

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
des Zentrums für Innere Medizin

Direktor: Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

Kohortenstudie zur Untersuchung der Wirksamkeit einer Kombinationstherapie bei chronisch HBV-infizierten Patienten mit multiplen antiviralen Resistenzen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von:

Jan Schollmeyer

aus Berlin

Hamburg 2010

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 30.06.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Jörg Petersen

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: Prof. Dr. med. Martina Sterneck

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. med. Jörg-Matthias Pollok

INHALTSVERZEICHNIS

1	ARBEITSHYPOTHESE.....	1
2	EINLEITUNG.....	2
2.1	Das Hepatitis-B-Virus	2
2.2	Hepatitis B	3
2.3	Therapie der chronischen HBV-Infektion	4
2.3.1	Indikation und Ziele der Behandlung.....	4
2.3.2	Behandlungsoptionen	5
2.3.2.1	Interferone	5
2.3.2.2	Nukleos(t)id-Analoga	6
2.4	Die HBV-Polymerase	9
2.5	Antivirale Resistenzen	10
2.6	Definition von virologischer, genotypischer und klinischer Resistenz	11
2.7	Resistenzmuster	12
2.8	Resistenzraten.....	13
2.9	Therapie bei Resistenzen	14
3	MATERIAL UND METHODEN	15
3.1	Material.....	16
3.1.1	Substanzen	16
3.1.2	Werkstoffe und Geräte	19
3.2	Methoden.....	22
3.2.1	Quantitative Bestimmung der HBV-DNA im Serum	23
3.2.2	INNO-LiPA HBV DRv2 + DRv3	24
3.2.2.1	Amplifizierung der aufgereinigten DNA	25
3.2.2.2	Visualisierung der Amplifikationsprodukte.....	28
3.2.2.3	Testverfahren für INNO-LiPA HBV DRv2 + DRv2.....	29
3.2.3	Sequenzierung der Proben	32
3.2.3.1	Aufreinigung des PCR-Produktes	32
3.2.3.2	Quantitative DNA-Messung.....	33
3.2.3.3	Vorbereitungen für den Versand	34
3.2.3.4	Versand und Auswertung der Proben	34
3.2.4	Statistische Analyse	34

4	ERGEBNISSE.....	35
4.1	Kohorte 1 (Adefovir + Entecavir).....	35
4.1.1	Baseline Charakteristika	35
4.1.1.1	Demographie	35
4.1.1.2	ALT und HBV Serologie	35
4.1.1.3	Leberstatus	36
4.1.1.4	Resistenzen vor Therapieumstellung.....	37
4.1.2	Therapieverlauf unter Adefovir + Entecavir	38
4.1.2.1	HBV-DNA	38
4.1.2.2	ALT	41
4.1.2.3	HBeAg und HBsAg Status.....	42
4.1.2.4	Sicherheit.....	42
4.1.3	Darstellung der Therapieverläufe	43
4.2	Kohorte 2 (Tenofovir + Entecavir)	48
4.2.1	Baseline Charakteristika	48
4.2.1.1	Demographie	48
4.2.1.2	ALT und HBV Serologie	48
4.2.1.3	Leberstatus	49
4.2.1.4	Resistenzen vor Therapieumstellung.....	50
4.2.2	Therapieverlauf unter Tenofovir + Entecavir.....	51
4.2.2.1	HBV-DNA	51
4.2.2.2	ALT	54
4.2.2.3	HBeAg und HBsAg Status.....	55
4.2.2.4	Sicherheit.....	55
4.2.3	Darstellung der Therapieverläufe	56
5	DISKUSSION.....	60
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	67
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	68
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	70
9	DANKSAGUNG.....	75
10	LEBENS LAUF.....	76
11	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	77

1 Arbeitshypothese

Die Behandlung chronisch Hepatitis B-infizierter Patienten mit Nukleos(t)id-Analoga in sequentiellen Monotherapien hat in der Vergangenheit zur Selektion von zum Teil multiplen antiviralen Resistenzen geführt [1, 2]. Patienten mit fortgeschrittener Leberfibrose oder Leberzirrhose sind besonders durch sog. entzündliche flares der HBV-Erkrankung gefährdet.

Bei Patienten mit Lamivudinresistenz wurde von Lampertico et al. nachgewiesen, dass eine „add on“ Therapie mit Adefovir die Entstehung neuer Resistenzen besser unterdrückt als ein Wechsel auf eine Adefovir-Monotherapie [3-5].

Das Konzept einer Kombinationstherapie hat sich seit langem in der HIV Therapie bewährt, wo durch Verminderung von Resistenzentwicklung eine reduzierte Mortalität erreicht werden konnte [6].

Nach Expertenmeinungen wird in der aktuellen deutschen Leitlinie bei Resistenzentstehung unter einer HBV-Monotherapie eine „add-on“-Therapie mit einem Nukleos(t)id-Analagon mit nicht überlappendem Resistenzprofil empfohlen [7].

Ziel der Arbeit war es, im Rahmen einer monozentrischen retrospektiven Kohortenstudie erstmalig die klinische Wirksamkeit und Sicherheit von den Kombinationstherapien (Adefovir + Entecavir; Tenofovir + Entecavir) in therapieerfahrenen Patienten mit multiplen antiviralen Resistenzen und/oder fortgeschrittenem Leberschaden zu untersuchen.

2 Einleitung

2.1 Das Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) ist ein partiell doppelsträngiges DNA-Virus und gehört zur Familie der Hepadnaviridae. Es ist Erreger einer der weltweit am häufigsten vorkommenden viralen Infektionen des Menschen.

Das Hepatitis-B-Virus hat ein sehr kleines Genom, die Länge des Minus-Strangs umfasst ca. 3200 Basen. Die HBV-Sequenzen wurden in 8 Genotypen (A-H) unterteilt. Diese Genotypen basieren auf Unterschieden in über 8% der Nukleotidsequenz und unterliegen einer deutlichen geografischen Verteilung [8, 9].

Im Vergleich zu anderen DNA-Viren zeigt das Hepatitis-B-Virus einen ungewöhnlichen Replikationszyklus. Sobald das Virus in die Zelle gelangt ist, wird das Hüllprotein entfernt und die virale-DNA in den Zellkern transferiert. Dort wird die partiell doppelsträngige DNA in eine kovalent geschlossene zirkuläre DNA (die sog. circular covalently closed DNA, cccDNA) umgewandelt, welche als Matrize für die mRNA-Synthese dient. Die virale mRNA wirkt als Prägenom, von welchem durch die virale reverse Transkriptase die neue virale DNA transkribiert wird (s. Abb. 1).

In Tiermodellen zeigte sich, dass das Hepatitis-B-Virus über einen Recyclingmechanismus verfügt, in dem ein Teil der neusynthetisierten HBV-DNA in den Zellkern zurücktransportiert, dort in zusätzliche cccDNA konvertiert wird und so den Pool an intrazellulärer cccDNA vergrößert [10] (s. Abb. 1).

Antivirale Therapien zielen auf die reverse Transkriptase der virale Polymerase im Zytoplasma (s. Abb. 1) und verhindern so die Neubildung von weiteren Virionen. Sie haben jedoch keinen direkten Einfluss auf die nukleäre cccDNA. Derzeit existiert keine antivirale Substanz, die einen direkten inhibitorischen Einfluss auf die cccDNA ausübt. Die episodale, als Minichromosomen vorliegende nukleäre cccDNA bedingt die Persistenz der Hepatitis B Virusinfektion. Eine Eradikation ist bislang nicht möglich.

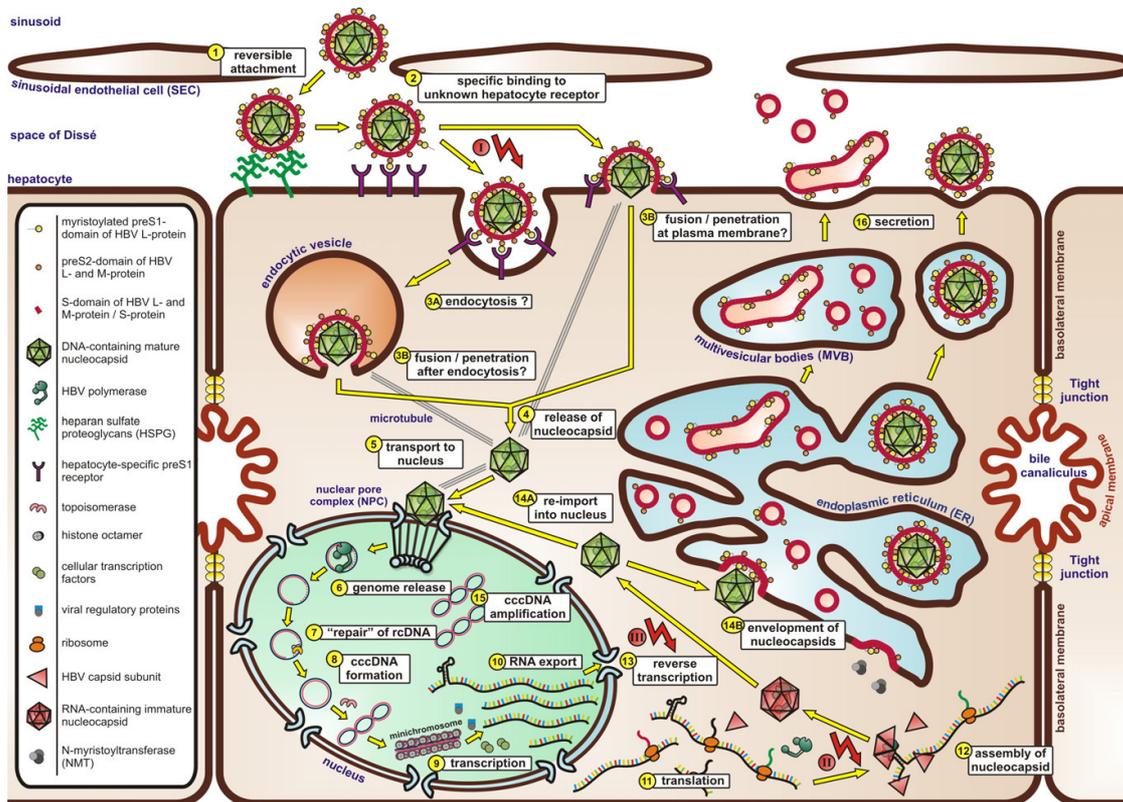


Abbildung 1: Der HBV-Lebenszyklus [11].

2.2 Hepatitis B

Die Hepatitis B-Infektion kann sich klinisch als akute und chronische Leberentzündung manifestieren. Im Erwachsenenalter kommt es meist zu einer akuten Hepatitis B-Infektion mit einer Spontanheilungsrate der Entzündung von 95- 99% [12], wohingegen perinatal oder im Kleinkindesalter häufiger ein chronischer Verlauf zu beobachten ist [7].

Entwickelt sich eine chronische Hepatitis B-Infektion (CHB), geht diese häufig mit schweren Leberschäden wie einer Leberzirrhose und einem hepatozellulärem Karzinom (HCC) einher. Nach Perz et al. sind weltweit 30% der Leberzirrhosen und 53 % des HCC einer CHB-Infektion zuzuordnen [13].

Mehr als 360 Millionen Menschen sind weltweit chronisch Hepatitis-B-infiziert und jedes Jahr sterben circa 600 Tausend Menschen an einer HBV-assoziierten Komplikation [13, 14].

2.3 Therapie der chronischen HBV-Infektion

2.3.1 Indikation und Ziele der Behandlung

Nach der aktuellen deutschen Hepatitis-B-Leitlinie [7] besteht eine sichere Behandlungsindikation bei Patienten mit HBeAg-positiver oder -negativer chronischer Hepatitis B Infektion mit einem deutlichen Virusnachweis ($>10^4$ Kopien/ml), sowie erhöhten Transaminasen, und/oder unter Berücksichtigung des Alters und der Begleiterkrankungen für ein erhöhtes Risiko der Entstehung einer Leberzirrhose [7].

Bei Patienten mit fortgeschrittener Fibrose oder Zirrhose ist jeglicher Nachweis einer Virämie Indikation für eine langfristige antivirale Therapie (s. Abb 2).

Hauptbehandlungsziel ist die Verzögerung der Erkrankungsprogression zur Leberzirrhose, zirrhatischen Dekompensation und hepatozellulärem Karzinom, und somit die Mortalität und Morbidität der chronischen Hepatitis B-Infektion zu vermindern. Um dieses Ziel zu erreichen muss die HBV-DNA dauerhaft unterdrückt und ein HBsAg-Verlust nachgewiesen werden.

Die klinische Ausheilung der Infektion wird als Verlust des HBsAg mit anschließendem Nachweis von Anti-HBs Antikörpern im Serum definiert. Dies kann mit den heute zur Verfügung stehenden Therapeutika aber nur in 5- 10% der chronisch HBV Infizierten erreicht werden [7].

Eine dauerhafte HBeAg-Serokonversion ist anzustreben und geht in der Regel mit einer Verbesserung der Prognose einher [15]. In Deutschland sind allerdings nur etwa 30% der Patienten initial HBeAg positiv. Die Viruslast sollte schnell und effizient gesenkt werden, da ein rascher Abfall der Virusmenge auf 1000 Kopien/ml mit einem geringeren Risiko antivirale Resistenzen zu entwickeln korreliert [16].

Eine Langzeitkontrolle der Virämie ist essentiell, um gegebenenfalls eine Reaktivierung des Virus rechtzeitig zu erkennen. Alle CHB-infizierten Patienten sollten mindestens im halbjährlichen Abstand untersucht werden. Ein sekundäres Behandlungsziel der antiviralen Therapie ist die Senkung der Infektiösität des Patienten, um so die Verbreitung des Virus auf andere Menschen zu vermeiden [7].

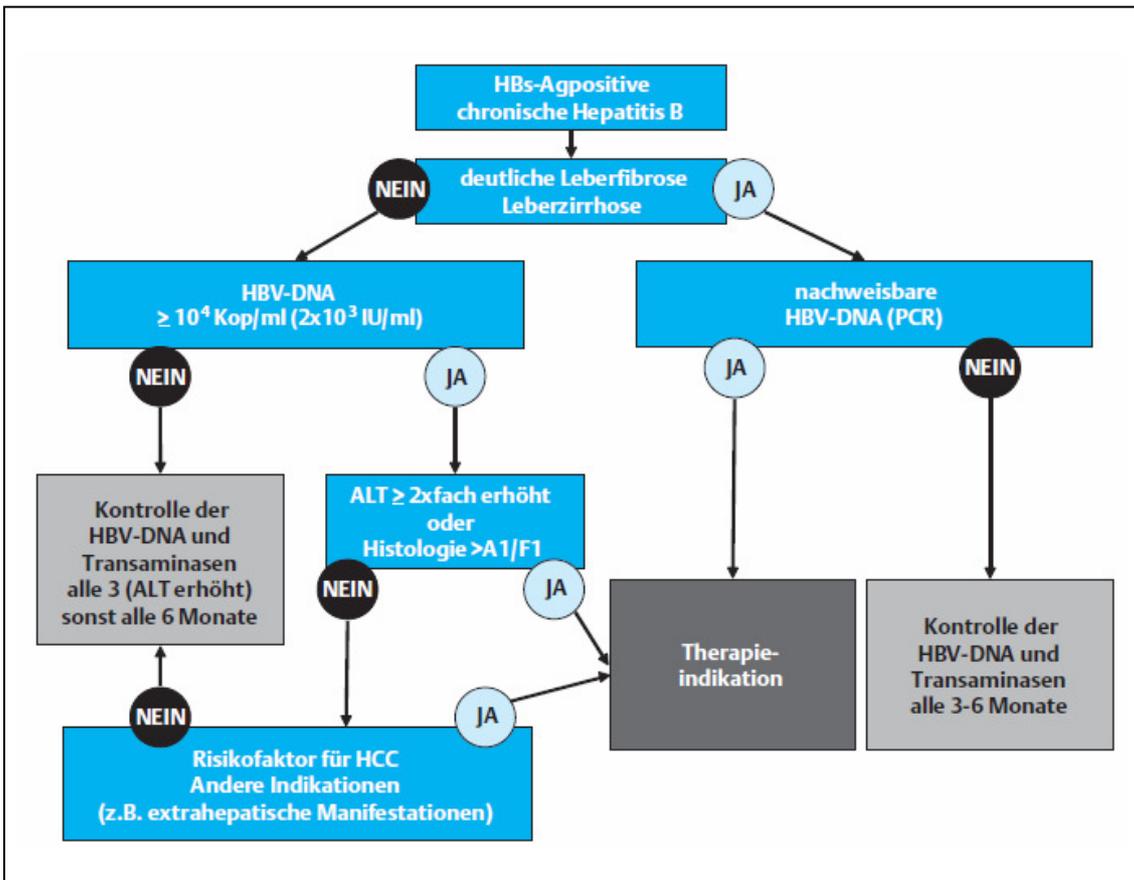


Abbildung 2: Übersicht zur Therapieindikation bei chronischer Hepatitis B nach deutscher Leitlinie [7].

2.3.2 Behandlungsoptionen

In Deutschland sind zurzeit sieben Substanzen zur Behandlung der chronischen Hepatitis B-Infektion zugelassen. Es gibt zwei unterschiedliche Behandlungsansätze, den Immunmodulatorischen (Interferon α und pegyliertes Interferon α -2a), und den Antiviralen durch Nukleosid- (Lamivudin, Entecavir und Telbivudin) und Nukleotid-Analoga (Adefovir und Tenofovir).

2.3.2.1 Interferone

Interferon α -2a (IFNa-2a) ist seit Anfang der 90er Jahre zur Therapie der chronischen Hepatitis B zugelassen (s.Abb.3) und wird zur primären Behandlung im kompensierten Stadium eingesetzt.

Das pegylierte Interferon α -2a (peg IFNa-2a) wurde im Jahr 2005 zugelassen (s.Abb. 3). Es besitzt eine längere Halbwertszeit als das IFNa-2a, muss somit

nur 1x/Woche verabreicht werden, und scheint damit patientenfreundlicher.

Der Vorteil einer Interferontherapie ist die limitierte Therapiedauer und das Ausbleiben von antiviralen Resistenzen, wohingegen die häufig auftretenden Nebenwirkungen und die subkutane Applikation Nachteile sind [17]. Die Nebenwirkungen wie Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Muskel- und Gelenkschmerzen, Anämie und Leukozytopenie, eine Infektneigung, depressive Verstimmung und zum Beispiel Haarausfall führen zu einer sehr belastenden Therapie für den Patienten.

Als Kontraindikationen einer Interferontherapie gelten neben Schwangerschaft und Stillzeit auch hohe Transaminasen (ALT >10 fache der Norm) und eine dekompensierte sowie fortgeschrittene Leberzirrhose [7].

Die Behandlung mit Interferon ist in ihrer Dauer auf 6-12 Monate begrenzt, während die Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga häufig unbegrenzt ist.

2.3.2.2 Nukleos(t)id-Analoga

Für diese antiviralen Therapeutika, auch Nukleos(t)idische-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) genannt, gibt es beim Hepatitis-B-Virus im Gegensatz zum Humanen-Immundefizienz-Virus (HIV) nur einen entscheidenden Angriffspunkt: Die reverse Transkriptase der HBV-Polymerase.

Über die letzten Jahre wurden vermehrt Nukleos(t)id-Analoga (NA) zur Behandlung der chronischen Hepatitis B-Infektion eingesetzt und in Europa zugelassen.

Nukleos(t)id-Analoga unterdrücken die Virusreplikation durch Hemmung der reversen Transkription zunächst effektiv und führen zu einer histologischen Verbesserung der Leber [18, 19].

Es lassen sich folgende Gruppen unterteilen [2]:

1. Die L- Nukleosidanaloga: Lamivudin (LAM), Telbivudin (LdT)
2. Die Azyklischen Phosphonate: Adefovir (ADV) und Tenofovir (TDF);
3. Die cyclopentane Ringgruppe: Entecavir (ETV).

Diese chemische Klassifikation ist wichtig, da sie die Strukturen und Entstehung von antiviralen Resistenzen bestimmt (s. 2.7).

Für die Therapie der chronischen Hepatitis B ist die Kenntnis der antiviralen Effektivität, des Resistenzprofil und der Resistenzentwicklungsrate der unterschiedlichen Nukleos(t)id-Analoga sehr wichtig.

Im Gegensatz zu Interferon treten Nebenwirkungen unter einer Therapie mit Nukleos(t)id-Analoga nur selten auf. Beschrieben werden Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schwindel, Übelkeit, Fieber, Magen-Darm-Beschwerden, Hautausschlag und Husten. Auf Grund einer toxischen Wirkung auf die Mitochondrien kann es zur Laktatazidose, Polyneuropathie und z.B. einer Pankreatitis kommen.

Lamivudin (LAM)

Bereits 1999 wurde das Nukleosid-Analogon Lamivudin (Zeffix[®], 100mg) als erstes orales Medikament zur Behandlung der chronischen Hepatitis B in Europa zugelassen (s.Abb. 3). Daher gibt es für Lamivudin die besten Langzeitdaten und Endpunktstudien.

In einer Studie mit HBeAg-positiven Patienten wurde eine Reduktion der Virusmenge um -4- -5 log₁₀ Kopien/ml und eine HBeAg-Serokonversion von 18-20% nach einem Jahr nachgewiesen. Die virale Unterdrückung ging mit einer ALT-Normalisierung und einer histologischen Verbesserung einher. Ein Rückfall der Erkrankung wurde bei bis zu 50% der Patienten innerhalb der ersten 5 Jahre nach Therapieende beobachtet [19-21].

Adefovir dipivoxil (ADV)

Im März 2003 erhielt mit dem Nukleotid-Analogon Adefovir (Hepsera[®], 10mg) eine neue Substanz die europäische Zulassung für die Behandlung der chronischen Hepatitis B-Infektion (s.Abb. 3). Es zeigt in höheren Dosen (30 und 60mg/d) eine Nephrotoxizität [22], hemmt aber in niedriger Dosis von 10 mg/d die HBV-Replikation effektiv. Eine Dosissteigerung auf 20 mg/d zeigte bei Patienten mit suboptimalem Therapieansprechen unter 10 mg/d keine verbesserte Virussuppression [23].

Die Phase-III-Zulassungsstudie von Adefovir zeigte nach einem Jahr bei 53% der Patienten eine histologische Verbesserung, eine HBV-DNA Reduktion von -3,5 log₁₀ Kopien/ml, bei 12% eine HBeAg-Serokonversion und bei 48% eine ALT-Normalisierung [24].

Bei eingeschränkter Nierenfunktion darf der Einsatz nur unter strenger Indikation und Dosisanpassung erfolgen. Ein primäres Therapieversagen oder ein nur partielles Ansprechen wird bei einer Adefovirtherapie in 10 bis 50% der Patienten beobachtet [25], eventuell auf Grund der geringen Dosis [22, 26].

Entecavir (ETV)

In der HIV-Behandlung zeigte Entecavir (Baraclude[®], 0,5mg) kaum Wirksamkeit und erst später erwies sich, dass es bei CHB-Infizierten Patienten sehr potent ist. Im August 2006 wurde Entecavir zur Behandlung der chronischen Hepatitis B in Europa zugelassen (s.Abb. 3). Eine multizentrische Studie zeigte, dass Entecavir bei HBeAg-positiven Patienten einen im Vergleich zu Lamivudin stärkeren virologischen und biochemischen Effekt hat. Die HBeAg-Serkonversionsrate zeigte jedoch keinen wesentlichen Unterschied (21% vs. 18%) [27].

Eine weitere Studie verglich Entecavir mit Adefovir bei HBeAg-positiven Patienten mit hoher HBV-DNA (medianer baseline Wert war 10,26 und 9,88 log₁₀ Kopien/ml). Entecavir zeigte schon nach 10 Tagen eine signifikant bessere Reduktion der HBV-DNA als Adefovir. Nach 12 Wochen lag die mediane Reduktion bei -6,23 vs. -4,42 log₁₀ Kopien/ml (ETV vs. ADV) und nach 48 Wochen bei -7,28 vs. -5,08 log₁₀ Kopien/ml. In Woche 48 waren 58% vs. 19% der Patienten unterhalb der viralen Nachweisgrenze (HBV-DNA <300 Kopien/ml) [28].

Tenofovir disoproxil fumarate (TDF)

Im April 2008 wurde das Nukleotidanalogon Tenofovir (Viread[®], 245mg) zur Therapie der chronischen Hepatitis B zugelassen (s. Abb.3). Tenofovir und Adefovir wurden in 2 multizentrischen randomisierten doppelblinden Phase-III-Studien mit mehr als 600 Patienten miteinander verglichen. In beiden Studien war Tenofovir signifikant besser als Adefovir. Nach einem Jahr lagen 93% der HBeAg-negativen und 76% der HBeAg-positiven Patienten unterhalb der viralen Nachweisgrenze von 400 Kopien/ml, bei Adefovir waren es 63% beziehungsweise 13% [29].

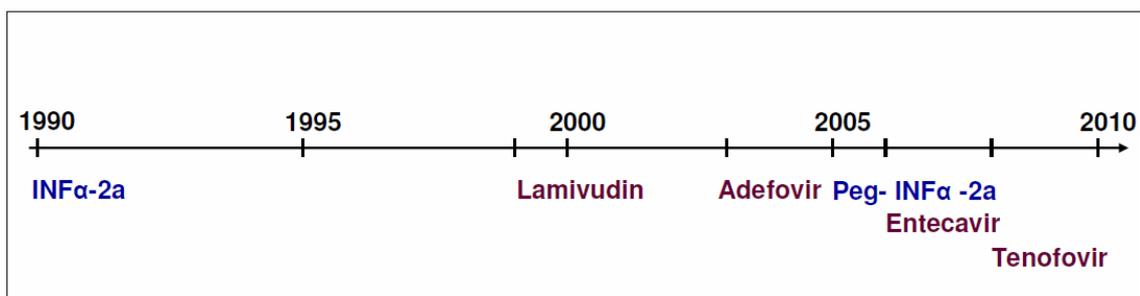


Abbildung 3: Zeitpunkte der Zulassung von HBV-Therapeutika.

2.4 Die HBV-Polymerase

Wirkungsort der Nukleos(t)id-Analoga ist die reverse Transkriptase (rt)-Region der HBV-Polymerase. Sie umfasst etwa 80% des HBV-Genoms und codiert für ca. 840 Aminosäuren. Sie besteht aus vier Domänen: dem Terminalen Protein, der Spacer Region, der reversen Transkriptase (rt) und der C-terminalen RNaseH [30](s. Abb. 4).

Die rt- und die C-terminale RNaseH- Domäne sind wichtige strukturelle Komponenten für die Enkapsidation der prägenomischen-RNA [31] und die C-terminale RNaseH degradiert die RNA von RNA-DNA Hybriden während der reversen Transkription.

Die rt-Region enthält das wichtige Tyrosin-Methionin-Aspartat-Aspartat-(YMDD) Motiv, welches das katalytische Zentrum der rt-Aktivität bildet. Innerhalb der rt-Region werden weitere 7 Domänen (A-G) unterschieden. Diese Domänen sind in Nukleotid- und pgRNA-(Template-) Bindungen involviert und katalysieren die Polymerasereaktion [32].

Eine Besonderheit bei der HBV-Polymerase ist, dass das Terminale-Protein am N-terminus durch einen hoch variablen und unwichtigen Spacer [33] von der reversen Transkriptase getrennt liegt. Der Spacer-Region konnte bisher keine eindeutige Funktion zugewiesen werden [32]. Das Terminale-Protein wurde zuerst als (-)-DNA-Bindungsprotein [34] identifiziert und später konnte gezeigt werden, dass es einen spezifischen Y-Rest, an welchen das erste Nukleotid der (-)-DNA kovalent bindet, bereitstellt [35, 36] und somit für das „priming“ der DNA-Synthese essenziell ist.

Die HBV-Polymerase-Sequenzen überlappen mit den drei anderen „HBV-Open Reading Fraems“ (ORF): Core, präS/S und X-Protein. Dadurch können Mutationen in der Polymeraseregion auch zu Veränderungen z.B. im HBsAg

führen.

Etwa 75% der Polymerase zeigen Homologien zu rt-Aktivität von anderen Retroviren wie HIV1 [32]. Die HBV-Polymerase besitzt keine sog. „proof-reading“-Funktion, so dass es häufig zum Auftreten von Mutationen kommt.

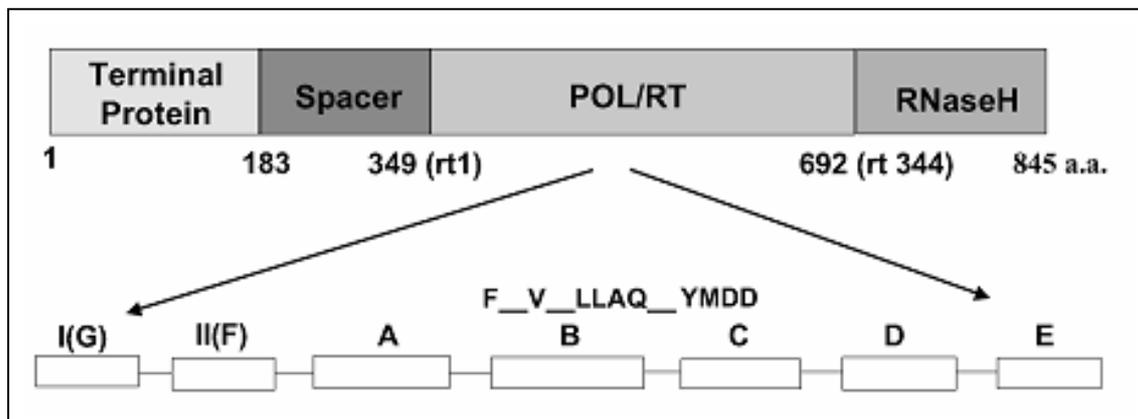


Abbildung 4: Die HBV-Polymerase [37]

2.5 Antivirale Resistenzen

In der Behandlung der chronischen Hepatitis B-Infektion sind antivirale Arzneimittelresistenzen von großer Bedeutung, da sie neben Adhärenzproblemen eine häufige Ursache für ein Therapieversagen darstellen [38]. Mit Ausnahme von Entecavir reicht eine Punktmutation aus um das Hepatitis-B-Virus gegen eine Substanz resistent werden zu lassen [39]. Für Tenofovir wurden bislang keine Resistenzen beschrieben.

In den meisten Fällen kommt es zu relevanten Aminosäure Variationen in der rt-Region. Resistenzen gegenüber einem Wirkstoff bilden auch sogenannte Kreuzresistenzen zu anderen Substanzen mit überlappendem Resistenzprofil, welchen das Virus nie ausgesetzt war.

Nach Entdeckung und Beschreibung von antiviraler Resistenz herrschte ein Durcheinander in der Namensgebung der Resistenzen, da die unterschiedlichen HBV-Genotypen in ihrer genomischen Länge variieren.

Im März 2001 veröffentlichten Lieven J. Stuyver und Kollegen einen Konsensus über die Standardisierung der Nomenklatur von antiviralen HBV-Resistenzen, welcher sich etabliert hat [40].

Stuyver unterteilte die HBV-Polymerase in vier verschiedene funktionelle Einheiten und nummerierte jede Einheit separat. Nach dem Konsensus beginnt

die rt-Region mit dem EDWGPCDEHG-Motiv und enthält 344 Aminosäuren. Mutationen in dieser Region werden mit den Buchstaben rt, gefolgt von der ursprünglichen Wildtyp-Aminosäure, der Kodonnummer relativ zu dem Start der rt-Region, sowie von der durch Mutation entstandenen Aminosäure beschrieben. Als Beispiel sei hier die primäre Lamivudineresistenz erwähnt, welche man als rtM204V/I Mutation beschreibt. Diese Resistenz ist Folge eines Aminosäureaustausches im YMDD-Motiv. Es kommt zu einem Austausch der Aminosäure Methionin durch Valin oder Isoleucin.

2.6 Definition von virologischer, genotypischer und klinischer Resistenz

Im Jahr 2007 wurde ein einheitlicher Konsensusvorschlag zur Standardisierung der Nomenklatur bezüglich antiviraler HBV-Resistenzen veröffentlicht [41]. Dieser Konsensus ist Grundlage der heutigen Definitionen.

Es wird die virologische, genotypische und klinische Resistenz unterschieden. Die virologische Resistenz ist definiert als ein Ansteigen ($>1.0 \log_{10}$ IU/ml) der Viruslast im Serum von Patienten, welche ein Therapieansprechen zeigten und therapieadhärent sind. Der Anstieg muss in zwei Seren, welche im Abstand eines Monats abgenommen wurden, nachweisbar sein.

Als genotypische Resistenz bezeichnet man den Nachweis von antiviralen Resistenzen in der HBV rt-Region. Es wird zwischen zwei Resistenztypen unterschieden: Die primären Resistenz-Mutationen (rt204V/I, rtN236T) und die sekundären/kompensatorischen Mutationen (rtL80V/I, rtL180M). Primäre Resistenzmutationen beruhen auf einem Austausch von Aminosäuren, wodurch beim Virus ein vermindertes therapeutisches Ansprechen hervorgerufen wird. Sekundäre so genannte kompensatorische Resistenzmutationen verursachen Aminosäureaustausche, welche die funktionellen Defekte der viralen Polymerase, verursacht durch primäre Mutationen, behebt. Als Beispiel verursacht das Auftreten einer primären Lamivudinresistenz im Kodon 204 der rt-Region eine mehr als 100fache Abnahme der Lamivudin-Sensibilität. Die häufig assoziierte kompensatorische Mutation ist die rtL180M (Leucin zu Methionin). Die rtL180M-Mutation führt zu einer Wiederherstellung der Replikationsfähigkeit der HBV-Polymerase welche die 204V/I Mutation beherbergt.

Die klinische Resistenz ist durch ein Ansteigen der ALT im Serum und eine Verschlechterung der klinischen Situation definiert.

2.7 Resistenzmuster

Fünf verschiedene Entstehungswege von antiviralen Resistenzen wurden in Patienten mit Nukleos(t)id-Analoga-Therapie beobachtet und von Stephen Locarnini beschrieben [2]. Die chemische Unterteilung der Nukleos(t)id-Analoga in die unter Abschnitt 2.3.2.2. beschriebenen Untergruppen spielt hierbei eine entscheidende Rolle.

Nach Locarnini ist die Entstehung der rtM204V/I-Mutation verantwortlich für Resistenzen gegen L-Nukleoside wie Lamivudin und Telbivudin(LdT), aber auch gegen Entecavir in Lamivudin-erfahrenen Patienten, während die rtN236T-Mutation eine Resistenz gegenüber azyklischen Phosphonaten (Adefovir und Tenofovir) erzeugt. Die rtN236T beeinträchtigt nicht signifikant die Therapie mit LAM, Ldt oder ETV [42, 43] vermindert aber die Effektivität von TDF in vitro [44] und vivo [45]. Diese beiden Entstehungswege können mit dem Auftreten sekundärer Mutationen (rtT184G, rtS202I) assoziiert sein, welche die anschließende Behandlung mit Nukleos(t)id-Analoga wie Entecavir beeinflussen.

Die rtA181T/V-Mutation tritt bei Behandlung mit L-Nukleosiden und alkalischen Phosphonaten auf und ist mit einer Lamivudin- und Adefovir-Resistenz und einer möglichen multiplen Arzneimittelresistenz (multidrug resistance, MDR) assoziiert. Allerdings hat die rtA181T/V-Mutation einen Einfluss auf die TDF-Sensitivität [46], wenn sie alleine oder in Kombination mit der rtN236T-Mutation auftritt.

Bei Entecavir-therapienaiven Patienten ist das Auftreten von mindestens 3 Mutationen zugleich erforderlich um die Entecavir-Sensitivität zu vermindern. Es handelt sich um die Mutationen rtL180M und rtM204V plus entweder rtT184G, rtS202I oder rtM250V.

In Patienten mit einer langen Therapiedauer fanden sich Resistenzmuster wie rtA181T/I233V/N236T/M250L welche mit einer MDR assoziiert sind (s. Abb. 5).

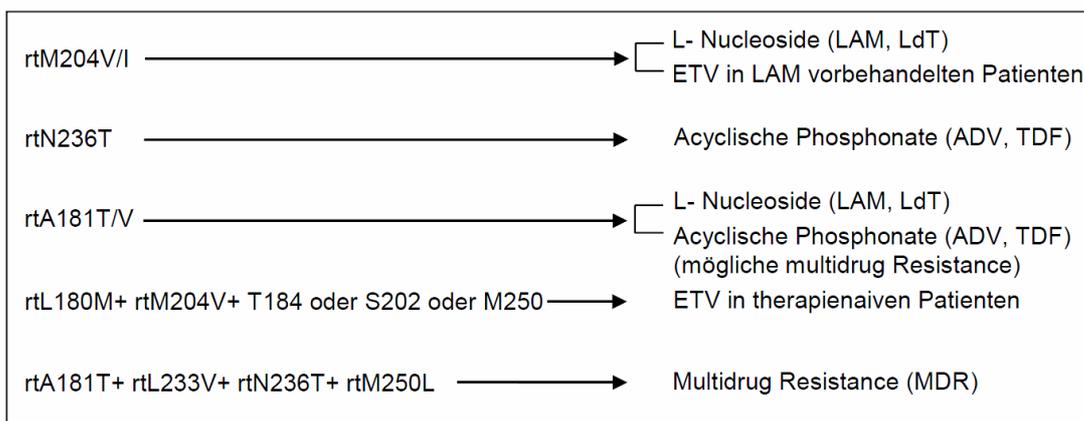


Abbildung 5: Entstehung antiviraler Resistenzen (modifiziert nach Locarnini et al. [2]).

2.8 Resistenzraten

Lamivudin ist ein Nucleosid-Analogon mit einer hohen Resistenzrate, da es eine Resistenzentwicklung von 20% pro Therapiejahr zeigt, welche sich nach 5 Jahren bei einer Gesamtresistenzrate von mehr als 70% stabilisiert [47]. Das bedeutet, dass nur etwa 30% der Patienten dauerhaft auf eine Lamivudintherapie ansprechen. Im Gegensatz zu Lamivudin weisen die anderen Nucleos(t)id-Analoga eine deutlich geringere Resistenzentwicklungsrate auf.

In Studien zeigte Adefovir bei therapienaiven Patienten nach 1 Jahr noch keine Resistenzbildung, nach 4 Jahren konnte jedoch eine Resistenzbildung bei 18%, und nach 5 Jahren bei 29% der Patienten nachgewiesen werden [48, 49].

Entecavir zeigte im Langzeitverlauf eine niedrige Resistenzrate bei therapienaiven Patienten. Nach 6 Jahren entwickelten 1,2% eine antivirale Resistenz [50]. Es wurde jedoch eine höhere Resistenzentwicklungsrate bei mit Lamivudin vorbehandelten Patienten beobachtet [51].

Bei Tenofovir ist nur in Einzelfällen bei HIV/HBV koinfizierten Patienten von einer Resistenzentwicklung berichtet worden [52]. In einer Langzeitstudie konnte beobachtet werden, dass Tenofovir in Lamivudin- und Adefovir-Erfahrenen Patienten keine Resistenz induzierte [45]. In der Zulassungsstudie von Tenofovir wurde nach 144 Wochen ebenfalls bislang keine Resistenzentwicklung beobachtet [53, 54] (s. Abb. 6).

Nukleos(t)idanalogen	Resistenzraten pro Therapiejahr in Prozent der Patienten					
	1	2	3	4	5	6
Lamivudine	23	46	55	71	80	
Adefovir (Therapienaive HBeAg neg. Patienten)	0	3	11	18	29	
Adefovir (bei LAM resistenten Patienten)	0- 18	-	-	-	-	
Entecavir (bei Therapienaiven Patienten)	0,1	0,4	1,1	1,1	-	
Entecavir (bei LAM resistenten Patienten)	6	15	35	43	-	57
Tenofovir	0	0	0	-	-	-

Abbildung 6: Resistenzraten (modifiziert nach Zoulim et al. [39]).

2.9 Therapie bei Resistenzen

Im Falle einer Resistenzentwicklung sollte eine adäquate Rescuetherapie mit dem größten antiviralen Effekt und dem kleinsten Risiko für das Auftreten von multiplen Resistenzen begonnen werden.

Das Hinzufügen (add-on) eines zweiten Nukleos(t)id-Analogons mit nicht überlappendem Resistenzprofil ist bei vorliegender antiviraler Resistenz die effizienteste Möglichkeit [17]. Durch eine add-on- Strategie kann das Auftreten von Resistenzen signifikant vermindert werden [4].

Die aktuelle europäische Leitlinie [17] empfiehlt bei Lamivudinresistenz ein add-on von Tenofovir. Bisher wurde die add-on Gabe von Adefovir empfohlen. Seit der Zulassung von Tenofovir wird dieses jedoch bevorzugt, da es in klinischen Studien eine stärkere virale Suppression [55], sowie geringere Resistenzraten vorweist.

Eine Umstellung (switch) auf Entecavir ist bei Patienten mit LAM-Resistenz untersucht worden. Die Therapie führt zu einer Unterdrückung der Viruslast, birgt jedoch ein relativ hohes Risiko für das Auftreten einer ETV-Resistenz mit mehr als 25% nach 3 Jahren [51] und ist somit laut Reijnders et al. und DGVS-Leitlinie nicht sinnvoll [7, 56]. Bei Lamivudin-vortheraipierten Patienten, welche keine Resistenzen entwickelten, bietet Entecavir weiterhin eine Therapieoption [56].

Bei vorliegender ADV-Resistenz wird ein switch zu Tenofovir und add-on eines zweiten Nukleos(t)id-Analogons ohne Kreuzresistenz empfohlen. Eine Tenofovir-Monotherapie reiche nicht aus, da eine Kreuzresistenz zwischen

Adefovir und Tenofovir vorliege [57]. Liegt eine rtN236T-Mutation vor ist ein add-on von Lamivudin, Entecavir, Telbivudin oder Emtricitabine möglich. Liegt die rtA181T/V-Mutation vor sollte Entecavir hinzugefügt werden. Bei einer LdT- sowie bei ETV-Resistenz sollte Tenofovir hinzugefügt werden.

Eine TDF-Resistenz wurde bisher nur in wenigen Einzelfällen bei HIV-koinfizierten Patienten beobachtet. Auch hier ist ein „add-on“ empfohlen. Adefovir sollte wegen des überlappenden Resistenzprofils nicht eingesetzt werden [17].

Die Kombination aus Tenofovir + Entecavir wird in den Hepatitis-B-Leitlinien nur für wenige gut charakterisierte Patienten indirekt empfohlen. Es gibt jedoch bisher keine Studien welche die Wirksamkeit und Sicherheit dieser Kombinationstherapie analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Effektivität und Sicherheit der Kombinationen Adefovir + Entecavir sowie Tenofovir + Entecavir nun erstmals in HBV-monoinfizierten Patienten mit langjähriger antiviraler Therapie, multiplen antiviralen Resistenzen und/oder inkomplettem virologischen Therapieansprechen bei zumindest fortgeschrittener Leberfibrose oder Leberzirrhose untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Substanzen

Destilliertes Wasser

GIBCO UltraPURE Distilled Water DNase, RNase Free, Invitrogen

H₂O, sterile, PCR grade

Light Cycler control kit, Roche Applied sciences, Mannheim, Deutschland

Ethanol 75%, 90%, 100%

Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Deutschland

Ethidiumbromid 1%ige Lösung in Wasser für die Elektrophorese

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

UltraPure Agarose

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus 0,5µg/ml

Fermentas Gmbh, St. Leon-Rot, Deutschland

6x DNA Loading Dye

Fermentas Gmbh, St. Leon-Rot, Deutschland

Taq DNA Polymerase, Concentration 5U/ml

Stratagene, Amsterdam, Holland

JumpStart™ Taq DNA Polymerase with MgCl₂

Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München, Deutschland

10x Taq Polymerase Buffer; 100mM Tris-HCl (pH 8,8), 500 mM KCl,

15 mM MgCl₂, 0,01% (w/v) gelatin,

Stratagene, Amsterdam, Holland

Deoxynucleotide Mix; Concentration 100mM (25mM each dNTP)

Stratagene, Amsterdam, Holland

EDTA Lösung pH 8,0 (0,5M)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Tris SIGMA 7-9

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

50x TAE-Buffer, hergestellt aus

242 g Trisbase

750 ml H₂O

57,1 ml Eisessig

100 ml EDTA (0,5M pH 8,0)

HBV-Plasmid

pHBVEcoR1

Spende von William E. Delaney, Fa. Gilead Sc., Foster City, CA, USA

Human genomic DNA [15ng/μl], template for control reaction

Light Cycler control kit, Roche Applied sciences, Mannheim, Deutschland

Light Cycler Fast Start DNA Master HybProbe

Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim,
Deutschland

Light Cycler DNA control kit

Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim,
Deutschland

Plasmid-Safe™ ATP-dependent DNase (1000 U/μl)

Fa. Epicentre, Madison, WI, USA über Fa. Biozym, Deutschland

Primer für die Light-Cycler-PCR:

Primer für total HBV Amplifikation:

-CCS Position: 256-274

5`-CTC GTG GTG GAC TTC TCT C – 3`

-CCAS Position: 421-404

5`- CAG CAG GAT GAA GAG GAA – 3`

Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

Primer für die Voramplifikation der HBV-Polymerase-Sequenz [58]:

Primer „HBV_pol_B1“

5`-GGC AGC GCC TAG CAG CCA TGG- 3`

Primer „HBV_pol_L1“

5`-TTC CTG CTG GTG GCT CCA GTT C- 3`

Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

Primer für die Sequenzierung [59]:

Primer „DR2 neF 320“

5`-TGG CCA AAA TTT GCA GTC CC-3`

Primer „DR2 neR 1019“

5`-GCA AAG CCC AAA AGA CCC AC-3`

Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

RLT-Buffer, Qiagen RNeasy mini Kit

Master Pure Complete DNA &RNA Purification Set

Epicentre, Madison, USA

INNO-LiPA HBV Genotyping KIT

Innogenetics GmbH, Hannover, Deutschland

INNO-LiPA HBV DRv2-KIT

Innogenetics GmbH, Hannover, Deutschland

INNO-LiPA HBV DRv3-Prototyp-Teststreifen
Innogenetics GmbH, Hannover, Deutschland

Quant-iT dsDNA BR Assay Kit
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.1.2 Werkstoffe und Geräte

Handschuhe Safe Skin Satin Plus
Fa. Kimberley-Clark, Zaventem, Belgien

Kühlblock Light Cyclers Centrifuge Adapters
Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Light Cyclers Capillaries (20µl)
Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Light Cyclers Instrument 1.5
Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Mikrotubes „Safe-Lock micro test tubes“
Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

MS2 Minishaker
IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland

Qubit Fluorometer
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Pipettenspitzen „SafeSeal-Tips“ (20µl, 200µl, 1000µl)
Fa. Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland

Pipettenspitzen 10µl Nerbe Plus
Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland

Potter, Wheaton Dounce Tissue grinder tight
Wheaton Science Products, Millville, USA

Reagenzgefäß 15ml, BlueMax™ Jr. 15ml, Polystyrene Conical Tube
Fa. Becton Dickinson Labware, NJ, USA

Thermomixer compact
Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tischzentrifuge – Centrifuge 5415R
Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tischzentrifuge – Centrifuge 5417C
Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Wasserbad Typ 1083
Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland

Eppendorf Multipette plus
Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Kombitips plus 50ml
Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipettierhilfen „pipetman“(10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)
Fa. Gilson, Middleton, WI, USA

PCR-Gerät iCycler
BIORAD

Inkubator 37°C Heraeus Instruments Typ T6
Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Gelkammern Model B2
PEQLAB, Erlangen, Deutschland

Waage Navigator

Ohaus Corporation, Schweiz

Schüttler Typ KL 2

Edmund Bühler Laborgerätebau, Tübingen, Deutschland

Mikrotubes „Safe-Lock micro test tubes”

Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Software

OmniForm 5.0

NUANCE, Vollversion OmniForm Formularerkennung

SPSS Version 11 SoftwarePaket

SPSS Inc., Chicago, IL

Excel 2007 (Windows)

Microsoft office 2007

CLC Sequence Viewer 6.3

Light Cyclor Software 3.5

Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

3.2 Methoden

In dieser retrospektiven monozentrischen Kohortenstudie wurden die Daten von 27 Patienten, welche in der medizinischen Poliklinik der 1. Med. Klinik des Universitätsklinikums Hamburg/Eppendorf behandelt wurden, ausgewertet.

Die Einschlusskriterien für die Studie waren: Patienten über 18 Jahre mit einer chronischen HBV-Monoinfektion und aktueller Therapie mit der Kombination bestehend aus Adefovir + Entecavir oder Tenofovir + Entecavir bei langjähriger antiviraler Therapie und inkompletter virologischer Antwort, multiplen antiviralen Resistenzen oder inkomplettem virologischen Therapieansprechen bei zumindest schwerer Leberfibrose oder Leberzirrhose.

Zu Beginn wurden die Akten der Patienten mittels eines speziell für diese Studie entwickelten Fragebogen (OmniForm 5.0) in pseudonomisierter Form ausgewertet. Mit dem Fragebogen wurden sowohl virologische und serologische Parameter wie ALT, Genotyp, HBeAg, HBsAg quantitativ (nach Laurell), anti-HBeAg, HBV-DNA und virale Resistenztestungen, als auch durchgeführte Leberbiopsien (Staging und Grading nach Desmet et al. [60]), Sonografien und insbesondere neu aufgetretene Nebenwirkungen unter der antiviralen Kombinationstherapie erfasst.

Die grafische Darstellung und statistische Auswertung wurde mit SPSS Version 15 SoftwarePaket (SPSS Inc., Chicago, IL) durchgeführt.

In Zusammenarbeit mit der Mikrobiologie des Universitätsklinikums Eppendorf wurden die Patientenserum vom Zeitpunkt der Umstellung auf die Kombinationstherapie, auf das Vorliegen von antiviralen Resistenzen untersucht. Die mittels MagNA Pure-DNA-Extraktionskit (Roche) aufgereinigte Virus-DNA [61] aus den Patientenserum wurde von der Mikrobiologie zur Verfügung gestellt.

Die aufgereinigte DNA wurde nun einer quantitativen HBV-DNA Messung unterzogen und nachfolgend auf das Vorliegen von antiviralen Resistenzen untersucht. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt aufgereinigt, quantifiziert und zum Sequenzieren verschickt. Der HBV-Genotyp wurde mit dem INNO- LiPA

genotyping Kit (Innogenetics) von der Mikrobiologie des Universitätsklinikums Eppendorf bestimmt.

3.2.1 Quantitative Bestimmung der HBV-DNA im Serum

Nach Werle-Lapostolle et al. wurde die quantitative Messung der HBV-DNA mittels Light Cycler System 1.5 von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Beschriebene HBV spezifische Primer und FRET-Hybridisierungssonden wurden verwendet [62, 63].

Als interner Standard für den total HBV-Lauf wurde das Plasmid pHBV Eco R1 verwendet. Dieser Standard besitzt 6182 Basenpaare (bp) mit $2,45 \times 10^{-5}$ picomol/plasmid (100 pg), was $1,48 \times 10^7$ Kopien/100 pg Plasmid entspricht. Der Stock hatte dabei eine Konzentration von 60 ng/ μ l, die auf Aliquots von jeweils 600 pg/ μ l aufgeteilt wurden. Diese Aliquots wurden bei -80° C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Zur Herstellung einer Standardreihe wurde das Plasmid 1:20 verdünnt, so dass sich nun eine Konzentration von 30 pg/ μ l ergab. Diese 30 pg/ μ l entsprachen 5×10^6 Kopien/ μ l und stellten den ersten Standard dar. Die Verdünnungsreihe wurde in 1:10 Verdünnungsschritten bis 20 Kopien/ μ l fortgesetzt.

Der Master-Mix des „total HBV-DNA–Laufs“ bestand aus:

- 6,4 μ l autoklaviertes destilliertes Wasser
- 1,6 μ l $MgCl_2$
- 1 μ l Primer CCAS
- 1 μ l Primer CCS
- 2 μ l Sonde CCFL
- 2 μ l Sonde CCLC
- 2 μ l Master

In jede Light Cycler-Kapillare wurde 16 μ l des Mastermixes aliquotiert. Dazu wurden die entsprechenden 4 μ l des Standards, der Negativkontrolle oder der Patienten-DNA pipettiert. Diese mit jeweils 20 μ l gefüllten Kapillaren wurden nun verschlossen und mitsamt ihren vorgekühlten Adaptern bei 3000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert.

Die Kapillaren wurden in das Light Cycler-Proben-Karussell überführt und mit folgendem „total HBV-PCR-Programm“ gemessen (s.Tab. 1).

Total HBV							
Cycles	Target °C	Incubation Hrs:min:sec	Temperature transition rate °C/s	Secondary target °C	step size °C	step delay cycles	Aquisition Mode
1x denature	95	10:00	20.00	0	0.0	0	NONE
45x amplification	95	10	20.00	0	0.0	0	NONE
	57	10	20.00	0	0.0	0	SINGLE
	72	15	20.00	0	0.0	0	NONE
1x cool	35	02:00	20.00	0	0.0	0	NONE

Tabelle 1: Einstellungen in der Light Cycler-Bedienoberfläche, die zum quantitativen Messen des total HBV-DNA-Gehaltes verwendet wurde.

Die Quantifizierung der HBV-DNA diente zur Abschätzung der benötigten Menge für eine positive Amplifikation des INNO-LiPA line Probe Assays.

3.2.2 INNO-LiPA HBV DRv2 + DRv3

Das Bestimmen von Mutationen im Polymerasegen des Hepatitis-B-Virus wurde mithilfe des INNO-LiPA HBV DRv2-Line Probe Assays (Innogenetics/Belgien) durchgeführt. Die bei dieser Methode eingesetzten biotinylierten Primer amplifizieren einen 867 bp großen Abschnitt der viralen Polymerase (Domäne A–F).

Nach der Amplifikation wird die Sequenz mit spezifischen Oligonukleotidsonden hybridisiert, welche als parallele Linien auf Membranstreifen immobilisiert wurden. Die nicht gebundene DNA wird durch Waschen entfernt. Mit alkalischer Phosphatase markiertes Streptavidin wird hinzugefügt und bindet an die zuvor biotinylierten Hybride. Durch eine nachfolgende Inkubation mit BCIP/NBT-Chromogen kommt es zu einer violett/braunen Färbung auf dem Teststreifen. Nun lassen sich mittels einer Ableseschablone eventuell vorhandene Mutationen oder Polymorphismen innerhalb der Kodons 80, 173, 180, 181, 204 und 236 feststellen. Der INNO-LiPA assay ist sehr sensitiv und kann entwickelte antivirale Resistenzen schon detektieren wenn die Mutanten nur eine geringe

Fraktion (5%-10%) der totalen viralen Population ausmachen [59]. Ein Nachteil ist, dass nur Resistenzen detektiert werden, welche bereits bekannt sind.

Für jede Probe wurde zusätzlich ein INNO-LiPA HBV DRv3 Prototyp Teststreifen verwendet. Es handelt sich hierbei um einen experimentellen Teststreifen, welcher uns von Innogenetics zu Verfügung gestellt wurde. Die Primer und das Arbeitsprotokoll sind identisch mit dem des DRv2-Teststreifens. Der DRv3-Teststreifen zeigt Mutationen, welche durch den DRv2-Teststreifen nicht abgedeckt sind. So lassen sich neben den Mutationen, welche durch den DRv2-Teststreifen nachweisbar sind, auch eventuell vorhandene Mutationen oder Polymorphismen innerhalb der Kodons 233, 194, 184, 202 und 250 nachweisen (s. Tab. 2).

Nukleos(t)id-Analoga	Assoziierte Resistenzmutationen	Durch INNO-LiPA HBV DRv2 nachweisbar	Durch INNO-LiPA HBV DRv3 nachweisbar
Lamivudin	L180M, M204V/I/S	Ja	Nein
Adefovir dipivoxil	A181V/T, N236T	Ja	Nein
Adefovir dipivoxil predisposition	I233V	Nein	ja
Tenofovir	A194T	Nein	ja
Entecavir	T184S/C/G/A/I/L/F/M, S202G/C/I, M250V/I/L	Nein	ja
Telbivudine	M204I	Ja	Nein
Emtricitabine	M204V/I	Ja	Nein

Tabelle 2: INNO-LiPA HBV DR-Nachweise für therapieassoziierte Resistenzmutationen.

3.2.2.1 Amplifizierung der aufgereinigten DNA

Die HBV-DNA aus den Serumproben der Patienten wurden mittels des von Zoulim veröffentlichten Primersatzes [58] amplifiziert und nachfolgend mit dem INNO-LiPA Primer-Mix einer nested-PCR unterzogen. Mit diesem Vorgehen konnten alle vorhandenen Patientenseren erfolgreich analysiert werden.

Die Primer HBV_pol_B1 und HBV_pol_L1 wurden bei MWG, Ebersberg, Deutschland bestellt. Sie binden an das Polymerasegen des viralen Genoms und haben eine Zielsequenz von 1341 Bp. Die Sequenz liegt zwischen a.a. 323 und 770, so dass ein großer Teil des sequenzierten Abschnitts die Reverse-

Transkriptase-Region betrifft (a.a. 349 – 692).

Der Master- Mix wurde Anhand des Sigma Jumpstart- Hersteller Protokoll (Sigma Aldrich, München, Deutschland) erstellt:

- 34 µl destilliertes Wasser
- + 5 µl 10x Taq Amplifikations-Puffer
- + 1 µl dNTP Mix (10 mM)
- + 1 µl Primer HBV_pol_B1
- + 1 µl Primer HBV_pol_L1
- + 3 µl 25mM MgCl₂
- + 1 µl Sigma JumpStart Taq DNA Polymerase

Die Menge des Wassers wurde je nach Template Menge so variiert, dass insgesamt 50µl amplifiziert wurden. Es wurden 2- 10µl Template eingesetzt.

Bei folgendem etablierten PCR- Programm (s.Abb. 7) zeigte sich, dass noch bei einer Virusmenge von 100 Kopien/ml die virale DNA amplifiziert wurde. Um festzustellen ob sich eine Genotyp-spezifische unterschiedliche Bindung zeigt, wurde mit Serum verschiedener Genotypen ebenfalls eine PCR durchgeführt. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede. Eine Temperaturgradienten-PCR ergab ein optimales annealing bei 60°C.

	Schritt	Temp	Zeit
1x	1. Denaturierung	94°C	1 Min
40x	2. Denaturierung	94°C	30 Sek
	3. Annealing der Primer	60°C	30 Sek
	4. Primer erweitern	72°C	1 Min
	5. Verlängern	72°C	7 Min

Abbildung 7: PCR –Programm Primersätze B1/L1 [58]

Vor Weiterverarbeitung mit dem INNO LiPA Primer Mix wurde das Amplifikationsprodukt mittels Gelelektrophorese überprüft (s. 3.2.2.2).

Nun wurde das PCR Produkt mittels Primer-Mix aus dem INNO- LiPA HBV DRv2-KIT erneut amplifiziert. Dieses PCR-Programm (s. Abb. 8) umfasst 50

Zyklen und führt zur Amplifikation eines 867 Bp großen Amplikons. Das Vorhandensein des amplifizierten Produktes wurde erneut mit Hilfe eines 2% Agarose Gels überprüft.

Für den Master- Mix wurde auch hier eine JumpStart Taq DNA Polymerase (Sigma), 10xPCR Buffer (Sigma) und dNTPs 10mM (Sigma) verwendet.

Pro Patientenprobe wurden:

- 37 µl autoklaviertes destilliertes Wasser
- + 5 µl 10x Taq Amplifikations-Puffer
- + 1 µl dNTP Mix (10 mM)
- + 1 µl Primer INNO- LiPA DR v2
- + 3 µl 25mM MgCl₂
- + 1 µl Sigma JumpStart Taq DNA Polymerase

für den Master-Mix eingesetzt. Die Reagenzien wurden auf einem Vortex-Mixer gemischt und zu jeweils 48µl Master Mix wurden 2µl voramplifiziertes PCR-Produkt hinzugefügt.

	Schritt	Temp	Zeit
1x	1. Denaturierung	95 °C	1 Min
50x	2. Denaturierung	94 °C	30 Sek
	3. Annealing der Primer	55 °C	30 Sek
	4. Primer erweitern	72 °C	40 Sek
	5. Verlängern	72 °C	7 Min

Abbildung 8: PCR Programm der INNO-LiPA HBV DRv2-Amplifikation

Bei jeder PCR wurde als Negativkontrolle ein Tube mit destilliertem Wasser statt Patientenmaterial mitgeführt.

3.2.2.2 Visualisierung der Amplifikationsprodukte

Sowohl das Vorhandensein, als auch die ungefähre Menge der in der PCR entstandenen Produkte wurde durch Auftragen auf ein 2%iges Agarosegel überprüft. Herstellung und Beladung eines 2%igen Agarosegels (100ml):

2g Agarose wird in 100ml TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Unter laufendem Wasser wird das noch flüssige Gel auf etwa 70°C abgekühlt, bevor 3µl 1% Ethidiumbromid hinzugemischt werden. Nach Gießen und Abkühlen des Gels, wird die Kammer mit TAE-Puffer aufgefüllt und die Taschen mit jeweils 10µl Amplikon und 2µl Loading-Dye beladen. Der Einlauf der Proben erfolgt bei geringer Spannung (ca. 50 Volt), danach wird die Spannung auf 100 Volt erhöht. UV-Licht macht das in die DNA-Banden interkalierte Ethidiumbromid sichtbar. Bei gelungener 2. Amplifikation zeigt die PCR ein Produkt von 867 Bp (s. Abb. 9).

Für das Testverfahren von INNO LiPA ist laut Hersteller genügend HBV-DNA für den Teststreifen vorhanden sobald das Amplifikationsprodukt im Gel sichtbar wird.

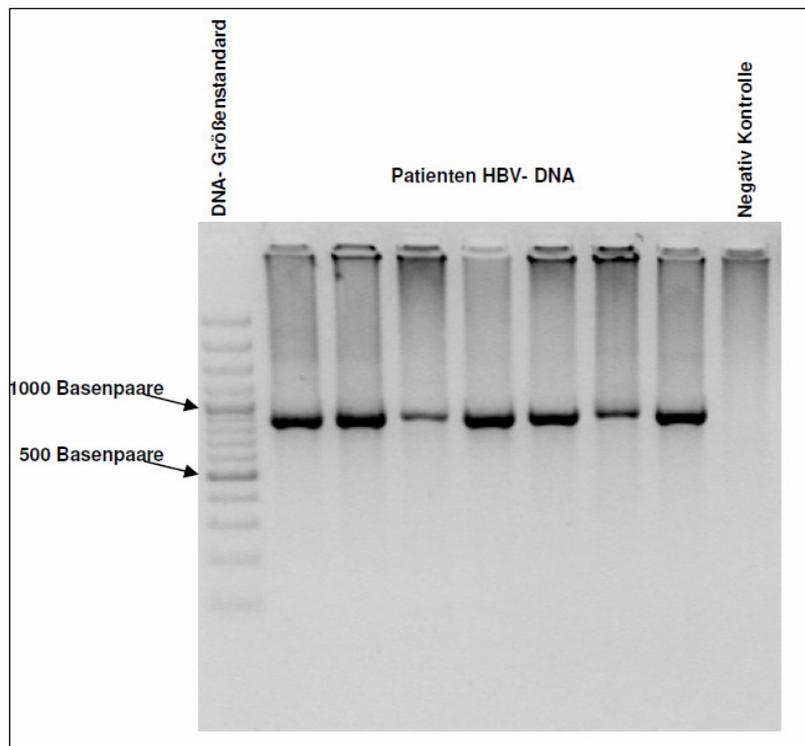


Abbildung 9: Agarose-Gel mit PCR Amplifikations-Produkten von 867 Bp. Das Gel dient als Kontrolle für: 1. Die Reinheit des spezifischen PCR-Produkts und 2. Die HBV-DNA Menge (sobald das Amplifikationsprodukt sichtbar wird ist genügend HBV-DNA für den Teststreifen vorhanden).

3.2.2.3 Testverfahren für INNO-LiPA HBV DRv2 + DRv2

Alle Reagenzien wurden 30 Minuten vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20° bis 25°C) equilibriert und unmittelbar nach dem Gebrauch wieder in den Kühlschrank gelegt. Vor dem Öffnen der Gefäße wurden sie auf dem Vortex-Mixer gemischt und abzentrifugiert.

Denaturierung der Proben

Ein Wasserbad, das über eine Schüttelvorrichtung verfügt, wurde auf 49°C eingestellt. Mit einem kalibrierten Thermometer wurde sichergestellt, dass die Temperatur nicht mehr als 0,5°C nach oben oder unten schwankte.

Die Hybridisierungslösung und die Stringent-Waschlösung wurden in das Wasserbad mit 49°C gestellt, bis die Kristalle vollständig gelöst waren.

Die Teststreifen wurden über der roten Markierungslinie mit einem Bleistift mit der jeweiligen Identifikationsnummer des Patienten beschriftet. Für jeden Streifen steht eine eigene kleine Wanne zur Verfügung, die auf einem speziell dafür vorgesehenen Rahmen fixiert wurde. Die Teststreifen wurden zu diesem Zeitpunkt noch außerhalb der Wannen belassen.

Nachdem 10µl Denaturierungslösung in die obere Ecke jeder Wanne pipettiert wurden, wurde zu dem Tropfen 10µl Probe hinzugefügt und durch auf- und abpipettieren gemischt. Denaturiert wurde bei Raumtemperatur für 5 Minuten.

Hybridisierung der Proben

Im Anschluss wurden die Wannen mit jeweils 2ml der warmen Hybridisierungslösung befüllt und die beschrifteten Teststreifen vollständig in die Lösung eingetaucht.

Die Vorrichtung auf der die Rahmen mit jeweils vier Wannen fixiert waren, wurde nun in das Schüttelwasserbad gestellt. Dabei war darauf zu achten, dass die Streifen in den Wannen frei schwammen und der Wasserstand im Wasserbad so hoch war, dass die Wannen bis zur Hälfte eintauchten. Das Wasserbad wurde auf etwa 80U/m eingestellt und der Deckel geschlossen um eine konstante Temperatur während der Hybridisierung zu gewährleisten. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten.

Waschen der Teststreifen

Nach Ablauf der Hybridisierung musste die hinzu gegebene Flüssigkeit nun wieder entfernt werden.

Als Absaugvorrichtung diente eine Glaspipette, die an eine Vakuumpumpe angeschlossen war. Die Wannen wurden leicht gekippt und die Lösung mit der Pipette abgesaugt. Die Streifen wurden nun drei Waschschritten unterzogen um sicher zu stellen, dass kein PCR-Produkt mehr ungebunden an ihnen oder der Wanne haften blieb. Gewaschen wurde mit warmer (etwa 45-49°C) Stringent-Waschlösung. Jeweils 2ml dieser Lösung wurden zu den Streifen pipettiert, welche dann durch leichtes Rütteln eine Minute lang in der Wanne geschwenkt wurden. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und der Waschschrift wiederholt. Danach wurden nochmals 2ml Waschlösung in die Wannen gegeben und diese wieder für 30 Minuten in das Wasserbad gestellt.

Ansetzen der Spülarbeitslösung und Konjugatarbeitslösung

Konjugatarbeitslösung: 100x konzentriertes Konjugat wurde im Verhältnis 1:100 mit Konjugatverdünner verdünnt, dabei wurden 2ml für jede Testwanne kalkuliert (+ 2ml Überschuss).

Spülarbeitslösung: 5x konzentrierte Spüllösung wurde im Verhältnis 1/5 mit deionisiertem Wasser verdünnt, für jede Wanne wurden 8ml kalkuliert (+10ml Überschuss).

Entwicklung der Farbe

Nach Ablauf der 30 Minuten wurden die Rahmen wieder aus dem Wasserbad genommen. Die Waschlösung wurde mit der Pipette aus den Wannen entfernt, bevor diese mit jeweils 2ml Spülarbeitslösung befüllt wurden. Nach einer Minute Rütteln bei Raumtemperatur, wurde die Flüssigkeit wieder abgesaugt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

Um die gebundene DNA auf den Teststreifen sichtbar zu machen, wurde die Konjugatarbeitslösung hinzugefügt. Je 2ml der wie oben beschrieben angesetzten Konjugatarbeitslösung wurden in die Wannen pipettiert, die daraufhin auf einem Schüttler befestigt wurden. (Einstellung: Schüttler: 50U/m)

Die Konjugatinkubation dauert 30 Minuten und geschieht bei Raumtemperatur.

Ansetzen der Substratarbeitslösung

10 Minuten vor Ende der Konjugatinkubation wurde die Substratarbeitslösung hergestellt.

100x konzentriertes BCIP/NBT-Substrat wurde im Verhältnis 1:100 mit Substratpuffer gemischt. Kalkuliert wurden 2ml pro Wanne und ein Überschuss von ebenfalls 2 ml.

Nach Ablauf der 30 Minuten Konjugatinkubationszeit, wurden die Wannen vom Schüttler genommen und die Konjugatarbeitslösung mit der Pipette entfernt. Es wurde erneut zwei Mal 1 Minute mit Spülarbeitslösung gewaschen. Darauf folgte ein einminütiger Waschschrift mit Substratpuffer, auch hier wurde durch Rütteln der Wannen die Waschung intensiviert.

Der Substratpuffer wurde abgesaugt und die Streifen mit jeweils 2ml Substratarbeitslösung bedeckt. Diese inkubierte 30 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur.

Nach Ablauf der 30 Minuten, wurde die Farbentwicklung durch zweimaliges Waschen mit destilliertem Wasser gestoppt. Gewaschen wurde für jeweils drei Minuten bei Raumtemperatur.

Die Teststreifen wurden mit einer Pinzette aus den Wannen entnommen und auf absorbierendes Papier gelegt bis sie vollständig getrocknet waren. Erst dann konnten sie mithilfe der mitgelieferten Ableseschablone ausgewertet werden.

Ablesen und Auswerten

Am oberen Ende des Streifens befinden sich zwei Kontrolllinien. Sie zeigen bei Färbung an, ob die vorhergehende PCR genug Produkt geliefert hat (Amp. Control) und ob die Zugabe von reaktivem Konjugat und Substratlösung während des Testverfahrens stattgefunden hat (Conj. Control)(s.Abb. 10).

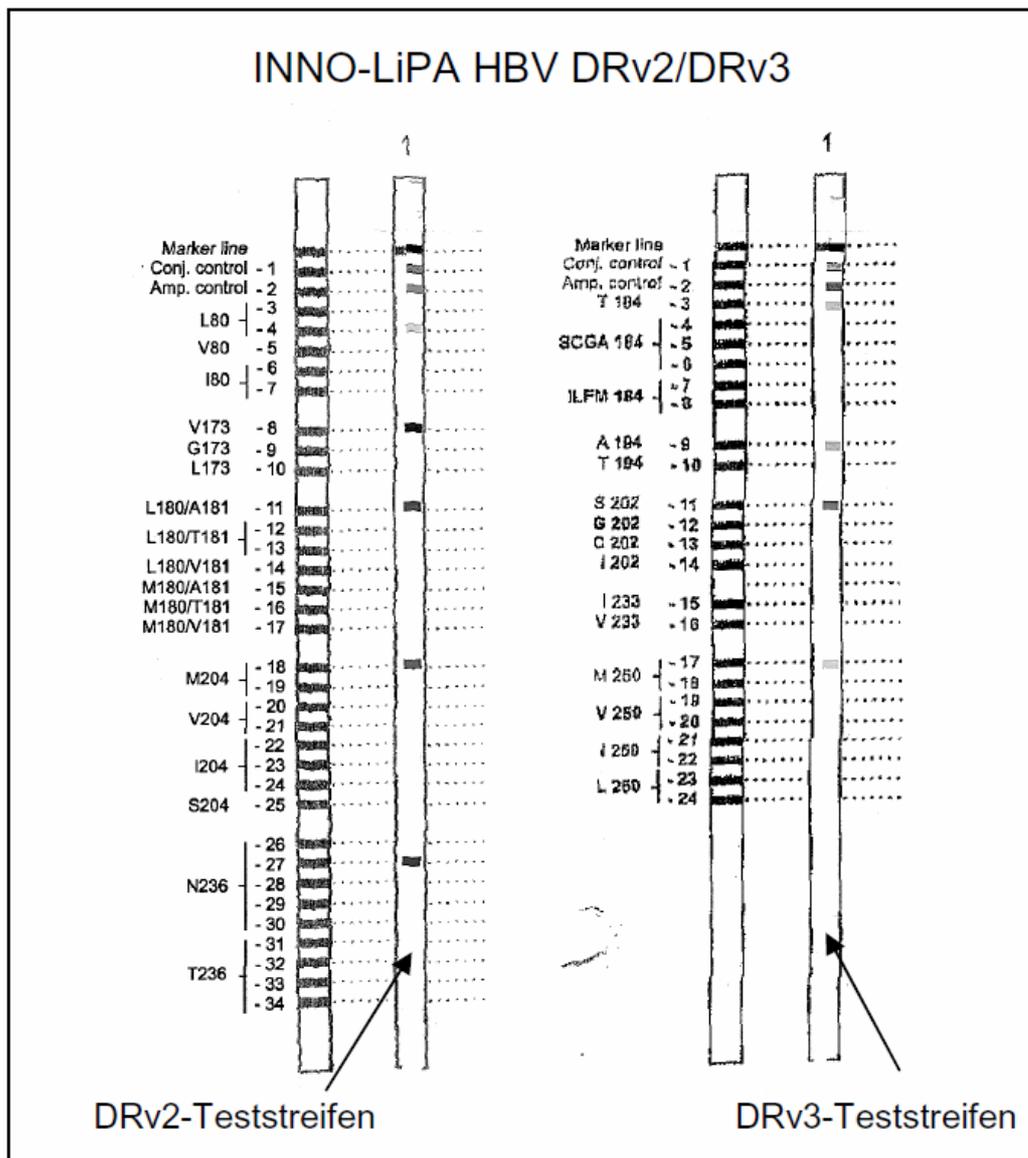


Abbildung 10: INNO-LiPA HBV DRv2- und DRv3-Teststreifen als Beispiel für einen Patienten mit einer HBV-Wildtyp-Sequenz.

3.2.3 Sequenzierung der Proben

30µl des PCR Produktes wurden mit dem „GENECLEAN Turbo for PCR-Kit“ aufgereinigt und nach einer Quantifizierung der DNA zum Sequenzieren versendet.

3.2.3.1 Aufreinigung des PCR-Produktes

Die Aufreinigung des PCR Produktes wurde mit dem „GENECLEAN Turbo for PCR-Kit“ durchgeführt. Dazu wurde das PCR-Produkt (30µl) in ein 1,5 ml

mikrozentrifugen Tube transferiert und mit der 5-fachen Menge (150µl) GENE CLEAN Turbo for PCR Salt Solution gemischt. Nun wurde der PCR reaction/Salt Solution Mix in eine Filtersäule pipettiert welche zuvor in ein 2 ml catch Tube eingesetzt wurde. Im folgendem Schritt wurde für 5 Sekunden bei <math><14000 \times g</math> zentrifugiert. Das Eluat wurde anschließend verworfen.

Nun wurden 500µl GENE CLEAN Turbo for PCR Wash Solution in die Säule pipettiert.

Die Probe wurde nun zentrifugiert (<math><14000 \times g</math> für 5 Sekunden) und das Zentrifugat verworfen. Nun wurde das Catch-Tube erneut in die Zentrifuge gestellt und bei <math><14000 \times g</math> für 4 Minuten zentrifugiert um die Säule zu trocknen. Während der Zentrifugation wurde für jede Probe ein 1,5 ml capeless Tube vorbereitet und beschriftet. Nach Ende der Zentrifugation wurde die Säule aus dem Catch Tube entfernt und in das 1,5 ml Mikrozentrifugen-Tube eingesetzt. Das Catch Tube wurde verworfen.

Es wurden 30 µl destilliertes Wasser direkt auf die Membran der Säule pipettiert und die Probe wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abschluss wurde das PCR-Produkt bei <math><14000 \times g</math> für 30 Sekunden von der Säule eluiert.

3.2.3.2 Quantitative DNA-Messung

Die quantitative Messung der DNA wurde mit dem Qubit Fluorometer von Invitrogen durchgeführt. Es wurde der Quant-iT dsDNA BR Assay Kit verwendet. Ein Master-Mix aus N x 200µl Quant-iT ds DNA BR Buffer und N x 1µl Leuchtstoff wurde vorbereitet. Der Master-Mix wurde für N Proben und 2 Standards Vorbereitet und anschließend gevortext. Es werden jeweils 190µl MM mit Standard 1 und 190 µl mit Standard 2 vermengt. Es wurden 199µl MM mit 1 µl der zu bestimmenden Probe gemixt. Die Proben wurden 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und vor der Messung noch einmal kurz gevortext. Die Messung wurde nach Protokoll durchgeführt.

3.2.3.3 Vorbereitungen für den Versand

Die Sequenzierung wurde von Eurofins MWG operon (Ebersberg/Deutschland) durchgeführt. Die virale DNA musste in einer Konzentration von 5 ng/μl in einem Mindestvolumen von 15μl vorliegen. Die Primer mussten in einer Konzentration von 2 pmol/μl mitgeschickt werden. Es wurden die Primer DR2 neF 320 (5`-TGG CCA AAA TTT GCA GTC CC-3`) und DR2 neR 1019 (5`-GCA AAG CCC AAA AGA CCC AC-3`) [59] verwendet.

3.2.3.4 Versand und Auswertung der Proben

Die Proben wurden mit zuvor bestellten Prepaid Barcode Labels versehen, an Eurofins MWG Operon, Sequencing Department, Fraunhoferstr. 22 in 82152 Martinsried verschickt, und via Internet geordert.

Die Sequenzen wurden mittels „CLC Sequence Viewer 6.3“ ausgewertet. Hierbei wurde auf Mutationen folgender Aminosäuren geachtet: rtL80V/I; rtD83V; rtI163V; rtF166L; rtV/G173L; rtL180M; rtA181T/V; rtT184S/C/G/A/I/L/F; rtA194T; rtS202G/C/I; rtM204V/I/S; rtV/L/M207I; rtV214A; rtQ215S; rtI233V; rtN236T; rtN/S/H/A238S; rtN/H248H; rtM250V/I/L; und rtV/I253I.

3.2.4 Statistische Analyse

Die erhobenen Daten aus den Patientenakten wurden mittels SPSS Version 15 Software Paket (SPSS Inc., Chicago, IL) analysiert und grafisch dargestellt. Für die Berechnung der Signifikanz wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Mittels Kaplan-Meier-Schätzer wurde die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Abfalls der Virämie unter die Nachweisgrenze (<400 Kopien/ml) ermittelt. Mittels Excel (Microsoft office 2007) wurden Blasendiagramme zur Veranschaulichung der Virämie im Therapieverlauf erstellt. Alle durchgeführten statistischen Tests waren doppelseitig. Dabei wurden p-Werte <0,05 als signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

Es wurden insgesamt 27 Patienten untersucht und nach der jeweiligen Kombinationstherapie in 2 Kohorten unterteilt.

4.1 Kohorte 1 (Adefovir + Entecavir)

4.1.1 Baseline Charakteristika

4.1.1.1 Demographie

Diese Kohorte besteht aus 15 Hepatitis B monoinfizierten Patienten (8 Männer) mit einem Alter von im Median 41 Jahren (Range 25–65 Jahre). 9 Patienten stammen aus Europa, 5 aus Asien und einer aus Afrika. Die Erstdiagnose der HBV-Infektion wurde im Median vor 12 Jahren (Range 4-28 Jahre) gestellt.

Die durchschnittliche Dauer der antiviralen Vortherapie beträgt 41 Monate (Range 19-63 Monate) und die Therapielinie vor Umstellung beträgt 3 Behandlungen (Range 1-5 Behandlungen). 2 Patienten wurden mit Entecavir- und 5 mit Adefovir-Monotherapie vorbehandelt. Weitere 8 Patienten bekamen Adefovir und Lamivudin in Kombination (s. Tab 2).

4.1.1.2 ALT und HBV Serologie

Vor Umstellung auf die Kombinationstherapie betrug die ALT im Median 0,77 ULN (upper limit of normal) (Range 0,37-1,96 ULN) und 5 von 15 Patienten hatten einen erhöhten ALT-Wert (>1 ULN) (s.Tab. 3).

In dieser Kohorte waren 9 von 15 Patienten HBeAg- positiv und die mediane Virämie lag bei 2×10^5 Kopien/ml (Range 9×10^3 - 4×10^7 Kopien/ml). Unter den Patienten zeigte sich eine Verteilung der HBV-Genotypen in 7x D, 3x C, 3x A, 1x G, und 1x unbekannt (s. Tab. 3).

Das HBsAg wurde quantitativ nach Laurell gemessen und lag im Median der letzten vorliegenden Werte bei 11 µg/ml (Range 0,5- 38 µg/ml).

Baseline Charakteristika unter ADV+ETV

Pat. Nr.	Sex (m/w)	Alter (Jahre)	Therapie- linie	Vorherige Therapie	ALT (ULN) BL	HBeAg BL	HBV-DNA (Kopien/ml) BL	Genotyp
1.	w	56	3	ADV	0,94	positiv	1*10 ⁶	D
2.	w	41	4	ADV+LAM	0,66	negativ	2*10 ⁵	D
3.	w	28	3	ETV	0,77	positiv	5*10 ⁴	C
4.	w	25	5	ETV	0,43	positiv	1*10 ⁵	D
5.	m	63	2	ADV+LAM	0,78	positiv	2*10 ⁴	A
6.	m	59	2	ADV+LAM	1,34	positiv	9*10 ³	A
7.	m	31	2	ADV+LAM	0,7	positiv	2*10 ⁵	D
8.	w	26	4	ADV+LAM	1,23	positiv	4*10 ⁷	D
9.	w	60	3	ADV	0,37	negativ	4*10 ⁴	C
10.	m	65	3	ADV+LAM	1,14	positiv	2*10 ⁶	A
11.	w	45	2	ADV+LAM	0,57	positiv	1*10 ⁶	D
12.	m	41	3	ADV+LAM	1,72	negativ	1*10 ⁵	C
13.	m	52	2	ADV	0,7	negativ	1*10 ⁴	G
14.	m	39	2	ADV	1,96	negativ	2*10 ⁶	nd
15.	m	34	2	ADV	0,46	negativ	6*10 ⁵	D

Tabelle 3: Baseline Charakteristika unter ADV + ETV. (m=männlich; w=weiblich; ADV=Adefovir; LAM=Lamivudin; ETV=Entecavir; ULN=upper limit of normal; BL=Baseline; nd=nicht durchgeführt).

4.1.1.3 Leberstatus

In der letzten Sonographie vor Umstellung zeigte sich bei 4 Patienten ein unauffälliger Befund, bei 9 Patienten ein leichter Leberschaden bei einem Patienten eine fortgeschrittene Fibrose, und bei einem Patienten eine Leberzirrhose (s.Tab. 4).

Leberbiopsien wurden bei 9 der 15 Patienten durchgeführt. Ein Patient zeigte keine fibrotischen Veränderungen, 3 Patienten eine milde Fibrose, 3 Patienten eine mäßige Fibrose, und 2 Patienten eine Leberzirrhose.

Bei Patient #6 und #7 zeigte sich histologisch ein schwerer Leberparenchymschaden, allerdings wurde dieser 2007 sonographisch als leichter Leberparenchymschaden beschrieben (s. Tab. 4).

Leberstatus

Pat. Nr.	Letzte Biopsie			Letzte Sonografie vor Therapieumstellung
	Grad*	Stadium*	Jahr	
1.	nd			leichter Leberparenchymschaden
2.	1	1	2003	leichter Leberparenchymschaden
3.	nd			leichter (mäßig) Leberparenchymschaden
4.	1	0	2006	unauffällig
5.	nd			unauffällig
6.	2	3-4	2004	leichter Leberparenchymschaden
7.	2	2-3	2004	leichter Leberparenchymschaden
8.	nd			Unauffällig
9.	3	1	2005	Unauffällig
10.	3	2	2005	leichter Leberparenchymschaden
11.	2	1	2004	leichter Leberparenchymschaden
12.	nd			leichter Leberparenchymschaden
13.	2	4	2006	Zirrhose
14.	Fibrose-index 1			fortgeschrittene Fibrose
15.	nd			leichter (mäßig) Leberparenchymschaden

Tabelle 4: Leberstatus (nd=nicht durchgeführt; * nach Desmet et al.)

4.1.1.4 Resistenzen vor Therapieumstellung

Vorhergehende Resistenztests, welche aus der Patientenakte entnommen wurden, sind durch die Mikrobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt worden. (s. Tab. 5)

Für diese Arbeit konnte aus dem Serum vor Therapieumstellung bei 14 von 15 Patienten eine Mutationsanalyse durchgeführt werden. Von einem Patienten (#14) stand kein Material zur Verfügung (s. Tab. 5).

In dem INNO-LiPA DRv2 Hybridisierungsassay zeigten 4 Patienten eine HBV-Wildtypsequenz, 2 Patienten eine rtA181V+rtN236T Mutation, 7 Patienten eine rtL180M+rtM204V Mutation und ein Patient eine rtA181T Mutation.

Im Prototyp DRv3-Teststreifen wurde bei Patient #5 zusätzlich die rtM250V Resistenz detektiert. Es wurden weder Tenofovir (rtA194T; rtV214A; rtQ215S) noch weitere Entecavir (rtT184S; rtS202G/C/I) spezifische Resistenzen in den Patientenseren nachgewiesen.

Um eventuelle Mutationen zu entdecken welche durch den INNO-LiPA Lineprobeassay (DRv2 und DRv3) nicht detektierbar sind, wurde zusätzlich eine direkte Sequenzierung durchgeführte (s. Methoden). Diese zeigte bei Patient #2 eine rtL163V und eine rtV253I Mutation. Die rtL163V Mutation wurde als

Komutation mit LAM- und ETV-Resistenzen assoziiert [64], die rtI253V Mutante wurde bisher noch nicht beschrieben.

Patient #2, #8 und #13 zeigten in der direkten Sequenzierung nicht die rtA181T Mutation welche zuvor durch den INNO-LiPA DRv2 Hybridisierungs assay nachgewiesen wurde. Bei Patient #3 zeigte sich die rtL180M + rtM204V Mutationen nicht und es wurde eine Wildtypsequenz nachgewiesen (s. Tab. 5).

Resistenzen vor Therapieumstellung

Pat. Nr.	Bekanntes Resistenzen vor Umstellung	Resistenztest zum Umstellungszeitpunkt	
		(INNO-LiPA DRv2/DRv3)	Sequenzierung
1.	wt	wt	wt
2.	wt	rtA181V ; rtN236T	rtL163V ;rtN236T; rtV253I
3.	wt	rtL180M; rtM204V	wt
4.	rtA181T	wt	wt
5.	wt	rtL180M; rtM204V; rtM250V	rtL180M; rtM204V
6.	rtM204I	rtL180M; rtM204I	Seq. nicht erfolgreich
7.	rtL180M; rtM204I	rtL180M; rtM204I	rtL180M; rtM204I
8.	rtA181T	rtA181T	wt
9.	rtL180M; rtM204I	rtL180M; rtM204V	rtL180M; rtM204V
10.	rtL180M; rtM204V	rtL180M; rtM204V	rtL180M; rtM204V
11.	wt	wt	wt
12.	wt	wt	wt
13.	nd	rtN236T; rtA181T	rtN236T
14.	nd	Kein Serum vorhanden	Kein Serum vorhanden
15.	nd	rtL180M; rtM204V	rtL180M; rtM204V

Tabelle 5: Resistenzen vor Therapieumstellung. Auffälligkeiten sind Fett hervorgehoben (wt=Wildtyp; nd=nicht durchgeführt).

4.1.2 Therapieverlauf unter Adefovir + Entecavir

4.1.2.1 HBV-DNA

Bei 11 von 15 Patienten ist nach im Median 14 Monaten (Range 8-20 Monate) Therapiedauer, die Viruslast unter die Nachweisgrenze (<400 Kopien/ml) gefallen (s. Tab. 6). Die Virusreduktion bis zum jeweils letzten bestimmten Wert beträgt im Median 3,7 log Kopien/ml (Range 0,3-4,97 log Kopien/ml), $p < 0,001$. Nach 3 Monaten Therapie mit Adefovir und Entecavir konnte bereits bei 4 von 14 Patienten kein Virus mehr detektiert werden. Bei 13 von 14 Patienten konnte eine signifikante Verminderung der HBV-DNA nachgewiesen werden, im Median 1,9 log Kopien/ml (Range -1- 4 log Kopien/ml), $P=0,005$ (s. Abb. 11).

Nach 6 Monaten konnte bei 11 von 13 Patienten kein Virus mehr quantifiziert werden. Im Median war die HBV-DNA um 3 log Kopien/ml (Range 1,6- 4,5 log Kopien/ml), $p < 0,001$ gesunken.

Unter Behandlung mit Adefovir + Entecavir zeigte sich in dieser Kohorte nach im Median 6 Monaten ein Abfall der Virämie unter die Nachweisgrenze (400 Kopien/ml). Die Schätzgenauigkeit liegt zwischen 5 und 7 Monaten (s. Abb. 12). Die Mediane HBV-DNA-Reduktion nach 9 Monaten (N= 12) betrug 3,8 log Kopien/ml (Range 0,3-4,97 log Kopien/ml). 10 von 12 Patienten waren zu diesem Zeitpunkt nicht mehr virämisch. Nach 12 Monaten konnte bei 7 von 9 Patienten kein Virus mehr nachgewiesen werden (s. Tab. 6)

HBV-DNA im Therapieverlauf

Pat. Nr.	HBV DNA Baseline	HBV DNA (Kopien/ml)					Letzter Wert	Zeit der Therapie (Monate)
		M3	M6	M9	M12	M15		
1.	$1 \cdot 10^6$	ud	ud	ud			ud (M9)	13
2.	$2 \cdot 10^5$	ud	ud		ud		ud (M12)	13
3.	$5 \cdot 10^4$	500	ud	ud	ud		ud (M12)	13
4.	$1 \cdot 10^5$	1000		$5 \cdot 10^4$			$5 \cdot 10^4$ (M9)	14
5.	$2 \cdot 10^4$	600	ud	ud		ud	ud (M15)	20
6.	$9 \cdot 10^3$	700	ud	ud	ud		ud (M12)	13
7.	$2 \cdot 10^5$	ud		ud			ud (M9)	14
8.	$4 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^3$		$4 \cdot 10^3$ (M12)	14
9.	$4 \cdot 10^4$	500	ud	ud	500	900	900(M13)	14
10.	$2 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$		$1 \cdot 10^4$		$1 \cdot 10^4$ (M12)	14
11.	$1 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^4$	ud	ud	ud		ud (M12)	13
12.	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	ud	ud			ud (M9)	14
13.	$1 \cdot 10^4$	ud	ud				ud (M6)	8
14.	$1,9 \cdot 10^6$		ud	ud	ud		ud (M12)	18
15.	$6 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^4$	ud	ud	ud		ud (M12)	13

Tabelle 6: HBV-DNA im Therapieverlauf. (ud= under detection; M=Monat)

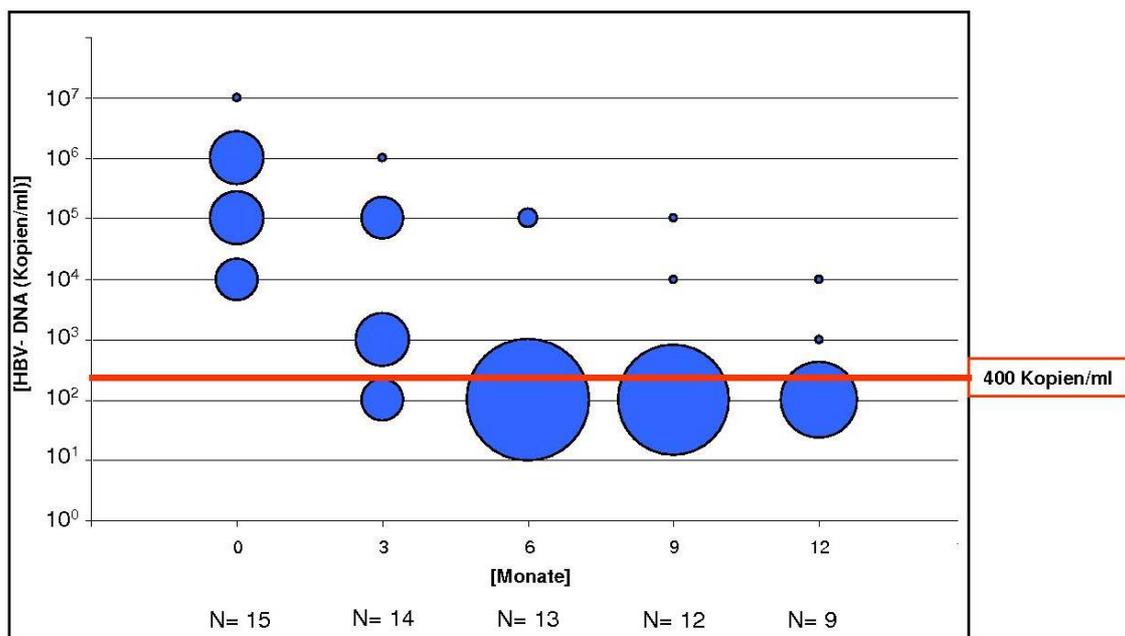


Abbildung 11: HBV-DNA-Verlauf unter Adefovir + Entecavir. Der Blasendurchmesser entspricht der Anzahl der Patienten. Die Viruslast wurde in diesem Fall gerundet um eine repräsentative Gruppe bilden zu können. N beschreibt die Anzahl der Patienten zu dem jeweiligen Monat. Nach 3 Monaten konnte bereits bei 4 von 14 Patienten kein Virus mehr detektiert werden. Bei 13 von 14 Patienten konnte eine signifikante Verminderung der Virämie nachgewiesen werden.

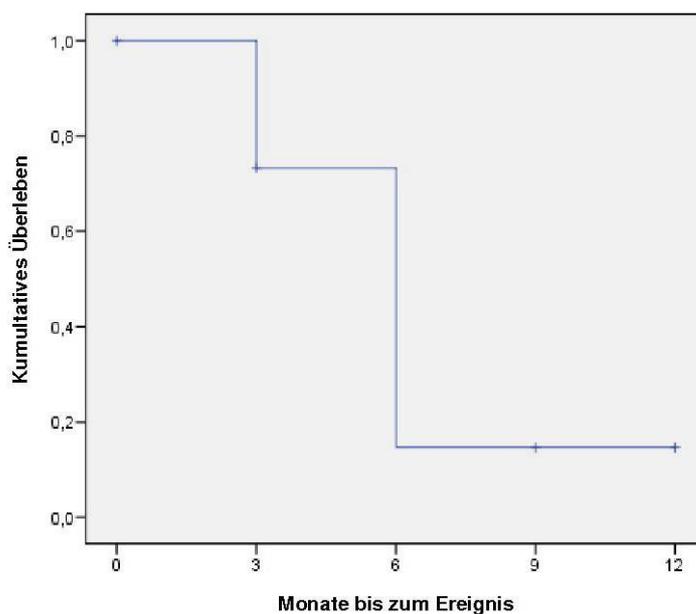


Abbildung 12: Kaplan Meier Kurve: Kohorte 1. Im Median kommt es nach 6 Monaten zu einem Abfall der Virämie unter 400 Kopien/ml. Die Schätzgenauigkeit liegt zwischen 5,043 und 6,957 Monaten.

Hervorzuheben ist, dass die Virusmenge von Patient #4 nach 9 Monaten im Vergleich zum 3. Monat um 1,7 log angestieg. Bei diesem Patienten wurde nach 9 Monaten aufgrund einer Behandlungs-Incompliance des Patienten die Behandlung abgebrochen (s. Abb. Therapieverläufe).

Bei Patient #8 und #10 zeigte sich im Verlauf eine langsame jedoch stetige Reduktion der HBV-DNA um 4 log bzw. um 2,3 log Kopien/ml im Vergleich zum Ausgangswert nach Umstellung auf die Kombinationstherapie. Bei beiden Patienten war jedoch nach 12 Monaten weiterhin eine Virämie nachweisbar.

Bei Patient #9 war nach 2 Messungen unterhalb der Nachweisgrenze die Viruslast auf 900 Kopien/ml angestiegen.

Bei 6 von 15 Patienten konnte im Median nach insgesamt 35 Monaten (Range 24-42 Monate) unter antiviraler Therapie erstmals durch Umstellung auf die Kombinationstherapie ein Abfall der Viruslast auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze (<400 HBV-DNA Kopien/ml) erreicht werden (s. Abb. Therapieverläufe).

4.1.2.2 ALT

Die jeweils letzten bekannten ALT- Werte zeigten eine mediane Reduktion der ALT um 0,14 (Range -0,14- 0,8) fold ULN (P= 0,064) im Vergleich zum ALT-Wert bei Umstellung (s. Tab. 7).

Die Werte der ALT waren nach 3 Monaten Therapiedauer im Median um 0,03 fold ULN (Range -2,84- 0,4) gesunken (P= 0,314). Bei 9 von 15 Patienten kam es zu einem Abfall der ALT.

Nach 6 Monaten zeigte sich eine durchschnittliche ALT-Reduktion von 0,18 fold ULN (Range -0,2- 0,8). Bei 11 von 13 Patienten konnte die ALT vermindert werden. Bei 12 Patienten zeigte sich nach 9 Monaten eine ALT Reduktion von im Median 0,2 fold ULN (Range -0,22- 0,76) und nach 12 Monaten bei 11 Patienten von 0,16 fold ULN (Range -0,14- 0,8).

3 von 5 Patienten mit erhöhter Baseline-ALT zeigten im Therapieverlauf einen Abfall der ALT unter 1 ULN. 2 der Patienten zeigten nach Monat 9 bzw. 12 weiterhin einen erhöhten ALT-Wert. Bei Patient #12 kam es nach 3 Monaten zu einem Anstieg der ALT um 2,84 fold ULN welche nach 6 Monaten allerdings unter den Normwert fiel (s. Tab. 7).

ALT im Therapieverlauf

Pat. Nr.	ALT(ULN) Baseline	ALT (ULN)					Letzter Wert	Zeit der Therapie (Monate)
		M3	M6	M9	M12	M15		
1.	0,94	0,86	0,69	0,43	0,51	.	0,51(M12)	13
2.	0,66	0,71	0,77	0,88	0,74	.	0,74(M12)	13
3.	0,77	0,86	0,97	0,94	0,8	.	0,8(M12)	13
4.	0,43	0,4	Nd	0,48	.	.	0,48(M9)	14
5.	0,78	0,62	0,6	0,66	0,6	0,56	0,56(M15)	20
6.	1,34	0,94	0,82	0,72	0,74	.	0,74(M12)	13
7.	0,7	0,76	Nd	0,44	.	.	0,44(M9)	14
8.	1,23	1,09	0,91	0,97	0,74	.	0,74(M12)	14
9.	0,37	0,49	0,49	0,49	0,51	.	0,51(M12)	14
10.	1,14	0,92	1,1	nd	1	.	1,0(M12)	14
11.	0,57	0,46	0,54	0,49	0,69	.	0,69(M12)	13
12.	1,72	4,56	0,92	1,52	.	.	1,52(M9)	14
13.	0,7	0,72	Nd	.	.	.	0,72(M3)	8
14.	1,96	1,6	1,62	1,2	1,16	.	1,16(M12)	18
15.	0,46	0,44	0,32	nd	0,44	.	0,44(M12)	13

Tabelle 7: ALT im Therapieverlauf. (nd=nicht durchgeführt; ULN=upper limit of normal; M=Monat)

4.1.2.3 HBeAg und HBsAg Status

HBeAg wurde bei 13 von 15 Patienten nach Umstellung auf die Kombinationstherapie, bei Abschluss der Studie, bestimmt. Keiner der 9 HBeAg-positiven Patienten zeigte im Laufe der Kombinationstherapie eine HBeAg-Serokonversion. Es konnte kein HBsAg-Verlust oder HBsAg-Serokonversion nachgewiesen werden.

4.1.2.4 Sicherheit

Die Therapieumstellung wurde von allen Patienten ausgezeichnet toleriert und es wurden keine Nebenwirkungen vermerkt.

4.1.3 Darstellung der Therapieverläufe

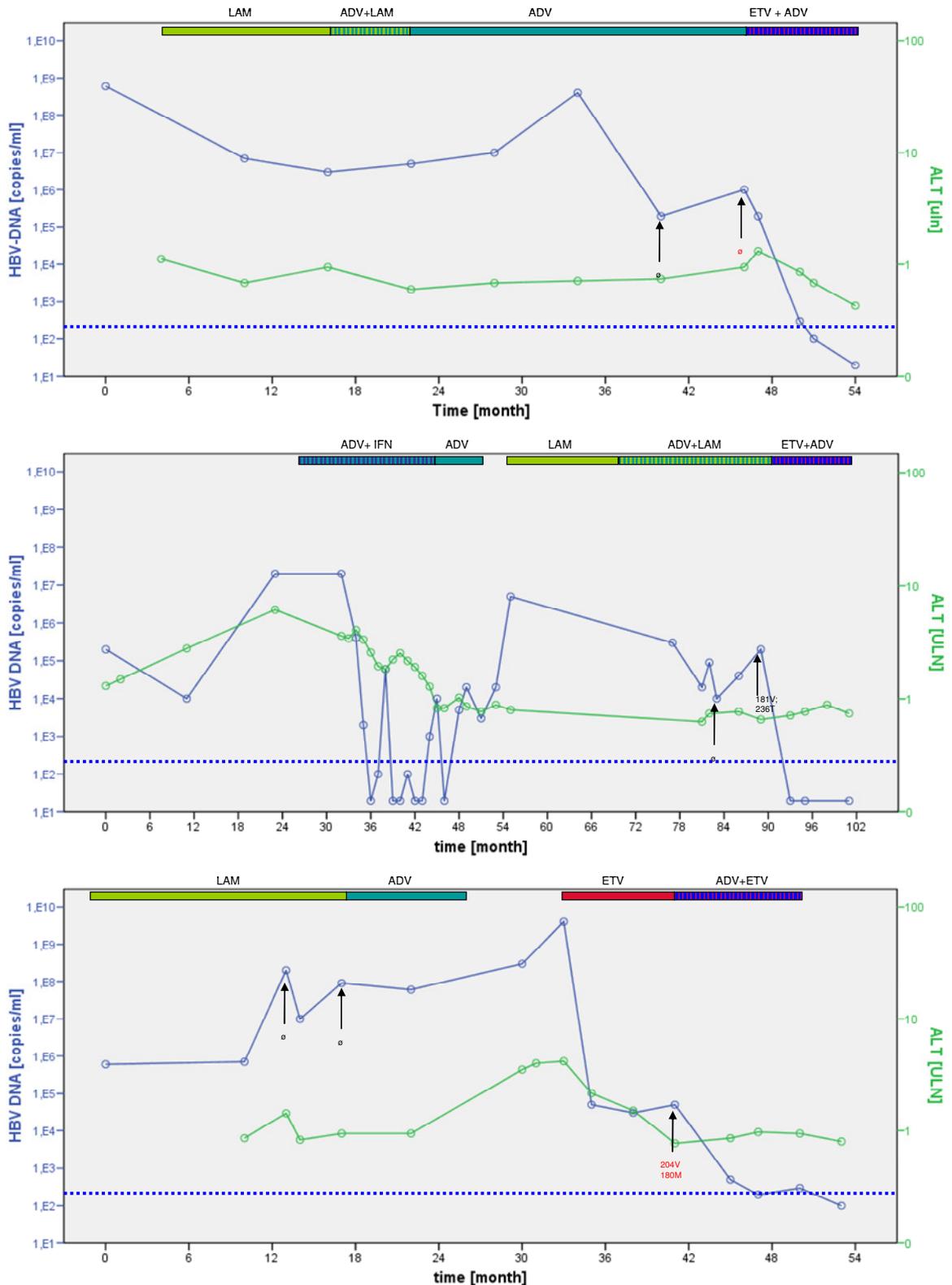


Abbildung 13: Oben: Patient#1; Mitte: Patient#2; Unten Patient#3. Patient#2 entwickelte innerhalb von 6 Monaten eine rtA181V und rtN236T Mutation, Patient#3 hatte einen Therapiestop mit ADV wegen V.a eine primäre Nonresponse.

Darstellung der Therapieverläufe

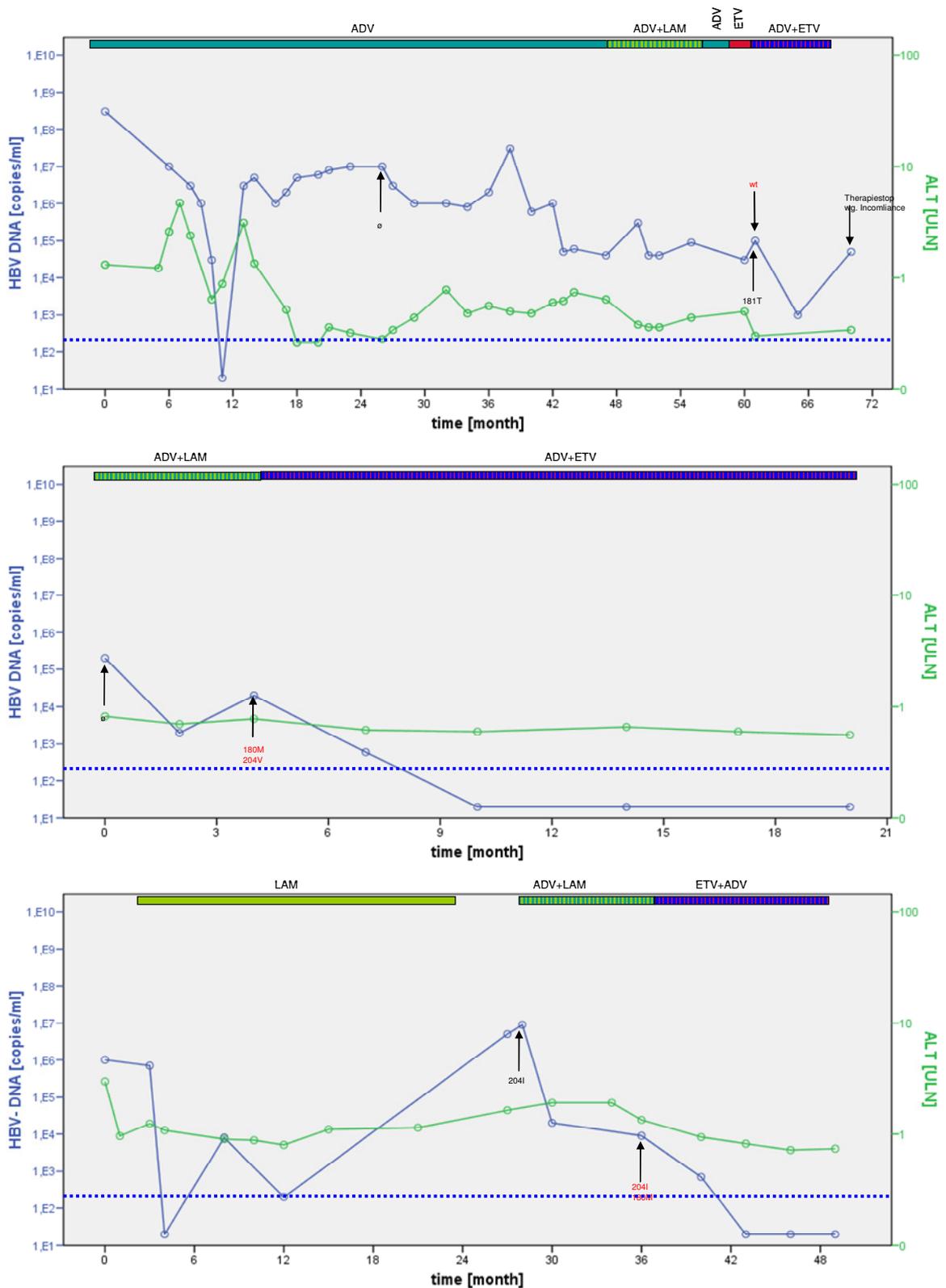


Abbildung 14: Oben: Patient#4; Mitte: Patient#5; Unten: Patient#6. Patient#4 hatte ein Therapieabbruch wegen V.a. Incompliance, Patient#5 zeigte zusätzlich eine rtM250V Mutation.

Darstellung der Therapieverläufe

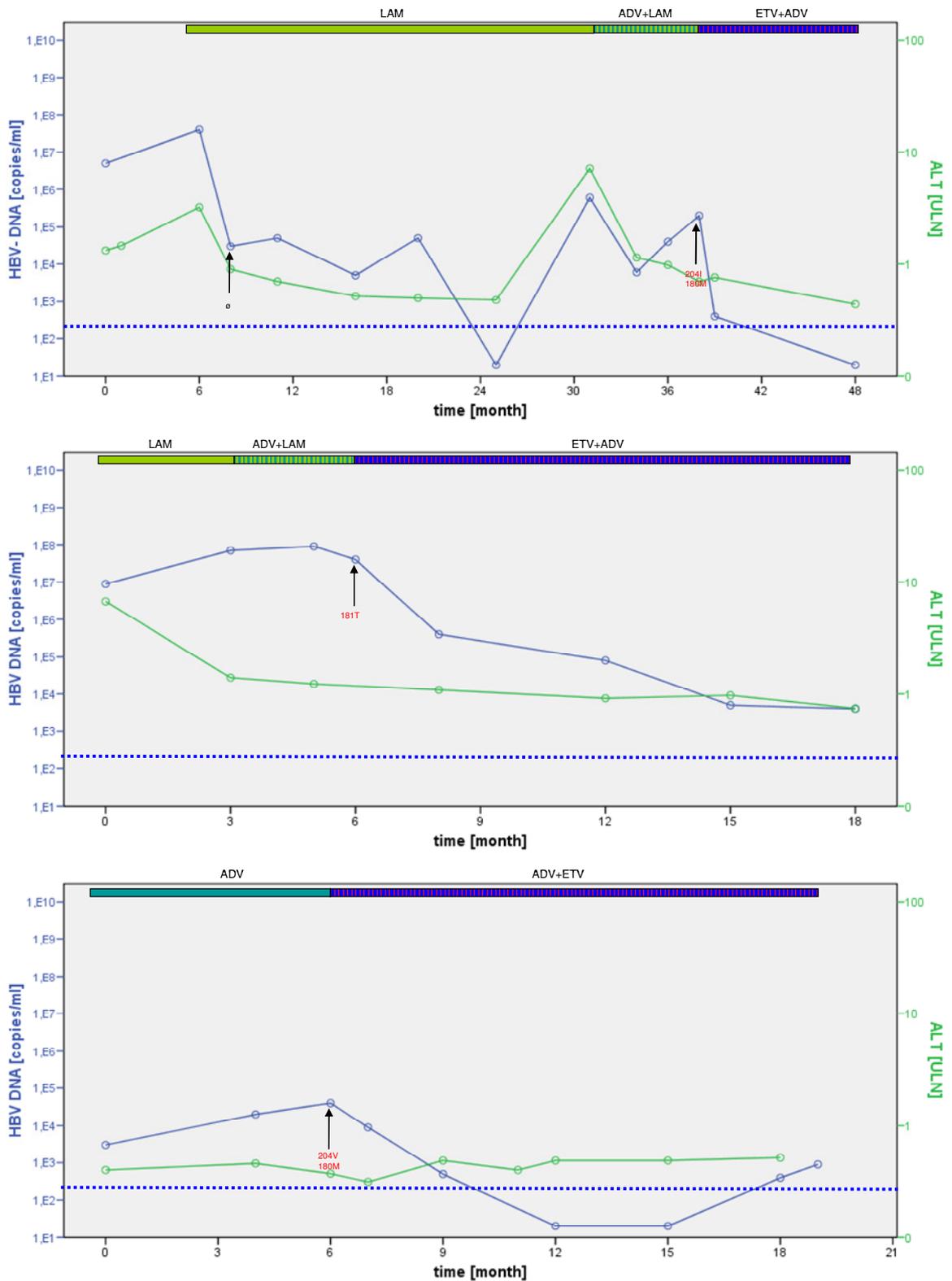


Abbildung 15: Oben: Patient#7; Mitte: Patient#8; Unten: Patient#9.

Darstellung der Therapieverläufe

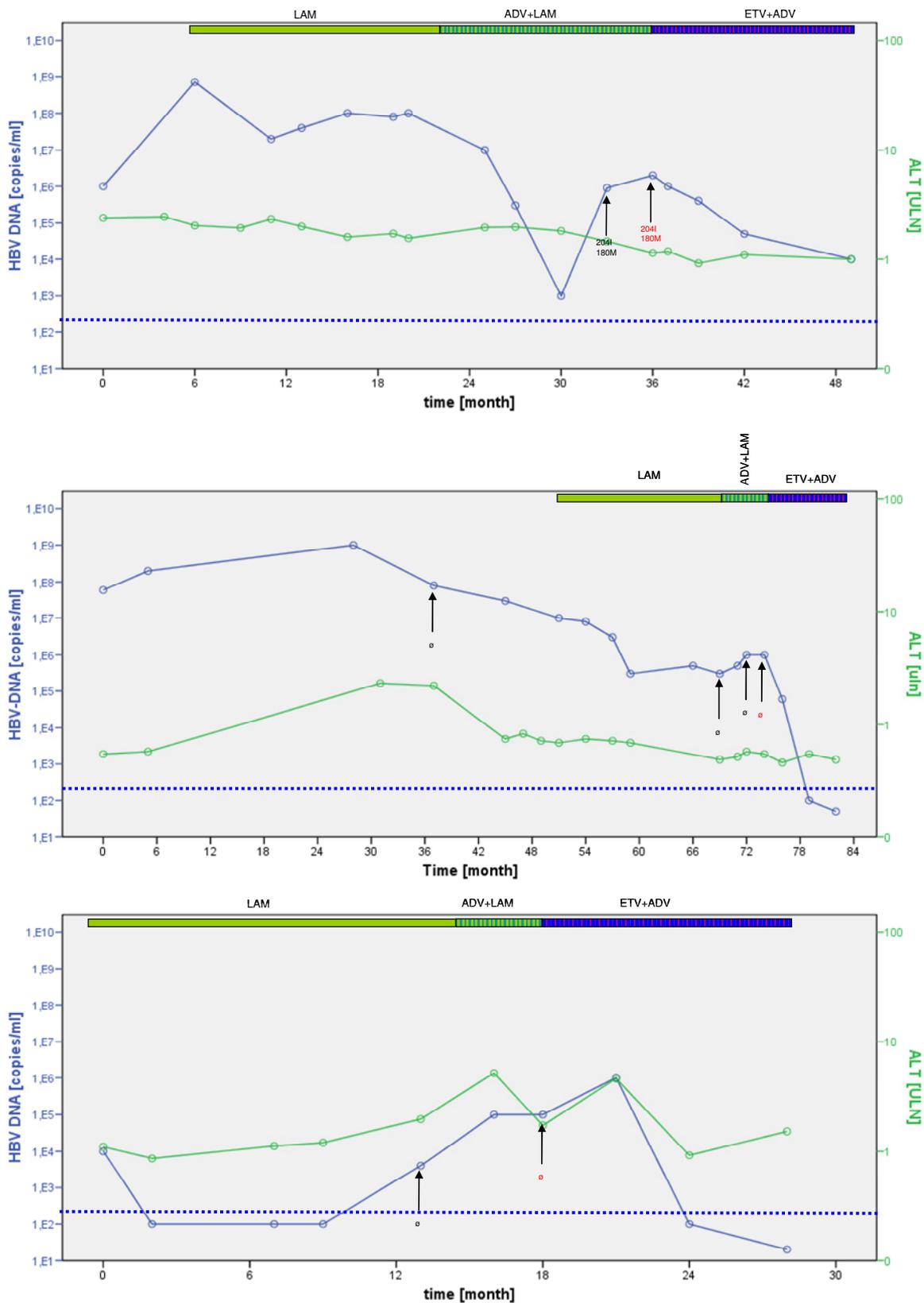


Abbildung 16: Oben: Patient#10; Mitte: Patient#11; Unten: Patient#12.

Darstellung der Therapieverläufe

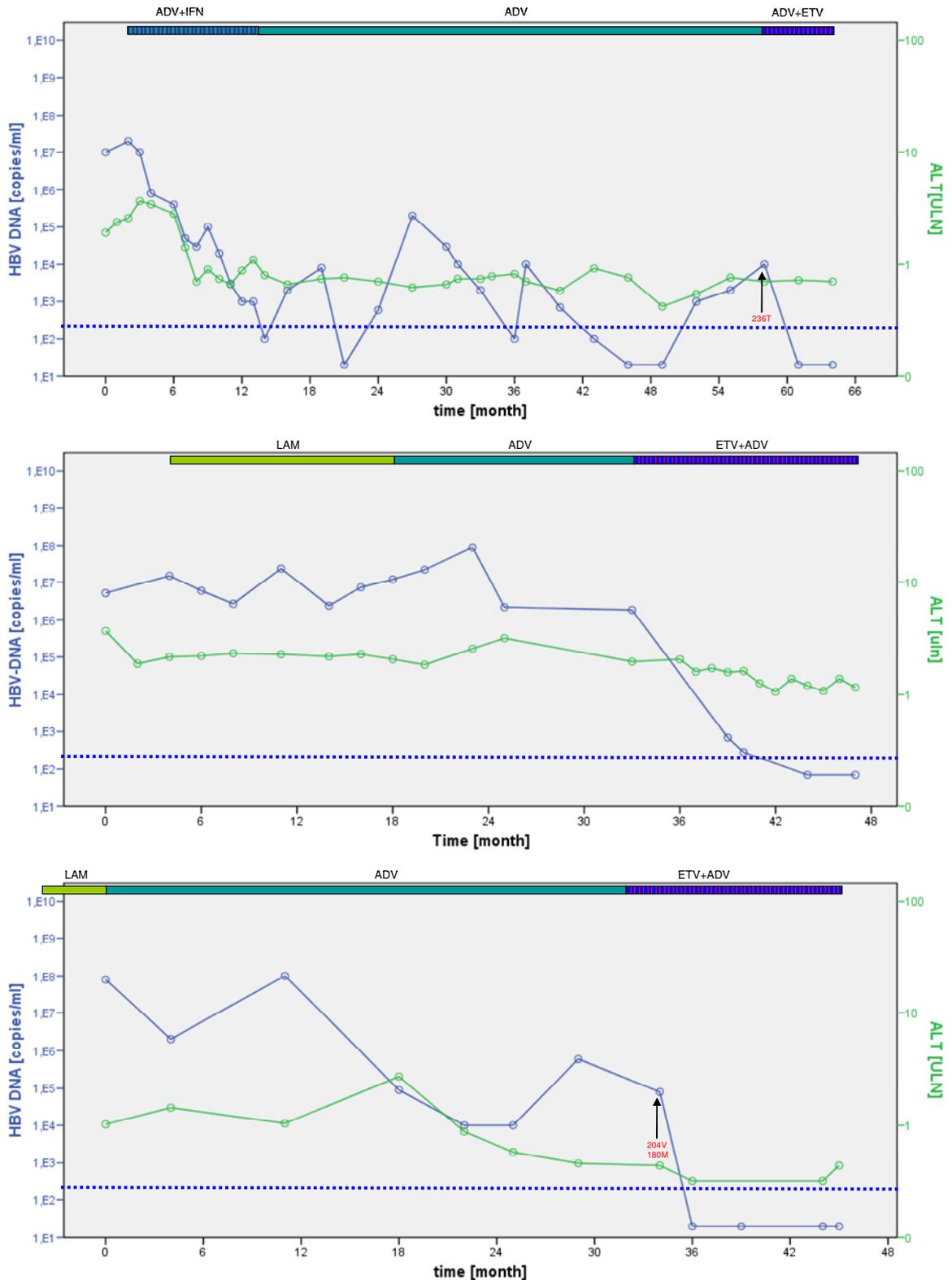


Abbildung 17: Oben: Patient#13; Mitte: Patient#14; Unten: Patient#15. Von Patient #14 stand kein Serum für Resistenztests zur Verfügung.

4.2 Kohorte 2 (Tenofovir + Entecavir)

4.2.1 Baseline Charakteristika

4.2.1.1 Demographie

Diese Kohorte besteht aus 12 Hepatitis B-monoinfizierten Patienten (12 Männer) mit einem Alter von im Median 48,5 Jahren (Range 31–66 Jahre).

8 Patienten stammen aus Europa, zwei aus Afrika und 2 aus Asien. Die Erstdiagnose der HBV-Infektion wurde im Median vor 8 Jahren (Range 4-24 Jahre) gestellt.

Die durchschnittliche Dauer der antiviralen Vortherapie beträgt 65 Monate (Range 6-107 Monate) und die Therapielinie vor Umstellung beträgt 3 Behandlungen (Range 1-6 Behandlungen). Die letzte Therapie vor Umstellung war bei jeweils einem Patienten eine Adefovir-, Entecavir-, Lamivudin-, oder Tenofovir-Monotherapie. Ein Patient bekam die Kombination aus Lamivudin + Tenofovir und 7 Patienten Lamivudin + Adefovir (s. Tab. 8).

4.2.1.2 ALT und HBV Serologie

Bei Umstellung auf die Kombinationstherapie betrug die ALT im Median 1,45 ULN (Range 0,38-4,1 ULN). 10 von 12 Patienten hatten einen erhöhten ALT-Wert (>1 ULN) (s. Tab. 8).

Der HBeAg-Status war bei 9 von 12 Patienten positiv und die Mediane Virämie lag bei 3×10^6 Kopien/ml (Range 7×10^3 - 7×10^9 Kopien/ml). In dieser Kohorte verteilen sich die HBV-Genotypen unter den Patienten auf 10x D und 2x E (s. Tab. 8).

Das HBsAg bestimmt nach Laurell lag im Median der letzten vorliegenden Werte bei 9 µg/ml (Range 0,5-280µg/ml).

Baseline Charakteristika unter Tenofovir + Entecavir

Pat. Nr.	Sex (m/w)	Alter (Jahre)	Therapie -linie	Vorherige Therapie	ALT (ULN) BL	HBeAg BL	HBV DNA (Kopien/ml) BL	Genotyp
1.	m	31	3	ADV+LAM	1,34	positiv	7*10 ⁸	D
2.	m	54	4	ETV	1,08	negativ	1*10 ⁵	D
3.	m	48	2	ADV+LAM	1,66	positiv	5*10 ⁵	D
4.	m	44	4	ADV+LAM	4,1	positiv	7*10 ⁹	D
5.	m	49	3	ADV+LAM	1,56	positiv	2*10 ⁷	D
6.	m	62	1	LAM	1,92	negativ	7*10 ⁵	D
7.	m	36	6	LAM+TDF	0,38	positiv	8*10 ³	D
8.	m	33	3	ADV	3,5	positiv	5*10 ⁶	E
9.	m	54	3	ADV+LAM	1,26	positiv	6*10 ⁶	D
10.	m	59	2	ADV+LAM	0,92	negativ	1*10 ⁶	E
11.	m	32	2	ADV+LAM	2,66	positiv	5*10 ⁹	D
12.	m	66	3	TDF	1,35	positiv	7*10 ³	D

Tabelle 8: Baseline Charakteristika unter TDF+ETV. (m=männlich; w=weiblich; ADV=Adefovir; LAM=Lamivudin; ETV=Entecavir; TDF=Tenofovir; ULN=upper limit of normal; BL=Baseline; nd=nicht durchgeführt).

4.2.1.3 Leberstatus

In der letzten Sonographie vor Umstellung zeigte sich bei 2 Patienten ein leichter-, bei 3 Patienten ein mäßiger-, und bei 3 Patienten einen deutlicher Leberschaden. 4 Patienten zeigten eine ausgeprägte Leberzirrhose (s. Tab. 9).

Leberbiopsien wurden bei 10 der 12 Patienten durchgeführt. 2 Patienten zeigten keine fibrotischen Veränderungen, zwei Patienten eine milde Fibrose, 4 Patienten einen mäßigen Leberschaden, ein Patient eine schwere/hochgradige Fibrose und ein Patient eine ausgeprägte Leberzirrhose.

Patient #6 zeigte eine Leberzirrhose und wurde im November 2008 transplantiert. Ein bioptischer bzw. sonografischer Befund nach der Transplantation liegt nicht vor. Die Biopsie liegt 1 Jahr vor der Sonographie wodurch die Differenz der Befunde zu erklären wäre (s. Tab. 9).

Leberstatus

Pat. Nr.	Letzte Biopsie			Sonografie zur Umstellung
	Grad*	Stadium*	Jahr	
1.	2	2	2005	mäßiger Leberschaden
2.	2	3	2005	deutlicher Leberschaden
3.	nd			Leberzirrhose
4.	2	1	1999	leichter Leberschaden
5.	1	1	2007	mäßiger Leberschaden
6.	3	2	2006	Leberzirrhose
7.	1	0	2006	leichter Leberschaden
8.	nd			Leberzirrhose
9.	3	4	2004	Leberzirrhose
10.	2	2	2007	fortgeschrittener Leberschaden
11.	1	0	unbekannt	Leberschaden mit Fettkomponente
12.	1	2	2005	mäßiger Leberschaden

Tabelle 9: Leberstatus. (nd= nicht durchgeführt; * nach Desmet et al.)

4.2.1.4 Resistenzen vor Therapieumstellung

Vorhergehende Resistenztests, welche aus der Patientenakte entnommen wurden, sind durch die Mikrobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt worden. (s. Tab. 10)

Es wurde bei 10 von 12 Patienten eine Mutationsanalyse im Serum vom Zeitpunkt der Umstellung auf Tenofovir und Entecavir durchgeführt. Von Patient #4 und #6 stand kein Material zur Verfügung.

In dem INNO-LiPA DRv2 Hybridisierungs assay zeigten 2 Patienten eine HBV-Wildtypsequenz, 3 Patienten eine rtA181V+rtN236T Mutation, 2 Patienten eine rtL180M+rtM204V Mutation, und ein Patient eine rtL80V/I+rtM204I Mutation. Weitere zwei Patienten zeigten Resistenzmuster wie rtL80V/I+rtL180M+rtM204I oder rtL180M+rtA181V+rtM204V (s. Tab. 10).

Bei keinem Patienten konnte mittels Prototyp DRv3-Teststreifen eine zusätzliche Resistenzmutation ermittelt werden. Es wurden weder Tenofovir (rtA194T; rtV214A; rtQ215S) noch Entecavir (rtT184S; rtS202G/C/I; rtM250V/I/L) spezifische Resistenzen detektiert.

Um eventuelle Mutationen zu entdecken welche durch den INNO-LiPA Lineprobeassay (DRv2 und DRv3) nicht detektierbar sind, wurde eine direkte Sequenzierung durchgeführt (s. Methoden). Diese zeigte keine weiteren Mutationen. Bei Patient #5 und Patient #8 konnte in der direkten Sequenzierung

die rtN236T Mutation, welche sich im INNO-LiPA Testverfahren zeigte, nicht bestätigt werden (s. Tab. 10).

Patient #2 und #11 zeigten innerhalb eines kurzen Zeitintervalls zwischen dem letzten Resistenztest der Mikrobiologie und den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tests unterschiedliche Sequenzen.

Resistenzen vor Therapieumstellung

Pat. Nr.	Bekannte Resistenzen vor Umstellung	Resistenztest zum Umstellungszeitpunkt	
		(INNO-LiPA DRv2/DRv3)	Sequenzierung
1.	nd	wt	wt
2.	rtN236T	rtL180M;rtA181V;rtM204V	rtL180M; rtA181V;rtM204V
3.	rtL80I; rtM204I	rtL80I;rtL180M;rtM204I	rtL80I; rtL180M; rtM204I
4.	rtA181V; rtM204I; rtN236T	nd	nd
5.	rtA181V	rtA181V; rtN236T	rtA181V
6.	rtM204I	nd	nd
7.	rtM204I	rtL180M;rtM204V	rtL180M; rtM204V
8.	rtA181V; rtN236T	rtA181V; rtN236T	rtA181V
9.	rtL80V; rtM204I	rtL80V;rtM204I	rtL80V; rtM204I
10.	rtL180M; rtM204V	rtL180M; rtM204V	rtL180M; rtM204V
11.	rtA181T	wt	wt
12.	rtA181V; rtN236T	rtA181V; rtN236T	rtA181V; rtN236T

Tabelle 10: Resistenzen vor Therapieumstellung. Auffälligkeiten sind Fett hervorgehoben (wt=Wildtyp; nd=nicht durchgeführt)

4.2.2 Therapieverlauf unter Tenofovir + Entecavir

4.2.2.1 HBV-DNA

Bei 11 von 12 Patienten ist nach im Median 10 Monaten (Range 3-16 Monate) Therapiedauer die Viruslast unter die Nachweisgrenze (<400 Kopien/ml) gefallen (s. Tab. 11). Die Virusreduktion bis zum jeweils letzten bestimmten Wert beträgt im Median 4,4 log Kopien/ml (Range 2,1-7,7 log Kopien/ml), $P < 0,001$.

Nach 3 Monaten Therapie mit Tenofovir + Entecavir konnte bereits bei 5 von 12 Patienten kein Virus mehr detektiert werden. Bei 12 von 12 Patienten konnte eine signifikante Verminderung der Virämie nachgewiesen werden, im Median um 3,2 log Kopien/ml (Range 0,94- 7,15 log Kopien/ml) ($P < 0,001$) (s. Abb. 18).

Nach 6 Monaten Therapiedauer war die Virusmenge bei 10 von 11 Patienten unterhalb der Nachweisgrenze. Im Vergleich zum Wert bei Umstellung ist eine

Reduktion der Virusmenge um 4,54 log Kopien/ml (Range 1,7-8,1 log Kopien/ml) ($P < 0,001$) zu vermerken.

In dieser Kohorte kam es nach im Median 6 Monaten zu einem Abfall der Virämie unter 400 Kopien/ml. Die Schätzgenauigkeit liegt zwischen 5,2 und 6,8 Monaten (s. Abb. 19).

Bei 5 von 7 Patienten war bei Monat 9 keine HBV-DNA mehr im Serum nachzuweisen. 2 von 7 Patienten zeigten einen leichten Anstieg der Virusreplikation (s. Tab. 11).

HBV-DNA im Therapieverlauf

Pat. Nr.	HBV DNA Baseline	HBV DNA (Kopien/ml)					Letzter Wert	Zeit der Therapie (Monate)
		M3	M6	M9	M12	M15		
1.	$7 \cdot 10^8$	ud	ud				ud(M6)	7
2.	$1 \cdot 10^5$	700	2000	ud			ud(M9)	10
3.	$5 \cdot 10^5$	700	ud	ud	ud		ud(M12)	14
4.	$7 \cdot 10^9$	200000	ud	1000			1000(M9)	11
5.	$2 \cdot 10^7$	2000	ud	2000	ud	ud	ud(M15)	16
6.	$7 \cdot 10^5$	ud	ud	ud	ud		ud(M12)	14
7.	$8 \cdot 10^3$	ud	ud	ud			ud(M9)	10
8.	$5 \cdot 10^6$	2000	ud	ud			ud(M9)	12
9.	$6 \cdot 10^6$	ud	ud				ud(M6)	9
10.	$1 \cdot 10^6$	8000	ud				ud(M6)	7
11.	$5 \cdot 10^9$	40000	ud				ud(M6)	8
12.	$7 \cdot 10^3$	ud					ud(M3)	3

Tabelle 11: HBV-DNA im Therapieverlauf (ud=under detection; M=Monat).

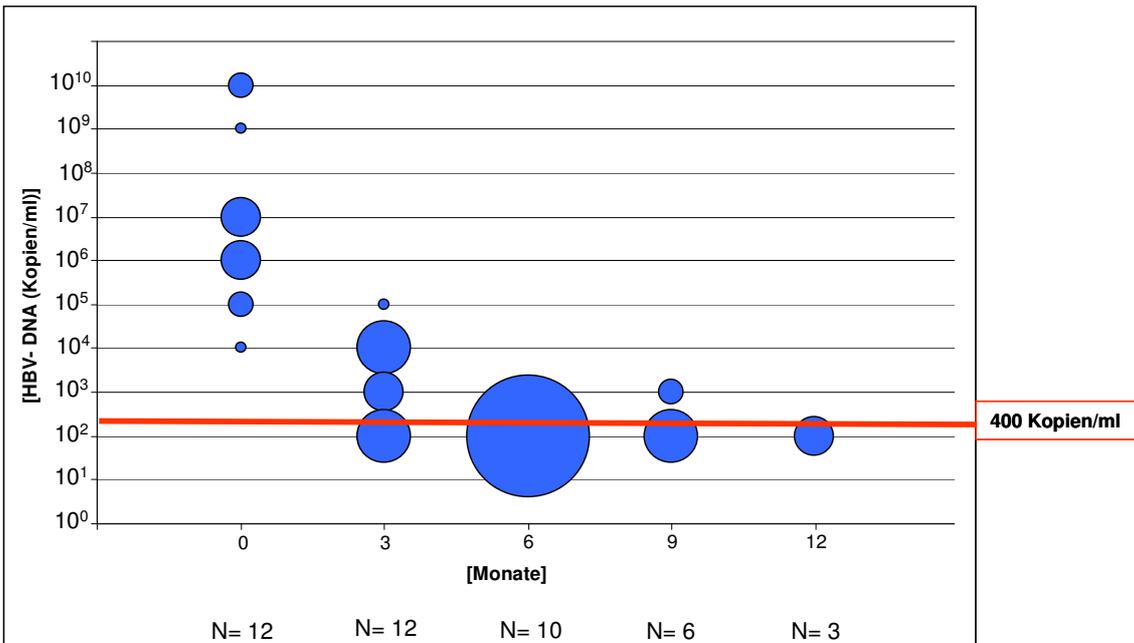


Abbildung 18: HBV-DNA Verlauf unter Tenofovir + Entecavir. Der Blasendurchmesser entspricht der Anzahl der Patienten. Die Viruslast wurde in diesem Fall gerundet um eine repräsentative Gruppe bilden zu können. N beschreibt die Anzahl der Patienten zu dem jeweiligen Monat. Nach 3 Monaten konnte bereits bei 5 von 12 Patienten kein Virus mehr detektiert werden. Bei 12 von 12 Patienten konnte eine signifikante Verminderung der Virämie nachgewiesen werden.

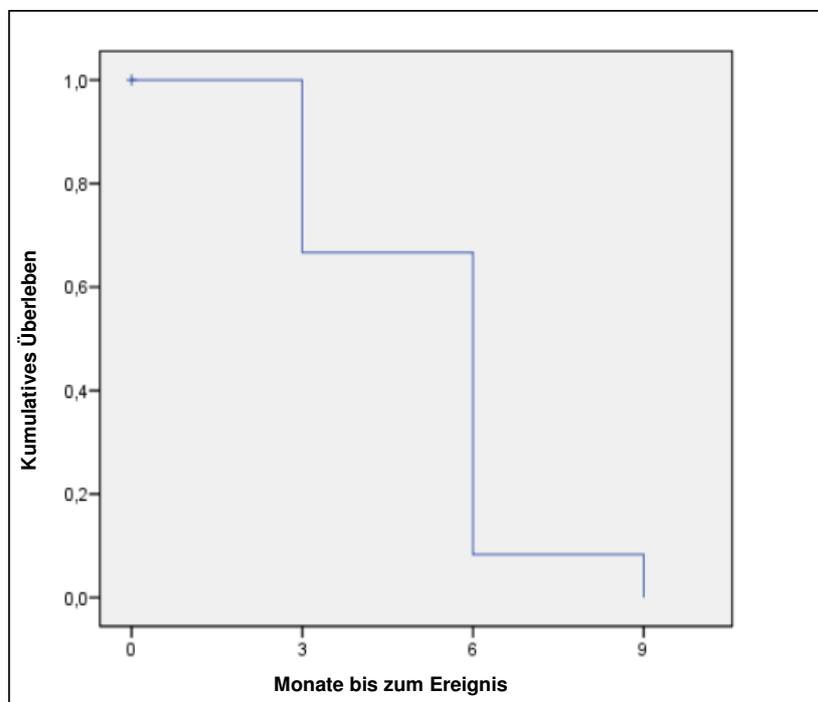


Abbildung 19: Kaplan-Meier Kurve: Kohorte 2. Im Median kommt es nach 6 Monaten zu einem Abfall der Virämie unter 400 Kopien/ml. Die Schätzgenauigkeit liegt zwischen 5,2 und 6,8 Monaten.

Hervorzuheben ist in dieser Kohorte, das sich bei Patient #4 nach 3 Monaten eine HBV-DNA Reduktion von 4,5 log Kopien/ml und nach 6 Monat von 8,2 log Kopien/ml nachwies. Dieser Patient war zuvor über 84 Monate antiviraler Therapie nie unter $1 \cdot 10^5$ HBV-DNA Kopien/ml gemessen worden.

Bei Patient #1 wurde die HBV-DNA ebenfalls in 34 Monaten Therapie nicht unterhalb von $5 \cdot 10^5$ Kopien/ml bestimmt. Bei der 3 Monats Messung war sie bereits um 7,2 log Kopien/ml auf 50 Kopien/ml gefallen.

Bei 5 von 12 Patienten kam es im Therapieverlauf nach 3 Monaten bereits zu einem rapiden Abfall der HBV-DNA um mehr als 4,5 log Kopien/ml.

Pat#6 entwickelte ein HCC und wurde im November 2007 Lebertransplantiert. Die Therapie mit Tenofovir und Entecavir wurde fortgesetzt. Die Transplantation lag zwischen dem 3- und 6-Monatswert.

Bei 7 von 12 Patienten war es, unter langjähriger Therapie (Median 41 Monaten, Range 15-114 Monate), zuvor nicht gelungen, die Viruslast unter die Nachweisgrenze zu senken. Unter der Kombinationstherapie war bei diesen Patienten erstmals kein Virus zu detektieren. (s. Therapieverläufe).

4.2.2.2 ALT

Der Median des jeweils letzten vorliegenden ALT- Wertes betrug 0,94 ULN(Range 0,3-2,36 ULN). Dies bedeutete eine Reduktion, im Vergleich zum ALT- Wert bei Umstellung, um 0,34 fold ULN (Range -0,36- 3,06 fold ULN) (P= 0,043).

Nach 3 Monaten zeigte sich unter Kombinationstherapie bei 6 von 11 Patienten ein Anstieg der ALT (P= 0,698).

Nach 6 Monaten zeigte sich bei 6 von 11 Patienten ein erhöhter ALT-Wert. Im Vergleich zum Umstellungszeitpunkt war bei 3 von 11 Patienten ein Anstieg der ALT zu beobachten. Die Reduktion betrug im Median 0,26 fold ULN (Range - 0,36- 2,68 fold ULN) (P= 0,105).

Nach 9 Monaten Therapiedauer liegen 6 Werte vor, und die mediane Reduktion der ALT-Werte war 0,87 fold ULN (Range 0,44-1,2 fold ULN) (s. Tab. 12).

ALT im Therapieverlauf

Pat. Nr.	ALT(ULN) Baseline	ALT (ULN)					Letzter Wert	Zeit der Therapie (Monate)
		M3	M6	M9	M12	M15		
1.	1,34	1,4	1,7	.	.	.	1,7(M6)	7
2.	1,08	1,24	0,94	.	.	.	0,94(M6)	10
3.	1,66	2,28	1,8	1,18	0,8	.	0,8(M12)	14
4.	4,1	2,34	1,72	1,04	.	.	1,04(M9)	11
5.	1,56	1,74	1,3	1,2	1,2	1,22	1,22(M15)	16
6.	1,92	1,7	0,54	0,44	.	.	0,44(M9)	14
7.	0,38	0,46	0,38	0,48	0,3	.	0,3(M12)	10
8.	3,5	1,26	0,82	0,7	.	.	0,7(M9)	12
9.	1,26	0,56	0,48	.	.	.	0,48(M6)	9
10.	0,92	0,92	1,24	.	.	.	1,24(M6)	7
11.	2,66	3,9	2,36	.	.	.	2,36(M6)	8
12.	1,32	1,2					1,2(M3)	3

Tabelle 12: ALT im Therapieverlauf. (nd=nicht durchgeführt; ULN=upper limit of normal; M=Monat)

4.2.2.3 HBeAg und HBsAg Status

HBeAg wurde bei 11 von 12 Patienten nach Umstellung auf die Kombinationstherapie, bei Abschluss der Studie, bestimmt. Keiner der 9 HBeAg-positiven Patienten zeigte im Laufe der Kombinationstherapie eine HBeAg-Serokonversion. Es konnte kein HBsAg-Verlust oder HBsAg-Serokonversion nachgewiesen werden.

4.2.2.4 Sicherheit

Die Therapieumstellung wurde von allen Patienten ausgezeichnet toleriert. Es wurden keine Nebenwirkungen vermerkt.

4.2.3 Darstellung der Therapieverläufe

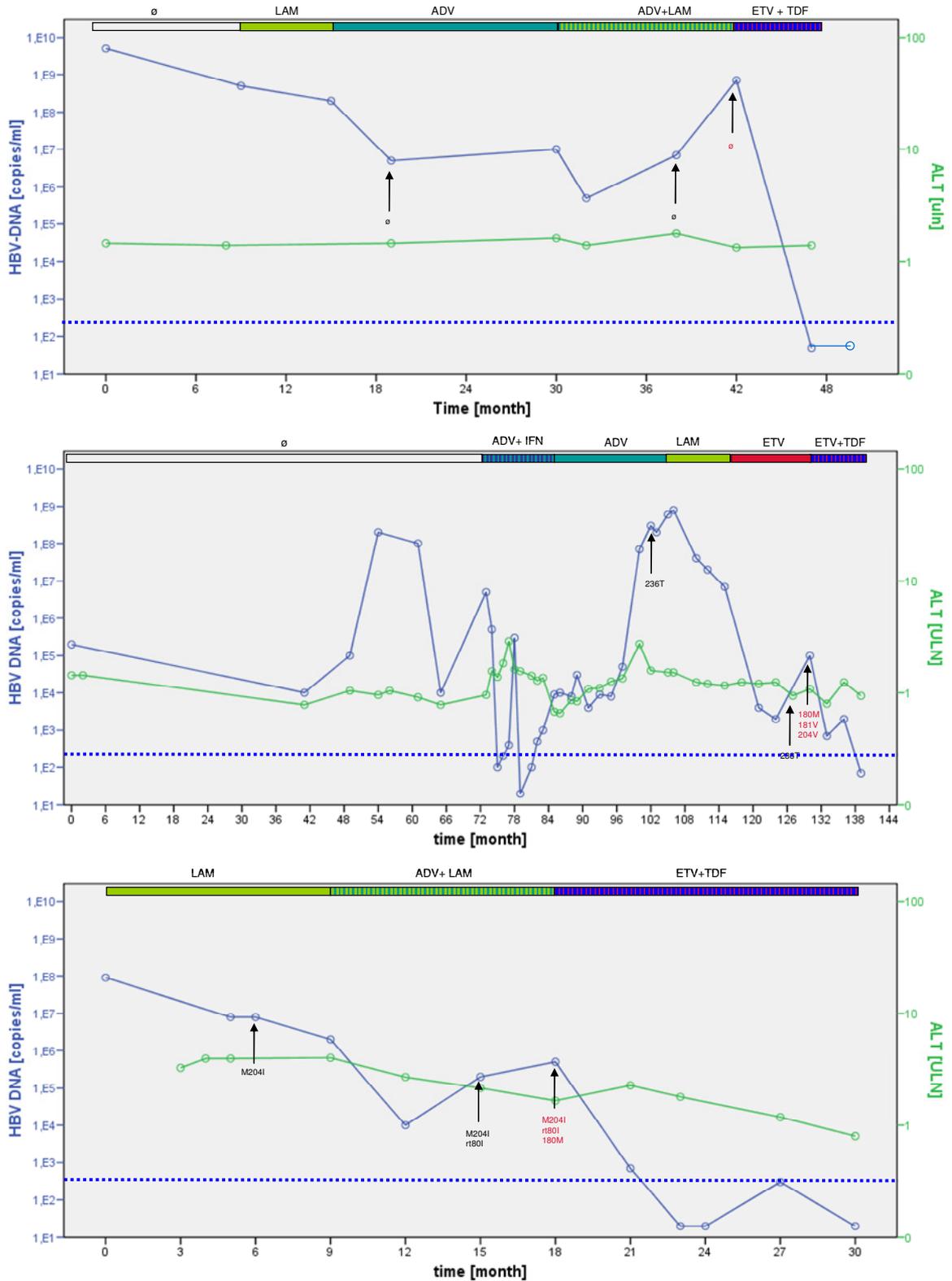


Abbildung 20: Oben: Patient#1; Mitte:Patient#2; Unten Patient#3. Patient #1 wurde unter 34 Monaten antiviraler Therapie nicht unterhalb von $5 \cdot 10^5$ Kopien/ml gemessen. Die 3 Monatsmessung zeigte bereits einen Abfall um 7,2 log Kopien/ml.

Darstellung der Therapieverläufe

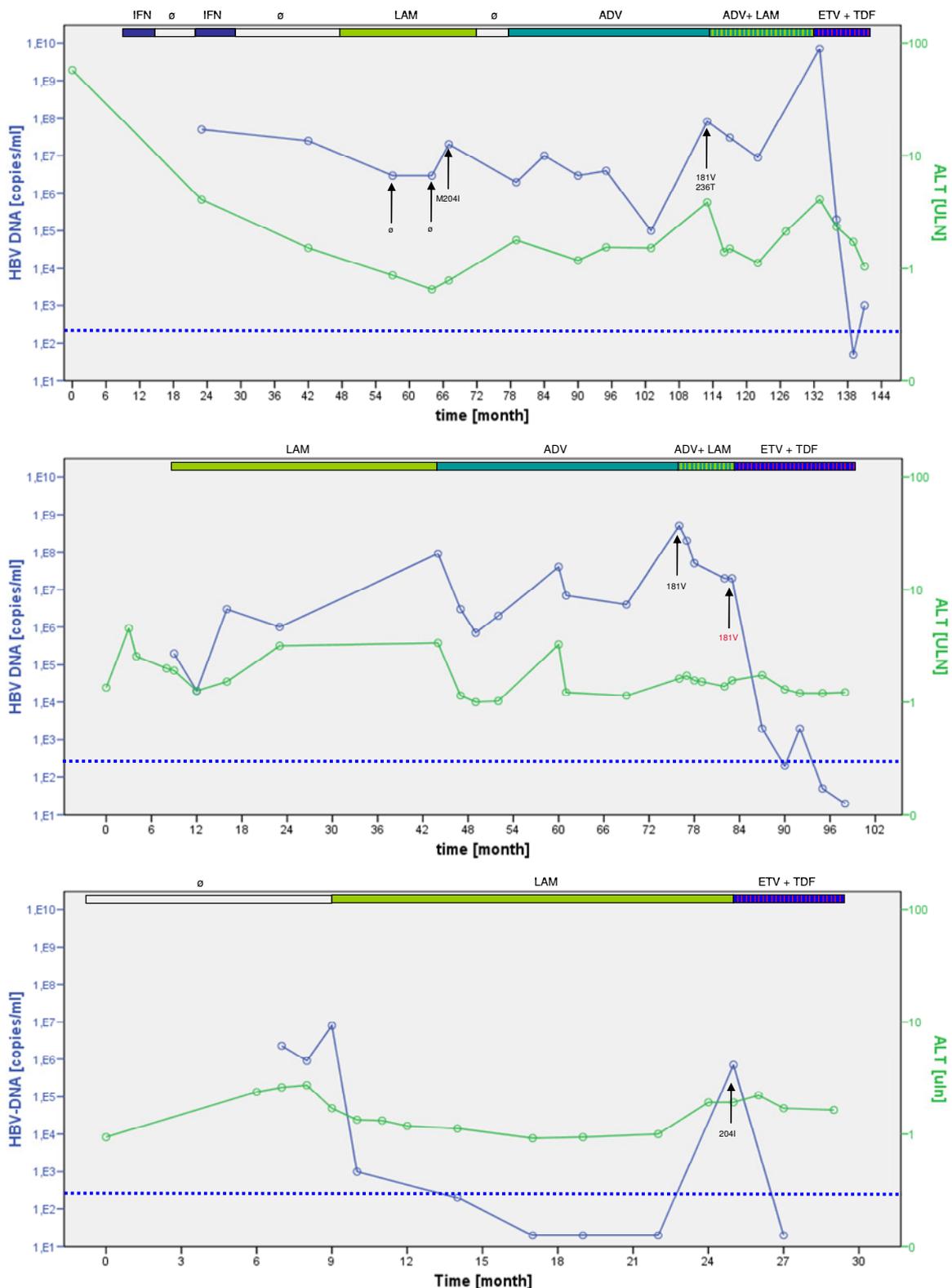


Abbildung 21: Oben: Patient#4, Mitte: Patient#5; Unten: Patient#6. Patient#6 hat Z.n LeberTx. Aktuelle Therapie besteht aus einer HBV-Reinfektionsprophylaxe mit TDF+ETV und Hepatec (200E i.v. bei einem Abfall des Anti-HBs-Titers unter 1000 ME/ml). Es ist nur der 3 Monatswert eingetragen. Nach 12 Monaten war der Patient weiterhin HBV-DNA negativ (s. Tab. 11).

Darstellung der Therapieverläufe

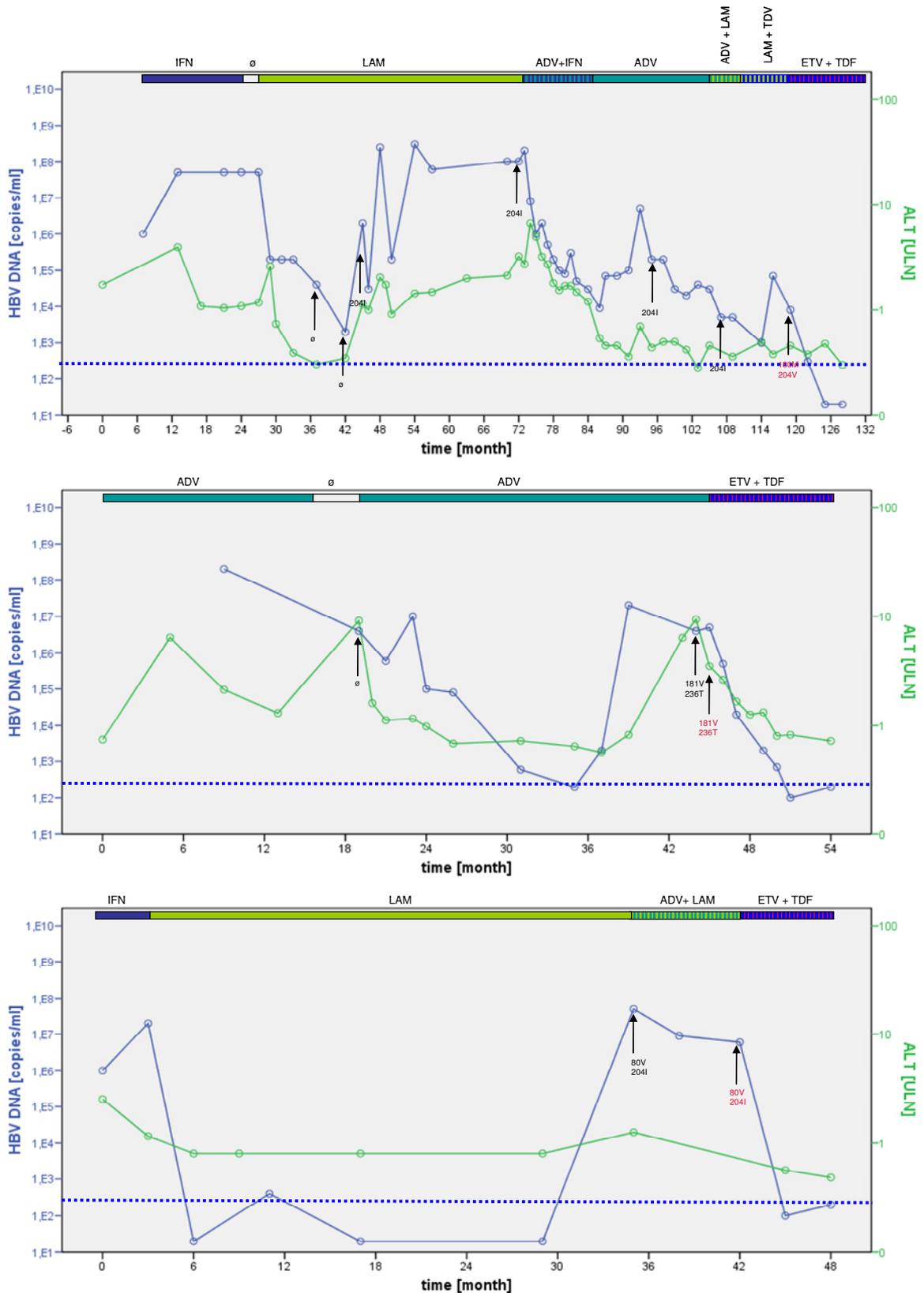


Abbildung 22: Oben: Patient#7; Mitte: Patient#8; Unten: Patient#9.

Darstellung der Therapieverläufe

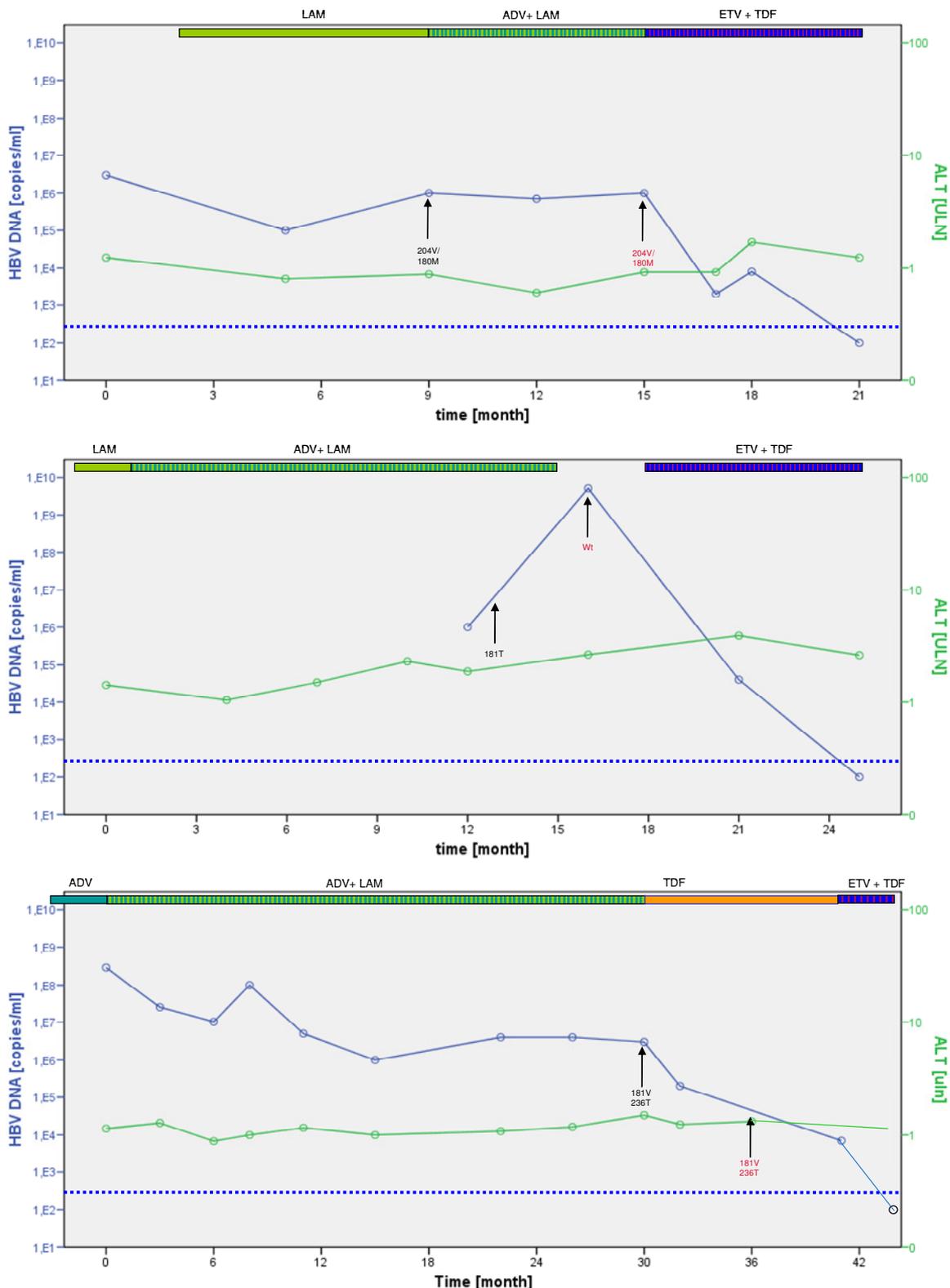


Abbildung 23: Oben: Patient#10, Mitte: Patient#11, Unten: Patient#12. Patient #11 wurde erst seit Umstellung auf die Kombinationstherapie im Universitätsklinikum Eppendorf behandelt. Es existierte nur ein Wert vor Umstellung welcher in der Türkei bestimmt wurde. Bei Patient#12 war bei Abschluss der Studie nur ein 3 Monatswert vorhanden.

5 Diskussion

Die Entwicklung von antiviralen Resistenzen stellt ein großes Problem in der Behandlung der chronischen Hepatitis B dar und ist einer der häufigsten Gründe eines Behandlungsversagens mit Nukleos(t)id-Analoga [38]. Die europäische Leitlinie empfiehlt bei Resistenzentstehung unter einer HBV-Monotherapie eine „add-on“-Therapie mit einem Nukleos(t)id-Analoga mit nicht überlappendem Resistenzprofil [17]. Es gibt aber bisher nur wenige Studien, auf welche sich diese Empfehlung stützt [4, 65].

Es wurde gezeigt, dass eine Kombinationstherapie mit Nukleos(t)id-Analoga mit nicht überlappenden Resistenzprofilen (Adefovir + Lamivudin) die Entstehung von Resistenzen vermindert und somit einen klaren klinischen Vorteil für bereits unzureichend vortherafierte Patienten besitzt. Es konnte jedoch sowohl bei Einsatz „de-novo“- als auch im Sinne einer Rescuetherapie keine stärkere antivirale Effektivität als bei einer Monotherapie nachgewiesen werden [5, 66]. Es scheint als richte sich die antivirale Potenz einer Kombinationstherapie nach dem potenteren Partner, da kein Synergismus beschrieben wurde und beide Nukleos(t)id-Analoga das gleiche virale Target besitzen. Vassiliadis et al. zeigte in einer 4 Jahresstudie bei LAM-resistenten Patienten, dass eine Kombinationstherapie vs. Monotherapie eine bessere antivirale Wirksamkeit aufwies [67].

Erstmals untersucht diese retrospektive Kohortenstudie die Wirksamkeit und Sicherheit der Kombinationstherapien Adefovir + Entecavir und Tenofovir + Entecavir, die im Sinne einer Rescuetherapie bei HBV-monoinfizierten Patienten mit komplexen viralen Resistenzmustern und/oder vorhergehenden suboptimalen Therapieansprechen eingesetzt wurden.

Die unterschiedlichen antiviralen Resistenzen (s.u.) und der häufige Therapiewechsel führen zu einem heterogenen und schwierigen Patientenkollektiv. In beiden Kohorten war die Kombinationstherapie im Median bereits der 4. Therapiewechsel in der Behandlungslinie. 60% (16/27) der hier vorgestellten Patienten wurden vor Umstellung auf die Rescuetherapie bereits mit einer Kombinationstherapie (56% Adefovir + Lamivudin) behandelt und

zeigten unter dieser kein oder nur ein suboptimales Therapieansprechen. Beide Kombinationstherapien erwiesen sich in ihrer Effektivität der Virussuppression als äußerst potent und wirksam. Bei 73% (11/15) und 92% (11/12) der Patienten unter Adefovir + Entecavir bzw. Tenofovir + Entecavir war im Median nach 14 und 10 Monaten Therapiedauer die Virämie unter die Nachweisgrenze von 400 Kopien/ml gefallen.

Im Vergleich mit einer Tenofovir-Monotherapie [68], welche bei 20 Patienten nach viralem Durchbruch unter Lamivudintherapie und darauf folgendem suboptimalem Therapieansprechen unter Adefovirtherapie im Sinne einer Rescuetherapie untersucht wurde, zeigt sich auch hier eine hohe antivirale Effizienz. Bei 95% (19/20) der Patienten kam es nach im Median 12 Monaten zu einer Reduktion der Viruslast unter die Nachweisgrenze (<400 Kopien/ml) [68].

In einer größeren internationalen und multizentrischen Studie führte eine Tenofovir-Monotherapie nach im Median 23 Monaten bei 79% (103/131) der Patienten zu einem Abfall der HBV-DNA unter die Nachweisgrenze (<400 Kopien/ml). Die Vortherapien waren Lamivudin (n=18), Adefovir (n=8), sequentielle Lamivudin- Adefovir- Therapie (n=73) oder add-on im Sinne einer Kombinationstherapie mit Adefovir + Lamivudin (n=29) [45].

Eine Tenofovir- Monotherapie zeigt also ebenfalls eine gute antivirale Effizienz in therapieerfahrenen Patienten. Die Patienten dieser Studien hatten allerdings weniger komplexe Therapieverläufe mit höchstens einem Therapiewechsel vor Umstellung und kein Patient [68] bzw. nur 21/113 (19%) Patienten zeigten zum Zeitpunkt der Umstellung ADV-Resistenzen [45].

Unter den beiden oben erwähnten Tenofovir-Monotherapie Studien zeigte die größere multizentrische Untersuchung ein weniger homogenes Patientenkollektiv und ein geringeres virales Ansprechen von Tenofovir (79% vs. 95%). Bei bestehender ADV-Resistenz zeigt eine Tenofovir-Monotherapie eine deutlich verminderte antivirale Wirksamkeit (s.u.).

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen hingegen, dass weder ADV- Resistenzen noch die Vorbehandlung mit einer Kombinationstherapie die Effizienz der Kombinationstherapien vermindert bzw. beeinflusst haben (siehe auch unten).

Interessanterweise war es bei 48% (13/27) der Patienten unter langjähriger antiviraler Therapie zuvor noch nicht gelungen, die Viruslast unter die Nachweisgrenze zu senken. Unter der jeweiligen Kombinationstherapie war bei diesen Patienten nun erstmalig kein Virus zu detektieren.

Im Gegensatz zu einer Tenofovir-Monotherapie erwies sich in einer Studie von Janssen et al. eine Entecavir-Monotherapie, bei 14 Patienten (57% mit LAM-Erfahrung) mit vermindertem Therapieansprechen nach 12 Monaten Behandlung mit Adefovir, als Rescuetherapie weniger effektiv. Nach im Median 15 Monaten wurde bei nur einem Patienten die HBV-DNA unterhalb der Nachweisgrenze (<373 Kopien/ml) gemessen [69]. Shim et al. bestätigte bei Patienten mit klinischer ADV- und LAM-Resistenz (n=50) und bei Patienten mit einer klinischen LAM-Resistenz (n=38) die schwache antivirale Effizienz von Entecavir als Rescuetherapie. Nach 48 Wochen wurden auch hier nur 10% (5/50) und 34% (13/38) der Patienten HBV-DNA negativ (<51 Kopien/mL) gemessen [70].

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass ein switch auf Entecavir + Adefovir nach suboptimalen Therapieansprechen bei einer sequentiellen- (n=5) oder Kombinationstherapie (n=8) mit Adefovir und Lamivudin bei 10/13 (77%) Patienten zu einer viralen Suppression unter die Nachweisgrenze (<400 Kopien/ml) führte. Dies bestätigte den Vorteil einer Kombinationstherapie als Rescuetherapie und die Empfehlung der Leitlinie.

HBeAg und HBsAg

Eine HBeAg-Serokonversion bei HBeAg-positiven chronischen Hepatitis B-infizierten Patienten ist mit einem verbesserten Krankheitsverlauf assoziiert [15, 71, 72] und somit eines der Behandlungsziele [17]. Interferon α war lange der Goldstandard für das Erreichen einer HBeAg-Serokonversion und zeigte nach 1 Jahr höhere HBeAg-Serokonversionsraten als Lamivudin oder Adefovir [73-75].

Trotz der besseren antiviralen Wirksamkeit von Entecavir und besonders Tenofovir, verglichen mit Adefovir und Lamivudin [29, 76], zeigte sich aber unter allen Nukleos(t)id-Analoga bei therapienaiven Patienten eine ähnliche HBeAg-

Serokonversionsrate, welche sich auf ~20% nach einem Jahr Therapie beläuft [77].

Entgegen dieser Daten zeigte sich in unseren Kohorten, ungeachtet der signifikanten Virussuppression, sowohl unter Adefovir + Entecavir als auch unter Tenofovir + Entecavir nach 14 und 10 Monaten weder eine Serokonversion noch ein Verlust des HBe- oder HBs- Antigens.

Diese Patienten wurden allerdings schon über langen Zeitraum behandelt (41 und 65 Monate) und unter keiner der Vortherapien (einige bekamen auch Interferon) kam es zu einer HBeAg- Serokonversion. Hohe ALT- Werte (>5x ULN) und eine niedrige Virämie bei Umstellung sind mit höheren HBeAg- Serokonversionsraten verbunden [78]. Nur ein geringer Teil (3/27) der hier vorgestellten Patienten zeigte ALT-Werte >2x ULN, jedoch eine hohe Virämie bei Umstellung auf die Kombinationstherapie.

Unter Interferon Therapie zeigte sich, dass der Genotyp A mit höheren HBeAg Serokonversionsraten einherging als Genotyp D oder C [79-81]. In unserer Untersuchung war überwiegend Genotyp D (7/14 und 10/12) nachweisbar.

Resistenzen

Besonders an dem hier vorgestellten Patientenkollektiv ist, dass ein Großteil der Patienten bereits unter vorhergehenden Therapien antivirale Resistenzen entwickelte. 71% (10/14) und 80% (8/10) der Patienten mit Resistenztests bei Umstellung auf Adefovir + Entecavir bzw. Tenofovir + Entecavir zeigten antivirale Resistenzen. Als primäre Resistenzmutationen wurde bei 50% (7/14) und 40% (4/10) der Patienten eine rtM204V Mutation, bei 14% (2/14) und 30% (3/10) eine Kombination der Resistenzmutationen rtA181V + rtN236T und bei 7% (1/14) eine rtA181T Mutation bzw. 10% (1/10) eine Kombination der rtA181V + rtM204V Mutation nachgewiesen.

Andere Studien wiesen, wie bereits oben erwähnt, für eine Tenofovir-Monotherapie bei Patienten mit ADV- Resistenzen eine verminderte antivirale Effektivität auf (52% <400 Kopien/ml) [45, 82]. Eine Entecavir-Monotherapie war bei Patienten mit ADV- und/oder LAM- Resistenzen nur schwach potent [70].

Interessanterweise konnte in unserer Arbeit jedoch kein Zusammenhang zwischen einem verminderten Therapieansprechen und einer der oben beschriebenen Resistenzen festgestellt werden. Patienten mit multiplen

antiviralen Resistenzen hatten innerhalb kürzester Zeit eine signifikante Virusreduktion. Weder vorliegende LAM- noch ADV- Resistenzen haben die Wirksamkeit der Kombinationstherapien beeinflusst. Patienten mit multiplen antiviralen Resistenzen, einer Monoresistenz oder ohne Resistenzmuster, zeigten keinen signifikanten Unterschied im Therapieansprechen.

Abzuwarten bleibt, wie die Resistenzentstehung sich unter einer Kombinationstherapie über einen langen Behandlungszeitraum entwickelt. Bisherige Daten zeigten, dass die Resistenzentwicklungsrate geringer ist als unter einer Monotherapie [5, 66].

Sicherheit

Zur Sicherheit einer Kombinationstherapie mit Nukleos(t)id-Analoga bei Behandlung einer chronischen Hepatitis B-Infektion gibt es bisher nur wenige Langzeitdaten. Besonders diese Daten sind aber von Bedeutung, denn häufig bedarf es Jahre, wenn nicht einer lebenslangen antiviralen Therapie, um eine klinische Besserung der viralen Infektion zu erreichen [83].

Die gute Verträglichkeit einer Monotherapie mit Nukleos(t)id-Analoga über einen Zeitraum bis zu 6 Jahren ist bekannt und wurde in Studien bestätigt. Lamivudin [84] und Adefovir [18] zeigten nach 6 und 5 Jahren keine schwerwiegenden Nebenwirkungen. In einer kleinen Studie von Lange et al. kam es unter Entecavir-Monotherapie innerhalb der ersten 240 Behandlungstage bei 5/16 Patienten zu einer Laktatazidose. Alle 5 Patienten hatten eine ausgeprägte verminderte Leberfunktion mit einem MELD-score >20. Die übrigen 11 Patienten hatten einen MELD-score <18. 1/5 der Patienten mit Laktatazidose verstarb. Die Anderen zeigten eine Besserung nach Absetzen bzw. Therapiepause mit Entecavir [85]. Die Ursache scheint hier in einer verstärkten mitochondrialen Toxizität begründet zu sein. Nach dieser Studie sollte Entecavir bei Patienten mit einem schweren Leberschaden nur vorsichtig eingesetzt werden.

Eine Monotherapie mit Tenofovir zeigte nach 23 Monaten keine Nebenwirkungen und keinen signifikanten Anstieg des Serum-Kreatinins [45]. Einzelne Fälle berichten von einer unter Behandlung mit Tenofovir

aufgetretenen Niereninsuffizienz, renal tubulären Abnormalitäten und einer Verminderung der Knochendichte [86, 87]. Diese Nebenwirkungen wurden bei HIV-Patienten, welche über langen Zeitraum behandelt wurden, beobachtet.

Lampertico et al. zeigte für eine Behandlung über 3 Jahre mit der Kombination Lamivudin + Adefovir eine gute Verträglichkeit. Bei 7% (10/145) der Patienten musste allerdings die Dosierung von Adefovir aufgrund eines Kreatinin-Anstiegs vermindert werden [4]. Eine andere Studie zeigte bei 45 Patienten, welche im Median 4 Jahre mit Adefovir + Lamivudin behandelt wurden, keine Nebenwirkungen [67].

Bei HIV/HBV-koinfizierten Patienten gibt es einige Erfahrungen mit der Behandlung durch eine Kombinationstherapie aus Tenofovir + Lamivudin bzw. Emtricitabine, welche keine erhöhten Nebenwirkungsraten und Medikamenteninteraktionen zeigten [88, 89].

Es bleibt abzuwarten, inwieweit eine längerfristige Kombinationstherapie negative Einflüsse auf die renale Verträglichkeit, insbesondere die tubuläre Nierenfunktion, besitzt.

In Rahmen unseres Beobachtungszeitraumes (10 und 14 Monate) wurden beide Kombinationstherapien gut toleriert und bei keinem Patienten Nebenwirkungen in der Patientenakte vermerkt.

Vergleich der antiviralen Effizienz beider Kombinationstherapien

Betrachtet man die Virämie bei Umstellung, im Median 2×10^5 vs. 3×10^6 Kopien/ml und die sonografischen (s. Tab. Leberstatus) Befunde, erscheint das Patientenkollektiv der Kohorte 2, fortgeschrittener im Krankheitsverlauf. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist bei Therapie mit Tenofovir + Entecavir jedoch eine schnellere Virusreduktion als unter Adefovir + Entecavir zu erwarten. Nach 3 Monaten wurde bei 93% (13/14) vs. 100% (12/12) (ADV + ETV vs. TDF + ETV) der Patienten ein Abfall der Virämie nachgewiesen. Im Median beträgt die Reduktion nach 3 Monaten 1,9 vs. 3,2 log Kopien/ml. Die Virusreduktion nach 14 und 10 Monaten beträgt im Median 3,7 vs. 4,4 log Kopien/ml. 73% vs. 92% der Patienten wurden bis Ende des Beobachtungszeitraumes HBV-DNA negativ gemessen (ADV + ETV vs. TDF + ETV).

Dieses Ergebnis bestätigt die stärkere antivirale Potenz von Tenofovir gegenüber Adefovir [29]. Ein Vorteil eines effizienteren initialen virologischen

Therapieansprechens von Tenofovir + Entecavir könnte die Entwicklung von geringeren antiviralen Resistenzraten sein [16, 90].

Fazit

Zusammenfassend war die Rescuetherapie mit Adefovir + Entecavir und Tenofovir + Entecavir bei mehrfach vorbehandelten Patienten mit zum Teil multiplen Resistenzmutationen und fortgeschrittenen Leberparenchymschaden effizient, sicher und wurde gut toleriert. In beiden Kohorten gab es keine signifikanten Veränderungen in der Patientencompliance vor und nach Beginn der Kombinationstherapie. Beide Kombinationstherapien führten zu einer starken viralen Suppression und im Gegensatz zu einer Tenofovir-Monotherapie konnte kein Zusammenhang zwischen einem verminderten Therapieansprechen und vorliegenden antiviralen Resistenzen (insbesondere ADV-Resistenzen) beobachtet werden.

Besonders die Kombination mit Tenofovir + Entecavir scheint eine gute Therapieoption bei schwierigen Patienten mit fortgeschrittenem Leberschaden, langjähriger Therapie und multiplen antiviralen Resistenzen darzustellen. Bei Patienten mit schwerem Leberschaden muss die Möglichkeit der Entstehung einer Laktatazidose unter Behandlung mit Entecavir bedacht werden.

Eine Kombinationstherapie sollte auf Grund der fehlenden Langzeitdaten und der bei Therapieversagen oder Resistenzentstehung, bisher fehlenden weiteren Behandlungsoptionen, nur vorsichtig eingesetzt werden. Nach van Bömmel et al. ist bei einer LAM-Monoresistenz, entgegen der Leitlinienempfehlung, eine Tenofovir-Monotherapie sehr effektiv und sollte überdacht werden [45]. Zudem sind bisher keine Resistenzen gegen Tenofovir bekannt geworden [53, 54].

Diese monozentrische Studie untersuchte nur ein kleines Patientenkollektiv und es handelt sich um eine nicht-kontrollierte und rein beobachtende Studie, welche mit im Median 14 und 10 Monaten einen relativ kurzen Untersuchungszeitraum hat.

Daher sind prospektive Studien sowie ein längerer Untersuchungszeitraum notwendig, um über die Langzeitsicherheit, die antivirale Langzeiteffektivität und die Entstehung neuer viraler Mutationen unter Gebrauch dieses therapeutischen Ansatzes bei chronischen Hepatitis B-infizierten Patienten mit fortgeschrittenem Leberschaden weitere Erfahrungen zu sammeln.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war erstmals die Wirksamkeit und die Sicherheit von Adefovir und Entecavir sowie Tenofovir und Entecavir als Kombinationstherapie, in therapieerfahrenen adulten CHB-Monoinfizierten Patienten mit multiplen antiviralen Resistenzen und/oder fortgeschrittenem Leberschaden zu untersuchen. Dafür wurden die Daten von 27 Patienten retrospektiv erhoben und ausgewertet. Die Patientenseren vom Zeitpunkt der Umstellung auf die Kombinationstherapie wurden mittels INNO-LiPA DRv2/DRv3- Line Probe Assay und direkter Sequenzierung auf antivirale Resistenzen getestet.

In beiden Kohorten erwies sich die Kombinationstherapie im Sinne einer Rescuetherapie als effizient, sicher und wurde gut toleriert. Bei 73% der Patienten unter Adefovir + Entecavir und bei 92% der Patienten unter Tenofovir + Entecavir war nach 14 und 10 Monaten keine Virämie mehr nachzuweisen. Insbesondere bestehende antivirale Resistenzen haben die Effektivität nicht nachweisbar beeinflusst und unter allen Patienten wurden keine signifikanten Nebenwirkungen vermerkt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationstherapie eine gute Therapieoption bei schwierig zu therapierenden chronisch HBV-infizierten Patienten mit fortgeschrittenem Leberschaden, bereits langjähriger antiviraler Vortherapie und/oder multiplen antiviralen Resistenzen zu sein scheint. Besonders bei Patienten mit einer ADV-Resistenz, zeigte sich eine Kombinationstherapie gegenüber einer Monotherapie überlegen.

Der weitere Verlauf dieser Studie und neue kontrollierte prospektive Studien sind notwendig, um über die antivirale Langzeiteffektivität einer Kombinationstherapie bei CHB-Infizierten Patienten mit fortgeschrittenem Leberschaden zu urteilen.

7 Abkürzungsverzeichnis

a.a.	amino acid
Abb.	Abbildung
ADV	Adefovir
ALT	Serum-Aminotransferase
Bp	Basenpaare
cccDNA	covalently closed circular DNA
CHB	Chronische Hepatitis B-Infektion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ETV	Entecavir
HBeAg	Hepatitis B envelope Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
H ₂ O	Wasser
IFN	Interferon
i.v.	intra Venös
LAM	Lamivudin
LC	Light Cyclor
LLoD	lower limit of detection
log	Logarithmus
MELD	Model for End-stage Liver Disease
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
N	Anzahl
NA	Nukleos(t)id-Analoga
nd	nicht durchgeführt
ORF	open reading frame
p	Wahrscheinlichkeit
PCR	polymerase chain reaction

rt	Reverse Transkriptase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
Tab.	Tabelle
TDF	Tenofovir
Tx	Transplantation
U	Umdrehung
ud	under detection
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
ULN	upper limit of normal
Z.n.	Zustand nach
%	Prozent
<	kleiner als
>	größer als

8 Literaturverzeichnis

1. Mutimer, D., et al., *Selection of multiresistant hepatitis B virus during sequential nucleoside-analogue therapy*. J Infect Dis, 2000. **181**(2): p. 713-6.
2. Locarnini, S., *Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure*. Hepatol Int, 2008. **2**(2): p. 147-51.
3. Lampertico, P., Marzano A, Levrero M et al., *Adefovir and lamivudine combination therapy is superior to adefovir monotherapy for lamivudine-resistant patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B*. Hepatology, 2005. **44** (693A-694A).
4. Lampertico, P., et al., *Low resistance to adefovir combined with lamivudine: a 3-year study of 145 lamivudine-resistant hepatitis B patients*. Gastroenterology, 2007. **133**(5): p. 1445-51.
5. Rapti, I., et al., *Adding-on versus switching-to adefovir therapy in lamivudine-resistant HBeAg-negative chronic hepatitis B*. Hepatology, 2007. **45**(2): p. 307-13.
6. *Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals*. Delta Coordinating Committee. Lancet, 1996. **348**(9023): p. 283-91.
7. Cornberg, M., et al., *Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis B virus (HBV) infection: the German guidelines for the management of HBV infection*. Z Gastroenterol, 2007. **45**(12): p. 1281-328.
8. Wai, C.T. and R.J. Fontana, *Clinical significance of hepatitis B virus genotypes, variants, and mutants*. Clin Liver Dis, 2004. **8**(2): p. 321-52, vi.
9. Norder, H., et al., *Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes*. Intervirology, 2004. **47**(6): p. 289-309.
10. Tuttleman, J.S., C. Pourcel, and J. Summers, *Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells*. Cell, 1986. **47**(3): p. 451-60.
11. Urban, S., et al., *The replication cycle of hepatitis B virus*. J Hepatol. **52**(2): p. 282-4.
12. McMahon, B.J., et al., *Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state*. J Infect Dis, 1985. **151**(4): p. 599-603.
13. Perz, J.F., et al., *The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide*. J Hepatol, 2006. **45**(4): p. 529-38.
14. Shepard, C.W., et al., *Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination*. Epidemiol Rev, 2006. **28**: p. 112-25.
15. Yang, H.I., et al., *Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma*. N Engl J Med, 2002. **347**(3): p. 168-74.
16. Lai, C.L., et al., *A 1-year trial of telbivudine, lamivudine, and the combination in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B*. Gastroenterology, 2005. **129**(2): p. 528-36.
17. European Association For The Study Of The, L., *EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B*. J Hepatol, 2009. **50**(2): p. 227-42.
18. Marcellin, P., et al., *Long-term efficacy and safety of adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B*. Hepatology, 2008. **48**(3): p. 750-8.
19. Leung, N., *Clinical experience with lamivudine*. Semin Liver Dis, 2002. **22 Suppl 1**: p. 15-21.

20. Yoon, S.K., et al., *Long-term results of lamivudine monotherapy in Korean patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B: response and relapse rates, and factors related to durability of HBeAg seroconversion*. *Intervirology*, 2005. **48**(6): p. 341-9.
21. Liaw, Y.F., et al., *Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B*. *Asia Hepatitis Lamivudine Study Group*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(1): p. 172-80.
22. Leung, N., *Recent data on treatment of chronic hepatitis B with nucleos(t)ide analogues*. *Hepatol Int*, 2008. **2**(2): p. 163-78.
23. Vigano, M., et al., *Failure of adefovir 20 mg to improve suboptimal response in lamivudine-resistant hepatitis B patients treated with adefovir 10 mg and lamivudine*. *J Viral Hepat*, 2008. **15**(12): p. 922-4.
24. Marcellin, P., et al., *Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(9): p. 808-16.
25. Fung, S.K., et al., *Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B*. *J Hepatol*, 2006. **44**(2): p. 283-90.
26. Carrouee-Durantel, S., et al., *Suboptimal response to adefovir dipivoxil therapy for chronic hepatitis B in nucleoside-naive patients is not due to pre-existing drug-resistant mutants*. *Antivir Ther*, 2008. **13**(3): p. 381-8.
27. Chang, T.T., et al., *A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(10): p. 1001-10.
28. Leung, N., Peng C-Y, Sollano J, Lesmana L, Yuen M-F, Jeffers L, Hann H-W, et al., *"Entecavir Results in Greater HBV DNA Reduction vs Adefovir in Chronically Infected HBeAg(+) Antiviral-Naive Adults: 24 Week Results (E.A.R.L.Y. Study)"*. *hepatology*, 2006. **44**(suppl 4); **554A**
29. Marcellin, P., et al., *Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(23): p. 2442-55.
30. Beck, J. and M. Nassal, *Hepatitis B virus replication*. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(1): p. 48-64.
31. Bartenschlager, R., M. Junker-Niepmann, and H. Schaller, *The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation*. *J Virol*, 1990. **64**(11): p. 5324-32.
32. Tillmann, H., *Hepatitis B - Diagnostik, Verlauf, Therapie*. *Hepatitis B Virus-Mutanten*. Vol. 1. 2007, Bremen: Uni-Med. S88- 93.
33. Radziwill, G., W. Tucker, and H. Schaller, *Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity*. *J Virol*, 1990. **64**(2): p. 613-20.
34. Bartenschlager, R. and H. Schaller, *The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription*. *Embo J*, 1988. **7**(13): p. 4185-92.
35. Zoulim, F. and C. Seeger, *Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase*. *J Virol*, 1994. **68**(1): p. 6-13.
36. Lanford, R.E., et al., *Transcomplementation of nucleotide priming and reverse transcription between independently expressed TP and RT domains of the hepatitis B virus reverse transcriptase*. *J Virol*, 1997. **71**(4): p. 2996-3004.
37. Sablon, E. and F. Shapiro, *Advances in Molecular Diagnosis of HBV Infection and Drug Resistance*. *Int J Med Sci*, 2005. **2**(1): p. 8-16.
38. Shaw, T., A. Bartholomeusz, and S. Locarnini, *HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation*. *J Hepatol*, 2006. **44**(3): p. 593-606.
39. Zoulim, F. and S. Locarnini, *Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues*. *Gastroenterology*, 2009. **137**(5): p. 1593-608 e1-2.
40. Stuyver, L.J., et al., *Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region*. *Hepatology*, 2001. **33**(3): p. 751-7.

41. Lok, A.S., et al., *Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management*. Hepatology, 2007. **46**(1): p. 254-65.
42. Angus, P., et al., *Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase*. Gastroenterology, 2003. **125**(2): p. 292-7.
43. Villeneuve, J.P., et al., *Selection of a hepatitis B virus strain resistant to adefovir in a liver transplantation patient*. J Hepatol, 2003. **39**(6): p. 1085-9.
44. Brunelle, M.N., et al., *Susceptibility to antivirals of a human HBV strain with mutations conferring resistance to both lamivudine and adefovir*. Hepatology, 2005. **41**(6): p. 1391-8.
45. van Bommel, F., et al., *Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues*. Hepatology, 2010. **51**(1): p. 73-80.
46. Villet, S., et al., *Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure*. J Hepatol, 2008. **48**(5): p. 747-55.
47. Lai, C.L., et al., *Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(6): p. 687-96.
48. Hadziyannis, S.J., et al., *Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B*. N Engl J Med, 2005. **352**(26): p. 2673-81.
49. Locarnini, S. and W.S. Mason, *Cellular and virological mechanisms of HBV drug resistance*. J Hepatol, 2006. **44**(2): p. 422-31.
50. Colonno, R.J., et al., *Entecavir resistance is rare in nucleoside naive patients with hepatitis B*. Hepatology, 2006. **44**(6): p. 1656-65.
51. Colonno R., R.R., Pokornowski K. et al., *Assessment at three years shows high barrier to resistance is maintained in entecavir-treated nucleoside naive patients while resistance emergence increases over time in lamivudine refractory patients*. Hepatology, 2006. **44**: p. 229A-230A.
52. Sheldon, J., et al., *Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir*. Antivir Ther, 2005. **10**(6): p. 727-34.
53. Snow-Lampart A, C.B., Curtis M, et al. , *Week 96 resistance surveillance for HBeAg positive and negative subjects with chronic HBV infection randomized to receive tenofovir DF 300 mg qd*. Hepatology, 2008. **48**: p. 745A.
54. Heathcote, E.J., et al., *Three-Year Efficacy and Safety of Tenofovir Disoproxil Fumarate Treatment for Chronic Hepatitis B*. Gastroenterology, 2010.
55. van Bommel, F., et al., *Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection*. Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1421-5.
56. Reijnders, J.G., et al., *Antiviral effect of entecavir in chronic hepatitis B: influence of prior exposure to nucleos(t)ide analogues*. J Hepatol, 2010. **52**(4): p. 493-500.
57. Locarnini, S., *Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy*. Semin Liver Dis, 2005. **25 Suppl 1**: p. 9-19.
58. Villet, S., et al., *Selection of a multiple drug-resistant hepatitis B virus strain in a liver-transplanted patient*. Gastroenterology, 2006. **131**(4): p. 1253-61.
59. Hussain, M., et al., *Sensitive line probe assay that simultaneously detects mutations conveying resistance to lamivudine and adefovir*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(3): p. 1094-7.
60. Desmet, V.J., et al., *Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging*. Hepatology, 1994. **19**(6): p. 1513-20.
61. Waltenberger, *MagNA Pure Compact System – Results of a Performance Study for Viral Nucleic Acid Isolation from Serum and Plasma Samples*. Biochemica, 2004. **3**: p. 10-11.

62. Sung, J.J., et al., *Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy*. *Gastroenterology*, 2005. **128**(7): p. 1890-7.
63. Werle-Lapostolle, B., et al., *Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(7): p. 1750-8.
64. Guo, J.J., et al., *Dynamics of hepatitis B virus resistance to entecavir in a nucleoside/nucleotide-naive patient*. *Antiviral Res*, 2009. **81**(2): p. 180-3.
65. Zoulim, F. and R. Perrillo, *Hepatitis B: reflections on the current approach to antiviral therapy*. *J Hepatol*, 2008. **48 Suppl 1**: p. S2-19.
66. Sung, J.J., et al., *Lamivudine compared with lamivudine and adefovir dipivoxil for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B*. *J Hepatol*, 2008. **48**(5): p. 728-35.
67. Vassiliadis, T.G., et al., *Adefovir plus lamivudine are more effective than adefovir alone in lamivudine-resistant HBeAg chronic hepatitis B patients: A 4-year study*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009.
68. van Bommel, F., et al., *Tenofovir for patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus (HBV) infection and high HBV DNA level during adefovir therapy*. *Hepatology*, 2006. **44**(2): p. 318-25.
69. Reijnders, J.G., et al., *Entecavir shows limited efficacy in HBeAg-positive hepatitis B patients with a partial virologic response to adefovir therapy*. *J Hepatol*, 2009. **50**(4): p. 674-83.
70. Shim, J.H., et al., *Efficacy of entecavir in patients with chronic hepatitis B resistant to both lamivudine and adefovir or to lamivudine alone*. *Hepatology*, 2009. **50**(4): p. 1064-71.
71. Chu, C.M., et al., *Natural history of hepatitis B e antigen to antibody seroconversion in patients with normal serum aminotransferase levels*. *Am J Med*, 2004. **116**(12): p. 829-34.
72. Hsu, Y.S., et al., *Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B*. *Hepatology*, 2002. **35**(6): p. 1522-7.
73. Lau, G.K., et al., *Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(26): p. 2682-95.
74. Fattovich, G., et al., *Long-term outcome of hepatitis B e antigen-positive patients with compensated cirrhosis treated with interferon alfa*. *European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP)*. *Hepatology*, 1997. **26**(5): p. 1338-42.
75. Fried, M.W., et al., *HBeAg and hepatitis B virus DNA as outcome predictors during therapy with peginterferon alfa-2a for HBeAg-positive chronic hepatitis B*. *Hepatology*, 2008. **47**(2): p. 428-34.
76. Yao, G., et al., *Virologic, serologic, and biochemical outcomes through 2 years of treatment with entecavir and lamivudine in nucleoside-naive Chinese patients with chronic hepatitis B: a randomized, multicenter study*. *Hepatol Int*, 2008. **2**(4): p. 486-93.
77. Lau, G.K., *Current treatments for patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B virus infection: a comparison focusing on HBeAg seroconversion*. *Liver Int*. **30**(4): p. 512-20.
78. Piratvisuth, T., et al., *Sustained response to peginterferon alfa-2a (40 kD) with or without lamivudine in Asian patients with HBeAg-positive and HBeAg-negative chronic hepatitis B*. *Hepatol Int*, 2008. **2**(1): p. 102-10.
79. Coffin, C.S. and S.S. Lee, *Treatment of HBeAg-positive patients with nucleos(t)ide analogues*. *Liver Int*, 2009. **29 Suppl 1**: p. 116-24.
80. Wai, C.T., et al., *HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C*. *Hepatology*, 2002. **36**(6): p. 1425-30.

81. Zhao, H., et al., *Genotype B and younger patient age associated with better response to low-dose therapy: a trial with pegylated/nonpegylated interferon-alpha-2b for hepatitis B e antigen-positive patients with chronic hepatitis B in China*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(4): p. 541-8.
82. Tan, J., et al., *Tenofovir monotherapy is effective in hepatitis B patients with antiviral treatment failure to adefovir in the absence of adefovir-resistant mutations*. J Hepatol, 2008. **48**(3): p. 391-8.
83. Lok, A.S., *Evolution of nucleoside/tide analogues for hepatitis B: is the ideal drug here yet?* J Hepatol, 2009. **51**(2): p. 416-8.
84. Lok, A.S., et al., *Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B*. Gastroenterology, 2003. **125**(6): p. 1714-22.
85. Lange, C.M., et al., *Severe lactic acidosis during treatment of chronic hepatitis B with entecavir in patients with impaired liver function*. Hepatology, 2009. **50**(6): p. 2001-6.
86. Nelson, M.R., et al., *The safety of tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of HIV infection in adults: the first 4 years*. Aids, 2007. **21**(10): p. 1273-81.
87. Gilead, Foster City, CA. *VIREAD® (tenofovir disoproxil fumarate) tablets. US Prescribing Information*. 2008: Gilead Sciences inc.
88. Benhamou, Y., et al., *Anti-hepatitis B virus efficacy of tenofovir disoproxil fumarate in HIV-infected patients*. Hepatology, 2006. **43**(3): p. 548-55.
89. Borroto-Esoda, K., et al., *In vitro evaluation of the anti-HIV activity and metabolic interactions of tenofovir and emtricitabine*. Antivir Ther, 2006. **11**(3): p. 377-84.
90. Yuen, M.F., et al., *Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy*. Hepatology, 2001. **34**(4 Pt 1): p. 785-91.

9 Danksagung

Mein Dank gilt allen Menschen die mich bei dieser Arbeit unterstützt und daran teilgenommen haben.

Herrn Prof. Dr. Jörg Petersen danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsthemas und seine freundliche Betreuung.

Einen besonderen Dank möchte ich an Dr. Marc Lütgehetmann richten, für seinen Rat, die vielen Diskussionen, seine Kritik und seine Motivation.

Tassilo Volz für seine Hilfe bei dem experimentellen Teil dieser Arbeit und seine ruhige und kompetente Art und Frau PD Dr. Maura Dandri für ihre herzliche Begleitung.

Mit einem guten Gefühl blicke ich auf meine Zeit in der AG Hepatologie Dandri/Petersen zurück.

Meine Freunde unterstützten mich durch ihren Rat sowie aufbauende und motivierende Gespräche. Besonders hervorheben möchte ich Laura, Nina, Sarah, Jan-Hendrik und Marcin.

Ich danke Anne, die mir Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit stets bestärkt hat.

Meine Tante Regina hat mich in einer schweren Zeit unterstützt und aufgebaut. Zuletzt danke ich meinen Eltern, die den Grundstein für meinen Weg gelegt haben und mir jederzeit liebevoll zur Seite stehen.

10 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 06. Dezember 2010

Jan Schollmeyer