie wurden nach der zweiten Exposition gegenüber Boceprevir, welche als Kombinationstherapie durchgeführt wurde, durch die Mutation V36A mit einer Häufigkeit von 3 % innerhalb der Quasispezies ersetzt. Sechs Wochen später, nach zwischenzeitlich durchgeführter pegIFN Monotherapie, erschien wieder T54A als alleinige Variante.

Patient 208 (siehe Abb. 4.15)

Innerhalb des Patienten 208 war das Hepatitis C Virus bereits vor Beginn der antiviralen Therapie als V55A Variante in jeder Sequenz nachzuweisen. Zusätzlich lag die V55A Mutation in allen Sequenzen gekoppelt mit der neuen Minor-Variante S174F vor. Auch zusätzliche genotypische Sequenzanalysen an den Tagen d1, d2 sowie d4 unter der Boceprevir Monotherapie konnten den dominierenden Anteil dieser Variante innerhalb der Quasispezies belegen. Lediglich zu Therapietag 1 (d1) wurde ein Anteil von 17 % der Viruspopulation vom Wildtyp gebildet. Überwiegend war die Doppelmutation V55A/S174F vorliegend, in geringer Häufigkeit zu 3-7 % auch als kombinierte Mutation mit Q41K/R bzw. R117H. Eine darauf folgende pegIFN Monotherapie über 14 Tage hatte keine Auswirkungen auf das Resistenzspektrum. Unter der Kombinationstherapie war ein ähnlicher Verlauf zu beobachten wie unter der Monotherapie mit Boceprevir. Die Quasispezies wurde zu jedem Zeitpunkt einer genotypischen Sequenzanalyse von der V55A/S174F Variante gebildet. Lediglich in einem Klon am zweiten Therapietag (d2) war eine Wildtypsequenz nachweisbar, was einem Anteil von 4 % an der Viruspopulation entsprach. Auch unter der Kombinationstherapie war ein geringer Anteil an kombinierten Mutationen von V55A/S174F mit D168G zu beobachten.

Patient 210 (siehe Abb. 4.16)

Bei Beendigung der Monotherapie mit Boceprevir wurden die Varianten Q41R und F43S zu jeweils 5 % detektiert. In der darauf folgenden washout-Phase wurden sie wieder durch den Wildtyp ersetzt. Nach der 14 tägigen Kombinationstherapie konnte erneut an Position F43 eine Resistenz selektioniert werden. Allerdings erfolgte keine Re-Selektion der F43S Variante aus der Monotherapie, sondern der Nachweis der Mutation F43L. Diese nahm wie die Varianten Q80R und R117H je einen Anteil von 5 % innerhalb der Quasispezies bei Beendigung der Kombinationstherapie ein. Die zuletzt durchgeführte Monotherapie mit pegIFN war auch hier ohne Auswirkungen auf das Resistenzspektrum.

In den folgenden Abbildungen 4.13 bis 4.16 wird jede Therapiesequenz eines gruppzugehörigen Patienten graphisch dargestellt, welche den Verlauf der Viruslast mit dynamischen Veränderungen der Zusammensetzung der Quasispezies unter den Bedingungen einer sequentiell durchgeführten antiviralen Therapie in Verbindung bringt. Nach jeder Therapiesequenz erfolgte eine therapiefreie Phase (wash-out) über einen Zeitraum von zwei Wochen, was in den Abbildungen als „two weeks off“ gekennzeichnet wird.

*Patient 201*

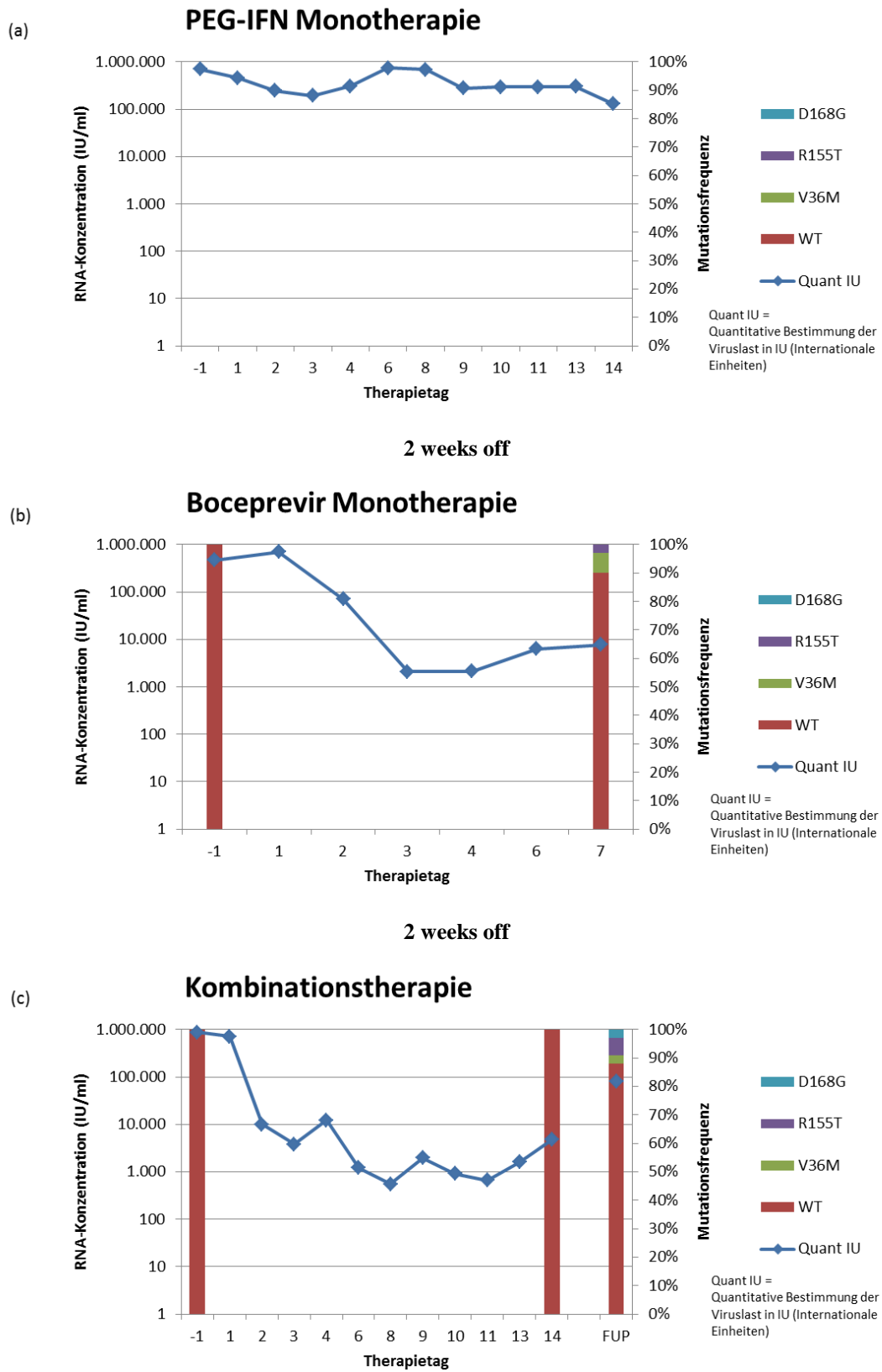


Abb. 4.13: (a)-(c) Therapiesequenzen von Patient 201  
 (a) PEG-IFN Monotherapie  
 (b) Boceprevir Monotherapie  
 (c) Kombinationstherapie

*Patient 205*

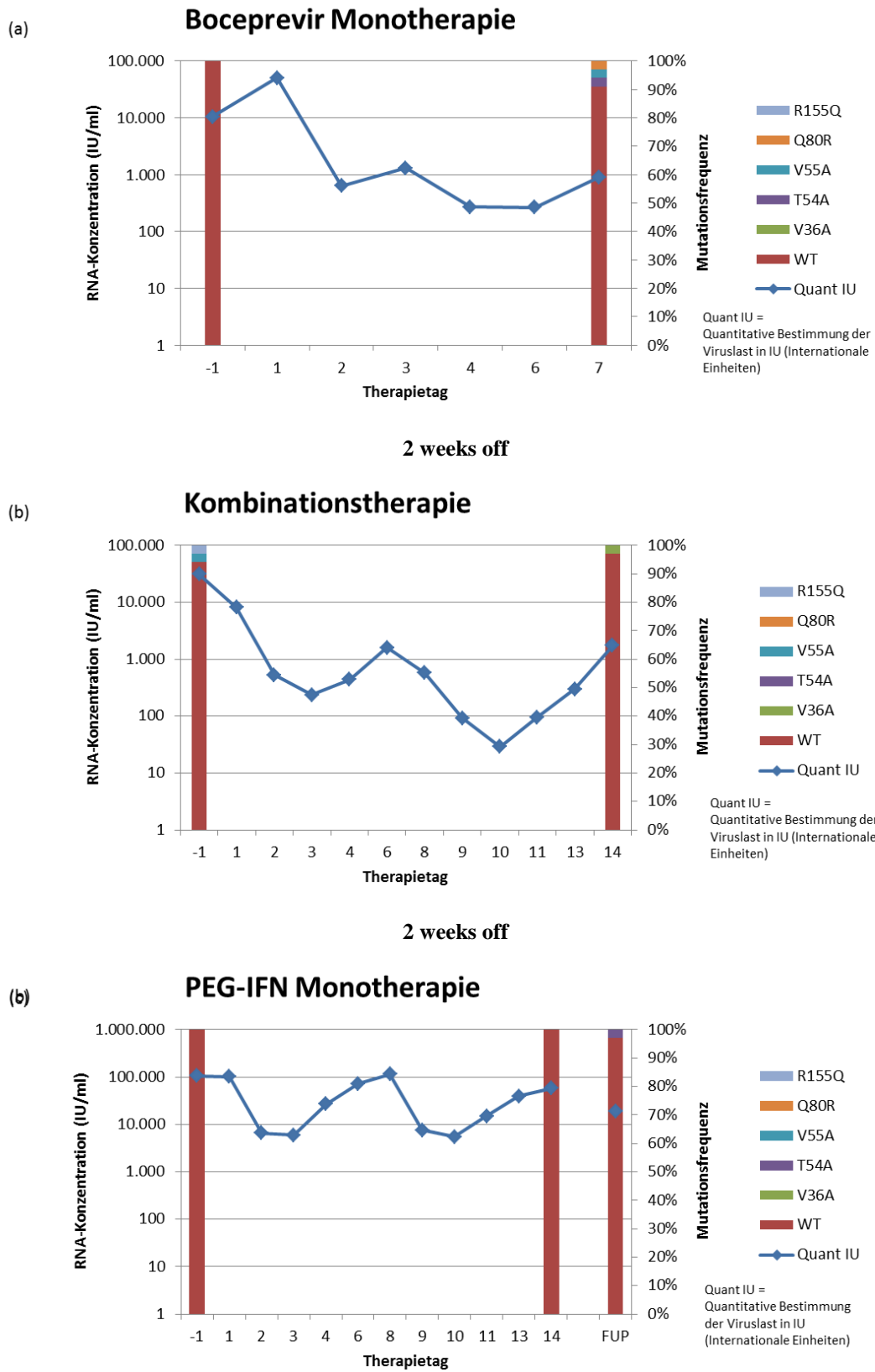


Abb. 4.14: (a)-(c) Therapiesequenzen von Patient 205  
 (a): Boceprevir Monotherapie  
 (b): Kombinationstherapie  
 (c): PEG-IFN Monotherapie

*Patient 208*

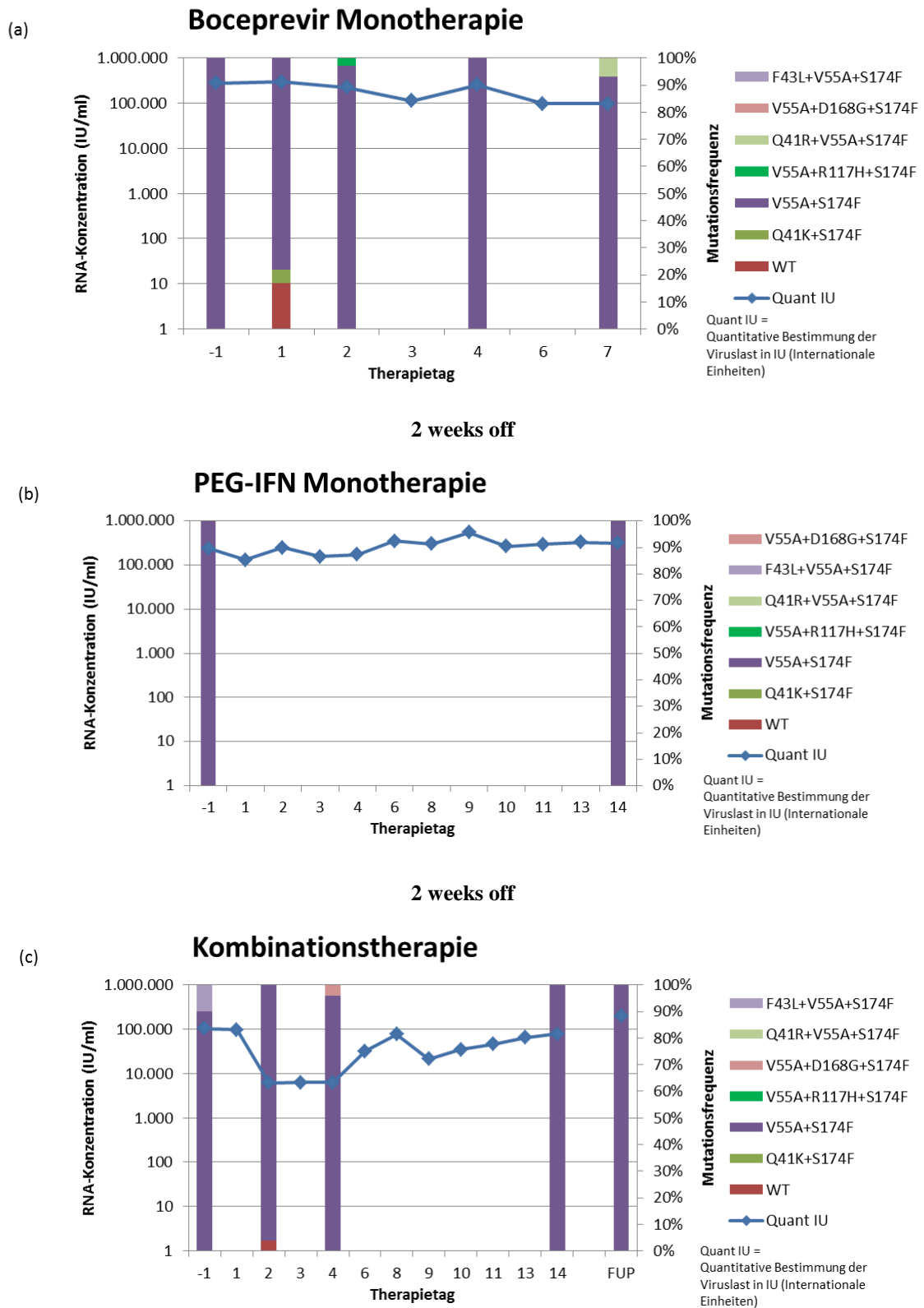


Abb.4.15: (a)-(c) Therapiesequenzen von Patient 208

(a): Boceprevir Monotherapie

(b): PEG-IFN Monotherapie

(c): Kombinationstherapie



**Patient 210**

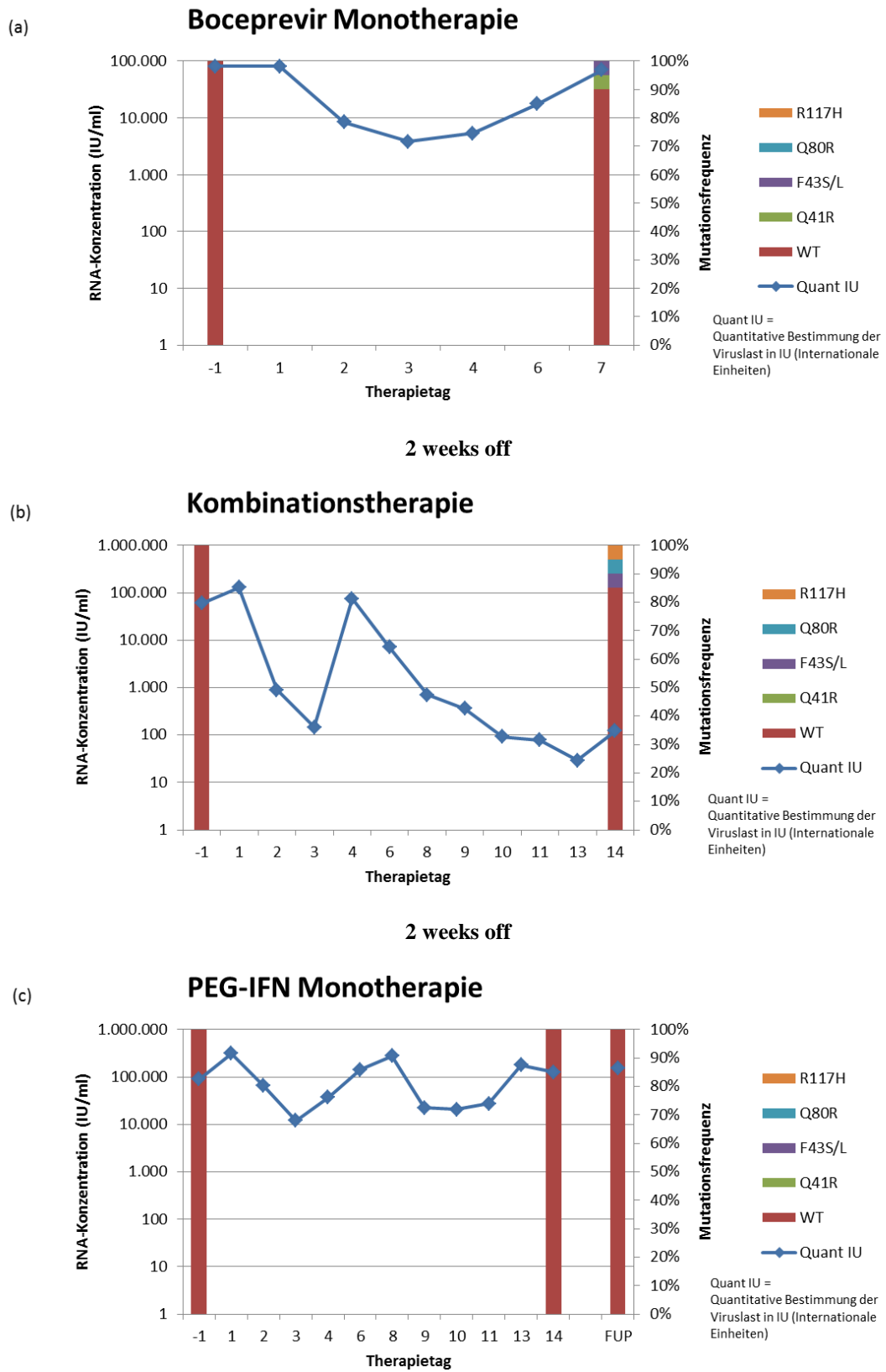


Abb.4.16: (a)-(c) Therapiesequenzen von Patient 210  
 (a): Boceprevir Monotherapie  
 (b): Kombinationstherapie  
 (c): PEG-IFN Monotherapie

### 4.2.2.3 Therapiesequenz Kombinationstherapie – Monotherapie

Fünf Studienteilnehmer (Patienten 203, 206, 207, 209 und 211) wurden zunächst mit Boceprevir 400 mg TID und pegIFN- $\alpha$ 2b in der Dosierung mit 1,5  $\mu$ g/kg/Woche als Kombinationstherapie über 14 Tage behandelt. Im weiteren Verlauf erfolgte die zweite Therapiesequenz mit Boceprevir 400 mg TID über sieben Tage als Monotherapie. In der folgenden Tabelle 4.3 ist das Resistenzspektrum der eben genannten fünf Patienten aufgeführt.

Tab.4.3: Resistenzspektrum der Patienten mit der Therapiesequenz Kombinationstherapie – Boceprevir Monotherapie

Patient	1. Sequenz	→	2. Sequenz	→	3. Sequenz	→	Follow-up
<b>203</b>	<b>Combo</b>		<b>Mono PEG</b>		<b>Mono PI</b>		
	R155G 3 %		R117H 64 %		R117H 8 % T54S+Q80K+R117H +R155K 84 %		R117H 24 % T54S+Q80K+R117H +R155K 67 %
<b>206</b>	<b>Combo</b>		<b>Mono PI</b>		<b>Mono PEG</b>		
	Q41R 3 % F43S/L 6 % D168E 6 %		V170A 11 %		-		Q41P 11 %
<b>207<sup>1)</sup></b>	<b>Combo</b>		<b>Mono PI</b>		<b>Mono PEG</b>		
	V55A+S174F 100 % Q80R 3 % D168G 3 %		V55A+S174F 100 % F43L 4 % T54A 52 % Q80R 3 %		-		-
<b>209</b>	<b>Mono PEG</b>		<b>Combo</b>		<b>Mono PI</b>		
	-		T54A 19 %		V55A 4 % A156T 4 %		R155W 3 %
<b>211</b>	<b>Combo</b>		<b>Mono PEG</b>		<b>Mono PI</b>		
	F43L 4 %		D168N 3 %		V55A 3 %		-

*Mono PEG = Monotherapie mit PEG-Interferon alpha...; Mono PI = Monotherapie mit Boceprevir ; Combo = Kombinationstherapie Boceprevir und PEG-Interferon*

Im Folgenden werden die in Tabelle 4.3 aufgeführten Patienten einzeln besprochen. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erfolgt auch hier zunächst die Betrachtung des Resistenzspektrums nach einer Ersttherapie bzw. einer Zweittherapie mit Boceprevir. Auswirkungen auf die Viruskinetik werden zu späterem Zeitpunkt aufgeführt.

Patient 203 (siehe Abb. 4.17)

Nach der ersten Exposition gegenüber Boceprevir unter der Kombinationstherapie war neben dem Wildtyp lediglich ein Anteil von 3 % mit einer R155G Variante zu sehen. Vor der Zweittherapie mit Boceprevir erfolgte die pegIFN Monotherapie. Während dieser Phase wurden keine genotypischen Sequenzanalysen durchgeführt. Zu Beginn der Boceprevir Monotherapie konnten in 64 % aller Sequenzen eine Variante mit der R117H Mutation nachgewiesen werden. Im Verlauf der Monotherapie war der Anteil der Variante mit R117H als Einzelmutation schließlich von 64 % auf 8 % rückläufig und wurde durch eine kombinierte Mehrfachmutation aus T54S, Q80K, R117H und R155K mit einer Häufigkeit von 84 % innerhalb der Quasispezies ersetzt. In der Nachbeobachtungsphase hat bei ausbleibendem Selektionsdruck durch den Proteaseinhibitor der prozentuale Anteil dieser Variante wieder abgenommen.

Patient 206 (siehe Abb. 4.18)

Bei Beendigung der Kombinationstherapie entsprachen alle Sequenzen dem Wildtyp-Virus. Erst zu Beginn der zweiten Therapiesequenz konnten bei Patient 206 zu einem geringen Anteil resistente Minor-Varianten detektiert werden (Q41R 3%, F43S/L 6% sowie D168E 6%). Zusätzlich wurde zu diesem Zeitpunkt an Position V170 in einer Sequenz die Mutation V170I (3 %) detektiert. Da sie jedoch nicht mit erhöhtem Resistenzniveau gegenüber Boceprevir einhergeht, wurde sie nicht in der Abb. 4.18 berücksichtigt. Bei Beendigung der Monotherapiesequenz waren keine Mutationen mehr nachzuweisen, jedoch zwei Wochen später zu Beginn der pegIFN Monotherapie die Variante V170A, die in 11 % aller Sequenzen detektiert werden konnte. Bis zur Beendigung der pegIFN Monotherapie wurde diese Variante wieder durch den Wildtyp ersetzt. In der Nachbeobachtungsphase wurde zu 11 % die Q41P Variante selektioniert.

Patient 207 (siehe Abb. 4.19)

Als präexistente Minor-Variante konnte bei Patient 207 die Variante R117H nachgewiesen werden, welche einen Anteil von 7 % an der Viruspopulation ausmachte. Unter dem Selektionsdruck der Kombinationstherapie dominierte sie jedoch nicht die Zusammensetzung der Quasispezies. Vielmehr wurde eine Variante mit der kombinierten Mutation V55A und S174F selektiert, die bei Beendigung der Therapiesequenz zu 100 % nachzuweisen war. Nachdem sie im therapiefreien Intervall wieder vollständig vom Wildtyp verdrängt wurde, konnte sie innerhalb der Zweittherapie mit Boceprevir zu Therapietag 4 (d4) nochmals zu 100 % detektiert werden. In einem Klon war zusätzlich die Mutation Q80R (3 %) zu beobachten. Am Ende der Boceprevir Monotherapie war in der genotypischen Sequenzanalyse erneut ausschließlich Wildtyp-Virus nachzuweisen. Die letzte Behandlungsperiode erfolgte auch hier als Monotherapie mit pegIFN. Hier setzte sich vor Beginn der Therapie die Quasispezies zu etwa 50 % aus der T54A Variante zusammen.

Patient 209 (siehe Abb. 4.20)

Die erste Behandlungsperiode erfolgte als Monotherapie mit pegIFN. Hierunter wurden keine Resistenzmutationen detektiert. Die T54A Variante, die nach Beendigung der Ersttherapie einen Anteil von 19 % an der Zusammensetzung der Quasispezies ausmachte, wurde im therapiefreien Intervall wieder durch die Wildtyp-Variante ersetzt. Die Re-Therapie mit Boceprevir als Monotherapie führte zur Selektion der Mutationen V55A und A156T zu jeweils 4 %.

Patient 211 (siehe Abb. 4.21)

Zu allen Zeitpunkten einer genotypischen Sequenzanalyse war die Wildtyp-Variante des Hepatitis C Virus hier dominierend. Unter der ersten Therapiesequenz, welche als Kombinationstherapie durchgeführt wurde, konnte die Variante F43L in einer Häufigkeit von 4 % detektiert werden. Nach Beendigung der pegIFN Monotherapie war die Mutation D168N zu 3 % innerhalb der Quasispezies nachweisbar. Die Re-Therapie mit Boceprevir als Monotherapie erfolgte als letzte Behandlungsperiode. Unter dem Selektionsdruck wurde hier die V55A Variante in einer Häufigkeit von 3 % detektiert.

In den folgenden Abbildungen 4.17 bis 4.21 wird für die eben vorgestellten Patienten, die zunächst Boceprevir als Kombinationstherapie gefolgt von einer Behandlungsperiode mit Boceprevir als Monotherapie erhielten, der Therapieverlauf dargestellt. Auch hier wird wiederum für jeden Patienten jede einzelne Behandlungsperiode graphisch dargestellt, indem der Verlauf der Viruskonzentration in Verbindung mit dynamischen Veränderungen in der Zusammensetzung der Quasispezies unter Therapie präsentiert wird.

*Patient 203*

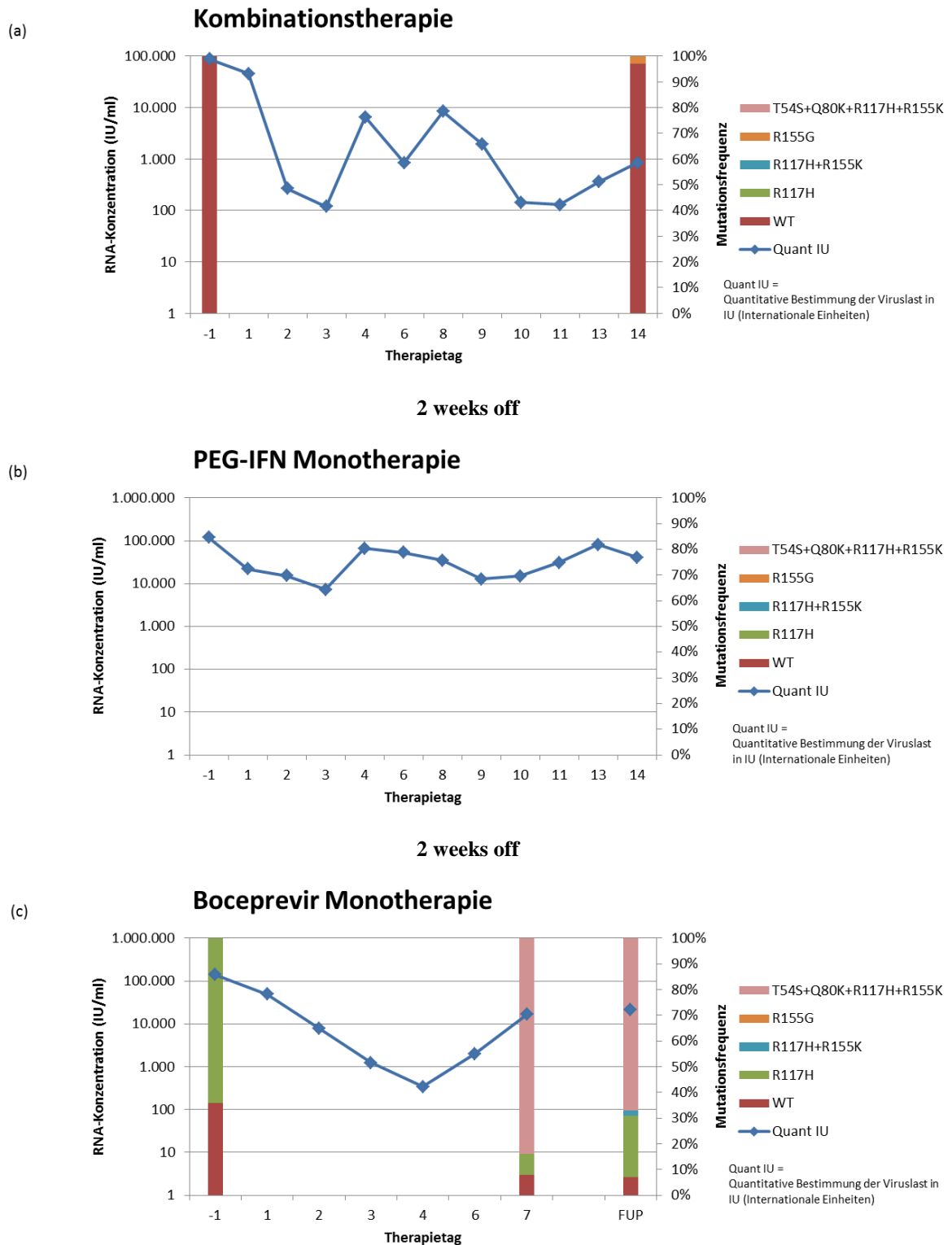


Abb.4.17: (a)-(c) Therapiesequenzen von Patient 203

(a): Kombinationstherapie

(b): PEG-IFN Monotherapie

(c): Boceprevir Monotherapie

*Patient 206*

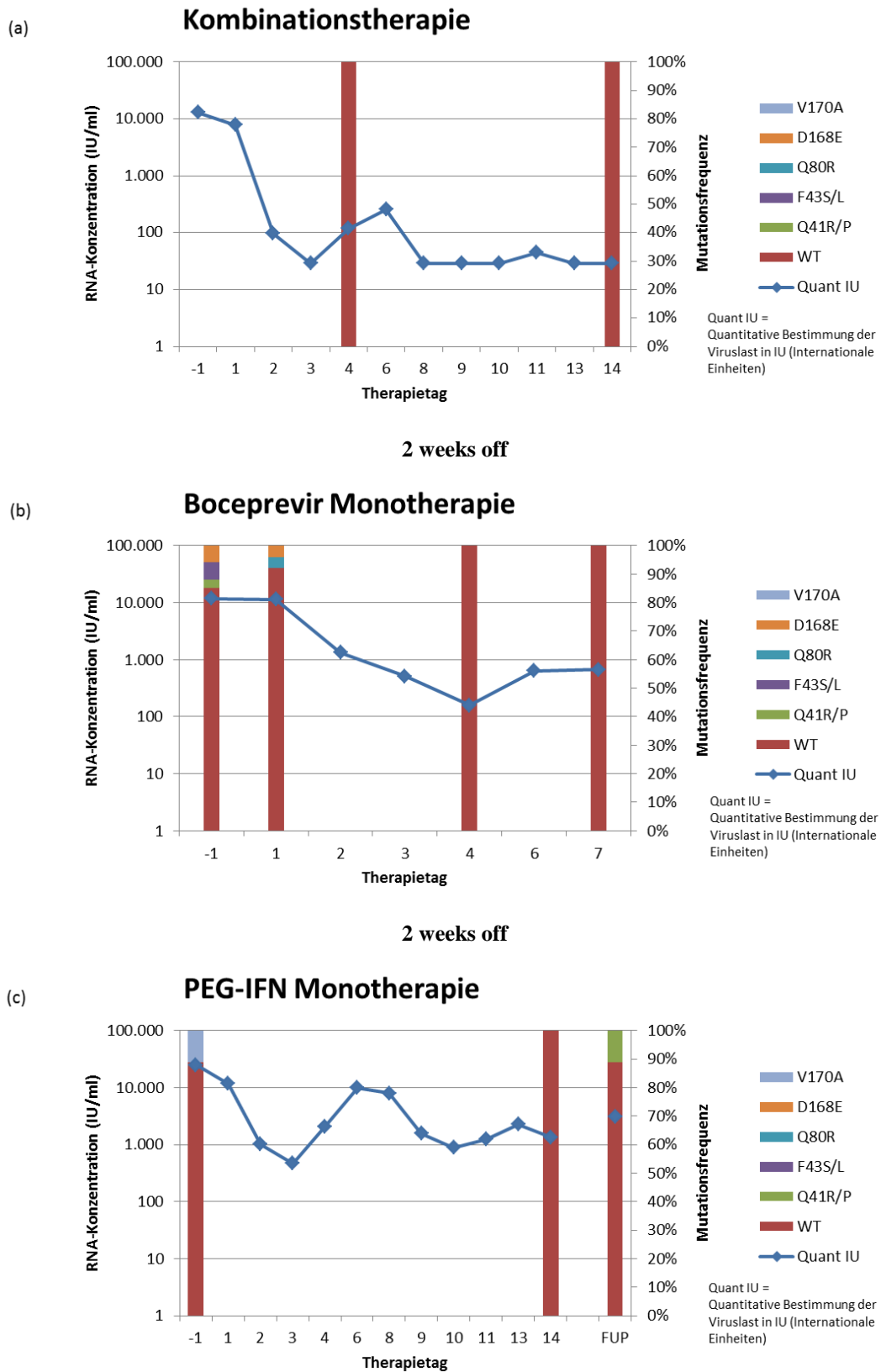


Abb.4.18: (a)-(c) Therapiesequenzen von Patient 206  
 (a): Kombinationstherapie  
 (b): Boceprevir Monotherapie  
 (c): PEG-IFN Monotherapie

*Patient 207*

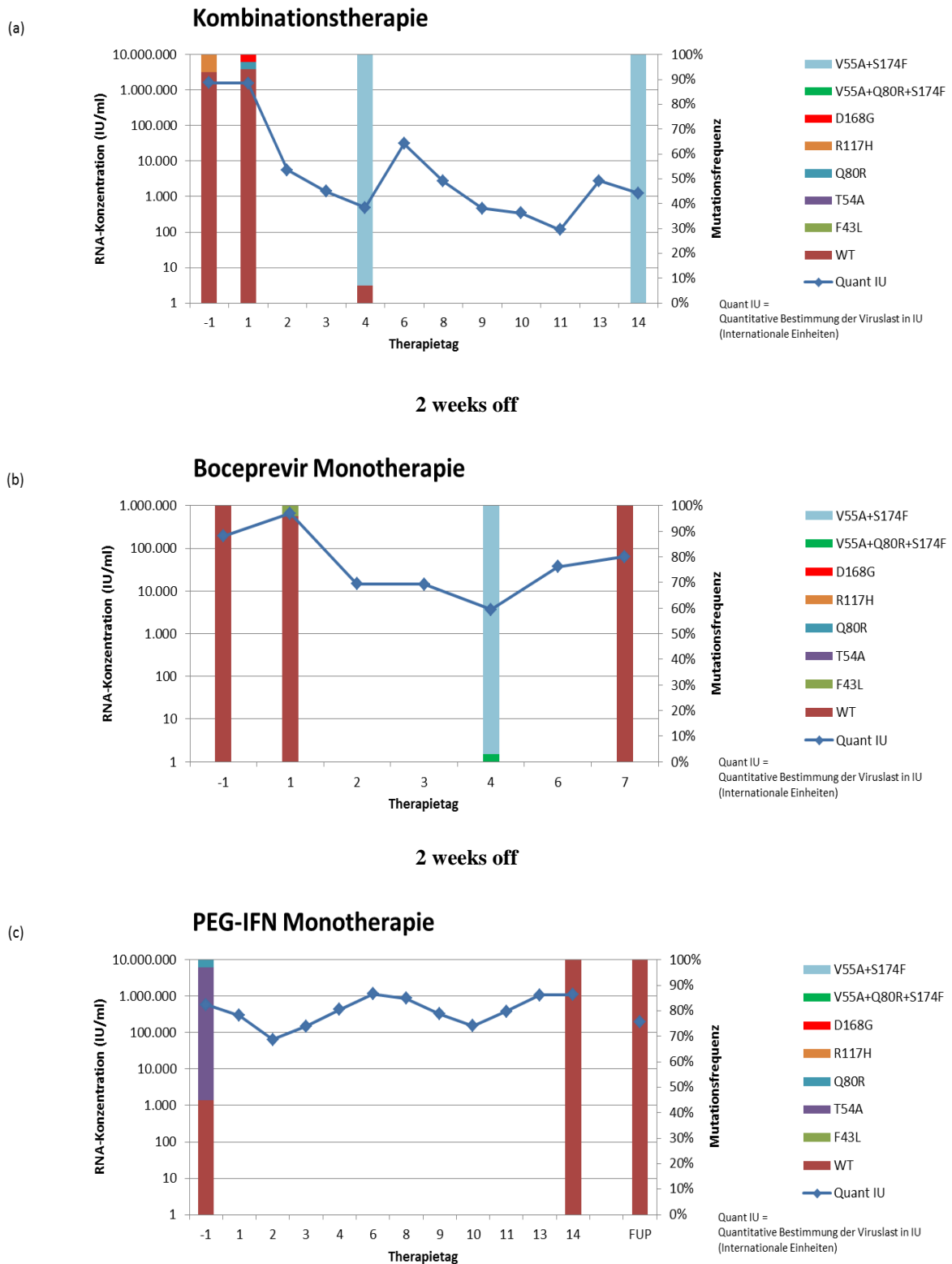


Abb.4.19: (a)-(c) Therapiesequenzen von Patient 207

(a): Kombinationstherapie

(b): Boceprevir Monotherapie

(c): PEG-IFN Monotherapie

*Patient 209*

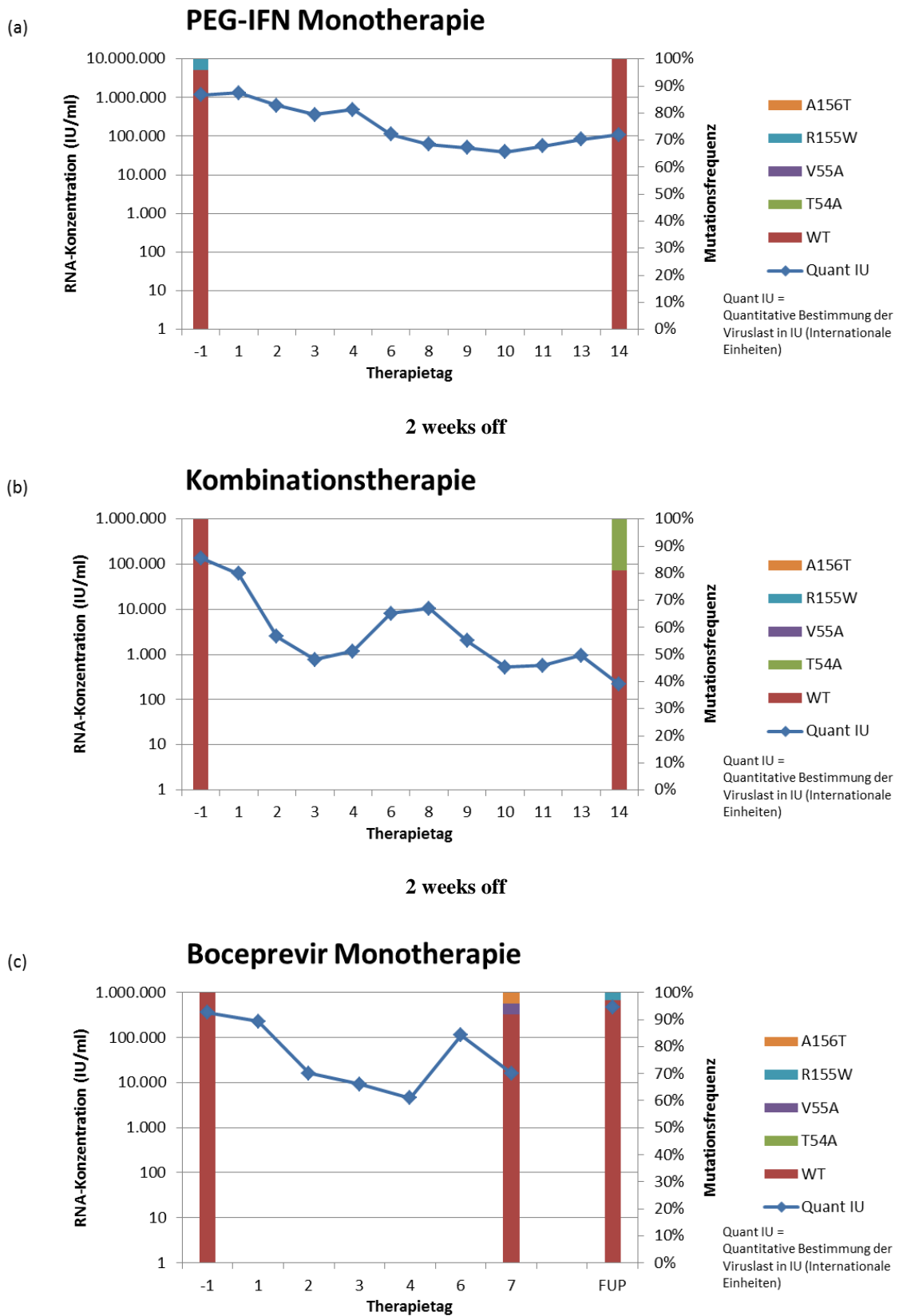


Abb.4.20: (a)-(c) Therapiesequenzen von Patient 209

(a): PEG-IFN Monotherapie

(b): Kombinationstherapie

(c): Boceprevir Monotherapie



*Patient 211*

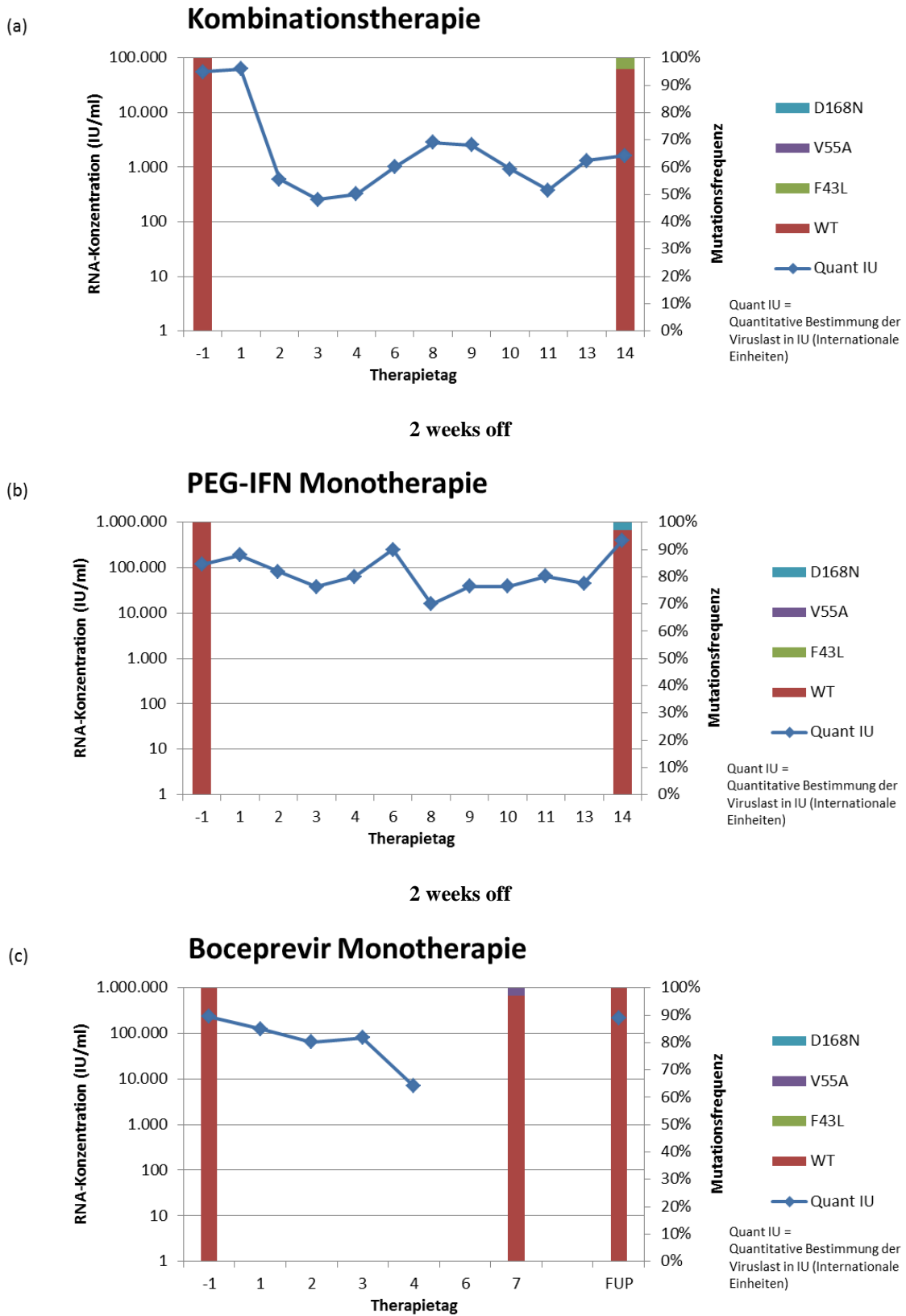


Abb.4.21: (a)-(c) Therapiesequenzen von Patient 211

(a): Kombinationstherapie

(b): PEG-IFN Monotherapie

(c): Boceprevir Monotherapie

#### **4.2.2.4 Vergleichbares Resistenzspektrum unter beiden Therapiesequenzen**

Bei drei Patienten (201, 206 und 210) waren nach Beendigung der ersten und zweiten Behandlungsperiode mit Boceprevir vergleichbare Resistenzprofile zu beobachten. Zwei Patienten in dieser Gruppe (Patienten 201 und 210) wurden zunächst mit einer Boceprevir Monotherapie behandelt, Patient 206 hingegen mit einer Kombinationstherapie. Hier konnten Einzelmutationen an Positionen V36 und R155 bei Patient 201 sowie F43 bei Patient 210, die mit einer Frequenz von 3 – 7 % nach Beendigung der ersten Therapiesequenz mit dem Proteaseinhibitor nachgewiesen wurden, in gleicher Häufigkeit nach Beendigung der Zweittherapie detektiert werden. Bei Patient 210 war dies der Fall nach Beendigung der Kombinationstherapie, hingegen bei Patient 201 erst zum Zeitpunkt der Nachbeobachtungsphase. Lediglich bei Patient 206 waren Varianten an den Positionen Q41 und V170 nach Abschluss der zweiten Behandlungsperiode mit Boceprevir häufiger zu beobachten als nach Ersttherapie. Hier war ein Anstieg von jeweils 3 % auf 11 % zu verzeichnen. Mutationen an bestimmten Positionen, die bei Patienten mit vergleichbarem Resistenzspektrum nach einer sequentiell durchgeführten Boceprevir-Therapie detektiert werden konnten, zeigten insgesamt in dieser Studie nur eine geringe Variabilität in der Häufigkeit ihres Auftretens. Weiterhin war bei allen Patienten sowohl unter der Mono- als auch unter der Kombinationstherapie ein Wiederanstieg der Viruslast zu beobachten.

#### **4.2.2.5 Divergierendes Resistenzspektrum unter beiden Therapiesequenzen**

In der Mehrzahl der Patienten (Patienten 203, 205, 207, 209 und 211) führte eine Re-Therapie mit dem gleichen Proteaseinhibitor zur Selektion eines divergierenden Spektrums an resistenten Varianten. Vier Patienten (203, 207, 209, 211) erhielten zunächst die Kombinationstherapie aus pegIFN- $\alpha$ 2b und Boceprevir gefolgt von einer Monotherapie mit Boceprevir. Lediglich Patient 205 begann in dieser Gruppe mit der Monotherapie-Sequenz. Das Wildtyp-Virus nahm auch hier bei den meisten Patienten während beider Behandlungsperioden den dominierenden Anteil innerhalb der Quasispezies ein. Nach der ersten Therapiesequenz wurden bei den Patienten 205, 209 und 211 Varianten an den Positionen F43, T54, V55, Q80 und R155 in einer Häufigkeit von 3 – 19 % nachgewiesen, nach der zweiten Therapie bildeten Varianten an Positionen V36, V55 und A156 einen Anteil von bis zu 4 % innerhalb der Quasispezies. In der genotypischen Sequenzanalyse der Patienten 203 und 207 waren neben Einzelmutationen auch kombinierte Mutationen nachweisbar. So wurde die Variante R155G aus der ersten Behandlungsperiode von Patient 203 durch eine Mehrfachmutation aus T54S, Q80K, R117H und R155K ersetzt. Patient 207 bildete die Doppelmutation aus V55A mit S174F bereits unter der ersten Therapiesequenz aus. Sie konnte im Verlauf der zweiten Behandlungsperiode mit Boceprevir beobachtet werden, wurde jedoch im Anschluss daran durch die T54A Variante ersetzt. Insgesamt war in dieser Gruppe ebenfalls bei allen Patienten sowohl während der Monotherapie als auch Kombinationstherapie nach anfänglichem Abfall der Virus-RNA ein Wiederanstieg zu beobachten.

#### 4.2.2.6 Patient 208 mit der Major-Variante V55A vor Therapie

Eine Sonderstellung in der Auswertung der Resistenzprofile wurde von Patient 208 eingenommen. Hier waren bereits vor der ersten Therapiesequenz mit Boceprevir in allen Sequenzen der Quasispezies die Variante V55A mit bekannter Resistenz gegenüber Boceprevir nachzuweisen. Bemerkenswert war, dass sie als Doppelmutation mit der neu nachgewiesenen Minor-Variante S174F vorlag. Auch in allen weiteren Messungen war sie in  $> 90$  % aller Sequenzen als Doppelmutation nachzuweisen. Lediglich am ersten Tag der Boceprevir-Therapie wurden 17 % der Quasispezies durch den Wildtyp gebildet. Kombinierte Mutationen konnten während der Monotherapie nur in geringer Frequenz zwischen 3 % und 7 % als V55A/S174F mit R117H, I170M bzw. Q41R beobachtet werden. Auch unter der Kombinationstherapie waren kombinierte Mutationen aus V55A/S174F mit F43L bzw. D168G lediglich in einer Häufigkeit von 4 – 10 % nachzuweisen. Wildtypsequenzen fanden sich nur zu 4 % am 2. Tag der Kombinationstherapie.

### 4.2.3 Viruskinetik unter Therapie

Bei allen neun Studienteilnehmern war unabhängig von der Therapiesequenz die Reduktion der Viruslast unter einer Kombinationstherapie aus pegIFN- $\alpha$ 2b und Boceprevir ausgeprägter als unter Monotherapie mit dem Proteaseinhibitor. Der durchschnittliche maximale Abfall der Viruslast unter Monotherapie lag bei 1,78  $\log_{10}$  Stufen (0,48 – 2,44  $\log_{10}$  Stufen) vom jeweiligen Wert der Baseline, wohingegen unter einer Kombinationstherapie ein Wert von 2,73  $\log_{10}$  Stufen (1,19 – 4,12  $\log_{10}$  Stufen) erreicht wurde.

#### 4.2.3.1 Therapiesequenz Monotherapie – Kombinationstherapie

Innerhalb der ersten drei Therapietage unter Monotherapie war ein rascher Abfall der Viruslast um durchschnittlich 1,44  $\log_{10}$  Stufen (0,41 – 2,44  $\log_{10}$  Stufen) zu beobachten. Der Tiefstwert wurde zwischen dem dritten und sechsten Tag erreicht und betrug im Durchschnitt 1,63  $\log_{10}$  Stufen (0,48 – 2,44  $\log_{10}$  Stufen). Unter der darauf folgenden Kombinationstherapie war die Abnahme der RNA-Konzentration ausgeprägter als unter der Monotherapie und lag am dritten Tag durchschnittlich bei 2  $\log_{10}$  Stufen (1,19 – 2,94  $\log_{10}$  Stufen). Der mittlere maximale Abfall der Viruslast betrug dabei 2,61  $\log_{10}$  Stufen (1,19 – 3,65  $\log_{10}$  Stufen). Lediglich im Zeitraum zwischen dem 4. und 6. Therapietag war unter der Monotherapie ein stärkerer Abfall der Viruslast zu erzielen als im selben Zeitraum während der Kombinationstherapie. Bei allen Patienten war sowohl unter Mono- als auch Kombinationstherapie im Verlauf ein Wiederanstieg der Viruslast zu beobachten. In der folgenden Abbildung 4.22 ist die Änderung der Viruslast unter Monotherapie mit anschließender Kombinationstherapie graphisch dargestellt.

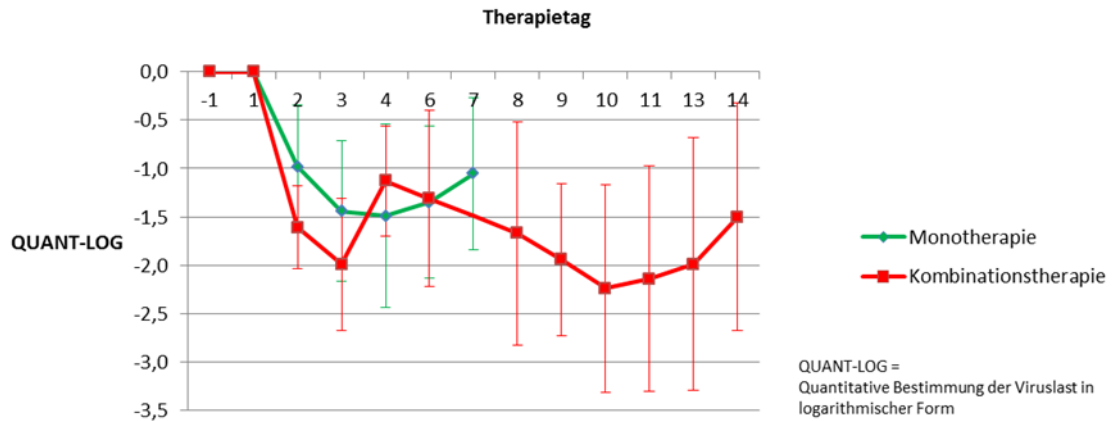


Abb.4.22: Therapiesequenz Monotherapie mit anschließender Kombinationstherapie

Die Markierungen auf der Kurve entsprechen den Zeitpunkten der Konzentrationsbestimmung der Viruslast. Dabei werden Änderungen der Viruslast unter Therapie in log-Einheiten zu jedem Zeitpunkt als Durchschnittswerte (Patienten 201, 205, 208 und 210) angegeben. Die Längsbalken zu jedem Messzeitpunkt stellen die Standardabweichung dar.

Das geringste Ansprechen auf die Therapie zeigte Patient 208 mit der präexistenten Doppelmutation V55A/S174F. Hier betrug die maximale Abnahme der Virus-RNA lediglich 0,48  $\log_{10}$  Stufen unter Monotherapie und 1,19  $\log_{10}$  Stufen am zweiten Tag der Kombinationstherapie. In Abbildung 4.23 wird die virologische Antwort auf die Therapie für jeden Patienten gesondert dargestellt.

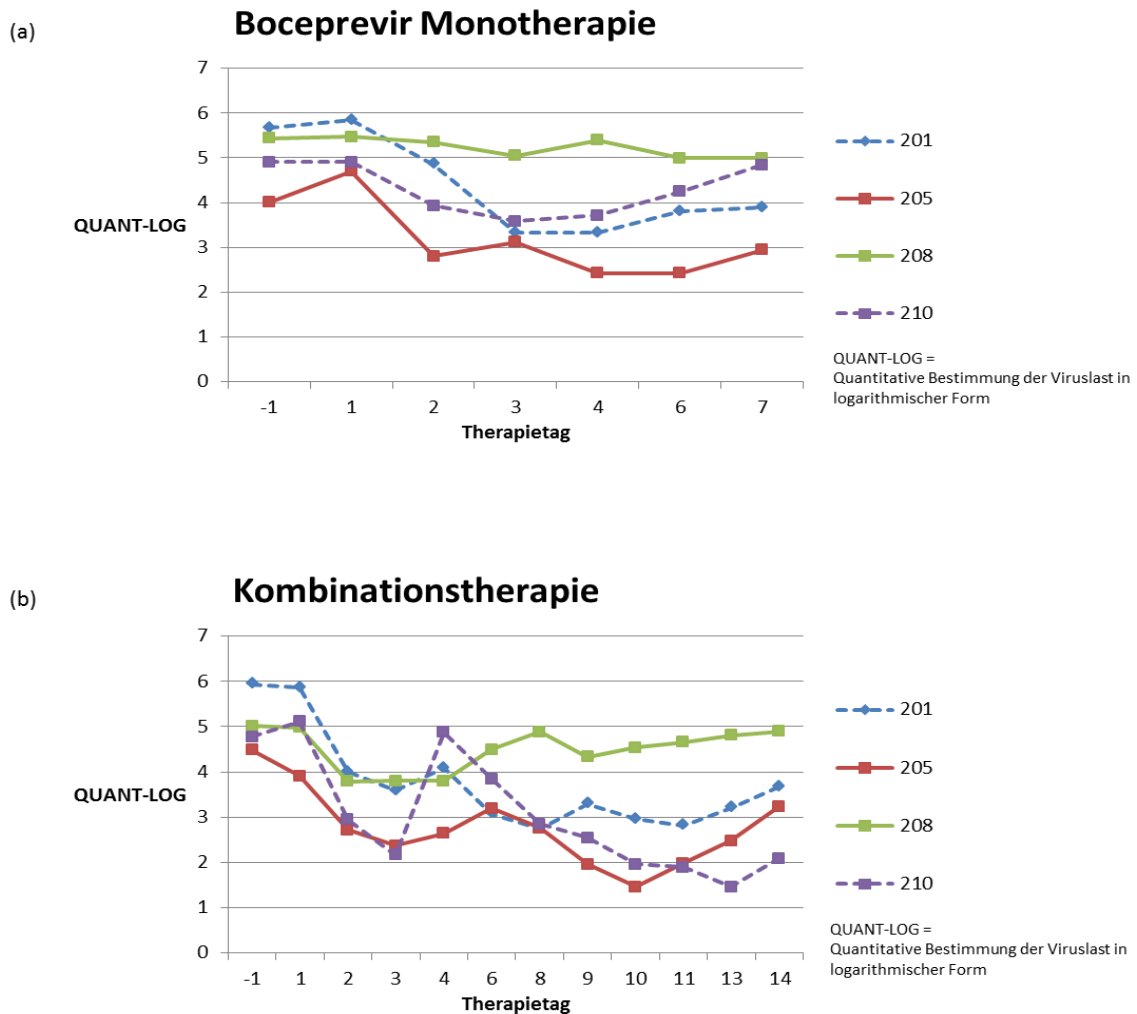


Abb.4.23: (a)-(b) Therapiesequenz Monotherapie (a) mit anschließender Kombinationstherapie (b) in Einzeldarstellung.

Die Markierungen auf der Kurve entsprechen den Zeitpunkten der Konzentrationsbestimmung der Viruslast. Die Viruslast unter Therapie wird in logarithmischer Form zu jedem Zeitpunkt angegeben. Patienten mit Re-Selektion von resistenten Varianten nach zweifacher Exposition gegenüber Boceprevir werden hier mit gestrichelter Linie dargestellt.

#### 4.2.3.2 Therapiesequenz Kombinationstherapie – Monotherapie

Innerhalb der ersten drei Therapietage während der Kombinationstherapie war ein rascher Abfall der Viruslast bei allen fünf Patienten um durchschnittlich  $2,5 \log_{10}$  Stufen ( $1,91 - 3,04 \log_{10}$  Stufen) von der Ausgangsviruslast zu beobachten, der mittlere maximale Abfall der Viruskonzentration ergab einen Wert von  $2,83 \log_{10}$  Stufen ( $2,39 - 4,12 \log_{10}$  Stufen). Während der darauf folgenden Monotherapie lag der durchschnittliche Abfall der Viruslast nach dem dritten Therapietag bei  $1,29 \log_{10}$  Stufen ( $0,19 - 1,88 \log_{10}$  Stufen) im Vergleich zu einem mittleren maximalen Durchschnittswert von  $1,9 \log_{10}$  Stufen ( $1,26 - 2,44 \log_{10}$  Stufen). Auch hier war bei allen Patienten sowohl während der ersten als auch zweiten Exposition gegenüber dem Proteaseinhibitor nach anfänglich raschem Abfall ein Wiederanstieg der Viruslast

zusehen. In dieser Therapiesequenz war die Kombinationstherapie während der gesamten Therapiedauer der Monotherapie überlegen.

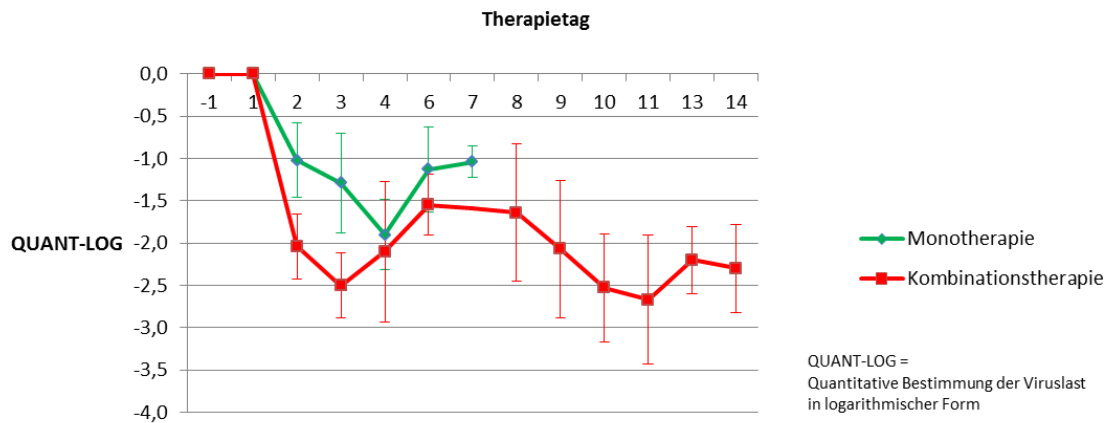


Abb.4.24: Therapiesequenz Kombinationstherapie mit anschließender Monotherapie

Die Markierungen auf der Kurve entsprechen den Zeitpunkten der Konzentrationsbestimmung der Viruslast. Dabei werden Änderungen der Viruslast unter Therapie in log-Einheiten zu jedem Zeitpunkt als Durchschnittswerte (Patienten 203, 206, 207, 209 und 211) angegeben. Die Längsbalken zu jedem Messzeitpunkt stellen die Standardabweichung dar.

In der folgenden Abbildung 4.25 ist erneut für jeden Patienten die virologische Antwort unter den Therapiesequenzen separat dargestellt.

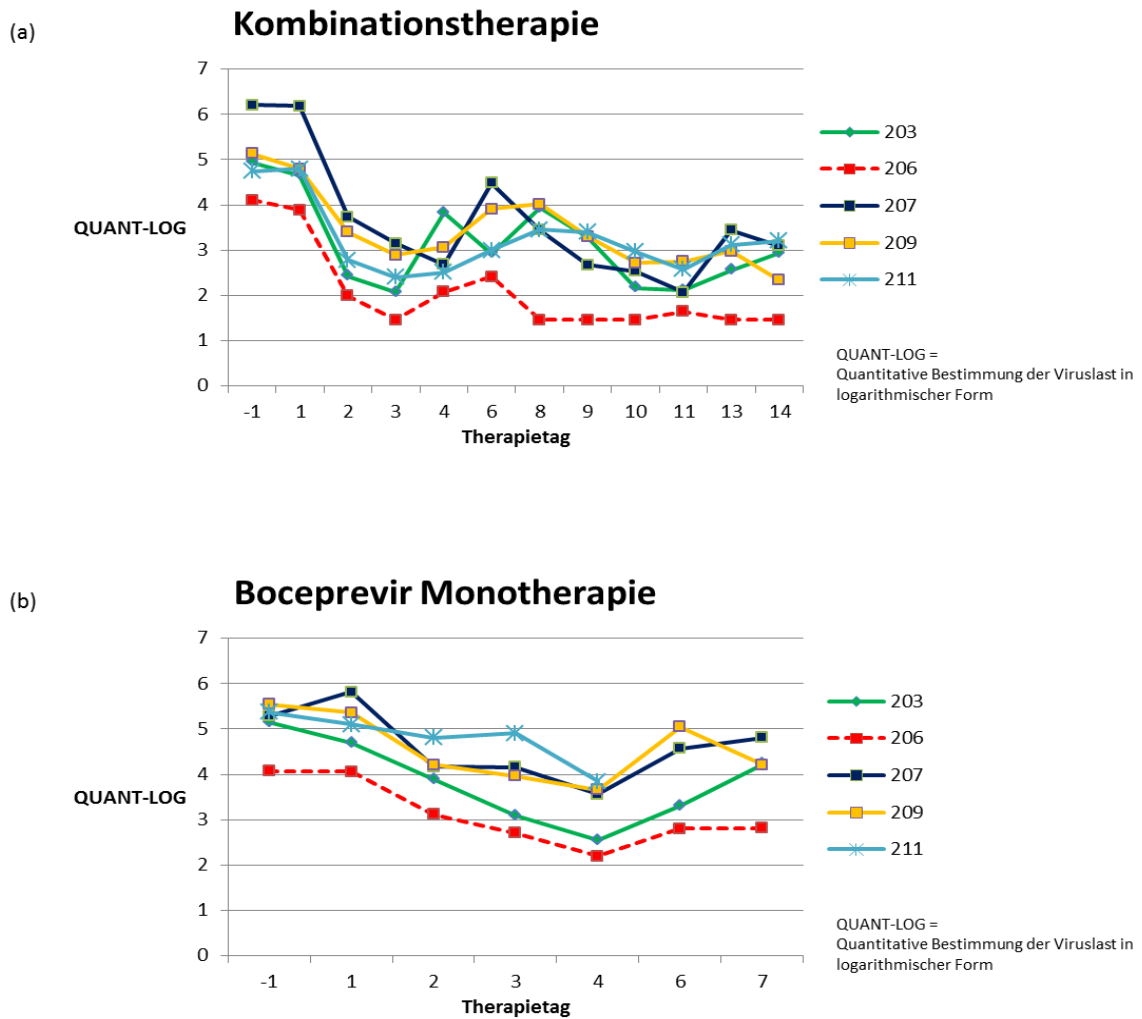


Abb.4.25: (a)-(b) Therapiesequenz Kombinationstherapie (a) mit anschließender Monotherapie (b) in Einzeldarstellung.

Die Markierungen auf der Kurve entsprechen den Zeitpunkten der Konzentrationsbestimmung der Viruslast. Die Viruslast unter Therapie wird in logarithmischer Form zu jedem Zeitpunkt angegeben. Patienten mit Re-Selektion von resistenten Varianten nach zweifacher Exposition gegenüber Boceprevir werden hier mit gestrichelter Linie dargestellt.

#### 4.2.3.3 Vergleich beider Therapiesequenzen

Unabhängig von der Abfolge der Therapiesequenzen war die Reduktion der Viruslast unter der Kombinationstherapie ausgeprägter als unter der Monotherapie mit Boceprevir. So fiel die Reduktion der HCV-RNA unter Kombinationstherapie im Mittel um 0,98  $\log_{10}$  Stufen höher aus bei denjenigen Patienten, die zunächst die Monotherapie erhielt, bzw. 0,93  $\log_{10}$  Stufen, wenn mit der Kombinationstherapie begonnen wurde. Auf das Ausmaß der Reduktion der Viruslast selbst hatte die Reihenfolge der Therapiesequenzen keine Auswirkung. Auch ein Zusammenhang zwischen der Viruskinetik und dem Spektrum an selektierten Resistenzen nach zweimaliger Exposition gegenüber Boceprevir konnte nicht hergestellt werden. Im Mittel war bei Patienten, in welchen nach der zweiten Therapie mit Boceprevir ein ähnliches Resistenzprofil beobachtet wurde

(Patient 201, 206 und 210), die Reduktion der Viruslast unter Monotherapie nur unwesentlich geringer im Vergleich zu Patienten mit divergierendem Spektrum an resistenten Varianten (1,88  $\log_{10}$  Stufen vs. 1,99  $\log_{10}$  Stufen), unter einer Kombinationstherapie hingegen etwas ausgeprägter (3,08  $\log_{10}$  Stufen vs. 2,83  $\log_{10}$  Stufen). Auch eine Abhängigkeit vom Genotyp konnte nicht hergestellt werden. Nach Beendigung der Monotherapie war die Reduktion der Viruslast bei Patienten mit Genotyp 1a durchschnittlich 2,1  $\log_{10}$  Stufen, bei Patienten mit Genotyp 1b mit 1,65  $\log_{10}$  Stufen etwas geringer. Nach der Kombinationstherapie war unter Berücksichtigung des Genotyps kein Unterschied zu beobachten. Hier lag sowohl bei Patienten mit Genotyp 1a als auch Genotyp 1b der Wert für den Abfall der HCV-RNA zwischen 2,7 und 2,8  $\log_{10}$  Stufen.



## 5 Diskussion

Mit der Zulassung der Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir im Jahr 2011 in Kombination mit pegIFN- $\alpha$ 2a/2b und Ribavirin zur Therapie der chronischen Hepatitis C mit dem Genotyp 1 war ein bedeutungsvoller Fortschritt in der Therapie dieser Erkrankung gelungen. Sie waren die ersten direkt antiviral wirkenden Medikamente, die in der Behandlung der chronischen Hepatitis C Anwendung fanden. So konnte in den Zulassungsstudien beider Medikamente ein anhaltendes virologisches Ansprechen bei 63 – 75 % behandlungsnaiver (Jacobson et al., 2011; Poordad et al., 2011; Sherman et al., 2011) sowie durchschnittlich 59 – 66 % vorhertherapierter Patienten (Bacon et al., 2011; Zeuzem et al., 2011), die mit HCV Genotyp 1 infiziert waren, belegt werden. Viele Patienten konnten unter bestimmten Voraussetzungen mit der neu etablierten Standardtherapie die Therapiedauer verkürzen, ohne die Wahrscheinlichkeit für einen andauernden Therapieerfolg zu mindern. Der Einsatz von Proteaseinhibitoren begünstigt jedoch die Selektion resistenter Viren, die einen Replikationsvorteil gegenüber dem Wildtyp erfahren und somit zum Therapieversagen führen können. Eine Selektion resistenter Varianten wurde bereits in der Therapie mit direkt antiviralen Medikamenten beobachtet, die beispielsweise gegen das HI-Virus oder Hepatitis B Virus gerichtet sind, und klinisch mit einer verminderten antiviralen Wirksamkeit bis hin zu einem Therapieversagen in Verbindung gebracht werden. In einer 14 tägigen Monotherapie Studie mit dem Proteaseinhibitor Telaprevir wurden innerhalb der NS3 Protease an den Positionen V36, T54, R155 und A156 Mutationen mit einem erhöhten Resistenzniveau unterschiedlichen Ausmaßes gegenüber Telaprevir identifiziert (Sarrazin et al., 2007a). In den Zulassungsstudien beider Proteaseinhibitoren konnten lediglich in bis zu 77 % der nicht erfolgreich therapierten Patienten bisher bekannte Resistenzen nachgewiesen werden (Barnard et al., 2013; Sullivan et al., 2013), so dass die Existenz weiterer bisher nicht beschriebener Resistenzmechanismen angenommen werden muss. Neben den bekannten Resistenzen war eine hohe Anzahl minorer Varianten innerhalb der Quasispezies zu sehen, deren Bedeutung für eine Resistenzentwicklung nicht bekannt ist. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung minorer Varianten hinsichtlich Resistenzentwicklung gegenüber Proteaseinhibitoren untersucht. Die Komplexität der viralen Quasispezies unter Therapie mit einer direkt antiviral wirkenden Medikation lässt weitere bisher nicht bekannte Resistenzmutationen annehmen. Drei bis sieben Monate nach Beendigung der Studie mit Telaprevir wurden hoch-resistente Varianten rascher durch den Wildtyp ersetzt als Viruspopulationen mit geringerem Resistenzniveau gegenüber Telaprevir (Sarrazin et al., 2007a). Auch mehrere Jahre nach einer Ersttherapie mit einem Proteaseinhibitor waren therapieresistente Varianten nachzuweisen (Susser et al., 2011). Derzeit gibt es für Patienten mit einem Therapieversagen unter Therapie mit einer direkt antiviral wirkenden Medikation keine eindeutige Empfehlung, welche Medikamente bzw. welche Kombination an Medikamenten verschiedener

Wirkstoffgruppen für eine Zweittherapie eingesetzt werden sollen. Bisher ist nicht ausreichend bekannt, welche Wirkungen eine Zweittherapie mit dem gleichen Proteaseinhibitor bzw. einem Präparat gleicher Wirkstoffklasse auf die Resistenzentwicklung sowie das virale Ansprechen ausübt. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse einer sequentiell verabreichten Therapie mit dem Proteaseinhibitor Boceprevir vorgestellt.

## **5.1 Analyse komplexer Mutationsmuster unter Monotherapie mit Proteaseinhibitoren**

### **5.1.1 Genotypische Sequenzanalyse nach Monotherapie mit Boceprevir**

In die Auswertung einer Phase I Studie mit Boceprevir als Monotherapie über 14 Tage gehen Ergebnisse von 22 Patienten ein, welche als Non-Responder aus einer vorangegangenen Therapie mit pegIFN ± Ribavirin hervorgegangen sind. Die Studie wurde randomisiert, doppelblind und Placebo-kontrolliert durchgeführt und jedem Patienten Boceprevir in der Dosierung von 400 mg zweimal bzw. dreimal täglich verabreicht. Bei Beendigung der Therapie sowie 14 Tage nach der letzten Einnahme des Proteaseinhibitors wurden für jeden Patienten durchschnittlich 47 Sequenzen erstellt und mit der Software Mutation Surveyor V2.52 (SoftGenetics, State College, PA) ausgewertet. Um Interpretationsfehler der Software in der Analyse der Nukleinsäuresequenz und damit einer fehlerbehafteten Zuordnung von Mutationen möglichst zu vermeiden, wurde jede einzelne Sequenz insbesondere an den Schlüsselpositionen mit der zugehörigen Konsensussequenz manuell auf Übereinstimmungen bzw. Abweichungen verglichen. Um die Heterogenität in der Zusammensetzung der Quasispezies unter Therapie zu charakterisieren, wurden alle Varianten mit einer Häufigkeit von mind. 5 % im Vergleich zur Konsensussequenz identifiziert. Anhand dieser Kriterien konnten für 51 Aminosäurepositionen innerhalb der Sequenz der NS3-Protease Mutationen selektioniert werden. In einer weiteren Phase I Studie mit dem Proteaseinhibitor Telaprevir als Monotherapie über 14 Tage konnten nach Therapie an 31 Positionen innerhalb der NS3 Protease Varianten mit einer Häufigkeit von mind. 5 % selektioniert werden (Sarrazin et al., 2007a). Eine Erklärung für die höhere Anzahl an Varianten mit einem Anteil von mind. 5 % innerhalb der Quasispezies unter Boceprevir könnte in der geringeren Dosierung von Boceprevir zu sehen sein (400 mg zweimal bzw. dreimal täglich). Telaprevir wurde hingegen zu je 450 mg alle 8h, 750 mg alle 8h oder 1250 mg alle 12h verabreicht. Die geringere Dosierung von Boceprevir könnte einen geringeren Selektionsdruck aufbauen, was die Selektion einer höheren Anzahl an Varianten mit guter Replikationsfähigkeit begünstigt. Eine Monotherapie mit Telaprevir in der Dosierung von 750 mg dreimal täglich über 14 Tage führte bei Non-Respondern, die mit dem Genotyp 1 infiziert waren, zu einem mittleren Abfall der Viruslast um 4,4 log<sub>10</sub> Stufen, hingegen

war in einer weiteren Studie mit Boceprevir (400 mg dreimal täglich) lediglich ein Abfall von 1,61  $\log_{10}$  Stufen zu belegen (Reesink et al., 2006; Sarrazin et al., 2007b). Telaprevir in der Dosierung von 750 mg dreimal täglich könnte also einen höheren Wirkspiegel im Blut der Patienten aufbauen als Boceprevir in der Dosierung von 400 mg dreimal täglich und somit eine stärkere antivirale Wirkung entfalten. Die Unterschiede in der antiviralen Wirkung könnten auch in der Pharmakokinetik beider Präparate selbst begründet sein. In keiner Sequenz war die unter *in vitro* Bedingungen vorgefundene hochresistente A156T Mutation zu belegen. Auch kombinierte Resistenzmutationen (V36M+T54S, T54S+A156S, V36A+R155K, T54S/A+R155K) waren nur in vereinzelten Klonen nachzuweisen. Möglicherweise wurde die Dosierung von Boceprevir in dieser Studie (400 mg zweimal oder dreimal täglich) zu gering angesetzt, worunter kein zur Selektion von A156T ausreichend hoher Selektionsdruck aufgebaut werden konnte und somit niedrig-resistenten Varianten gegenüber dem Wildtyp einen Selektionsvorteil verschaffte. Auch für die seltene Selektion gekoppelter Mutationen wäre dies eine Begründung, da die niedrige Resistenz von einer ausreichenden viralen fitness begleitet wird und sich somit keine kompensatorischen replikationssteigernden Mutationen ausgebildet haben.

### **5.1.2 Identifizierung neuer Varianten durch ein sequenzanalytisches Modell und Phänotypisierung**

Die Heterogenität der viralen Quasispezies nach Therapie mit einem Proteaseinhibitor über 14 Tage einerseits und der oftmals fehlende Nachweis resistenter Varianten nach Therapieversagen (Barnard et al., 2013; Sullivan et al., 2013) lässt annehmen, dass weitere bisher nicht bekannte Resistenzmechanismen des Hepatitis C Virus existieren. Eine fehlende Korrekturfunktion der RNA-abhängigen RNA-Polymerase sowie der hohe Umsatz des Virus mit einer täglichen Neubildung von bis zu  $10^{12}$  Virionen (Neumann et al., 1998) lässt die tägliche Entstehung jeder möglichen Variante und somit auch jeder resistenten Variante annehmen. Die Schwierigkeit besteht in der Identifizierung möglicher Resistenzmutationen aus der Vielzahl an Wildtypvarianten. Unter der Voraussetzung, dass mögliche resistente Virusvarianten einen Anteil von mindestens 5 % an der Quasispezies bilden und bei mind. einem Patienten nachweisbar sind, konnten relevante Aminosäure-Positionen innerhalb der NS3 Protease unter Monotherapie mit Telaprevir identifiziert werden (Sarrazin et al., 2007a). In der hier vorliegenden Arbeit wurden in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Informatik in Saarbrücken Sequenzen der NS3 Protease aus zwei Phase I Studien einer Monotherapie mit Proteaseinhibitoren auf charakteristische wiederkehrende Muster an Veränderungen innerhalb der Nukleinsäuresequenz unter Therapie analysiert. Der „multivariate a priori pattern mining approach“ (siehe Kap. 4.1.3, S. 78) verfolgte das Ziel, wiederkehrende Muster an Sequenzvariationen zu detektieren und somit mögliche neue Resistenzmutationen zu identifizieren. Anhand dieser Methodik konnten an vier Positionen innerhalb der NS3 Protease Mutationen identifiziert werden, deren Bedeutung hinsichtlich Resistenzentwicklung unter

Therapie mit einem Proteaseinhibitor bisher unbekannt war. Sie wurden zur weiteren phänotypischen Charakterisierung in das HCV Con-1b Replikon eingefügt und die  $IC_{50}$ -Werte für die Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir bestimmt. Die n-fache Erhöhung des  $IC_{50}$  gegenüber dem  $IC_{50}$  des Wildtyps diente der Bestimmung des Resistenzniveaus. Zur Bestimmung einer möglichen Kreuzresistenz wurden weitere Proteaseinhibitoren (Faldaprevir, Danoprevir und Simeprevir) im Replikon untersucht. Die Ergebnisse finden sich in den Abbildungen 4.3 bis 4.9 (S. 83 bis 86). Die untersuchten Mutationen A87T, R117H und S174F führen gegenüber Boceprevir zu einem niedrig bis mittlerem Resistenzniveau (2,1 – 5,8-fache Erhöhung des  $IC_{50}$ ). Zu einer Kreuzresistenz führte lediglich die S174F Variante (Telaprevir: 2,3-fach erhöhter  $IC_{50}$ ; Simeprevir: 6,8-fach erhöhter  $IC_{50}$ ). Die Variante V132A hingegen trug gegenüber den getesteten Proteaseinhibitoren zu keiner Resistenzentwicklung bei. Die neuen Varianten mit niedrigem bis mittlerem Resistenzniveau wurden unter einer zweimal bzw. dreimal täglichen Gabe von 400 mg Boceprevir selektiert. Zugelassen wurde Boceprevir in der Dosierung von dreimal täglich 800 mg, wofür jedoch keine Daten einer Monotherapie existieren. Es wäre denkbar, dass die höhere Dosierung einen höheren Selektionsdruck auf das Hepatitis C Virus aufbaut und zur Suppression dieser neuen Minor Varianten führt.

Lenz et al konnten durch die Technik des Pyrosequencing Mutationen in einer Häufigkeit von weniger als 1 % nachweisen, die mit der Methodik der Klonierung und Sequenzierung entgangen wären (Lenz et al., 2012). Durch eine eingeschränkte Replikationsfähigkeit könnten innerhalb der Patientenpopulation relevante resistente Virusvarianten vorliegen, die mit der hier angewendeten Methodik unterhalb der Nachweisgrenze geblieben sind.

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass im Rahmen dieser Studie lediglich die Protease-Domäne von NS3 untersucht wurde. Die NS3 Helikase bzw. der NS4A Co-Faktor, welche für die Funktion der NS3/4A Protease erforderlich sind, wurden hier nicht untersucht. In einer aktuellen Studie konnte in der NS3 Helikase Mutationen identifiziert werden die Einfluss auf die RNA-Replikation nehmen (Stross et al., 2016).

### 5.1.3 *In silico* Strukturanalyse der neuen Mutationen

Zur phänotypischen Charakterisierung von Mutationen werden diese im Replikon-Modell untersucht und über Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes im Vergleich zum Wildtyp ihr Resistenzniveau bestimmt. Um die Resistenzmechanismen auf molekularer Ebene zu verstehen, welche zu einem relevanten Anstieg der  $IC_{50}$ -Werte im Replikon führen, sind weitere Untersuchungen erforderlich. In einem Strukturmodell der NS3 Protease sind die Aminosäuren R155 und A156 nahe der P2-Bindungstasche der Substratbindungsstelle gelegen und somit nahe der katalytischen Triade des aktiven Zentrums der NS3 Protease. Da die Aminosäure A156 direkt an der Substratbindung beteiligt ist, führen Mutationen dieser Aminosäure zur Ausbildung eines hohen Resistenzniveaus

(Sarrazin et al., 2007a). Mutationen an den Positionen V36 bzw. T54 hingegen führen zu keiner direkten Interaktion mit dem Proteaseinhibitor Telaprevir, haben jedoch Konformationsänderungen und somit Änderungen der geometrischen Ausrichtung der Substratbindungstasche zur Folge, welches die Bindungsfähigkeit des Proteaseinhibitors herabsetzt. Eine herabgesetzte Bindung der Cyclopropylgruppe von Telaprevir innerhalb der Bindungstasche resultiert in einer Resistenzentwicklung von niedrigem bis mittlerem Niveau (Welsch et al., 2008). Die Variante V55A vermittelt gegenüber dem Proteaseinhibitor Boceprevir ein mittleres Resistenzniveau. In einer RIN (residue interaction network) basierter Analyse wurde für die Position Val55 eine regulatorische Funktion für die Struktur der NS3 Protease zugesprochen. So führt die Mutation V55A zu molekularen Änderungen im Bereich der Substratbindungstasche, was ein erhöhtes Resistenzniveau erklärt (Welsch et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit konnte für die Varianten A87T, R117H und S174F gegenüber Proteaseinhibitoren ein niedriges bis mittleres Resistenzniveau (2,1- bis 6,8-facher Anstieg des  $IC_{50}$ ) bestimmt werden. Es wäre somit zu vermuten, dass diese Aminosäuren nicht direkt mit dem Proteaseinhibitor interferieren, sondern zu Konformationsänderungen der Substratbindungstasche führen und somit das Bindungsverhalten des Proteaseinhibitors negativ beeinflussen. In Abbildung 5.1 ist die NS3 Protease als Ribbon Modell in Interaktion mit dem Proteaseinhibitor Boceprevir dargestellt. Zusätzlich sind die Positionen der drei neu identifizierten Varianten markiert.

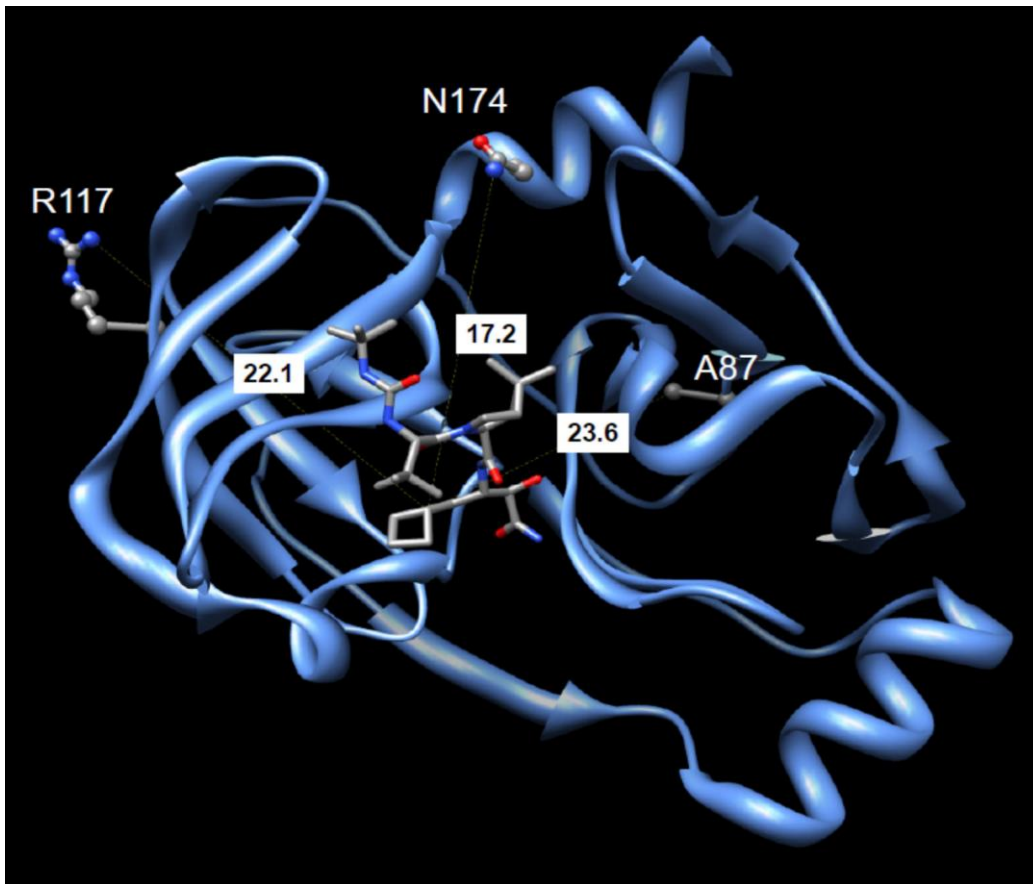


Abb. 5.1: Ribbon Modell zur Struktur der NS3 Protease 20C8 der Proteindatenbank (RCSB PDB) mit Bindung des Proteaseinhibitors Boceprevir

Die Positionen der drei neu identifizierten Varianten A87, R117 und N174 sind innerhalb des Strukturmodells als Kugel-Stab-Modell abgebildet. Ihre Abstände zur P1-Gruppe des Liganden sind in der Maßeinheit Ångström in einem weißen Kästchen angegeben.

Die phänotypische Analyse der neuen Resistenzmutationen im Replikon-Modell erbrachte für alle drei neuen Varianten ein gering höheres Resistenzniveau für Boceprevir im Vergleich zum Proteaseinhibitor Telaprevir. Eine Erklärung hierfür lieferte eine RIN (residue interaction network) basierte Analyse durch Bestimmung der kürzesten Distanz von der entsprechenden Aminosäureposition zum Proteaseinhibitor. Als Grundlage hierfür dienten von der Proteindatenbank RCSB PDB die kristallinen Strukturen 2OC8 bzw. 2P59 für eine Strukturanalyse. Sie enthalten die NS3 Protease eines HCV Genotyp 1a in Bindung mit Boceprevir (2OC8) bzw. eines Telaprevir-ähnlichen Liganden (2P59). Hier konnte das höhere Resistenzniveau der neuen Varianten an Positionen A87, R117 und N174 gegenüber Boceprevir auf Längenunterschiede in der kürzesten Verbindung zum Proteaseinhibitor unter Berücksichtigung nicht-kovalenter Verbindungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals Kräfte zurückgeführt werden. Auch die Interaktion mit unterschiedlichen Aminosäuren der NS3 Protease mit dem Proteaseinhibitor erscheint hierfür von Bedeutung zu sein.

Für die V55A Variante konnte im Vergleich zum Wildtyp eine höhere Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen als Ursache für ein erhöhtes Resistenzniveau nachgewiesen werden (Welsch et al., 2012). Unter *in vitro* Bedingungen war eine deutliche Minderung der Virusproduktion zu belegen, was eine inverse Korrelation von Resistenz und viraler fitness bestätigt (Sarrazin et al., 2007a). In einer anderen Studie unter Verwendung eines Volllängenkonstruktes des HCV Genotyp 1a konnte dies jedoch nicht bestätigt werden, obwohl allgemein die meisten bekannten Resistenzmutationen einen nachteiligen Einfluss auf die Replikation viraler RNA ausüben (Shimakami et al., 2011). Neben dem Ausmaß der Resistenzentwicklung ist jedoch die Replikationsfähigkeit einer Variante ein wichtiger Faktor für die Wahrscheinlichkeit ihrer Selektion sowie Persistenz unter Therapie (Shimakami et al., 2011). Die Auswirkungen eines niedrig bis mittlerem erhöhtem Resistenzniveau der neu identifizierten RAV's an den Positionen A87, R117 und S174, welches *in vitro* im Replikon-Modell unter Einfluss von Proteaseinhibitoren belegt werden konnte, auf die Replikationsfähigkeit des Virus ist nicht bekannt. Um zu prüfen, wie sich das erhöhte Resistenzniveau der neuen Mutationen auf die Funktion der NS3 Protease im Sinne von RNA-Replikation und Zusammenbau infektiöser Viren auswirkt, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

## 5.2 Genotypische Resistenzanalyse einer sequentiell durchgeführten Therapie mit Boceprevir

Unter einer Behandlung mit Boceprevir können Patienten mit chronischer Hepatitis C resistente Varianten selektionieren, welche eine verminderte antivirale Wirksamkeit zur Folge haben. Niedrig-resistente Varianten haben aufgrund ihrer replikativen Fitness das Potential im Langzeitverlauf zu persistieren, wohingegen Varianten mit hoher Resistenz aufgrund ihrer herabgesetzten Replikationsfähigkeit bereits nach drei bis sieben Monaten überwiegend durch den Wildtyp ersetzt wurden (Sarrazin et al., 2007a). Etwa vier Jahre nach Beendigung von Phase I Studien mit Telaprevir und Boceprevir waren noch vereinzelt Varianten mit unterschiedlichem Resistenzniveau nachzuweisen, wobei ein Zusammenhang mit dem Resistenzprofil bei Beendigung der Therapie nicht hergestellt werden konnte (Susser et al., 2011). Bisher sind Auswirkungen einer erneuten Therapie mit dem gleichen Proteaseinhibitor bzw. einer Substanz der gleichen Wirkklasse auf die Viruskinetik bzw. Dynamik der Quasispezies nach stattgehabter Ersttherapie nur unzureichend beschrieben. Grundlage einer hier vorliegenden Phase Ib Studie, welche randomisiert und nicht verblindet an mehreren Studienzentren durchgeführt wurde, war eine sequentiell durchgeführte Therapie mit Boceprevir mit einer PI-freien Zeit von zwei bis sechs Wochen. Neun Patienten, die mit dem Hepatitis C Virus Genotyp 1 infiziert waren und als Non-Responder aus einer vorausgegangenen Therapie mit Interferon ± Ribavirin hervorgegangen sind (Definition Non-Responder: Abfall der HCV-RNA  $< 2 \log_{10}$  Stufen nach einer Therapie über mind. 12 Wochen),

erhielten zwei sequenziell durchgeführte Therapien mit dem Proteaseinhibitor Boceprevir sowie eine Monotherapie mit pegIFN in variabler Abfolge: Boceprevir (400 mg dreimal täglich) als Monotherapie über eine Woche, pegIFN- $\alpha$ 2b (1,5  $\mu$ g/kg/Woche) als Monotherapie über zwei Wochen und eine Kombinationstherapie aus beiden Medikamenten in entsprechender Dosierung über zwei Wochen. Nach Beendigung jeder Sequenz erfolgte ein therapiefreies Intervall von zwei Wochen (Vermehren et al., 2012b). Aufgrund ihrer günstigen replikativen Eigenschaften und dem Potential zur Langzeitpersistenz könnte ihre erneute Selektion nach einer kurzen Unterbrechung der Therapie mit Boceprevir über einen Zeitraum von zwei bis sechs Wochen angenommen werden.

### 5.2.1 Genotypische Charakterisierung der Konsensussequenzen

Die Konsensussequenzen wurden durch Klonierung und Sequenzierung erstellt, was im Vergleich zur Direktsequenzierung auch eine Analyse gekoppelt auftretender Mutationen ermöglichte. Eine natürlich auftretende Variante mit der Mutation V55A, welche in Kapitel 5.2.4 gesondert diskutiert wird, war mit einer Häufigkeit von 100 % innerhalb der viralen Quasispezies eines Patienten vertreten. Bemerkenswert war, dass sie in jeder Sequenz zusammen mit der neu identifizierten Minor-Variante S174F (5,8-facher  $IC_{50}$  für Boceprevir) vorlag. In geringerer Häufigkeit konnten zwei weitere Varianten selektioniert werden. In einer Sequenz eines Patienten mit Genotyp 1b konnte mit einem Anteil von 4 % innerhalb der Quasispezies an Position 155 der Austausch der Aminosäure Arginin zu Tryptophan (R155W) beobachtet werden. Da bereits an dieser Position low-level Resistenzen gegenüber Boceprevir bekannt sind (R155K/T/Q), wäre ein Einfluss von R155W auf ein Therapieansprechen mit diesem Proteaseinhibitor zu vermuten. Eine weiterführende phänotypische Charakterisierung *in vitro* im Replikon-Modell würde hierüber Aufschluss geben. Interessanterweise wurde die Konsensussequenz dieses Patienten an Position 174 durch ein Alanin gebildet. Im Falle einer replikationsmindernden Funktion von R155W könnte die A174 Variante einen günstigen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit ausüben. In einem weiteren Patienten, der mit dem Subtyp 1b infiziert war, bildete die Variante R117H einen Anteil von 7 % der Quasispezies. Auch diese Variante konnte im Rahmen der „a priori“ Studie als neue Minor-Variante mit niedriger Resistenz gegenüber Boceprevir (2,6-facher  $IC_{50}$ ) identifiziert werden. Eine ausführliche Diskussion präexistierender Varianten findet sich in Kapitel 5.2.4.

### 5.2.2 Genotypische Charakterisierung nach Therapie und Re-Therapie mit dem gleichen Proteaseinhibitor

Die Anordnung der Therapiesequenzen, mit welcher neun Patienten aus dem Studienkollektiv behandelt wurden, kann Tabelle 4.1 auf Seite 89 entnommen werden. Vier Patienten wurden zunächst mit Boceprevir als Monotherapie behandelt gefolgt von einer Kombinationstherapie aus



Boceprevir und pegIFN, fünf Patienten in umgekehrter Reihenfolge. Aus der HIV-Forschung ist bekannt, dass die Informationen resistenter Varianten als Provirus-DNA in das humane Genom beispielsweise der T-Gedächtniszellen integriert werden und ihre erneute Selektion unter Therapie mit der direkt antiviral wirkenden Substanz zum Wirkverlust führen können (Boucher et al., 2005). Ein solches Reservoir existiert jedoch für das Hepatitis C Virus nicht. Abhängig von der Replikationsfähigkeit resistenter Viren besteht jedoch das Potential, im Langzeitverlauf zu persistieren und sich nachteilig auf eine erneute Therapie auszuwirken.

Unter einer Ersttherapie mit Boceprevir als Monotherapie wurden Varianten mit niedrigem Resistenzniveau gegenüber Boceprevir in Form von V36M, Q41R, F43S, T54A, V55A sowie R155T/Q mit einer Häufigkeit von 3 – 7 % innerhalb der Quasispezies nachgewiesen. Nach Beendigung der Kombinationstherapie als zweiter Therapiesequenz bzw. in der Nachbeobachtungsphase war der Anteil der Varianten V36A/M, F43L, R117H, R155T und D168G in Relation zum Wildtyp gleichbleibend im Vergleich zur Ersttherapie. Für die Position 168 sind weder *in vitro* noch *in vivo* Mutationen beschrieben, welche eine verminderte Wirksamkeit von Boceprevir herbeiführen. Auch Lenz et al. beschreiben für die Variante D168G *in vitro* ein gering erhöhtes Resistenzniveau gegenüber den makrozyklischen Proteaseinhibitoren TMC-435 und ITMN-191, nicht jedoch gegenüber Boceprevir (Lenz et al., 2010). Sie könnte somit als zufällig generierte Mutation innerhalb des Wildtyps entstanden und somit für eine Therapie mit Boceprevir bedeutungslos sein. Eine weitere Erklärung wäre, dass eine Re-Therapie mit Boceprevir auch die Selektion resistenter Varianten gegenüber Proteaseinhibitoren mit anderem Resistenzspektrum, wie beispielsweise den makrozyklischen Proteasehemmern, begünstigen kann. Dies könnte die medikamentöse Auswahl einer zukünftigen geeigneten Therapie einschränken.

Nachdem fünf Patienten zunächst mit der Kombinationstherapie und anschließend mit der Monotherapie aus Boceprevir behandelt wurden, war bei den meisten ein ähnliches Resultat zu beobachten: Mutationen aus der Ersttherapie wurden nach Beendigung der zweiten Therapiesequenz durch ein anderes Resistenzspektrum ersetzt. Bei Beendigung der ersten Therapiesequenz bzw. vor Beginn der Re-Therapie konnten Einzelmutationen als Q41R, F43S/L, T54A, R117H, R155G und D168E in einer Häufigkeit von 3 – 64 % beobachtet werden, die folgende Monotherapie führte zur Selektion von Q41P, T54A, V55A, Q80R, R117H, R155W, A156T und V170A mit einem Anteil von 3 – 52 % innerhalb der Quasispezies. Kombinierte Mutationen traten mit höherer Frequenz auf, V55A + S174F sogar bis zu 100 % nach der Kombinationstherapie. Bei Beendigung der Monotherapie mit Boceprevir wurde die Variante aus T54S, Q80K, R117H und R155K bei einem Patienten zu 84 % selektioniert. Da die Mutation R117H bereits vor Beginn der Monotherapie mit einer Häufigkeit von 64 % nachgewiesen wurde, könnte eine Zweittherapie im zeitlichen Verlauf das begleitende Auftreten von Mutationen an den Positionen T54, Q80 und R155 als kompensatorische Mutationen zur Steigerung der Replikationskapazität begünstigen. Hierfür würde auch der hohe Anteil dieser Mehrfachmutation

an der gesamten Viruspopulation sprechen. In einer Studie mit Telaprevir als Monotherapie konnte für kombinierte Mutationen an den Positionen 36 + 155 sowie 36 + 156 im Vergleich zu ihren Einzelmutationen eine Zunahme an Resistenz, allerdings auch eine Steigerung der replikativen Fitness gezeigt werden (Sarrazin et al., 2007a).

Unabhängig von der Abfolge der Therapiesequenzen war unter der Kombinationstherapie aus Boceprevir und pegIFN kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Monotherapie mit Boceprevir zu erkennen, sowohl was das Spektrum an selektionierten Mutationen betrifft als auch der prozentuale Anteil resistenter Varianten in Relation zum Wildtyp. Auch traten nach einer Kombinationstherapie ebenso häufig Mutationen auf wie nach einer Monotherapie. Eine Erklärung hierfür wäre eine unzureichende antivirale Wirkung von Interferon innerhalb des Studienkollektivs. Da die Patienten bereits aus einer früheren Therapie mit Interferon ± Ribavirin als Non-Responder hervorgegangen sind, könnte die Kombinationstherapie als funktionelle Monotherapie gedeutet werden. Resistente Varianten erlangen somit einen Replikationsvorteil innerhalb der Population, da sie aufgrund ungenügender antiviraler Wirkung von Interferon nicht supprimiert werden.

Aus den Ergebnissen der hier vorliegenden genotypischen Sequenzanalyse nach einer sequentiell durchgeführten Therapie mit Boceprevir als Monotherapie (400 mg TID) über einen Zeitraum von einer Woche sowie einer Kombinationstherapie aus Boceprevir (400 mg TID) und pegIFN- $\alpha$ 2b (1,5  $\mu$ g/kg/Woche) über zwei Wochen konnten keine unmittelbaren Wechselbeziehungen beider Therapiesequenzen aufgedeckt werden. Die Resistenzprofile nach einer Ersttherapie mit Boceprevir ließen keine Rückschlüsse auf dynamische Veränderungen innerhalb der Quasispezies unter einer erneuten Exposition mit dem gleichen Proteaseinhibitor zu. Aufgrund eines kurzen PI-freien Intervalls von zwei bis sechs Wochen einerseits und der Selektion von low-level Resistenzen mit Potential zur Langzeitpersistenz andererseits, wäre unter einer Re-Therapie mit Boceprevir eine rasche Selektion des gleichen Resistenzspektrums zu erwarten gewesen. Tatsächlich war dies nur bei drei Patienten zu beobachten, wohingegen in der Mehrzahl der Patienten die Resistenzprofile nach beiden Therapiesequenzen divergierten (Vermehren et al., 2012b). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen innerhalb eines kleinen Studienkollektivs, deren fünf Teilnehmer einer zweimaligen Therapie mit dem makrozyklischen Proteaseinhibitor Simeprevir (TMC-435) ausgesetzt waren (Lenz et al., 2012). Einer Monotherapie mit Simeprevir (200 mg einmal täglich) über fünf Tage folgte in einem zeitlichen Abstand von etwa 1,5 Jahren eine Kombinationstherapie aus Simeprevir (200 mg einmal täglich) mit pegIFN- $\alpha$ 2a und Ribavirin über vier Wochen. Auch diese Patienten waren mit dem Hepatitis C Virus Genotyp 1 infiziert und Non-Responder bzw. Relapser aus einer vorausgegangenen Interferon-basierten Therapie. Resistente Varianten gegenüber Simeprevir konnten nach der Ersttherapie an den Positionen Q80, R155, A156 und D168 identifiziert und ihr Persistieren bis zum Beginn der Re-Therapie durch Direktsequenzierung der Baseline ausgeschlossen werden. Auch in dieser Studie konnte das Resistenzprofil während der zweiten Exposition gegenüber Simeprevir nicht aus den Ergebnissen

der Monotherapie abgeleitet werden. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass diese Studien mit geringen Fallzahlen durchgeführt wurden und die Ergebnisse nicht auf ein größeres Studienkollektiv übertragbar sind. Dies sollte in einer größer angelegten Studie geprüft werden. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch eine jüngst veröffentlichte Studie von Susser et al., welche das Resistenzspektrum von vier Patienten nach zweimaliger Therapie mit dem Proteaseinhibitor Telaprevir untersuchte (Susser et al., 2015). Auf eine erste Therapie mit Telaprevir folgte nach 4,3 bis 5,7 Jahren eine zweite Therapiesequenz. Identische resistente Varianten nach beiden Therapien zeigten im Mittel Nukleinsäureabweichungen an sieben Positionen innerhalb der Sequenz der NS3-Protease. Die Ergebnisse phylogenetischer Stammbäume unterstützen die Hypothese einer de novo Selektion identischer resistenter Varianten nach einer zweimaligen Therapie mit dem Proteaseinhibitor Telaprevir (Susser et al., 2015). In der hier vorliegenden Arbeit wurden gezielt die Aminosäurepositionen innerhalb der NS3 Protease untersucht, welche mit bekannter Resistenzbildung gegenüber Boceprevir einhergehen bzw. als neue Varianten in der „a priori Studie“ identifiziert werden konnten. Das Ausmaß der Nukleinsäurevariabilität über die gesamte Sequenz der NS3 Protease wurde hierbei nicht berücksichtigt. Durch Klonierung und Sequenzierung konnten bei drei Patienten diejenigen Varianten, welche nach einer Ersttherapie mit Boceprevir selektioniert werden konnten, auch nach einer zweiten Therapiesequenz mit dem Proteaseinhibitor beobachtet werden. Hierbei wäre es interessant, insbesondere unter Berücksichtigung einer Therapieunterbrechung mit Boceprevir von zwei bis sechs Wochen, das Ausmaß der Nukleinsäurevariabilität über die gesamte Sequenz der NS3 Protease als Hinweis für eine de novo Selektion bzw. Re-Selektion bei Persistenz der Resistenzvariante zu berücksichtigen.

Verschiedene Mechanismen könnten in Betracht gezogen werden, die nach Beendigung von zwei kurzen Therapiesequenzen mit einer Boceprevir basierten Therapie, welche für zwei bis sechs Wochen unterbrochen wird, in der Mehrzahl der Patienten ein voneinander abweichendes Spektrum an resistenten Varianten aufkommen lassen. Die enorme Replikationsrate mit der Produktion von etwa  $10^{12}$  Virionen täglich, die kurze Halbwertszeit sowie das fehlende proof-reading der RNA-Polymerase lassen täglich nicht nur jede mögliche Variante des Virus, sondern auch jede potentiell resistente Variante innerhalb der Quasispezies entstehen. So könnten resistente Varianten nach Beendigung der Therapie wieder durch den Wildtyp ersetzt werden, welcher unter einer erneuten Therapie wiederum aufgrund des Replikationsvorteils einer anderen selektierten präexistenten Variante verdrängt wird. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass bei fünf Patienten in der Baseline vor Beginn der zweiten Therapie mit Boceprevir durch eine klonale Sequenzanalyse keine resistenten Varianten beobachtet werden konnten. Eine andere Erklärung begründet sich auf einer möglicherweise zu niedrigen Sensitivität der Klonierung und Sequenzierung als geeignete Methode zur Detektion von Minor-Varianten, welche eine Therapie nachteilig beeinflussen könnten. Für einen Nachweis von Varianten mit einem prozentualen Anteil von mindestens 4 %

innerhalb der Quasispezies ist die Sequenzanalyse von etwa 80 Klonen (Konfidenzintervall 95 %) notwendig (Sarrazin et al., 2007a). Potentiell resistente Varianten mit geringerer Häufigkeit könnten nicht mehr mit ausreichender Sicherheit nachgewiesen bzw. beurteilt werden. Hierfür wäre die Analyse einer noch größeren Anzahl an Klonen notwendig, was einerseits einen hohen personellen Zeitaufwand mit sich bringt und andererseits den Materialbedarf und damit einhergehende Kosten nicht oder nur bedingt rechtfertigen würde. Ein alternatives Verfahren zur klonalen Sequenzanalyse mit höherer Sensitivität stellt das Pyrosequencing dar, womit sich auch noch Varianten mit einer Häufigkeit  $< 1\%$  nachweisen lassen. Während in der Studie mit Simeprevir 1,5 Jahre im Anschluss an eine Monotherapie durch Direktsequenzierung bei keinem Patienten eine persistierende Resistenzmutation belegt werden konnte, war durch Pyrosequencing der Nachweis von zwei Mutationen mit einer Häufigkeit von 1 – 2 % innerhalb der Quasispezies der Baseline möglich. Hiervon hatte sich eine Mutation bereits 1,5 Jahre zuvor unter der Monotherapie ausgebildet (Lenz et al., 2012). Es wäre somit denkbar, dass in der hier vorliegenden Studie mit Boceprevir resistente Varianten, welche durch Klonierung und Sequenzierung erst während der Re-Therapie selektioniert werden konnten, sich in einer für diese Technik nicht nachweisbaren Frequenz bereits unter der Ersttherapie entwickelt haben. Im Umkehrschluss ließe sich hieraus folgern, dass resistente Varianten aus einer Ersttherapie mit Boceprevir durch die Methode des Pyrosequencing als persistierende Varianten niedriger Frequenz unter erneuter Therapie nachweisbar sein könnten. Trotz höherer Sensitivität ist diese Methode mit Nachteilen gegenüber der Klonierung verbunden. Aufgrund technischer Gegebenheiten müsste die 543 Nukleotide umfassende NS3 Protease in kleinere Fragmente geteilt und getrennt voneinander analysiert werden. Ein kombiniertes Auftreten von Mutationen innerhalb der N-terminalen 181 Aminosäuren wäre somit nicht mehr zu beurteilen, was die Bedeutung der Klonierung und Sequenzierung unterstreicht. Ein weiteres alternatives Verfahren zum Nachweis von Mutationen stellt die Allel-spezifische PCR, beispielsweise der TaqMan Mismatch Amplification Mutation Assay (TaqMAMA), dar. Über diese Methode können ebenfalls Mutationen mit einem Anteil von  $< 1\%$  an der Quasispezies nachgewiesen werden (Curry et al., 2008). Hierbei wird der PCR eine fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde beigefügt, deren Sequenz zum Abschnitt der gesuchten Mutation komplementär ist. Diese Allel-spezifische Bindung der Sonde setzt spezifische Farbsignale frei und ermöglicht somit eine Unterscheidung zwischen Mutation und Wildtyp. Potentiell neue Mutationen können mit dieser Methode jedoch nicht nachgewiesen werden. Wie beim Pyrosequencing ist auch mit einer Allel-spezifischen PCR keine Analyse kombinierter Mutationen möglich. Jedoch könnte ein Einsatz dieser sensitiven Verfahren zu mehreren Zeitpunkten einer antiviralen Therapie neue Erkenntnisse über die zeitliche Entwicklung von Doppel- bzw. Mehrfachmutationen liefern und zum besseren Verständnis ihrer gegenseitigen Wechselwirkungen beitragen. Beispielsweise waren bei Patient 207 die Mutationen V55A und S174F erstmals zu Tag 4 der ersten Therapiesequenz in Form einer Doppelmutation nachweisbar. Es wäre denkbar, dass V55A

oder S174F als Einzelmutation bereits vor Therapiebeginn in einer geringen und nur für hochsensitive Nachweisverfahren erkennbaren Frequenz existierte. Die Doppelmutation könnte sich daraufhin unter dem Selektionsdruck als kompensatorische Mutation innerhalb der ersten vier Tage entwickelt haben. Ähnliches dürfte auch für die Mehrfachmutation von Patient 203 zutreffen. Diese könnte sich aus der Variante R117H entwickelt haben, da diese Mutation bereits zu Beginn der zweiten Therapiesequenz als Einzelmutation nachweisbar war. In welcher Reihenfolge sich die Mutationen T54S, Q80K und R155K entwickelt haben und sich gegenseitig beeinflussen, bleibt jedoch unklar.

### 5.2.3 Virologisches Ansprechen auf die Erst- und Zweittherapie mit Boceprevir

Unabhängig von der Reihenfolge der beiden Therapiesequenzen war der mittlere maximale Abfall der HCV-RNA unter der Kombinationstherapie aus Boceprevir und pegIFN im Vergleich zur Monotherapie mit Boceprevir ausgeprägter ( $2,73 \log_{10}$  Stufen vs.  $1,78 \log_{10}$  Stufen). Beide Therapieformen übten somit anhand des geringen Abfalls der Viruslast einen nur geringen Druck auf die virale Quasispezies aus, was sich in der Selektion von Varianten mit geringer Resistenz gegenüber Boceprevir widerspiegelte. Bei allen Patienten war unter mindestens einer Therapiesequenz ein Wiederanstieg der Viruslast vom Nadir bis zur Beendigung der entsprechenden Sequenz zu beobachten, bei fünf Patienten sogar ein Anstieg der Viruslast um  $> 1 \log_{10}$  Stufe, wofür die gute replikative Fitness der resistenten Varianten verantwortlich sein dürfte. Auch in der Studie mit Telaprevir als Monotherapie in der Dosierung 750 mg dreimal täglich über 14 Tage waren in der Gruppe mit Breakthrough unter Therapie überwiegend Varianten mit low-level Resistenz zu beobachten. Mutationen mit einer *in vitro* belegten hohen Resistenz gegenüber Telaprevir überwiegen hingegen in der Gruppe mit stärkerer antiviraler Aktivität der Therapie (Sarrazin et al., 2007a). In der vorliegenden Studie erholte sich die Viruslast im Boceprevir-freien Intervall und kehrte zu Beginn der Re-Therapie auf das Ausgangsniveau zurück. Hierbei war eine Differenz von durchschnittlich  $0,39 \log_{10}$  Stufen (Spannweite  $-0,92 \log_{10}$  Stufen bis  $+0,63 \log_{10}$  Stufen) zu erkennen. Auch eine zwischengeschaltete Monotherapie mit pegIFN zwischen beide Boceprevir-Sequenzen zeigte diesbezüglich keine nachteiligen Auswirkungen. Durch eine klonale Sequenzanalyse waren zudem bei fünf Patienten keine resistenten Varianten vor der zweiten Exposition gegenüber Boceprevir zu belegen. Die Abbildungen 4.22 bis 4.25 geben das virologische Ansprechen auf die Boceprevir-basierten Therapien wieder, indem der Verlauf der Viruslast in log-Einheiten über die Zeit aufgetragen wird. Aus diesen eben aufgeführten Ergebnissen ist ein Einfluss resistenter Varianten, die unter einer Kurzzeittherapie mit Boceprevir selektioniert wurden, auf den Verlauf einer erneuten Therapie mit dem gleichen Proteaseinhibitor nach einer Unterbrechung der Therapie von zwei bis sechs Wochen nicht zu erkennen. Der Verlauf einer Zweittherapie erscheint somit von der ersten Therapie unabhängig zu sein. Auf Grundlage der

Ergebnisse dieser Studie wäre denkbar, dass sich die Wahrscheinlichkeit für ein anhaltendes virologisches Ansprechen unter einer Zweittherapie mit einem Proteaseinhibitor + pegIFN/Ribavirin zur Behandlung des HCV Genotyp 1 nicht von der einer Ersttherapie unterscheidet. Eine erfolgreiche Behandlung nach Therapieversagen in einer Ersttherapie erscheint somit möglich zu sein. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass diese Resultate innerhalb eines kleinen Studienkollektivs aus lediglich neun Patienten gewonnen wurden und somit wohl nicht uneingeschränkt auf die Gesamtpopulation übertragbar sein dürften. Als kritischer Faktor könnte sich der ideale Zeitpunkt darstellen, wann mit einer Re-Therapie mit demselben Proteaseinhibitor begonnen werden sollte. Es ist bekannt, dass resistente Varianten viele Jahre nach Beendigung einer spezifischen Therapie mit Telaprevir bzw. Boceprevir noch nachweisbar sind (Susser et al., 2011). Jedoch ist unklar, in welcher Häufigkeit innerhalb der Quasispezies die Variante vorliegen muss, um eine Therapie ungünstig zu beeinflussen. Weitere Studien, die eine größere Anzahl an Patienten, eine längere Therapiedauer sowie die konventionelle Triple-Therapie aus einem Proteaseinhibitor, pegIFN und Ribavirin berücksichtigen, sollten dies prüfen.

#### **5.2.4 Die präexistierende Major-Variante V55A**

Eine präexistierende Variante war mit V55A bereits vor Beginn einer antiviralen Therapie mit Boceprevir in einer Häufigkeit von 100 % innerhalb der Quasispezies eines Patienten mit Genotyp 1b nachweisbar. Phänotypische Untersuchungen konnten für diese Mutation ein erhöhtes Resistenzniveau belegen, wonach im Replikon-Modell der  $IC_{50}$  für Boceprevir im Vergleich zum Wildtyp 6,9-fach erhöht war (Susser et al., 2009). Dies könnte das verminderte Ansprechen auf die antivirale Therapie mit Boceprevir bei diesem Patienten begründen, da sowohl unter der Monotherapie wie auch unter der Kombinationstherapie sich unter allen Patienten hier der geringste Abfall der Viruslast abzeichnete ( $0,48 \log_{10}$  Stufen bzw.  $1,19 \log_{10}$  Stufen). Eine Major-Variante, wie sie hier vorgefunden wurde, könnte das Ansprechen auf eine antivirale Therapie und somit auch die Wahrscheinlichkeit für ein anhaltendes virologisches Ansprechen nachteilig beeinflussen. Untersuchungen an einem Strukturmodell der NS3 Protease haben ergeben, dass die Substitution von Valin zu Alanin an Position 55 zu Änderungen chemischer Wechselwirkungen innerhalb des Proteins führt sowie eine Änderung der Konfiguration der Liganden-Bindungsstelle im Bereich der  $S_1$ -Tasche zur Folge hat (Welsch et al., 2012). Diese Ergebnisse wurden mit einer verminderten replikativen Fitness der V55A Variante im Vergleich zum Wildtyp in Verbindung gebracht, was sich in der Zellkultur auf Grundlage der H77-Sequenz des HCV Genotyp 1a für diese Mutation bestätigte (Welsch et al., 2012). Eine unter *in vitro* Bedingungen herabgesetzte Replikationsfähigkeit resistenter Varianten lässt vermuten, dass sie in behandlungsnaiven Patienten nur selten nachzuweisen sind. Kuntzen et al. konnten in diesem Zusammenhang resistente Varianten durch Direktsequenzierung in einer Häufigkeit zwischen 0,3 % und 2,8 % innerhalb der Population identifizieren (Kuntzen et al., 2008). Die herabgesetzte Replikationsfähigkeit in den

phänotypischen Assays lässt sich jedoch nicht zwingend auf die Bedingungen, wie sie *in vivo* vorzufinden sind, übertragen. Vor Beginn der antiviralen Therapie konnte bei Patient 208 mit der V55A Variante die Viruslast mit einem Wert von 276.744 IU/ml gemessen werden und war somit geringfügig unter dem Durchschnittswert aller Patienten (445.223 IU/ml). Fünf Patienten ohne Nachweis einer präexistenten Variante hatten sogar eine geringere Ausgangs-Viruslast, was eine gute Replikationsfähigkeit der Viren mit der V55A Mutation *in vivo* bei diesem Patienten unterstreicht. Eine Erklärung hierfür könnte die in allen Sequenzen kombiniert vorliegende Variante aus V55A mit S174F sein. Die S174F Variante verursachte im Replikon-Assay ein niedrig bis mittleres erhöhtes Resistenzniveau für den Proteaseinhibitor Boceprevir (5,8-facher IC<sub>50</sub>) und konnte als neue Minor-Variante identifiziert werden. Hier könnte sie als kompensatorische Variante die Replikationseffektivität von V55A erhöhen oder Wechselwirkungen zwischen beiden Mutationen hierfür verantwortlich gemacht werden. Hierfür sprechen auch Ergebnisse der Phase III Zulassungsstudien für den Proteaseinhibitor Telaprevir, wonach anhand eines Kaplan-Meier Modells für die Doppelmutation V36M und R155K eine höhere replikative fitness nachgewiesen werden konnte als für ihre Einzelmutation (Sullivan et al., 2013). Im Verlauf unter Therapie mit Boceprevir waren weitere Varianten (Q41R, F43L, R117H und D168G) in einer Häufigkeit von 3 – 10 % nachzuweisen. Durch den Selektionsdruck des Proteaseinhibitors könnten sie auch bei nur geringem Abfall der Viruslast unter Mono- bzw. Kombinationstherapie (0,48 log<sub>10</sub> Stufen bzw. 1,19 log<sub>10</sub> Stufen) einen Überlebensvorteil erlangen. Eine weitere Erklärung wäre, dass sie zufällig auf dem gleichen Isolat zusammen mit V55A selektioniert wurden. Ergebnisse einer größeren Studie berichteten von bis zu 3 % behandlungsnaiver Patienten mit einer low-level Resistenz gegenüber Telaprevir als Major-Variante. Der prozentuale Anteil an Patienten in dieser Gruppe, die ein dauerhaftes virologisches Ansprechen unter einer Dreifachtherapie mit Telaprevir (Telaprevir + pegIFN/Ribavirin) erreichten, war im Vergleich zu den Patienten mit dem Wildtyp-Virus nur unwesentlich geringer (Bartels et al., 2013). Die Existenz präexistenter Varianten dürfte somit nicht zwingend ein negativer Prädiktor für einen anhaltenden Therapieerfolg darstellen, jedoch ist ein Ansprechen auf die antivirale Wirkung von Interferon hierfür von Bedeutung (Bartels et al., 2013). In diesem Zusammenhang könnte der bereits bekannte Status des Patienten als pegIFN/Ribavirin Non-Responder das geringe Ansprechen der antiviralen Therapie gegenüber der V55A Variante begründen. Das erhöhte Resistenzniveau gegenüber Boceprevir einerseits sowie eine unzureichende antivirale Wirkung von pegIFN andererseits könnte die ausbleibende supprimierende Wirkung der Mono- und Kombinationstherapie auf die V55A Variante erklären. Es wäre denkbar, dass durch höhere Dosierung von Boceprevir, z.B. 800 mg dreimal täglich oder Durchführung der Therapie als Dreifach-Therapie mit Ribavirin, eine supprimierende Wirkung erreicht werden kann. Allgemein scheinen der Nachweis einer resistenten Variante sowie ihr prozentualer Anteil innerhalb der Quasispezies von der angewandten molekularbiologischen Methode abzuhängen. Mit der hochsensitiven Allel-spezifischen PCR und dem Pyrosequencing

war es möglich, innerhalb kleiner Studienkollektive in bis zu 67 % der behandlungsnaiven Patienten Minor-Varianten mit unterschiedlichem Resistenzniveau in geringer Frequenz im Bereich von < 0,1 % bis 5,7 % zu detektieren (Franco et al., 2011; Thomas et al., 2012). Interessanterweise waren präexistente Varianten auf diesem Level nicht zwingend mit ihrer Selektion unter 14 tägiger Monotherapie mit Telaprevir verbunden (Thomas et al., 2012), wohingegen andere Varianten wiederum ein Therapieversagen begünstigten. Auch durch das Pyrosequencing war kein Zusammenhang zwischen präexistenten Varianten und einer Resistenzentwicklung unter Therapie erkennbar. Weitere Untersuchungen sollten sich mit der Frage beschäftigen, welche präexistenten Varianten sich in welcher Frequenz und innerhalb welcher Patientenpopulationen nachteilig auf einen Therapieerfolg auswirken können. Es wäre denkbar, dass darunter Risikogruppen identifiziert werden können, die von einer auf ihr Resistenzprofil abgestimmten individualisierten antiviralen Therapie profitieren und somit langfristig die Eradikation des Virus ermöglichen.

### 5.2.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend wurde in der hier vorliegenden Arbeit eine sequentielle Therapie mit Boceprevir als Monotherapie (400 mg tid) über sieben Tage und als Kombinationstherapie mit pegIFN- $\alpha$ 2b (1,5  $\mu$ g/kg/Woche) über zwei Wochen durchgeführt. Die Ergebnisse beziehen sich auf eine Gruppe aus neun Interferon-Nonresponder mit Genotyp 1a bzw. 1b. Zur Vermeidung von Überhangeffekten aus einer Behandlungsperiode in die darauf folgende wurde ein zweiwöchiges PI-freies Intervall als washout-Phase eingefügt. Bei drei Patienten betrug der Zeitraum zwischen beiden Therapiesequenzen mit Boceprevir aufgrund einer zwischengeschalteten pegIFN-Monotherapie sechs Wochen. Durch Klonierung und Sequenzierung wurde die Dynamik von selektierten Resistenzmutationen unter beiden Behandlungsperioden mit Boceprevir registriert und untereinander verglichen. In der Mehrheit der Patienten war das Resistenzspektrum aus der Zweittherapie nicht aus der vorangegangenen Therapie mit Boceprevir abzuleiten. Dies hatte jedoch keine nachteiligen Auswirkungen auf das virale Ansprechen der Therapie. Unabhängig von der Abfolge der Behandlungsperioden war unter einer Monotherapie die Reduzierung der Viruslast geringer als unter einer Kombinationstherapie. Die Studie weist jedoch mehrere Einschränkungen auf, die eine Übertragung der Ergebnisse in die Praxis beeinträchtigen. Die Studienpopulation umfasste lediglich neun Patienten. Eine größer angelegte Studie wäre erforderlich, um die Auswirkungen einer Re-Therapie mit dem gleichen Proteaseinhibitor zu prüfen. Weiterhin waren die Behandlungsperioden mit einer Woche als Monotherapie und zwei Wochen als Kombinationstherapie deutlich kürzer als es der Therapiedauer nach Leitlinien entspricht. Es wäre denkbar, dass die kurze Therapiesequenz innerhalb des kleinen Studienkollektivs nicht ausreichend war zur Ausbildung von Resistenzen. Auch wurden die Therapiesequenzen nicht in der Dosierung nach Zulassung von Boceprevir durchgeführt. Hier wird Boceprevir 3x täglich zu je 800 mg in Verbindung von Interferon und Ribavirin verabreicht.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Afdhal, N., Zeuzem, S., Kwo, P., Chojkier, M., Gitlin, N., Puoti, M., Romero-Gomez, M., Zarski, J. P., Agarwal, K., Buggisch, P., Foster, G. R., Brau, N., Buti, M., Jacobson, I. M., Subramanian, G. M., Ding, X., Mo, H., Yang, J. C., Pang, P. S., Symonds, W. T., McHutchison, J. G., Muir, A. J., Mangia, A., Marcellin, P., Investigators, I. O. N. (2014). Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 370: 1889-1898.
2. Alter, M. J., Kruszon-Moran, D., Nainan, O. V., McQuillan, G. M., Gao, F., Moyer, L. A., Kaslow, R. A., Margolis, H. S. (1999). The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 341: 556-562.
3. Alter, M. J. (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 13: 2436-2441.
4. Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., Bartenschlager, R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 4: e1000035.
5. Bacon, B. R., Gordon, S. C., Lawitz, E., Marcellin, P., Vierling, J. M., Zeuzem, S., Poordad, F., Goodman, Z. D., Sings, H. L., Boparai, N., Burroughs, M., Brass, C. A., Albrecht, J. K., Esteban, R. (2011). Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 364: 1207-1217.
6. Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M. J., Miyamura, T., Brechot, C. (1997). Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1200-1205.
7. Barnard, R. J., Howe, J. A., Ogert, R. A., Zeuzem, S., Poordad, F., Gordon, S. C., Ralston, R., Tong, X., Sniukiene, V., Strizki, J., Ryan, D., Long, J., Qiu, P., Brass, C. A., Albrecht, J., Burroughs, M., Vuocolo, S., Hazuda, D. J. (2013). Analysis of boceprevir resistance associated amino acid variants (RAVs) in two phase 3 boceprevir clinical studies. *Virology* 444: 329-336.
8. Barritt, A. S. t., Fried, M. W. (2012). Maximizing opportunities and avoiding mistakes in triple therapy for hepatitis C virus. *Gastroenterology* 142: 1314-1323 e1311.
9. Bartels, D. J., Sullivan, J. C., Zhang, E. Z., Tigges, A. M., Dorrian, J. L., De Meyer, S., Takemoto, D., Dondero, E., Kwong, A. D., Picchio, G., Kieffer, T. L. (2013). Hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to direct-acting antivirals (DAAs) were rarely observed in DAA-naïve patients prior to treatment. *J Virol* 87: 1544-1553.
10. Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., Jacobsen, H. (1993). Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol* 67: 3835-3844.

11. Bartenschlager, R. , Lohmann, V. (2000). Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 81: 1631-1648.
12. Bartenschlager, R. (2002). Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 1: 911-916.
13. Bartenschlager, R., Cosset, F. L. , Lohmann, V. (2010). Hepatitis C virus replication cycle. *J Hepatol* 53: 583-585.
14. Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V. , Andre, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 19: 95-103.
15. Bartosch, B., Dubuisson, J. , Cosset, F. L. (2003). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 197: 633-642.
16. Bellecave, P., Sarasin-Filipowicz, M., Donze, O., Kennel, A., Gouttenoire, J., Meylan, E., Terracciano, L., Tschopp, J., Sarrazin, C., Berg, T., Moradpour, D. , Heim, M. H. (2010). Cleavage of mitochondrial antiviral signaling protein in the liver of patients with chronic hepatitis C correlates with a reduced activation of the endogenous interferon system. *Hepatology* 51: 1127-1136.
17. Berg, T., Hopf, U., Stark, K., Baumgarten, R., Lobeck, H. , Schreier, E. (1997). Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters. *J Hepatol* 26: 484-491.
18. Boucher, S., Recordon-Pinson, P., Neau, D., Ragnaud, J. M., Titier, K., Faure, M., Fleury, H. , Masquelier, B. (2005). Clonal analysis of HIV-1 variants in proviral DNA during treatment interruption in patients with multiple therapy failures. *J Clin Virol* 34: 288-294.
19. Branch, A. D., Stump, D. D., Gutierrez, J. A., Eng, F. , Walewski, J. L. (2005). The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* 25: 105-117.
20. Bukh, J., Purcell, R. H. , Miller, R. H. (1994). Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8239-8243.
21. Bukh, J., Miller, R. H. , Purcell, R. H. (1995). Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 15: 41-63.
22. Burlone, M. E. , Budkowska, A. (2009). Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* 90: 1055-1070.
23. Chang, M. H., Gordon, L. A. , Fung, H. B. (2012). Boceprevir: a protease inhibitor for the treatment of hepatitis C. *Clin Ther* 34: 2021-2038.
24. Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. , Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362.

25. Chung, H., Kudo, M., Kumada, T., Katsushima, S., Okano, A., Nakamura, T., Osaki, Y., Kohigashi, K., Yamashita, Y., Komori, H., Nishiura, S. (2003). Risk of HCV transmission after needlestick injury, and the efficacy of short-duration interferon administration to prevent HCV transmission to medical personnel. *J Gastroenterol* 38: 877-879.
26. Ciesek, S., Steinmann, E., Wedemeyer, H., Manns, M. P., Neyts, J., Tautz, N., Madan, V., Bartenschlager, R., von Hahn, T., Pietschmann, T. (2009). Cyclosporine A inhibits hepatitis C virus nonstructural protein 2 through cyclophilin A. *Hepatology* 50: 1638-1645.
27. Clarke, B. (1997). Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 78 ( Pt 10): 2397-2410.
28. Cox, A. L., Netski, D. M., Mosbrugger, T., Sherman, S. G., Strathdee, S., Ompad, D., Vlahov, D., Chien, D., Shyamala, V., Ray, S. C., Thomas, D. L. (2005). Prospective evaluation of community-acquired acute-phase hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 40: 951-958.
29. Curry, S., Qiu, P., Tong, X. (2008). Analysis of HCV resistance mutations during combination therapy with protease inhibitor boceprevir and PEG-IFN alpha-2b using TaqMan mismatch amplification mutation assay. *J Virol Methods* 153: 156-162.
30. Deterding, K., Wiegand, J., Gruner, N., Hahn, A., Jackel, E., Jung, M. C., Buggisch, P., Galle, P., Berg, T., Hinrichsen, H., Potthoff, A., Zeuzem, S., Cornberg, M., Manns, M., Wedemeyer, H. (2009). The German Hep-Net acute hepatitis C cohort: impact of viral and host factors on the initial presentation of acute hepatitis C virus infection. *Z Gastroenterol* 47: 531-540.
31. Deterding, K., Gruner, N., Buggisch, P., Wiegand, J., Galle, P. R., Spengler, U., Hinrichsen, H., Berg, T., Potthoff, A., Malek, N., Grosshennig, A., Koch, A., Diepolder, H., Luth, S., Feyerabend, S., Jung, M. C., Rogalska-Taranta, M., Schlaphoff, V., Cornberg, M., Manns, M. P., Wedemeyer, H. (2013). Delayed versus immediate treatment for patients with acute hepatitis C: a randomised controlled non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis*.
32. Deterding, K., Spinner, C. D., Schott, E., Welzel, T. M., Gerken, G., Klinker, H., Spengler, U., Wiegand, J., Zur Wiesch, J. S., Pathil, A., Cornberg, M., Umgelter, A., Zollner, C., Zeuzem, S., Papkalla, A., Weber, K., Hardtke, S., von der Leyen, H., Koch, A., von Witzendorff, D., Manns, M. P., Wedemeyer, H., HepNet Acute, H. C. V. I. V. S. G. (2017). Ledipasvir plus sofosbuvir fixed-dose combination for 6 weeks in patients with acute hepatitis C virus genotype 1 mono-infection (HepNet Acute HCV IV): an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Infect Dis* 17: 215-222.
33. Deuffic-Burban, S., Castel, H., Wiegand, J., Manns, M. P., Wedemeyer, H., Mathurin, P., Yazdanpanah, Y. (2012). Immediate vs. delayed treatment in patients with acute hepatitis C based on IL28B polymorphism: a model-based analysis. *J Hepatol* 57: 260-266.
34. Dumont, S., Cheng, W., Serebrov, V., Beran, R. K., Tinoco, I., Jr., Pyle, A. M., Bustamante, C. (2006). RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP. *Nature* 439: 105-108.
35. Dusheiko, G., Main, J., Thomas, H., Reichard, O., Lee, C., Dhillon, A., Rassam, S., Fryden, A., Reesink, H., Bassendine, M., Norkrans, G., Cuyper, T., Lelie, N., Telfer, P., Watson, J., Weegink, C., Sillikens, P., Weiland, O. (1996). Ribavirin treatment for patients with chronic hepatitis C: results of a placebo-controlled study. *J Hepatol* 25: 591-598.

36. Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. , Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76: 5974-5984.
37. Enomoto, N., Takada, A., Nakao, T. , Date, T. (1990). There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 1021-1025.
38. Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Izumi, N., Marumo, F. , Sato, C. (1995). Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 96: 224-230.
39. Esteban, J. I., Sauleda, S. , Quer, J. (2008). The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol* 48: 148-162.
40. European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e. e. e. , European Association for the Study of the, L. (2018). EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J Hepatol*.
41. Evans, M. J., Rice, C. M. , Goff, S. P. (2004). Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13038-13043.
42. Evans, M. J., von Hahn, T., Tschernie, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D. , Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446: 801-805.
43. Fafi-Kremer, S., Fauvelle, C., Felmlee, D. J., Zeisel, M. B., Lepiller, Q., Fofana, I., Heydmann, L., Stoll-Keller, F. , Baumert, T. F. (2012). Neutralizing antibodies and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Viruses* 4: 2016-2030.
44. Failla, C., Tomei, L. , De Francesco, R. (1994). Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* 68: 3753-3760.
45. Failla, C., Tomei, L. , De Francesco, R. (1995). An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A. *J Virol* 69: 1769-1777.
46. Farrell, G. C. (1997). Therapy of hepatitis C: interferon alfa-n1 trials. *Hepatology* 26: 96S-100S.
47. Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. , Holland, P. V. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 292: 767-770.
48. Flint, M., Thomas, J. M., Maidens, C. M., Shotton, C., Levy, S., Barclay, W. S. , McKeating, J. A. (1999). Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* 73: 6782-6790.
49. Franco, S., Bellido, R., Aparicio, E., Canete, N., Garcia-Retortillo, M., Sola, R., Tural, C., Clotet, B., Paredes, R. , Martinez, M. A. (2011). Natural prevalence of HCV minority variants that are highly resistant to NS3/4A protease inhibitors. *J Viral Hepat* 18: e578-582.

50. Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 75: 12047-12057.
51. Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J. P., Bartenschlager, R. (2005). Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol* 79: 380-392.
52. Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinos, G., Goncales, F. L., Jr., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., Yu, J. (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347: 975-982.
53. Gale, M., Jr., Blakely, C. M., Kwieciszewski, B., Tan, S. L., Dossett, M., Tang, N. M., Korth, M. J., Polyak, S. J., Gretch, D. R., Katze, M. G. (1998). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 18: 5208-5218.
54. Ge, D., Fellay, J., Thompson, A. J., Simon, J. S., Shianna, K. V., Urban, T. J., Heinzen, E. L., Qiu, P., Bertelsen, A. H., Muir, A. J., Sulkowski, M., McHutchison, J. G., Goldstein, D. B. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461: 399-401.
55. Ghany, M. G., Strader, D. B., Thomas, D. L., Seeff, L. B. (2009). Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 49: 1335-1374.
56. Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K., Moradpour, D. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77: 5487-5492.
57. Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M., Rice, C. M. (1993). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 67: 1385-1395.
58. Griffin, S. D., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P., Rowlands, D. J. (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 535: 34-38.
59. Halfon, P., Locarnini, S. (2011). Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J Hepatol* 55: 192-206.
60. Han, J. H., Shyamala, V., Richman, K. H., Brauer, M. J., Irvine, B., Urdea, M. S., Tekamp-Olson, P., Kuo, G., Choo, Q. L., Houghton, M. (1991). Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1711-1715.
61. Heim, M. H. (2013). Innate immunity and HCV. *J Hepatol* 58: 564-574.
62. Herrine, S. K. (2002). Approach to the patient with chronic hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 136: 747-757.
63. Hezode, C., Forestier, N., Dusheiko, G., Ferenci, P., Pol, S., Goeser, T., Bronowicki, J. P., Bourliere, M., Gharakhanian, S., Bengtsson, L., McNair, L., George, S., Kieffer, T., Kwon, A.,

- Kauffman, R. S., Alam, J., Pawlotsky, J. M., Zeuzem, S. (2009). Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 360: 1839-1850.
64. Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K., Shimotohno, K. (1993). Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 67: 4665-4675.
65. Hofmann, W. P., Zeuzem, S., Sarrazin, C. (2005). Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy. *J Clin Virol* 32: 86-91.
66. Hofmann, W. P., Polta, A., Herrmann, E., Mihm, U., Kronenberger, B., Sonntag, T., Lohmann, V., Schonberger, B., Zeuzem, S., Sarrazin, C. (2007). Mutagenic effect of ribavirin on hepatitis C nonstructural 5B quasispecies in vitro and during antiviral therapy. *Gastroenterology* 132: 921-930.
67. Hoofnagle, J. H. (1997). Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 26: 15S-20S.
68. Hoofnagle, J. H. (2002). Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36: S21-29.
69. Horner, S. M., Gale, M., Jr. (2013). Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nat Med* 19: 879-888.
70. Huang, H., Sun, F., Owen, D. M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Jr., Ye, J. (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5848-5853.
71. Huppe, D., Zehnter, E., Mauss, S., Boker, K., Lutz, T., Racky, S., Schmidt, W., Ullrich, J., Sbrijer, I., Heyne, R., Schober, A., John, C., Hey, K. H., Bokemeyer, B., Kallinowski, B., Moller, B., Pape, S., Gutmann, M., Alshuth, U., Niederau, C. (2008). [Epidemiology of chronic hepatitis C in Germany--an analysis of 10,326 patients in hepatitis centres and outpatient units]. *Z Gastroenterol* 46: 34-44.
72. Jacobson, I. M., McHutchison, J. G., Dusheiko, G., Di Bisceglie, A. M., Reddy, K. R., Bzowej, N. H., Marcellin, P., Muir, A. J., Ferenci, P., Flisiak, R., George, J., Rizzetto, M., Shouval, D., Sola, R., Terg, R. A., Yoshida, E. M., Adda, N., Bengtsson, L., Sankoh, A. J., Kieffer, T. L., George, S., Kauffman, R. S., Zeuzem, S., Team, A. S. (2011). Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 364: 2405-2416.
73. Jirasko, V., Montserret, R., Appel, N., Janvier, A., Eustachi, L., Brohm, C., Steinmann, E., Pietschmann, T., Penin, F., Bartenschlager, R. (2008). Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem* 283: 28546-28562.
74. Jones, C. T., Murray, C. L., Eastman, D. K., Tassello, J., Rice, C. M. (2007). Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol* 81: 8374-8383.
75. Jones, D. M., Patel, A. H., Targett-Adams, P., McLauchlan, J. (2009). The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. *J Virol* 83: 2163-2177.

76. Kamal, S. M., Fouly, A. E., Kamel, R. R., Hockenjos, B., Al Tawil, A., Khalifa, K. E., He, Q., Koziel, M. J., El Naggar, K. M., Rasenack, J., Afdhal, N. H. (2006). Peginterferon alfa-2b therapy in acute hepatitis C: impact of onset of therapy on sustained virologic response. *Gastroenterology* 130: 632-638.
77. Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T., Shimotohno, K. (1990). Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9524-9528.
78. Kau, A., Vermehren, J., Sarrazin, C. (2008). Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol* 49: 634-651.
79. Kiiver, K., Merits, A., Ustav, M., Zusinaite, E. (2006). Complex formation between hepatitis C virus NS2 and NS3 proteins. *Virus Res* 117: 264-272.
80. Kim, C. W., Chang, K. M. (2013). Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clin Mol Hepatol* 19: 17-25.
81. Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M. D., Landro, J. A., Chambers, S. P., Markland, W., Lepre, C. A., O'Malley, E. T., Harbeson, S. L., Rice, C. M., Murcko, M. A., Caron, P. R., Thomson, J. A. (1996). Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 87: 343-355.
82. Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M., Rice, C. M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70: 3363-3371.
83. Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., Feinstone, S. M., Rice, C. M. (2000). Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* 74: 2046-2051.
84. Kowdley, K. V., Gordon, S. C., Reddy, K. R., Rossaro, L., Bernstein, D. E., Lawitz, E., Shiffman, M. L., Schiff, E., Ghalib, R., Ryan, M., Rustgi, V., Chojkier, M., Herring, R., Di Bisceglie, A. M., Pockros, P. J., Subramanian, G. M., An, D., Svarovskaia, E., Hyland, R. H., Pang, P. S., Symonds, W. T., McHutchison, J. G., Muir, A. J., Pound, D., Fried, M. W., Investigators, I. O. N. (2014). Ledipasvir and sofosbuvir for 8 or 12 weeks for chronic HCV without cirrhosis. *N Engl J Med* 370: 1879-1888.
85. Krieger, N., Lohmann, V., Bartenschlager, R. (2001). Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* 75: 4614-4624.
86. Kuntzen, T., Timm, J., Berical, A., Lennon, N., Berlin, A. M., Young, S. K., Lee, B., Heckerman, D., Carlson, J., Reyor, L. L., Kleyman, M., McMahon, C. M., Birch, C., Schulze Zur Wiesch, J., Ledlie, T., Koehrsen, M., Kodira, C., Roberts, A. D., Lauer, G. M., Rosen, H. R., Bihl, F., Cerny, A., Spengler, U., Liu, Z., Kim, A. Y., Xing, Y., Schneidewind, A., Madey, M. A., Fleckenstein, J. F., Park, V. M., Galagan, J. E., Nusbaum, C., Walker, B. D., Lake-Bakaar, G. V., Daar, E. S., Jacobson, I. M., Gomperts, E. D., Edlin, B. R., Donfield, S. M., Chung, R. T., Talal, A. H., Marion, T., Birren, B. W., Henn, M. R., Allen, T. M. (2008). Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naive patients. *Hepatology* 48: 1769-1778.

87. Kuo, G., Choo, Q. L., Alter, H. J., Gitnick, G. L., Redeker, A. G., Purcell, R. H., Miyamura, T., Dienstag, J. L., Alter, M. J., Stevens, C. E., et al. (1989). An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244: 362-364.
88. Kwo, P. Y., Lawitz, E. J., McCone, J., Schiff, E. R., Vierling, J. M., Pound, D., Davis, M. N., Galati, J. S., Gordon, S. C., Ravendhran, N., Rossaro, L., Anderson, F. H., Jacobson, I. M., Rubin, R., Koury, K., Pedicone, L. D., Brass, C. A., Chaudhri, E., Albrecht, J. K. (2010). Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naïve patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet* 376: 705-716.
89. Lamarre, D., Anderson, P. C., Bailey, M., Beaulieu, P., Bolger, G., Bonneau, P., Bos, M., Cameron, D. R., Cartier, M., Cordingley, M. G., Faucher, A. M., Goudreau, N., Kawai, S. H., Kukulj, G., Lagace, L., LaPlante, S. R., Narjes, H., Poupard, M. A., Rancourt, J., Sentjens, R. E., St George, R., Simoneau, B., Steinmann, G., Thibeault, D., Tsantrizos, Y. S., Weldon, S. M., Yong, C. L., Llinas-Brunet, M. (2003). An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 426: 186-189.
90. Lange, C. M., Sarrazin, C., Zeuzem, S. (2011). [Future of antiviral therapy for chronic hepatitis C. Direct antiviral acting medications]. *Pharm Unserer Zeit* 40: 60-67.
91. Lange, C. M., Zeuzem, S. (2013). Perspectives and challenges of interferon-free therapy for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 58: 583-592.
92. Lauer, G. M., Walker, B. D. (2001). Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 345: 41-52.
93. Lenz, O., Verbinnen, T., Lin, T. I., Vijgen, L., Cummings, M. D., Lindberg, J., Berke, J. M., Dehertogh, P., Fransen, E., Scholliers, A., Vermeiren, K., Ivens, T., Raboisson, P., Edlund, M., Storm, S., Vrang, L., de Kock, H., Fanning, G. C., Simmen, K. A. (2010). In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1878-1887.
94. Lenz, O., de Bruijne, J., Vijgen, L., Verbinnen, T., Weegink, C., Van Marck, H., Vandembroucke, I., Peeters, M., Simmen, K., Fanning, G., Verloes, R., Picchio, G., Reesink, H. (2012). Efficacy of re-treatment with TMC435 as combination therapy in hepatitis C virus-infected patients following TMC435 monotherapy. *Gastroenterology* 143: 1176-1178 e1171-1176.
95. Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F., Weber, P. C. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* 6: 937-943.
96. Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285: 110-113.
97. Lundin, M., Monne, M., Widell, A., Von Heijne, G., Persson, M. A. (2003). Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* 77: 5428-5438.
98. Malcolm, B. A., Liu, R., Lahser, F., Agrawal, S., Belanger, B., Butkiewicz, N., Chase, R., Gheyas, F., Hart, A., Hesk, D., Ingravallo, P., Jiang, C., Kong, R., Lu, J., Pichardo, J., Prongay, A., Skelton, A., Tong, X., Venkatraman, S., Xia, E., Girijavallabhan, V., Njoroge, F. G. (2006). SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein



maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1013-1020.

99. Manns, M. P., McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Rustgi, V. K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z. D., Koury, K., Ling, M., Albrecht, J. K. (2001). Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358: 958-965.

100. Martell, M., Esteban, J. I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J., Gomez, J. (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66: 3225-3229.

101. Martinot-Peignoux, M., Marcellin, P., Pouteau, M., Castelnau, C., Boyer, N., Poliquin, M., Degott, C., Descombes, I., Le Breton, V., Milotova, V., et al. (1995). Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 22: 1050-1056.

102. Matsumoto, M., Hsieh, T. Y., Zhu, N., VanArsdale, T., Hwang, S. B., Jeng, K. S., Gorbalenya, A. E., Lo, S. Y., Ou, J. H., Ware, C. F., Lai, M. M. (1997). Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 71: 1301-1309.

103. McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Schiff, E. R., Shiffman, M. L., Lee, W. M., Rustgi, V. K., Goodman, Z. D., Ling, M. H., Cort, S., Albrecht, J. K. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339: 1485-1492.

104. McHutchison, J. G., Lawitz, E. J., Shiffman, M. L., Muir, A. J., Galler, G. W., McCone, J., Nyberg, L. M., Lee, W. M., Ghalib, R. H., Schiff, E. R., Galati, J. S., Bacon, B. R., Davis, M. N., Mukhopadhyay, P., Koury, K., Noviello, S., Pedicone, L. D., Brass, C. A., Albrecht, J. K., Sulkowski, M. S. (2009). Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med* 361: 580-593.

105. McLauchlan, J. (2000). Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 7: 2-14.

106. McMullan, L. K., Grakoui, A., Evans, M. J., Mihalik, K., Puig, M., Branch, A. D., Feinstone, S. M., Rice, C. M. (2007). Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2879-2884.

107. Meurs, E. F., Breiman, A. (2007). The interferon inducing pathways and the hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 13: 2446-2454.

108. Miller, R. H., Purcell, R. H. (1990). Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2057-2061.

109. Mizokami, M., Gojobori, T., Ohba, K., Ikeo, K., Ge, X. M., Ohno, T., Orito, E., Lau, J. Y. (1996). Hepatitis C virus types 7, 8 and 9 should be classified as type 6 subtypes. *J Hepatol* 24: 622-624.

110. Moradpour, D., Penin, F., Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5: 453-463.
111. Murphy, D. G., Sablon, E., Chamberland, J., Fournier, E., Dandavino, R., Tremblay, C. L. (2015). Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa. *J Clin Microbiol* 53: 967-972.
112. Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J., Perelson, A. S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282: 103-107.
113. Palitzsch, K. D., Hottentrager, B., Schlottmann, K., Frick, E., Holstege, A., Scholmerich, J., Jilg, W. (1999). Prevalence of antibodies against hepatitis C virus in the adult German population. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11: 1215-1220.
114. Pawlotsky, J. M., Tsakiris, L., Roudot-Thoraval, F., Pellet, C., Stuyver, L., Duval, J., Dhumeaux, D. (1995). Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 171: 1607-1610.
115. Peiffer, K. H., Sommer, L., Susser, S., Vermehren, J., Herrmann, E., Doring, M., Dietz, J., Perner, D., Berkowski, C., Zeuzem, S., Sarrazin, C. (2016). Interferon lambda 4 genotypes and resistance-associated variants in patients infected with hepatitis C virus genotypes 1 and 3. *Hepatology* 63: 63-73.
116. Pestka, J. M., Zeisel, M. B., Blaser, E., Schurmann, P., Bartosch, B., Cosset, F. L., Patel, A. H., Meisel, H., Baumert, J., Viazov, S., Rispeter, K., Blum, H. E., Roggendorf, M., Baumert, T. F. (2007). Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6025-6030.
117. Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G., Kurpanek, K., Bartenschlager, R. (2001). Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 75: 1252-1264.
118. Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F. L., Bartenschlager, R. (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7408-7413.
119. Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282: 938-941.
120. Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P., Rice, C. M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457: 882-886.
121. Polaris Observatory, H. C. V. C. (2017). Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2: 161-176.
122. Poordad, F., McCone, J., Jr., Bacon, B. R., Bruno, S., Manns, M. P., Sulkowski, M. S., Jacobson, I. M., Reddy, K. R., Goodman, Z. D., Boparai, N., DiNubile, M. J., Sniukiene, V., Brass,

- C. A., Albrecht, J. K. , Bronowicki, J. P. (2011). Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 364: 1195-1206.
123. Poordad, F., Bronowicki, J. P., Gordon, S. C., Zeuzem, S., Jacobson, I. M., Sulkowski, M. S., Poynard, T., Morgan, T. R., Molony, C., Pedicone, L. D., Sings, H. L., Burroughs, M. H., Sniukiene, V., Boparai, N., Goteti, V. S., Brass, C. A., Albrecht, J. K. , Bacon, B. R. (2012). Factors that predict response of patients with hepatitis C virus infection to boceprevir. *Gastroenterology* 143: 608-618 e601-605.
124. Post, J., Ratnarajah, S. , Lloyd, A. R. (2009). Immunological determinants of the outcomes from primary hepatitis C infection. *Cell Mol Life Sci* 66: 733-756.
125. Poynard, T., Marcellin, P., Lee, S. S., Niederau, C., Minuk, G. S., Ideo, G., Bain, V., Heathcote, J., Zeuzem, S., Trepo, C. , Albrecht, J. (1998). Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 352: 1426-1432.
126. Ratniner, M., Boulant, S., Crussard, S., McLauchlan, J. , Lavergne, J. P. (2009). Subcellular localizations of the hepatitis C virus alternate reading frame proteins. *Virus Res* 139: 106-110.
127. Reed, K. E., Gorbalenya, A. E. , Rice, C. M. (1998). The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol* 72: 6199-6206.
128. Reesink, H. W., Zeuzem, S., Weegink, C. J., Forestier, N., van Vliet, A., van de Wetering de Rooij, J., McNair, L., Purdy, S., Kauffman, R., Alam, J. , Jansen, P. L. (2006). Rapid decline of viral RNA in hepatitis C patients treated with VX-950: a phase Ib, placebo-controlled, randomized study. *Gastroenterology* 131: 997-1002.
129. Reiser, M., Hinrichsen, H., Benhamou, Y., Reesink, H. W., Wedemeyer, H., Avendano, C., Riba, N., Yong, C. L., Nehmiz, G. , Steinmann, G. G. (2005). Antiviral efficacy of NS3-serine protease inhibitor BILN-2061 in patients with chronic genotype 2 and 3 hepatitis C. *Hepatology* 41: 832-835.
130. Reynolds, J. E., Kaminski, A., Kettinen, H. J., Grace, K., Clarke, B. E., Carroll, A. R., Rowlands, D. J. , Jackson, R. J. (1995). Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *Embo J* 14: 6010-6020.
131. Roingeard, P. , Hourieux, C. (2008). Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *J Viral Hepat* 15: 157-164.
132. Rosa, D., Campagnoli, S., Moretto, C., Guenzi, E., Cousens, L., Chin, M., Dong, C., Weiner, A. J., Lau, J. Y., Choo, Q. L., Chien, D., Pileri, P., Houghton, M. , Abrignani, S. (1996). A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1759-1763.
133. Saito, K., Meyer, K., Warner, R., Basu, A., Ray, R. B. , Ray, R. (2006). Hepatitis C virus core protein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by a protective effect involving cellular FLICE inhibitory protein. *J Virol* 80: 4372-4379.

134. Sakai, A., Claire, M. S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H., Bukh, J. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11646-11651.
135. Sangiovanni, A., Prati, G. M., Fasani, P., Ronchi, G., Romeo, R., Manini, M., Del Ninno, E., Morabito, A., Colombo, M. (2006). The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology* 43: 1303-1310.
136. Santolini, E., Migliaccio, G., La Monica, N. (1994). Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 68: 3631-3641.
137. Sarrazin, C., Kieffer, T. L., Bartels, D., Hanzelka, B., Muh, U., Welker, M., Wincheringer, D., Zhou, Y., Chu, H. M., Lin, C., Weegink, C., Reesink, H., Zeuzem, S., Kwong, A. D. (2007a). Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* 132: 1767-1777.
138. Sarrazin, C., Rouzier, R., Wagner, F., Forestier, N., Larrey, D., Gupta, S. K., Hussain, M., Shah, A., Cutler, D., Zhang, J., Zeuzem, S. (2007b). SCH 503034, a novel hepatitis C virus protease inhibitor, plus pegylated interferon alpha-2b for genotype 1 nonresponders. *Gastroenterology* 132: 1270-1278.
139. Sarrazin, C., Berg, T., Cornberg, M., Dollinger, M., Ferenci, P., Hinrichsen, H., Klinker, H., Kraus, M., Manns, M., Mauss, S., Peck-Radosavljevic, M., Schmidt, H., Spengler, U., Wedemeyer, H., Wirth, S., Zeuzem, S. (2012). [Expert opinion on boceprevir- and telaprevir-based triple therapies of chronic hepatitis C]. *Z Gastroenterol* 50: 57-72.
140. Sarrazin, C. (2016). The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *J Hepatol* 64: 486-504.
141. Sarrazin, C., Zimmermann, T., Berg, T., Neumann, U. P., Schirmacher, P., Schmidt, H., Spengler, U., Timm, J., Wedemeyer, H., Wirth, S., Zeuzem, S., Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, V.-u. S., Deutsche Gesellschaft für Pathologie e, V., Deutsche, L., Gesellschaft für Virologie e, V., Gesellschaft für Padiatrische Gastroenterologie und, E., Österreichische Gesellschaft für Gastroenterologie und, H., Schweizerische Gesellschaft für, G., Deutsche Transplantationsgesellschaft e, V., Deutsche Leberhilfe e, V., Deutsche Gesellschaft für Infektiologie e, V., Deutsche Gesellschaft für Suchtmedizin e, V., Deutsche, A.-G. e. V., Deutsche Arbeitsgemeinschaft niedergelassener Ärzte für die Versorgung, H. I. V. I., Robert, K.-I. (2018). [Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis-C-virus (HCV) infection: the German guidelines on the management of HCV infection - AWMF-Register-No.: 021/012]. *Z Gastroenterol* 56: 756-838.
142. Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* 21: 5017-5025.
143. Seeff, L. B. (2002). Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36: S35-46.
144. Shavinskaya, A., Boulant, S., Penin, F., McLauchlan, J., Bartenschlager, R. (2007). The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem* 282: 37158-37169.

145. She, Y., Han, T., Ye, L., Wu, Z. (2009). Hepatitis C virus NS2/3 protease regulates HCV IRES-dependent translation and NS5B RdRp activity. *Arch Virol* 154: 1465-1473.
146. Shepard, C. W., Finelli, L., Alter, M. J. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5: 558-567.
147. Sherman, K. E., Flamm, S. L., Afdhal, N. H., Nelson, D. R., Sulkowski, M. S., Everson, G. T., Fried, M. W., Adler, M., Reesink, H. W., Martin, M., Sankoh, A. J., Adda, N., Kauffman, R. S., George, S., Wright, C. I., Poordad, F. (2011). Response-guided telaprevir combination treatment for hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 365: 1014-1024.
148. Shimakami, T., Welsch, C., Yamane, D., McGivern, D. R., Yi, M., Zeuzem, S., Lemon, S. M. (2011). Protease inhibitor-resistant hepatitis C virus mutants with reduced fitness from impaired production of infectious virus. *Gastroenterology* 140: 667-675.
149. Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin, I. T., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J., Widell, A. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42: 962-973.
150. Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A. H., Bartenschlager, R., Pietschmann, T. (2007). Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* 3: e103.
151. Strader, D. B., Wright, T., Thomas, D. L., Seeff, L. B. (2004). Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 39: 1147-1171.
152. Stross, C., Shimakami, T., Haselow, K., Ahmad, M. Q., Zeuzem, S., Lange, C. M., Welsch, C. (2016). Natural HCV variants with increased replicative fitness due to NS3 helicase mutations in the C-terminal helix alpha18. *Sci Rep* 6: 19526.
153. Sullivan, J. C., De Meyer, S., Bartels, D. J., Dierynck, I., Zhang, E. Z., Spinks, J., Tigges, A. M., Ghys, A., Dorrian, J., Adda, N., Martin, E. C., Beumont, M., Jacobson, I. M., Sherman, K. E., Zeuzem, S., Picchio, G., Kieffer, T. L. (2013). Evolution of treatment-emergent resistant variants in telaprevir phase 3 clinical trials. *Clin Infect Dis* 57: 221-229.
154. Susser, S., Welsch, C., Wang, Y., Zettler, M., Domingues, F. S., Karey, U., Hughes, E., Ralston, R., Tong, X., Herrmann, E., Zeuzem, S., Sarrazin, C. (2009). Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* 50: 1709-1718.
155. Susser, S., Vermehren, J., Forestier, N., Welker, M. W., Grigorian, N., Fuller, C., Perner, D., Zeuzem, S., Sarrazin, C. (2011). Analysis of long-term persistence of resistance mutations within the hepatitis C virus NS3 protease after treatment with telaprevir or boceprevir. *J Clin Virol* 52: 321-327.
156. Susser, S., Flinders, M., Reesink, H. W., Zeuzem, S., Lawyer, G., Ghys, A., Van Eygen, V., Wittek, J., De Meyer, S., Sarrazin, C. (2015). Evolution of hepatitis C virus quasispecies during repeated treatment with the NS3/4A protease inhibitor telaprevir. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 2746-2755.

157. Swain, M. G., Lai, M. Y., Shiffman, M. L., Cooksley, W. G., Zeuzem, S., Dieterich, D. T., Abergel, A., Pessoa, M. G., Lin, A., Tietz, A., Connell, E. V., Diago, M. (2010). A sustained virologic response is durable in patients with chronic hepatitis C treated with peginterferon alfa-2a and ribavirin. *Gastroenterology* 139: 1593-1601.
158. Takamizawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onishi, E., Andoh, T., Yoshida, I., Okayama, H. (1991). Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 65: 1105-1113.
159. Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K., Shimotohno, K. (1996). Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 70: 3307-3312.
160. Tanaka, Y., Shimoike, T., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Ushijima, H., Matsuura, Y., Miyamura, T. (2000). Selective binding of hepatitis C virus core protein to synthetic oligonucleotides corresponding to the 5' untranslated region of the viral genome. *Virology* 270: 229-236.
161. Tanji, Y., Kaneko, T., Satoh, S., Shimotohno, K. (1995). Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *J Virol* 69: 3980-3986.
162. Targett-Adams, P., Hope, G., Boulant, S., McLauchlan, J. (2008). Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *J Biol Chem* 283: 16850-16859.
163. Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N., Lai, M. M. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285: 107-110.
164. Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L., Treadaway, J. C., Rice, C. M. (2008). Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol* 82: 1073-1083.
165. Terrault, N. A. (2002). Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 36: S99-105.
166. Terrault, N. A., Dodge, J. L., Murphy, E. L., Tavis, J. E., Kiss, A., Levin, T. R., Gish, R. G., Busch, M. P., Reingold, A. L., Alter, M. J. (2013). Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. *Hepatology* 57: 881-889.
167. Thierfelder, W., Hellenbrand, W., Meisel, H., Schreier, E., Dortsch, R. (2001). Prevalence of markers for hepatitis A, B and C in the German population. Results of the German National Health Interview and Examination Survey 1998. *Eur J Epidemiol* 17: 429-435.
168. Thimme, R., Binder, M., Bartenschlager, R. (2012). Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiol Rev* 36: 663-683.
169. Thomas, X. V., de Bruijne, J., Sullivan, J. C., Kieffer, T. L., Ho, C. K., Rebers, S. P., de Vries, M., Reesink, H. W., Weegink, C. J., Molenkamp, R., Schinkel, J. (2012). Evaluation of persistence of resistant variants with ultra-deep pyrosequencing in chronic hepatitis C patients treated with telaprevir. *PLoS One* 7: e41191.

170. Tokita, H., Okamoto, H., Iizuka, H., Kishimoto, J., Tsuda, F., Lesmana, L. A., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1996). Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotypes in the second (2e and 2f), tenth (10a) and eleventh (11a) genetic groups. *J Gen Virol* 77 ( Pt 2 ): 293-301.
171. Tong, X., Chase, R., Skelton, A., Chen, T., Wright-Minogue, J., Malcolm, B. A. (2006). Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH 503034. *Antiviral Res* 70: 28-38.
172. Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66: 1476-1483.
173. Vermehren, J., Schlosser, B., Domke, D., Elanjimattom, S., Muller, C., Hintereder, G., Hensel-Wiegel, K., Tauber, R., Berger, A., Haas, N., Walcher, F., Mockel, M., Lehmann, R., Zeuzem, S., Sarrazin, C., Berg, T. (2012a). High prevalence of anti-HCV antibodies in two metropolitan emergency departments in Germany: a prospective screening analysis of 28,809 patients. *PLoS One* 7: e41206.
174. Vermehren, J., Susser, S., Lange, C. M., Forestier, N., Karey, U., Hughes, E., Ralston, R., Tong, X., Zeuzem, S., Sarrazin, C. (2012b). Mutations selected in the hepatitis C virus NS3 protease domain during sequential treatment with boceprevir with and without pegylated interferon alfa-2b. *J Viral Hepat* 19: 120-127.
175. Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A. H., Dubuisson, J. (2010). Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol* 84: 10159-10168.
176. Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., Liang, T. J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11: 791-796.
177. Walewski, J. L., Keller, T. R., Stump, D. D., Branch, A. D. (2001). Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *Rna* 7: 710-721.
178. Wang, Y. S., Youngster, S., Grace, M., Bausch, J., Borden, R., Wyss, D. F. (2002). Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 547-570.
179. Webster, G., Barnes, E., Brown, D., Dusheiko, G. (2000). HCV genotypes--role in pathogenesis of disease and response to therapy. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 14: 229-240.
180. Weiner, A. J., Geysen, H. M., Christopherson, C., Hall, J. E., Mason, T. J., Saracco, G., Bonino, F., Crawford, K., Marion, C. D., Crawford, K. A., et al. (1992). Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3468-3472.
181. Welsch, C., Domingues, F. S., Susser, S., Antes, I., Hartmann, C., Mayr, G., Schlicker, A., Sarrazin, C., Albrecht, M., Zeuzem, S., Lengauer, T. (2008). Molecular basis of telaprevir

resistance due to V36 and T54 mutations in the NS3-4A protease of the hepatitis C virus. *Genome Biol* 9: R16.

182. Welsch, C., Schweizer, S., Shimakami, T., Domingues, F. S., Kim, S., Lemon, S. M., Antes, I. (2012). Ketoamide resistance and hepatitis C virus fitness in val55 variants of the NS3 serine protease. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 1907-1915.

183. Wiegand, J., Buggisch, P., Boecher, W., Zeuzem, S., Gelbmann, C. M., Berg, T., Kauffmann, W., Kallinowski, B., Cornberg, M., Jaeckel, E., Wedemeyer, H., Manns, M. P. (2006). Early monotherapy with pegylated interferon alpha-2b for acute hepatitis C infection: the HEP-NET acute-HCV-II study. *Hepatology* 43: 250-256.

184. Wolk, B., Sansonno, D., Krausslich, H. G., Dammacco, F., Rice, C. M., Blum, H. E., Moradpour, D. (2000). Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* 74: 2293-2304.

185. Wose Kinge, C. N., Espiritu, C., Prabdi-Sing, N., Sithebe, N. P., Saeed, M., Rice, C. M. (2014). Hepatitis C virus genotype 5a subgenomic replicons for evaluation of direct-acting antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 5386-5394.

186. Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S. I., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J. R., Kohara, M. (1998). The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 72: 6048-6055.

187. Yu, K. L., Jang, S. I., You, J. C. (2009). Identification of in vivo interaction between Hepatitis C Virus core protein and 5' and 3' UTR RNA. *Virus Res* 145: 285-292.

188. Yu, M., Peng, B., Chan, K., Gong, R., Yang, H., Delaney, W. t., Cheng, G. (2014). Robust and persistent replication of the genotype 6a hepatitis C virus replicon in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 2638-2646.

189. Zeuzem, S., Feinman, S. V., Rasenack, J., Heathcote, E. J., Lai, M. Y., Gane, E., O'Grady, J., Reichen, J., Diago, M., Lin, A., Hoffman, J., Brunda, M. J. (2000). Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 343: 1666-1672.

190. Zeuzem, S., Andreone, P., Pol, S., Lawitz, E., Diago, M., Roberts, S., Focaccia, R., Younossi, Z., Foster, G. R., Horban, A., Ferenci, P., Nevens, F., Mullhaupt, B., Pockros, P., Terg, R., Shouval, D., van Hoek, B., Weiland, O., Van Heeswijk, R., De Meyer, S., Luo, D., Boogaerts, G., Polo, R., Picchio, G., Beumont, M. (2011). Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med* 364: 2417-2428.

191. Zeuzem, S., Foster, G. R., Wang, S., Asatryan, A., Gane, E., Feld, J. J., Asselah, T., Bourliere, M., Ruane, P. J., Wedemeyer, H., Pol, S., Flisiak, R., Poordad, F., Chuang, W. L., Stedman, C. A., Flamm, S., Kwo, P., Dore, G. J., Sepulveda-Arzola, G., Roberts, S. K., Soto-Malave, R., Kaita, K., Puoti, M., Vierling, J., Tam, E., Vargas, H. E., Bruck, R., Fuster, F., Paik, S. W., Felizarta, F., Kort, J., Fu, B., Liu, R., Ng, T. I., Pilot-Matias, T., Lin, C. W., Trinh, R., Mensa, F. J. (2018). Glecaprevir-Pibrentasvir for 8 or 12 Weeks in HCV Genotype 1 or 3 Infection. *N Engl J Med* 378: 354-369.



## 7 Publikationen

Teile dieser Arbeit finden sich in folgenden Publikationen:

Susser, S., Welsch, C., Wang, Y., **Zettler, M.**, Domingues, F. S., Karey, U., Hughes, E., Ralston, R., Tong, X., Herrmann, E., Zeuzem, S., Sarrazin, C. (2009). Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* 50: 1709-1718.

Vermehren, J., Susser, S., Lange, C. M., Forestier, N., Karey, U., Hughes, E., Ralston, R., Tong, X., Zeuzem, S., Sarrazin, C. (2012b). Mutations selected in the hepatitis C virus NS3 protease domain during sequential treatment with boceprevir with and without pegylated interferon alfa-2b. *J Viral Hepat* 19: 120-127.

Susser, S. (2009). Genotypische und phänotypische Untersuchungen zu Resistenzmechanismen des Hepatitis C Virus gegenüber NS3 Protease Inhibitoren. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften.

Inhalte der Arbeit wurden auf verschiedenen Kongressen präsentiert:

Europäischer Leberkongress (EASL), Berlin, 2011

Susser S, Schelhorn S-E, Lange CM, Welsch C, Vermehren J, Füller C, Zeuzem S, Lengauer T, Sarrazin C

Analysis of complex mutation patterns in the hcv quasispezies of patients treated with telaprevir or boceprevir

Amerikanischer Leberkongress (AASLD), San Francisco, 2011

Susser, S., Schelhorn, S.-E., Lange, C.M., Welsch, C., Vermehren, J., Perner, D., Füller, C., Zeuzem, S., Sarrazin, C.

Importance of newly described rare hepatitis C virus protease resistance mutations in patients treated with telaprevir and boceprevir

---

Amerikanischer Leberkongress (AASLD), Boston, 2012

S Susser, S-E Schelhorn, CM Lange, C Welsch, J Vermehren, D Perner, C Füller, T Lengauer, S Zeuzem, C Sarrazin

454 Deep Sequencing Analysis of Hepatitis C Virus NS3 Protease Resistance Mutations A87T, R117H, and S174F in Patients Treated with Telaprevir or Boceprevir

## 8 Danksagung

Besonderer Dank gebührt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. C. Sarrazin. Durch die Bereitstellung dieses Themas war es mir möglich, innerhalb der Laboratorien der Abteilung für Gastroenterologie am Universitätsklinikum Homburg Einblicke in den Laboralltag und Kenntnisse im wissenschaftlichen Arbeiten sowie molekularbiologischer Arbeitstechniken zu erlangen.

Bei meiner Betreuerin, Dr. rer. nat. Simone Susser, möchte ich mich für die Geduld über die vielen Jahre bis zur Fertigstellung der Arbeit bedanken. Ihre konstruktive Kritik und Hilfestellungen während jeder Phase der Arbeit haben maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Bei Dennis Wincheringer möchte ich mich bedanken, da ich durch ihn erst an diese Promotionsarbeit geraten bin.

Weiterhin möchte ich mich bei den vielen Kollegen, mit welchen ich im Zeitraum von Ende 2006 bis Ende 2007 in den Laboratorien der gastroenterologischen Abteilung am Universitätsklinikum Homburg arbeiten durfte, herzlichst bedanken. Ihre ständige Hilfsbereitschaft bei kleinen wie größeren Problemen im Laboralltag sowie ein durchweg kollegiales und freundliches Arbeitsklima haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, deren aufmunternde Worte mich über die Jahre das ein oder andere Mal vor Verzweiflung bewahrt haben.

## **9 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.