

## 5 Diskussion

Seit 1987 mit dem Wirkstoff AZT das erste antiretrovirale Medikament zur Behandlung von HIV Infektionen in Deutschland zugelassen wurde, wird von Resistenzentwicklungen der Viren und damit verbundenen Therapieversagen berichtet (Marx 1989, Larder *et al.* 1989, Van Vaerenbergh *et al.* 2002). Inzwischen stehen in Deutschland 16 Wirkstoffe zur Verfügung, die seit der Zulassung der Proteaseinhibitoren 1996 in Kombinationstherapien (HAART) eingesetzt werden.

Trotz der durch HAART erreichten langandauernden Unterdrückung der viralen Replikation unter die Nachweisgrenze kommerzieller Testsysteme (Viruslast  $< 50$  geq/ml), entstehen auch unter einer Therapie neue Virusvarianten, die aufgrund von Mutationen in den therapeutischen Zielenzymen Protease und Reverse Transkriptase gegenüber den Wildtypvarianten unter Therapie einen Wachstumsvorteil haben. Wenn sich solche Virusvarianten durch Übertragung ausbreiten, ist eine baldige Unwirksamkeit der Wirkstoffe wahrscheinlich. Für die Einschätzung der HIV-Epidemie und deren Verlauf ist es daher wichtig, Kenntnis darüber zu erlangen, ob diese resistenten Virusvarianten bei einer Infektion übertragen werden, und ob die Übertragungsrate im zeitlichen Verlauf zunimmt. Darüber hinaus ist die Kenntnis über die Vermehrungsfähigkeit (virale Fitness) der resistenten Virusvarianten in Abwesenheit von antiretroviralen Substanzen von Bedeutung. Wenn immer zahlreichere Neuinfektionen mit bereits resistenten Virusvarianten erfolgen würden, die eine ähnliche virale Fitness aufzeigen wie die Wildtypvarianten, stünden in absehbarer Zeit keine wirksamen antiretroviralen Substanzen zur initialen Behandlung der HIV Infektion zur Verfügung und es würde bald die gleiche therapeutische Situation vorliegen wie zu Beginn der Epidemie.

### 5.1 Übertragung resistenter HIV

Es wurden 136 therapie-naive HIV-Infizierte untersucht, die im Rahmen der Seroconverterstudie des Robert Koch-Institutes zwischen 1996 und 2001 rekrutiert wurden und in Deutschland leben.

Dabei zeigte sich, dass 11% der Neuinfektionen in diesem Patientenkollektiv mit bereits resistenten Viren erfolgten. Die meisten der untersuchten PatientInnen kamen aus Berlin und die Übertragung der Viren erfolgte hauptsächlich durch homosexuelle Kontakte ( $>90\%$ ).

Obwohl das Kollektiv nicht repräsentativ für Deutschland ist, können anhand der Daten Aussagen über die Übertragungsrate resistenter HIV bei Neuinfektionen getroffen werden.

Eine wesentliche Qualität der Serokonverterstudie war der dokumentierte Zeitraum der Serokonversion der infizierten Patienten. Die Kenntnis der Serokonversion ermöglicht die Eingrenzung des Infektionszeitpunktes, der bei der überwiegenden Zahl der HIV Infizierten nicht bekannt ist, wodurch Inkubations- und Überlebenszeiten nur schwer abschätzbar sind.

Da nach einer Übertragung resistenter Viren der Selektionsdruck durch die Therapie wegfällt, besteht die Möglichkeit, dass diese resistenten Viren von Wildtypvarianten überwachsen werden, sollten sie aufgrund der Resistenzverursachenden Mutationen in den therapeutischen Zielenzymen langsamer als der Wildtyp replizieren. Diese Varianten werden, wenn der Zeitraum zwischen Infektion und der Blutabnahme, aus der die Resistenztestung erfolgt zu lang ist, nicht erfasst. Sie können jedoch in Kompartimenten wie den Lymphknoten, systemischen Organen oder dem Liquor/ZNS vorhanden sein, dort als Proviren in die genomische DNA der Zellen integrieren, unter Therapie rasch reaktiviert werden und zu einem frühen Therapieversagen führen.

In dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientenkollektiv erfolgte die Asservierung einer Blutprobe zur Resistenztestung bei der Hälfte der PatientInnen in weniger als drei Monaten nach der Infektion. Bei ca. 30% der Infizierten war es sogar möglich den Infektionszeitpunkt noch näher zu bestimmen, da hier noch vor der Serokonversion, also während der akuten Phase der Infektion (erste virämische Phase) eine Blutprobe erhalten werden konnte. Lag eine genauere Angabe zum Infektionszeitpunkt nicht vor, wurde das arithmetische Mittel zwischen dem letzten negativen HIV-Test und dem ersten positiven HIV-Nachweis (RNA- oder AK-Test) als Infektionszeitpunkt angenommen. Studienbedingt sollten diese beiden HIV Teste nicht länger als drei Jahre auseinander liegen, so dass nur fünf der 136 untersuchten Blutproben später als 18 Monate nach diesem errechneten Infektionsdatum asserviert wurden, da in den meisten Fällen eine Blutprobe von der Abnahme, mit der der positive HIV Nachweis erfolgt war, erhalten werden konnte.

Dennoch ist es aufgrund der Möglichkeit des Überwachsens resistenter Viren durch replikationskompetentere Wildtypvarianten sehr wahrscheinlich, dass in mehr als 11% der Neuinfektionen phänotypisch resistente Viren übertragen werden.

Nach den Ergebnissen der genotypischen Resistenzuntersuchungen der HIV aus dem Studienkollektiv der therapie-naiven Serokonverter hatten 47% (n=64) der übertragenen Viren mindestens eine resistenz-assoziierte Mutation (primär oder sekundär) in den therapeutischen Zielenzymen. Davon zeigten jedoch nur 23% (n=15) eine relevante phänotypische Resistenz.

Es ist wahrscheinlich, dass hier Übertragungen resistenter Viren stattgefunden haben, die zum Zeitpunkt der Blutabnahme schon vom Wildtyp überwachsen waren. Diese Hypothese wird

gestützt durch das Auffinden von Mutationen an resistenz-assoziierten Aminosäurepositionen sensitiver Viren.

Ein deutliches Beispiel für diese Befunde sind die Mutationen an der Position 215 der Reversen Transkriptase. Wird das dort im Wildtyp vorliegende Threonin durch Tyrosin oder Phenylalanin (T215Y/F) ersetzt, besteht für das Virus eine *in vitro* Resistenz gegen AZT, wodurch es in Anwesenheit der Substanz einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp erhält.

Fällt jedoch der Selektionsdruck durch die Therapie weg, vermehren sich Viren mit dieser Mutation schlechter als der Wildtyp und werden rasch vom Wildtyp überwachsen (Yerly *et al.* 1998) bzw. es kommt zu weiteren Mutationen an diesem Codon, wie Untersuchungen an Virusklonen zeigten (deRonde *et al.* 1998). Dabei wird keine Rückmutation der Viren zum Threonin an Codon 215 beobachtet, wofür zwei Nukleotidaustausche notwendig wären, sondern die Viren mutieren von der resistenten Variante T215Y zu der sensitiven Variante T215D (1 Nukleotidaustausch). Nach weiteren Replikationen wird in diesen Virusvarianten hauptsächlich Serin an Position 215 der RT beobachtet (T215S).

Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit durch Untersuchungen von Viren aus therapie-naiven Serokonvertern bestätigt werden. In den drei Fällen der Übertragung von Viren mit den AS-Austauschen T215Y/F lag die zeitliche Differenz zwischen Serokonversion und Blutabnahme zwischen null (akute Phase der Infektion) und fünf Monaten. In drei weiteren Fällen, in denen Viren mit den Mutationen T215D bzw. T215S in therapie-naiven Serokonvertern detektiert wurden, war die Infektion 11-15 Monate vor Blutabnahme erfolgt. In zwei Proben wurden Viren mit der Mutation T215S vier bzw. fünf Monate nach Infektion nachgewiesen. In einem Fall wurde in Viren die T215D-Mutation nachgewiesen, obwohl die untersuchte Blutprobe während der akuten Phase der Infektion des Indexpatienten erhalten werden konnte. Es ist jedoch auch möglich, dass hier der Selektionsdruck schon vor dem Transmissionsereignis nicht mehr vorlag, so dass bereits die sensitive Virusvariante übertragen wurde.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse die zeitliche Abhängigkeit der Mutationen an Codon 215 der RT in Abwesenheit von AZT *in vivo*, so dass eine große Wahrscheinlichkeit der Übertragung von mindestens fünf weiteren resistenten Viren in therapie-naive Serokonverter aus dem hier untersuchten Patientenkollektiv besteht.

Auch wenn die Virusvarianten mit den T215D/S Mutationen im *in vitro* Phänotypentest zur Resistenzuntersuchung eine Sensitivität gegen AZT aufzeigten, tragen sie das Potential zur schnellen Resistenzentwicklung unter Therapie.

Werden diese Befunde bei der Berechnung der Übertragungsrate resistenter HIV in Deutschland berücksichtigt, erfolgten 15% der 136 Neuinfektionen mit bereits resistenten Viren. Innerhalb des Studienkollektives wurden weitere Viren aufgefunden, die Mutationen an resistenz-assoziierten Positionen trugen, jedoch sensitiv für antiretrovirale Wirkstoffe waren. Da diese Mutationen in der Literatur nicht als Folgemutationen resistenter Viren beschrieben sind, wurden sie in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse zeigen deutlich die Wichtigkeit der Kenntnis des Infektionszeitpunktes zur Erfassung der Übertragungsrate resistenter Viren und außerdem die Notwendigkeit, die Resistenzuntersuchung möglichst früh nach der Infektion durchzuführen, um eine Aussage über das Resistenzmuster der tatsächlich übertragenen Viren zu erhalten.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass in Deutschland 11%-15% der Neuinfektionen zwischen 1996 und 2001 mit bereits resistenten HIV-1 erfolgten.

Ähnliche Übertragungsraten primärresistenter Viren wurden auch in anderen europäischen Ländern und den USA beobachtet (Perrin *et al.* 1999, Little *et al.* 1999, Yerly *et al.* 1999, Boden *et al.* 1999, Wegner *et al.* 2000, UK Collaborative Group 2001, Briones *et al.* 2001).

Unterschiede im Studiendesign erschweren den Vergleich der Übertragungsraten in den verschiedenen Ländern. So wurde in einigen Studien nur die genotypische Resistenz, also die Anzahl der resistenz-assoziierten Mutationen, untersucht, wobei insbesondere in der Resistenzbestimmung der Protease aufgrund natürlicher Polymorphismen und sekundärer resistenz-assoziiierter Mutationen Diskrepanzen in der Definition für Resistenz in unterschiedlichen Studien vorlagen.

Auch die Unterschiede im Therapie-Regime in den jeweiligen Ländern erschweren die Vergleichbarkeit der Studienergebnisse. So wurden z.B. in einem Studienkollektiv in den USA höhere Übertragungsraten NNRTI-resistenter Viren beobachtet (Wegner *et al.* 2000), als in dem hier für Deutschland untersuchten Patientenkollektiv. Eine mögliche Ursache dafür könnte der Zeitpunkt der Verfügbarkeit des NNRTI Nevirapin sein, das in Deutschland erst seit 1998 und auch nur über internationale Apotheken zu beziehen, in den USA jedoch seit 1996 von der FDA zur Behandlung von HIV-1 Infektionen zugelassen ist.

Die Definition der Serokonversion und damit des möglichen Infektionszeitpunktes der untersuchten Infizierten ist nicht einheitlich, so dass in einigen Studien nur das Datum der Blutabnahme vorliegt. Die in diesen Studien erfolgten Untersuchungen können, wie hier gezeigt wurde, rasch zu zu niedrigen Ergebnissen bei der Untersuchung der Übertragungsraten primärresistenter Viren führen.

Des Weiteren wurde in manchen Studien nur eine kleine Anzahl Patienten untersucht, so dass die beschriebenen Übertragungsraten nicht zwingend repräsentativ für das jeweilige Land sind.

Zur europaweiten Erfassung der Transmission resistenter HIV-1 wurde deshalb Anfang 2002 ein europäisches Projekt SPREAD (Strategy to Control Spread of HIV Drug Resistance in Europe) begonnen, das von Charles Boucher (Eijkman-Winkler Institut for Medical and Clinical Microbiology, Utrecht) koordiniert wird und an dem bisher 14 europäische Mitgliedsstaaten und zwei assoziierte europäische Länder beteiligt sind.

Ziel dieses für zunächst drei Jahre (2002-2004) angelegten Projektes ist unter anderem eine Erhebung repräsentativer Daten auf europäischer Ebene, auf deren Grundlage dann weitere Richtlinien und Empfehlungen zur Resistenztestung erarbeitet werden können, um Faktoren zu erkennen, die zur Übertragung primärresistenter Viren beitragen und eine Strategie zur Senkung der Transmissionsrate resistenter HIV zu entwickeln.

In dieses Projekt werden auch die Daten der Serokonverterstudie einfließen, die im Rahmen des HIV-Kompetenznetzwerkes fortgeführt wird. Die damit verbundene Langzeitbeobachtung der in dieser Arbeit untersuchten Serokonverter sollte eine Beurteilung darüber ermöglichen, ob die nachgewiesenen resistenz-assoziierten Mutationen unter Therapie die Selektion resistenter Varianten beschleunigen.

## 5.2 Dynamik der Übertragung resistenter HIV

Die Resistenzentwicklung der HIV und die Übertragung resistenter Viren bei Neuinfektionen stellen ein zunehmendes Problem bei der Behandlung der HIV-1 Infektionen dar.

Während in den USA ein signifikanter Anstieg der Übertragung resistenter Viren zwischen 1996 und 2000 beobachtet wird (Simon 2001, Little *et al.* 2001, Grant *et al.* 2002) war in den europäischen Ländern zwischen 1996 und 1999 kein Anstieg in den Übertragungsraten primärresistenter Viren zu erkennen (Frankreich, Harzic *et al.* 2002). In der Schweiz ist die Übertragungsrate resistenter HIV nach einem anfänglichen Anstieg von 1996 bis 1997 (8,6% zu 14,6%) kontinuierlich rückläufig, so dass im Jahr 2000 nur noch 4% der Neuinfektionen mit resistenten Viren erfolgten (Yerly *et al.* 2001).

Nachdem Hecht *et al.* erstmals 1998 von einer Übertragung multiresistenter Viren berichtete, stieg die Übertragungsrate von Viren, die gegen zwei Wirkstoffklassen resistent waren, in den USA von 1,5% (Juli 1996) auf 13,5% (Juli 2001) (Grant *et al.* 2002).

Das, in dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv, beobachtete gehäufte Auftreten der Übertragung multiresistenter Viren in den Jahren 2000 und 2001, erreichte keine

statistische Signifikanz. Es ist wahrscheinlich, dass ein eventuell vorhandener Trend in der Transmissionshäufigkeit aufgrund der kleinen Fallzahlen in der vorliegenden Untersuchung statistisch nicht belegt werden kann.

Die Vergleichbarkeit der Übertragungsraten in den verschiedenen Ländern ist aufgrund der doch recht unterschiedlichen Zusammensetzung der Patientenkollektive und Definitionen von Resistenz nicht gegeben. Es ist jedoch klar erkennbar, dass in den USA die Übertragungsrate resistenter Viren seit Einführung von HAART 1996 zunimmt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch in Europa bzw. in Deutschland in einigen Jahren ähnliche Trends beobachtet werden. Aufschluss darüber wird das für Europa initiierte SPREAD Projekt geben.

Angesichts der doch recht hohen Übertragungsraten resistenter Viren (11%-16%) sollte in Deutschland entsprechend den europäischen Richtlinien zur Resistenztestung vor Beginn einer Therapie eine genotypische Resistenztestung erfolgen (The EuroGuidelines Group for HIV Resistance 2001). Dadurch könnten unzureichende Therapieregime vermieden werden, die zur schnellen Resistenzbildung der Viren beitragen und eine Zunahme der Übertragungshäufigkeiten resistenter Viren, wie sie momentan in den USA beobachtet wird, verhindert werden.

### 5.3 Vergleich der genotypischen und phänotypischen Resistenzanalyse

Genotypische Resistenzanalysen zum Auffinden von resistenz-assoziierten Mutationen sind schnell, einfach und relativ kostengünstig durchführbar. Die Bewertung der Ergebnisse gestaltet sich jedoch aufgrund der Komplexität und durch die Möglichkeit der Entwicklung von Kreuzresistenzen zunehmend schwieriger und kann nur von Experten vorgenommen werden.

Die Einrichtung von Datenbanken, die eine Vorhersage der Resistenzeigenschaften der Viren anhand der Nukleotidsequenz der *pol*-Region ermöglichen, hat die Auswertung zunächst vereinfacht. Jedoch können auch diese Ergebnisse ohne Kenntnis der Anamnese des Patienten und ohne virologisches Expertenwissen keine Therapieempfehlungen liefern.

Darüber hinaus stimmen die Vorhersagen zur Resistenz aus dem Genotyp nicht immer mit den tatsächlich *in vitro* gemessenen Phänotyp überein. Dies liegt teilweise daran, dass mit den verwendeten Methoden minoritäre Varianten, die zu weniger als 20% in der Quasiespezies enthalten sind, nicht detektiert werden. Solche Varianten können jedoch teilweise in phänotypischen Resistenzuntersuchungen nachgewiesen werden.

In Ringversuchen wurde gezeigt, dass hier starke laborspezifische Unterschiede vorliegen (Schuurman *et al.* 2002), so dass auch das Auffinden der resistenz-assoziierten Mutationen als

solches ein großes Maß an Erfahrung erfordert. Aber auch wenn die resistenz-assozierten Mutationen in der HIV *pol*-Sequenz detektiert werden, kommt es zu unterschiedlichen Vorhersagen der Resistenzeigenschaften der Viren aufgrund der Kreuzresistenz verursachenden Mutationen, die in ihrer Komplexität bisher nicht vollständig verstanden sind (Schmidt *et al.* 2002). Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig, die Aufschluss darüber geben, wie die einzelnen Mutationen synergistisch und antagonistisch zusammenwirken.

Die phänotypische Resistenzanalyse erscheint zunächst hinsichtlich der Interpretation der Ergebnisse einfacher, werden doch mit dieser Methode die Resistenzeigenschaften der Viren direkt *in vitro* gemessen. Hier besteht jedoch das Problem bei der Bestimmung des "Cut-Off", der eine Aussage darüber zulässt, ab welcher 50% inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) ein HIV-Isolat als resistent gegenüber einer Substanz einzustufen ist. Zur Zeit werden der technische, biologische und klinische "Cut-off" unterschieden.

Der technische "Cut-off" ist von der Methode abhängig, für alle Wirkstoffe gleich und ergibt sich aus empirisch ermittelten Inter-Assay Varianzen. Eine Resistenz kann aufgrund des technischen "Cut-offs" erst ab einer 2,5fachen Erhöhung der  $IC_{50}$  nachgewiesen werden.

Der biologische "Cut-off" spiegelt die phänotypische Schwankungsbreite von Isolaten aus 1000 therapie-naiven Patienten wieder. Er wurde als Mass für die natürliche Variationsbreite von "Wildtyp"-Viren für jedes Medikament separat bestimmt (Antivirogramm<sup>®</sup>, Firma Virco).

Der klinische Cut-off wurde aus der Korrelation zwischen dem Ergebnis der Phänotypisierung und dem klinischen Ansprechen auf eine Therapie abgeleitet (Phenosense<sup>®</sup>, Firma Virologic).

Durch diese unterschiedlichen Grenzwerte, die die Resistenz bzw. Sensitivität der Viren definieren, bedarf auch die phänotypische Resistenzuntersuchung noch der Standardisierung. Zusätzlich werden hohe Anforderungen an den Sicherheitsstandard des Labors, das die Resistenzuntersuchungen gegenüber antiretroviralen Substanzen durchführt, gestellt (BSL3) und es entstehen hohe Kosten für die Untersuchungen in der Zellkultur.

## 5.4 Klinische Relevanz der Resistenzbestimmung

In verschiedenen klinischen Studien zeigten sich Hinweise auf einen Vorteil der Resistenzbestimmung gegenüber dem "standard of care" (VIRADAPT Durant *et al.* 1999; GART Baxter *et al.* 2000; HAVANA Tural *et al.* 2002; ARGENTA Cingolani *et al.* 2002; VIRA 3001; Cohen *et al.* 2002).

Davon ist die VIRADAPT Studie zur Zeit die wichtigste. In ihr wurde gezeigt, dass nach sechs Monaten im Genotyparm der Anteil der Patienten mit einer Viruslast <200 geq/ml doppelt so hoch war, wie in der Vergleichsgruppe, die ohne vorangegangene Genotypisierung therapiert wurde. Nachdem die Studie geöffnet wurde, hatten die Patienten die Möglichkeit eine Therapieumstellung aufgrund einer genotypischen Resistenzbestimmung zu bekommen. Daraufhin wurden im Kontrollarm nach 12 Monaten die gleichen Resultate erzielt wie im Genotyp-Arm.

Die erst kürzlich publizierte HAVANA Studie (Tural *et al.* 2002) zeigt deutlich ein besseres virologisches Ansprechen gegenüber dem "*standard of care*", wenn das Therapieregime auf Expertenratschlag und Genotypisierung der Viren beruht.

Diese Ergebnisse zeigen, zusammen mit den Daten von Hogg *et al.* (2002) und Wood *et al.* (2002), nach denen die Lebenserwartung der Patienten mit der Erfahrung des behandelnden Arztes korrelierte, die Notwendigkeit von Expertenwissen aufgrund der Komplexität der HIV-Therapie und der damit verbundenen Resistenzentwicklung der Viren bei der Behandlung von HIV-Infektionen.

## 5.5 Auswirkung natürlicher Resistenzen auf die Therapierbarkeit von HIV-1 non-B-Infektionen

Für alle Resistenzuntersuchungen werden als Kontrollen Viren des HIV-1 Subtyps B verwendet. Es ist aus der Literatur bekannt, dass Viren des non-B Subtyps "natürliche" Aminosäuremuster im *pol*-Gen aufweisen können, die zu phänotypischen Resistenzen gegen NNRTI und gegen Proteaseinhibitoren führen (Subtyp G Viren und Gruppe O Viren, Descamps *et al.* 1997 und 1998).

Bei Viren mit Zugehörigkeiten zu den HIV-1 Subtypen A, C, D, E, F und J ist aufgrund einiger Mutationen im *pol*-Gen eine rasche Resistenzentwicklung der Viren unter dem Selektionsdruck einer Therapie nicht auszuschließen.



In der vorliegenden Arbeit wurden Viren des Subtyps G und rekombinante Viren des Typs CRF02-AG (IBNG-like) auf das Vorliegen natürlicher Resistenzen sowohl genotypisch als auch phänotypisch untersucht.

Die für den HIV-1 Subtyp G in der Literatur beschriebene phänotypische Resistenz der viralen Protease konnte dabei nicht bestätigt werden. Es wurden jedoch resistenz-assoziierte Mutationen in den Proteasen detektiert, die bei Viren beider Subtypen (G und CRF02-AG) eine rasche Resistenzentwicklung unter PI-Therapie wahrscheinlich erscheinen lassen.

Untersuchungen von Gomes *et al.* (2002) weisen darauf hin, dass die Resistenzentwicklung gegen den PI Nelfinavir abhängig ist von der Subtypzugehörigkeit der Viren. In Viren des Subtyps B konnte nach einem therapeutischen Versagen und dem damit verbundenen Wiederanstieg der Viruslast in der Protease die resistenz-assoziierte Mutation D30N detektiert werden. Viren des Subtyps G hingegen, die Nelfinavirresistenz aufgrund der Mutation L90M entwickelten, wiesen eine Kreuzresistenzen gegen alle PI auf. Darüber hinaus zeigten die meisten Viren des Subtyps G die I54V Mutation.

Nach diesen Ergebnissen ist es zu erwarten, dass Viren des Subtyps G mit größerer Wahrscheinlichkeit als Subtyp B Viren Kreuzresistenzen gegen PI entwickeln, wenn die initiale Therapie Nelfinavir enthält. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Kenntnis der Subtypzugehörigkeit der zu behandelnden HIV-1 Infektion.

## 5.6 Virale Fitness resistenter HIV-1

Viren, mit phänotypischer Resistenz (NRTI/PI und NRTI/NNRTI) wurden auf ihre Vermehrungsfähigkeit (virale Fitness) in Abwesenheit von antiretroviralen Substanzen untersucht. Die virale Fitness beschreibt die Fähigkeit eines Virus in einer gegebenen Umgebung zu replizieren (Nijhuis *et al.* 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die zur Resistenz führenden Mutationen in den therapeutischen Zielenzymen Reverse Transkriptase und Protease in Abwesenheit des Selektionsdrucks die Vermehrungsfähigkeit der resistenten Viren im Vergleich zu sensitiven Wildtypviren herabsetzen.

Um die Ergebnisse der Wachstumsuntersuchungen direkt mit den resistenz-assoziierten Mutationen in Beziehung setzen zu können, wurde das *pol*-Fragment der resistenten Viren in einen HIV-Deletionsvektor kloniert, der bis auf das entsprechende Fragment alle HIV-Gene des Wildtypvirus NL4.3 codierte. Eventuell vorhandene Mutationen in anderen Genen des resistenten Virus, die einen Einfluss auf die Vermehrungseffizienz haben bzw. resistenz-

assoziierte Mutationen wieder kompensieren können, wurden bis auf die in den *gag/pol* Schnittstellen p7/p1 und p1/p6, dadurch ausgeschlossen.

In der Entwicklung der viralen Fitness können zwei Phasen unterschieden werden:

die erste Phase ist charakterisiert durch die Selektion von Viren, die eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber den antiretroviralen Substanzen (Resistenz), aber gleichzeitig ein vermindertes Replikationspotential zeigen;

die zweite Phase ist charakterisiert durch das Auftreten und Selektion zusätzlicher kompensatorischer Mutationen, die das Replikationspotential verstärken (Nijhuis *et al.* 1999).

Die in dieser Arbeit ausgesuchten viralen Klone trugen sowohl fitnessmindernde als auch kompensatorische Mutationen im *pol*-Gen. Das aus Klon 97-4527-K12 hergestellte rekombinante infektiöse Virus zeigte *in vitro* eine AZT und DLV Resistenz und enthielt im Reverse Transkriptase-Gen die als fitnessmindernd beschriebene Mutation M41L (Harrigan *et al.* 1998, Keulen *et al.* 1998), sowie die als Nachfolgemutation des T215Y-Austausches beschriebene T215D-Substitution, die als kompensatorische Mutation gilt, da der fitnessmindernde Einfluss der Mutation 215Y durch Substitution des resistenzvermittelnden Tyrosin durch Aspartat entfällt (Yerly *et al.* 1998, Garcia-Lerma *et al.* 2001).

Die DLV-Resistenz assoziierte Mutation K101R lag in der HIV Quasiespezies der untersuchten Probe nur als minoritäre Variante vor (ca. 30%), so dass insgesamt von Klonen mit diesem genotypischen Resistenzmuster in der RT (M41L, S68G, K101R, R211K, L214F, T215D) eine geringere Vermehrungsfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp erwartet werden konnte.

Die HIV-Klone (99-1408-K03, 99-1408-K04, 99-1408-K05), die aus der multiresistenten Probe 99-1408 hergestellt wurden, wiesen in der Protease ein nahezu identisches Aminosäuremuster auf (L10I, K20R, M36I, M46L, I54V, L63P, A71V, I84V, L90M, I93L).

Die einzigen Unterschiede zwischen diesen Klonen lagen in An- oder Abwesenheit der sekundären Mutationen Q58E und D60E, von denen kein Einfluss auf die virale Fitness zu erwarten war.

Die durch IDV und RTV selektierten Mutationen M46L und I54V hingegen reduzieren die Vermehrungsfähigkeit des Virus, wenn sie in Verbindung mit der V82A-Substitution auftreten (Zhang *et al.* 1997, Mammano *et al.* 1998). Die als stark fitnessmindernde und Kreuzresistenz verursachende Mutation L90M, deren Effekt durch das Vorhandensein des L63P Austausches kompensiert werden kann (Martinez-Picado *et al.* 1999), lag in jedem der drei untersuchten Klone vor. Auch für die Mutationen L10I, M36I, I84V und L90M in Verbindung mit der G48V Substitution (hier nicht vorhanden) ist ein fitnessmindernder Effekt in der Literatur beschrieben (Mammano *et al.* 1998).

Insgesamt war bei der Untersuchung der multiresistenten Probe eine im Vergleich zum Wildtyp geringere Vermehrungsfähigkeit aufgrund der zahlreichen resistenz-assoziierten Mutationen, die nicht durch zusätzliche Mutationen in den *gag/pol*-Schnittstellen p1/p6 und p7/p1 kompensiert waren, zu erwarten.

Zusätzlich zu diesen PI-assoziierten Mutationen trugen die untersuchten multiresistenten HIV Klone resistenz-assoziierte Mutationen der Reversen Transkriptase (D67N, (T69N), K70R, (M184V), R211K, L214F, K219Q). Die Aminosäuremuster der Klone unterschieden sich dabei in der An- und Abwesenheit der Mutationen T69N und M184V, die in Klon 99-1408-K05 gemeinsam, in den Klonen 99-1408-K03 (T69N) und K04 (M184V) einzeln vorhanden waren, so dass anhand dieser drei Klone der Einfluss der M184V Mutation im Zusammenspiel mit der Mutation T69N auf die virale Fitness untersucht werden konnte.

Dabei wurde ein, wie in der Literatur beschrieben, fitnessreduzierender Effekt, verursacht durch die M→V Substitution an Codon 184 der RT in den Klonen 99-1408-K04 und 99-1408-K05 angenommen (Back *et al.* 1996, Larder *et al.* 1995, Miller *et al.* 2002). Für die in allen drei multiresistenten Klonen vorhandenen Mutationen D67N, K70R und K219Q wurden von Caliendo *et al.* (1996) im Zusammenhang mit der T215Y Mutation (in den untersuchten Klonen nicht vorhanden) fitnesssteigernde Effekte beschrieben.

Es war zu erwarten, dass aufgrund der zahlreichen resistenz-assoziierten und teilweise fitnessmindernden Mutationen in den therapeutischen Zielenzymen der multiresistenten Virusklone diese in Abwesenheit von antiretroviralen Substanzen eine gegenüber dem Wildtyp verminderte Vermehrungsfähigkeit zeigen. Dabei war es wahrscheinlich, dass die virale Fitness der Klone 99-1408-K04 und 99-1408-K05, die in der RT die M184V Substitution trugen am geringsten sein würde und die NRTI/PI-resistenten Klone insgesamt weniger effizient replizieren würden als der AZT/DLV resistente Klon 97-4527-K12.

Wie erwartet, wurden für alle resistenten Klone eine gegenüber dem Wildtyp verminderte virale Fitness gemessen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Vermehrungsfähigkeit der einzelnen Klone festgestellt werden. Dies könnte zum Einen daran liegen, dass die virale Fitness der resistenten Viren so stark eingeschränkt ist, dass eine zusätzliche Reduktion, die z.B. durch die M184V Mutation hervorgerufen wird, mit den eingesetzten Methoden nicht mehr messbar ist.

Zum Anderen könnten die Intra-Assay Varianzen der verwendeten Methoden zur Quantifizierung von Virusproduktion (Bestimmung des infektiösen Titors, p24-Antigen Konzentration, Messung der in den Zellkulturüberstand sezernierten Alkalischen Phosphatase SEAP) so groß sein, dass geringere Unterschiede in der Replikationsfähigkeit der einzelnen Virusklone nicht mehr erkennbar sind. Nur wenn die Replikationsfähigkeit der Viren durch Quantifizierung der viralen RNA Moleküle in einer *real time* RT-PCR (TaqMan) untersucht

wurde, konnte eine geringfügig höhere virale Fitness des AZT/DLV resistenten Klons im Vergleich zu den NRTI/PI-resistenten Klonen gemessen werden.

In dieser Messung konnte auch gezeigt werden, dass die multiresistenten Klone, die in der RT die M184V Mutation trugen, wie erwartet geringfügig schlechter replizierten, als der Klon 99-1408-K03 ohne diese Mutation. Ein Einfluss der T69N Mutation auf die virale Fitness, der von Naugler *et al.* (2002) beschrieben wurde, konnte hier nicht beobachtet werden.

Prinzipiell sind alle vier in dieser Arbeit verwendeten Methoden geeignet, virale Fitness resistenter Virusvarianten im Vergleich zu Wildtypviren *in vitro* zu untersuchen. Es ist dabei jedoch wahrscheinlich, dass geringe Unterschiede in der Replikationskapazität, die auftreten könnten, wenn einzelne Mutationen betrachtet werden, damit nicht mehr detektierbar sind. Um diese dennoch zu erfassen, müssten Replikations-Kompetitions-Assays durchgeführt werden, in denen die Viruspopulationen in einem Ansatz gemischt werden und das Herauswachsen der replikationsfähigeren Variante untersucht wird.

## 5.7 Reverse Transkriptase Aktivität resistenter HIV-1

Neben der Untersuchung der viralen Fitness durch Quantifizierung der Virusproduktion wurde die Replikationskompetenz resistenter Viren im Vergleich zu Wildtypviren anhand der viralen Reverse Transkriptase Aktivitäten verglichen. Dazu wurde als Matrize MS2 Phagen RNA verwendet, die von den aus Viruslysaten präparierten RT in cDNA revers transkribiert und anschließend in einer *real time* TaqMan PCR quantifiziert wurde (Böni *et al.* 1996, Arnold *et al.* 1998).

Bei der Auswertung zeigten sich starke Unterschiede in den Ergebnissen, abhängig davon welcher Parameter zur Standardisierung der gemessenen enzymatischen Aktivität auf die Virusmenge verwendet wurde. Da die mit dem p24-Antigentest bzw. mit Virustitration ermittelte Virusmenge der untersuchten Suspensionen nicht mit der RT Konzentration korreliert und auch die Anzahl der RT-Moleküle pro Virupartikel nicht einheitlich ist (zwischen 20-100 RT-Moleküle, Kacian *et al.* 1971, Krakower *et al.* 1977) eignet sich die hier verwendete Methode zwar prinzipiell zur Messung und auch zur Quantifizierung von RT-Aktivitäten, jedoch ist anhand dieser Ergebnisse keine Aussage darüber möglich, ob sich die gemessenen Aktivitätsunterschiede auf unterschiedliche RT-Konzentrationen im Viruslysate oder auf unterschiedliche Enzymaktivitäten begründen. Deshalb ist mit der hier verwendeten Methode nur die virologische jedoch nicht die enzymatische Aktivität der antiretroviral resistenten und sensitiven Reversen Transkriptasen erfassbar (Mölling 1974).

Zur Messung der enzymatischen Aktivität müsste zunächst DNA, die für die Untereinheiten der zu untersuchenden Enzyme codiert in Expressionsvektoren kloniert werden. Nach Überexpression der enzymatischen Untereinheiten in Bakterien, könnten diese aufgereinigt, quantifiziert und dimerisiert werden. Anschließend könnte dann die Messung der RT-Aktivität dieser Präparationen erfolgen (Miller *et al.* 1998, Gerondelis *et al.* 1999). Durch zielgerichtete Mutagenese der Genomabschnitte könnte der Einfluss der einzelnen resistenz-assoziierten Mutationen auf die enzymatische Aktivität direkt untersucht werden.

Zur Messung der enzymatischen Aktivität der viralen Protease wäre diese Methode ebenfalls anwendbar, wie Kiermayr und Skern 2000 zeigten. Hierzu wurde der Expressionvektor derart gestaltet, dass die exprimierten Untereinheiten der Protease durch einen Linker verbunden waren. Die enzymatische Aktivität resistenter und sensitiver Proteasen wurde dann durch Proteolyseexperimente an synthetischen Schnittstellen untersucht.

Für die Einschätzung der Relevanz resistenter HIV am weiteren Verlauf der Epidemie ist es jedoch von größerem Vorteil, Kenntnisse über die virologische Aktivität resistenter Viren als über den Einfluss einzelner resistenz-assoziiertes Mutationen auf die enzymatische Aktivitäten der Protease und Reversen Transkriptase zu erlangen.

## 5.8 Perspektiven

Resistenz gegen die antiretrovirale Wirkstoffe ist ein häufiges Problem bei der Therapie der HIV-1 Infektion und wird verursacht durch Mutationen in den Enzymen Protease und Reverse Transkriptase, gegen die die zur Zeit verfügbaren Wirkstoffe gerichtet sind. Diese resistenten Viren liegen entweder vor Beginn der Therapie in der Quasispezies vor oder sie entstehen während einer Therapie. In Ländern, in denen HIV Infektionen durch eine Kombinationstherapie behandelt werden, wird eine Übertragungsrate resistenter Viren bei Neuinfektionen von ca. 15%-30% beobachtet.

Es wurden mathematische Modelle entwickelt, um die Entwicklung resistenter Viren und deren zukünftige Übertragungsraten vorherzusagen. In einem Modell wird das Therapieversagen hauptsächlich durch das Vorliegen bereits resistenter Viren vor Beginn der initialen Therapie erklärt (Ribeiro *et al.* 2000). In einem zweiten Modell wird die epidemische Verbreitung resistenter Viren hauptsächlich durch die Konversion sensitiver Viren erklärt (Blower *et al.* 2001).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse zweier mathematischer Modelle zeigen deutlich, dass eine Vorhersage und eine Einschätzung des weiteren Verlaufs der Epidemie ohne ausreichend gute Datenerfassung nicht möglich ist. Es wird deutlich, dass eine weitere Überwachung der Transmissionsraten von Primärresistenzen und die Untersuchung der Vermehrungsfähigkeit resistenter Viren für die Entwicklung zukünftiger Therapieschemata unerlässlich ist.

Die Vertiefung der Kenntnisse über die Pharmakokinese der Wirkstoffe bzw. die Optimierung der Wirkstoffe hinsichtlich der Überwindung physiologischer Barrieren (z.B. Blut-Hirn Schranke) in Begleitung der Überwachung der Medikamentenspiegel unter Therapie können die dauerhafte Wirksamkeit von Therapiekonzepten entscheidend verbessern.

Neuere Medikamente, die sich zur Zeit im Zulassungsverfahren befinden und in klinischen Studien erprobt werden, zeigen Wirksamkeit gegen HIV, die bereits gegen die zur Zeit verfügbaren Medikamente resistent sind (NNRTI: TMC125 Gazzard *et al.* 2002, DPC 083 Ruiz *et al.* 2002; PI: Tipranavir Schwartz *et al.* 2002; NRTI: DPC817 Erickson-Viitanen *et al.* 2002, DAPD Chong *et al.* 2002).

Darüber hinaus eröffnet das Prinzip der unter dem Begriff "Entry-Inhibitoren" zusammengefassten drei Wirkstoffklassen der Attachment-Inhibitoren, der Corezeptor-Antagonisten und der Fusionsinhibitoren neue therapeutische Möglichkeiten. Substanzen aus dieser Wirkstoffgruppe zeigten im Tiermodell (SCID-Maus-Modell) und teilweise in klinischen Studien therapeutische Wirksamkeiten, jedoch ist die orale Verfügbarkeit für alle Substanzen dieser Gruppe bisher nicht gegeben. Dennoch wird die Zulassung des Fusionsinhibitors T-20, der sich zur Zeit in der klinischen Phase-II-Studie befindet, erwartet (Lalezari *et al.* 2002).

Die Wirkstoffklasse der Integraseinhibitoren wird zur Zeit in keiner klinischen Studie erprobt, jedoch zeigten Untersuchungen der Substanz S-1360 *in vitro* Wirksamkeit gegen NRTI- und PI-resistente HIV. Außerdem erwies sich das oral verfügbare Medikament im Tiermodell als wenig toxisch (Yoshinaga *et al.* 2002).

Mit diesen neuen Medikamenten könnte es möglich sein HIV Infektionen zu behandeln, die aufgrund von Unverträglichkeiten oder Resistenzen zur Zeit als nicht therapierbar gelten.

Es konnte jedoch auch anhand der Untersuchungen klinischer Verläufe einiger HIV-Infektionen in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch resistente Viren verursachte Infektionen mit veränderten Kombinationstherapieschemata erfolgreich behandelt werden können. Desgleichen bieten Therapiepausen die Möglichkeit, dass die weniger vermehrungskompetenten resistenten Viren vom Wildtyp überwachsen werden und dadurch wieder neue Therapiekombinationen wirksam werden. Solange die Eradizierung der HIV-Infektion nicht

möglich und eine erfolgreich protektive Impfung unwahrscheinlich erscheint, besteht die Notwendigkeit der Überwachung der Evolution resistenter Viren und deren Transmission, sowie der methodischen Weiterentwicklung zur Detektion resistenter Virusvarianten bei Neuinfektionen und Therapieversagen.