

FXREPORT

zu HIV und AIDS

Ausgabe Nr. 14-15/2003 vom 12.11.2003

Impressum

Redaktion: Bernd Vielhaber
Fon: 0 30 – 62 70 48 02/ Fax: 0 30 – 62 70 48 03
email: bernd.vielhaber@snaflu.de

Lektorat: Helmut Hartl, München

Herausgeber:
Deutsche AIDS-Hilfe e.V., Armin Schafberger
Dieffenbachstraße 33, 10967 Berlin
Fon: 0 30 – 69 00 87-0/ Fax: 0 30 – 69 00 87 42
www.aidshilfe.de/ email: faxreport@dah.aidshilfe.de

BESTELLUNG / RÜCKFRAGEN

Bei technischen Problemen, Abobestellung oder –
änderung wenden Sie sich bitte an Uli Sporleder
(email: uli.sporleder@dah.aidshilfe.de)

Spendenkonto der Deutschen AIDS-Hilfe e.V.
Kto.-Nr. 220 220 220, Berliner Sparkasse, BLZ 100 500
00

WICHTIGE HINWEISE!

Die hier genannten Verfahren, Medikamente, Inhalts-
stoffe und Generika werden ohne Rücksicht auf die
bestehende Patentlage mitgeteilt. Geschützte Waren-
namen (Warenzeichen) sind nicht als solche gekenn-
zeichnet; es darf daher nicht angenommen werden,
dass es sich bei den verwendeten Bezeichnungen um
freie Warennamen handelt. Redaktion und Heraus-
geber übernehmen keinerlei Gewähr für die Richtigkeit
der Angaben und haften nicht für Schäden durch et-
waige Irrtümer. Wir raten unseren Leserinnen und Le-
sern, auf die Originaltexte und die Beipackzettel der
Herstellerfirmen zurückzugreifen. Dies gilt insbesonde-
re dann, wenn eine Substanz verschrieben werden soll,
mit der weder der behandelnde Arzt/die behandelnde
Ärztin noch der Patient/die Patientin vertraut sind.

Wir danken für die Unterstützung von:

**Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung,
Abbott GmbH, Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers
Squibb GmbH, Gilead Science, GlaxoSmithKline,
Hoffmann La Roche AG, MSD Sharp & Dohme
GmbH**

INHALT

**FTC (Emtricitabin, Handelsname
Emtriva) zugelassen 2**

**Sex, Drugs, and viral Escape – Bericht
vom XII International HIV Drug
Resistance Workshop (10. – 14. Juni
2003, Los Cabos, Mexiko) – Teil 2 2**

Wie schwer ist es, primärresistente
HIV-Stämme zu behandeln? 2

Superinfizierendes Virus verdrängt
ursprüngliches Virus 4

Kommentar der Redaktion 6

„Versteckte“ Mutanten können ein
Salvageregime scheitern lassen 6

Schwierigkeiten bei dem Ergebnissen
phänotypischer Resistenztests 8

Literatur 10



FTC (Emtricitabin, Handelsname Emtriva) zugelassen

Am 24. Oktober hat die EMEA Emtriva (Emtricitabin, FTC) zugelassen - der genaue Wortlaut der Zulassung ist wie folgt:

„Emtriva ist in Kombination mit anderen antiretroviralen Arzneimitteln zur Behandlung HIV-1-infizierter Erwachsener und Kinder angezeigt.

Diese Indikation beruht auf Studien an nicht vorbehandelten Patienten und an vorbehandelten Patienten mit stabiler virologischer Kontrolle. Es liegen keine Erfahrungswerte über die Anwendung von Emtriva bei Patienten vor, deren gegenwärtige Therapie versagt oder die ein mehrfaches Therapieversagen aufweisen.

Bei der Entscheidung über ein neues Behandlungsschema für Patienten, bei denen eine antiretrovirale Therapie versagt hat, müssen die Mutationsmuster der verschiedenen Arzneimittel und vorangegangene Therapien beim einzelnen Patienten sorgfältig berücksichtigt werden. Ein Resistenztest - sofern verfügbar - könnte angebracht sein.“

Anders als in den Vereinigten Staaten ist Emtriva in der EU auch für Kinder zugelassen worden, ein Saft wird voraussichtlich ab Mitte 2004 zur Verfügung stehen. Die kommerzielle Einführung von Emtriva ist für den 1. Dezember 2003 geplant.

Quelle: Gilead Sciences GmbH

Sex, Drugs, and viral Escape – Bericht vom XII International HIV Drug Resistance Workshop (10. – 14. Juni 2003, Los Cabos, Mexiko) – Teil 2

von Mark Mascolini mailmark@ptd.net

Wie schwer ist es, primärresistente HIV-Stämme zu behandeln?

Die ultimative Frage im Zusammenhang mit der Übertragung von resistenten Stämmen ist, welche klinischen Konsequenzen daraus für den damit Infizierten erwachsen. Man darf annehmen, dass das Ansprechen auf die Therapie schlechter ist, als wenn ein Patient mit Wild-Typ-Viren infiziert ist – zumindest trifft dies bei Patienten zu, die mit einem medikamentenempfindlichen Virus eine HAART begonnen haben und unter Therapie Medikamentenresistenzen entwickelt haben [19]. Aber die Berichte über die Krankheitsprogression und den Therapieerfolg von mit primärresistentem HIV infizierten Patienten sind erstaunlich uneinheitlich.

Auf dem letztjährigen Resistenzworkshop berichtete Robert Grant, dass die CD4-Werte von mit resistenten Viren infizierter Patienten auf höherem Niveau erhalten bleiben, als bei mit Wild-Typ-Viren Infizierten ($p = 0,02$). Dieses Ergebnis bleibt auch nach Adjustierung für die Infektionsdauer erhalten [21]. Der Grund hierfür ist möglicherweise eine geringere Fitness der resistenten Stämme im Vergleich zum Wild-Typ. Die mediane Replikationskapazität betrug bei PI-resistenten Viren 24 % im Vergleich zum Wild-Typ. Die CD4-Werte bei den Patienten mit Viren geringer Replikationskapazität lag im Durchschnitt um 100 Zellen/ μ l über denen bei Patienten mit fitteren Viren ($p = 0,008$). Die Studie von Susan Little zeigte allerdings, dass übertragene medikamentenresistente Viren nicht immer eine solch niedrige Replikationskapazität aufweisen [10].

Auf dem diesjährigen Workshop stellten Ärzte aus Madrid eine Studie an 46 nicht vorbehandelten Serokonvertern vor. Neun dieser Patienten waren mit resistenten Viren infiziert [22].



Bei diesen Patienten schritt die Erkrankung über den Beobachtungszeitraum von 3,5 Jahren nicht schneller voran, als bei den Patienten, die mit Wild-Typ-Viren infiziert waren. Die beiden Gruppen hatten ähnliche Ausgangs-CD4-Werte (716 bzw. 715 CD4-Zellen/ μ l) und ähnliche Viruslasten (12.340 bzw. 15.440 RNA-Kopien/ml.). In beiden Gruppen sank die CD4-Zellzahl um 46 Zellen/ μ l pro Jahr ab.

Zumindest eine Studie ergab dramatischere Trends. Die Forscher aus Vancouver berichteten, dass zwei mit medikamentenresistenten Viren infizierte Patienten einen anhaltend schnellen Verlust der CD4-Zellen aufwiesen [12].

Was passiert, wenn mit medikamentenresistenten Viren infizierte Patienten mit einer anti-retroviralen Therapie beginnen? Die wenigen Berichte zu dieser Fragestellung stellen übereinstimmend ein langsames virologisches Ansprechen fest – die Patienten sprechen aber auf die Therapie an. Aber auch hier sind einige Ergebnisse beunruhigend.

Bei dem ersten berichteten Fall einer Infektion mit einem PI- und NRTI-resistenten Virus, dauerte es unter Dreifachkombinationstherapie (mit PI) 20 Wochen, bis die Viruslast unter der Nachweisgrenze lag. Im Vergleich dazu benötigten 36 Vergleichspatienten, die dieselbe Therapie einnahmen, im Schnitt nur 12 Wochen [23]. Der Autor vermutete, dass dieses langsame Absinken der Viruslast von 100.000 RNA-Kopien/ml. „höchstwahrscheinlich teilweise auf die natürliche VL-Dynamik zurückzuführen ist, die nach der primären HIV-Infektion entsteht.“ Die CD4-Werte dieses Patienten sanken von etwa 1.100 Zellen/ μ l in den ersten drei Wochen der Therapie ab, stabilisierten sich dann und stiegen wieder an.

Auf dem letztjährigen Resistenzworkshop berichteten französische Forscher ebenfalls von langsamerem Absinken der Viruslast bei frisch mit medikamentenresistentem HIV Infizierten im Vergleich zu Frisch-Infizierten, die mit Wild-Typ-Viren infiziert waren [24]. Der mediane Abfall der Viruslast nach drei Monaten betrug bei 19 – mit medikamentenresistenten Viren infizierten Patienten – 2,46 log – im Vergleich zu 3,88 log bei 226 Patienten, die eine HAART mit Wild-Typ-Viren begannen. Robert Grant bestätigte diesen Trend in einer konsekutiven Serie von 225 Patienten, die sich zwischen Juni 1996 und Juni 2001 infizierten [25]. Im Vergleich zu Patienten mit Wild-Typ-Viren, bei denen es unter Therapie 5 Wochen dauerte, bis die Viruslast unter der Nachweisgrenze von 500 Kopien/ml. lag, benötigten die mit medikamentenresistenten Viren infizierten Patienten 12 Wochen ($p = 0,02$).

Ein Studie von Susan Little und Kollegen in 10 nordamerikanischen Städten zeigte als erste Studie sowohl ein verzögertes virologisches Ansprechen auf die Therapie, als auch schnelleres virologisches Therapieversagen bei mit resistenten Viren infizierten Patienten [26]. Bei 202 Frisch-Infizierten die mit einer HAART begannen, war die Zeit bis zu einer nicht mehr detektierbaren Viruslast bei den Patienten mit vollständig medikamentenempfindlichen Viren signifikant kürzer (median 56 Tage) als bei Patienten mit einem phänotypisch zehnfach vermindert empfindlichen Virus (median 88 Tage, $p = 0,05$) oder mit Viren, die eine majore Resistenzmutation aufwiesen ($p = 0,03$). Bis auf einen Patienten lag nach 24 Wochen jedoch bei allen die Viruslast unter der Nachweisgrenze von 500 Kopien/ml. Bei den Patienten mit einem virologischen Therapieversagen war der Zeitraum bis zum Versagen bei den Patienten mit primärresistenten Viren signifikant kürzer ($p = 0,05$).

Diese Ergebnisse sind aber mit Vorsicht zu genießen. Little erklärte: „Da die Patienten behandelt worden sind, bevor Daten über Resistenzen verfügbar waren, ist es schwierig zu sagen, ob die Raten des Therapieversagens auf eine Selektion resistenter Viren oder auf eine insuffiziente Medikamentenauswahl zurückzuführen sind.“

Um das herauszufinden, verglich die Arbeitsgruppe Patienten, die 0 bis 2 aktive Substanzen (definiert als IC_{50} um nicht mehr als das zehnfache erhöht im Vergleich zum Wild-Typ) einnahmen, mit Patienten, die 3 oder mehr aktive Substanzen einnahmen. „Die Anzahl der aktiven Substanzen in der Kombination“, so die Arbeitsgruppe, „beeinflusste die Zeit bis zur Unterdrückung der Viruslast nicht signifikant.“ Es gab allerdings einen Trend in diese Richtung ($p = 0,17$).



Das höchste Risiko eines virologischen Therapieversagens scheinen die Patienten zu haben, die mit einem gegen alle drei gängigen Medikamentenklassen resistenten Virus infiziert sind – wie die beiden bereits vorgestellten Fallberichte von Constance Delaugerre [14].

Die Viruspopulation, die einen Menschen zuerst infiziert, scheint homogen zu sein. Beginnt sich das Virus im neuen Wirt zu vermehren, verändert sich das. Obwohl Susan Little und andere nur eine langsame Evolution primärresistenter HIV-Stämme in Abwesenheit medikamentöser Selektionsdrucks dokumentieren konnten [10 – 14], diversifizierte selbst eine resistente Viruspopulation ohne medikamentösen Selektionsdruck. Ist ein Patient gleichzeitig mit mutierten und Wild-Typ Viren infiziert, können sich diese beiden Spezies rekombinieren. Das konnte bei einem Patienten in einer Studie aus Montreal [11] beobachtet werden. Dieser Patient hatte bis etwa ein Jahr nach seiner Infektion eine stabile Viruslast von etwa 1.000 Kopien/ml. Dann schnellte die Viruslast hoch. Die Autoren führten diesen plötzlichen Anstieg auf ein „*de Novo* Auftreten einer PI-resistenten Variante durch eine Rekombination des ursprünglich mehrfachmedikamentenresistenten Virus“ zurück.

Superinfizierendes Virus verdrängt ursprüngliches Virus

Die Verbreitung resistenter Viren ist nicht die einzige mögliche Folge zunehmenden Risikoverhaltens. Wie mehrere Arbeitsgruppen im Laufe des letzten Jahres berichteten, kann sich ein bereits HIV-Infizierter mit einem zweiten HIV-Stamm anstecken [27 – 29]. Dieser superinfizierende Stamm kann unter Umständen pathogener sein, als der ursprünglich vorhandene. Zwei Berichte auf diesem Workshop legen nahe, dass der zweite Stamm die Tendenz zu haben scheint, die initiale Spezies zu verdrängen. Beide Studien bestätigten, dass die Infektion mit einem HIV-Stamm nicht vor einer Infektion mit einem anderen HIV-Stamm schützt.

Luc Perrin (Universität Genf) untersuchte die Viren von drei i.v.-Drogengebern, die mit verschiedenen HIV-1 Subtypen koinfiziert und von zwei i.v.-Drogengebern (IVDU), die mit verschiedenen Stämmen superinfiziert waren. Er stellte fest, dass im Plasma der koinfizierten Patienten beide Subtypen persistierten – nicht jedoch im Plasma der superinfizierten Patienten [30].

Perrin hatte diese Studie begonnen, nachdem festgestellt worden war, dass die zirkulierende Rekombinante 11 von HIV-1 (Circulating Recombinant Form (CRF)-11) sich in der Schweizer Population der i.v.-Drogengebern (IVDU) ausbreitet. Er sequenzierte Viren von IVDU mit primärer HIV-Infektion und fand 26 Patienten mit Subtyp B, 11 mit CRF-11, drei koinfiziert mit Subtyp B und CRF-11 und zwei mit anderen Stämmen. Bei den Koinfizierten persistierten beide Varianten im Plasma und der „archivierten“ proviralen DNA zu den Beobachtungszeitpunkten Monate 14, 20 und 24.

Als nächstes sequenzierte Perrin Viren von 256 IVDU, die einen unerklärlichen Anstieg der Viruslast um das zehnfache oder mehr hatten. Er verglich die Sequenzen der Viren vor und nach diesem Anstieg der Viruslast und fand zwei Patienten, die ursprünglich mit HIV-1 Subtyp B infiziert waren und offensichtlich mit CRF-11 superinfiziert waren. Obwohl keiner der beiden Patienten eine antiretrovirale Therapie einnahm, lag die Viruslast bei einem der beiden über drei Jahre unter 50 Kopien/ml. und beim anderen über fünf Jahre unter 500 Kopien/ml. Die Superinfektion mit CRF-11 verursachte bei beiden ein akutes retrovirales Syndrom – die VL schoss bei dem einen auf etwa 100.000 Kopien/ml. hoch, beim anderen auf etwa 1.000.000 Kopien/ml. Ihre CD4-Werte sackten ab. Plasmaproben, die während des akuten retroviralen Syndroms und zu späteren Zeitpunkten genommen worden waren, zeigten nur CRF-11 Viren. Der Subtyp B ließ sich nur noch als provirale DNA nachweisen.

Daraus lassen sich zwei ernüchternde Schlussfolgerungen ziehen:

1. Eine Superinfektion kann die Krankheitsprogression erheblich beschleunigen.
2. Die immunologische Langzeitkontrolle eines Stammes (ohne medikamentöse Intervention) bedeutet nicht, dass das Immunsystem in der Lage ist, ebenfalls einen superinfizierenden Stamm zu kontrollieren.



Ein Fallbericht von Sarah Palmer (National Cancer Institute) scheint die Ergebnisse Perrins, wonach ein superinfizierender HIV-Stamm den ursprünglichen Stamm verdrängen kann, zu bestätigen [31]. Sie sequenzierte Viren eines Patienten aus Proben, die zu folgenden Zeitpunkten entnommen worden waren:

- Probe 1: einen Monat nach dem akuten retroviralen Syndrom (Viruslast etwa 1.000 Kopien/ml.)
- Probe 2: fünf Monate später (Viruslast etwa 10.000 Kopien/ml.)
- Probe 3: 13 Monate später (Viruslast etwa 100.000 Kopien/ml.)
- Probe 4: 17 Monate später (Viruslast etwa 500.000 Kopien/ml.)

In der Zeit zwischen der ersten und der zweiten Probe hatte der Patient ungeschützten Sex. Die erste Probe zeigte einen Stamm mit 10 NRTI- und PI-Mutationen. Keine dieser Mutationen konnte in der zweiten Probe nachgewiesen werden. Es wurde nur ein Polymorphismus des Protease-Gens (L63P) gefunden. Auch in der dritten und vierten Probe konnte nur dieser Genotyp festgestellt werden. Mit einem modifizierten Assay, das in der Lage ist, Spezies zu identifizieren, die nur einen Anteil von 0,1 % der Gesamtpopulation ausmachen, fand Palmer heraus, dass in der ersten Probe 94 % der Population eine Mutation des RT-Gens am Codon 103 hatten. In der zweiten Probe zeigten nur noch 31 % der Population die K103N-Mutation. In der dritten und vierten Probe nur noch 0,1 % der Population.

Die virale Diversität in der ersten Probe betrug 0,026 %, in der zweiten Probe 0,019 % in der dritten Probe 0,9 % und in der vierten Probe 0,18 %. Da Palmer keinen Hinweis darauf fand, dass sich der Wild-Typ (mit dem Polymorphismus) mit der ursprünglichen resistenten Population rekombinierte, schlussfolgerte sie, dass sich die Wild-Typ-Population langsam alleine diversifiziert.

Mehrere Workshopteilnehmer merkten in der Diskussion an, dass Palmer keinesfalls notwendigerweise einen Fall von Superinfektion präsentiert habe. Die Wild-Typ-Population kann eine so geringe Minorität dargestellt haben, dass sie mit den heute verfügbaren Testverfahren schlicht nicht nachzuweisen gewesen sei und über die Zeit die weniger replikationskompetente resistente Population überwachsen habe. Palmer argumentierte, dass der ungeschützte Sexualkontakt mit dem plötzlichen Anstieg der Viruslast korreliere. Aber die Quelle der Superinfektion konnte nicht eruiert werden, so dass der HIV-Stamm des vermutlichen Index-Patienten nicht analysiert und die Superinfektion nicht verifiziert werden konnte.

Auf der anderen Seite war Mark Weinberg (McGill University, Montreal) der Überzeugung, dass Superinfektionen weitaus häufiger vorkommen, als derzeit angenommen. Allerdings die superinfizierenden Stämme – anders als in Perrins und Palmers Fällen – eben nicht die initialen Stämme überwachsen und deshalb von den Standardassays nicht entdeckt würden, die minore Populationen eben nicht entdecken können.

Douglas Richman (University of California, San Diego) schloss sich dieser Argumentation an und widersprach der Schlussfolgerung von Perrin und Palmer, dass ein superinfizierender Stamm den initialen Stamm überwächst. Die überlegen virale Fitness der superinfizierenden Stämme in diesen beiden Studien ist möglicherweise die Fehlerquelle, die zu dieser Schlussfolgerung geführt hat – so Richman. Manche Patienten infizieren sich möglicherweise mit einem weniger fitten zweiten Virus, was deshalb nicht nachgewiesen werden kann. Richman merkte an, dass viele der Teilnehmer in Susan Littles Kohorte Frischinfizierter, weiterhin Sex haben, bislang aber keine Superinfektion zu Tage getreten ist. Charles Boucher (University Hospital Utrecht) bot eine weitere Erklärung an: Möglicherweise müssen die beiden Stämme im selben Wirt überhaupt nicht miteinander konkurrieren, sondern nisten sich exklusiv in Nischen ein.

Die lebhafte Auseinandersetzung nach der Präsentation dieser beiden Superinfektions-Präsentationen hat die Kontroverse nicht auflösen können – hat aber eine Sache überdeutlich werden lassen: Ob die Folgen einer Superinfektion nun schwerwiegend sind oder völlig



zu vernachlässigen – die Studien zu diesem Thema stecken noch in den Kinderschuhen und von voreiligen Schlussfolgerungen sollte Abstand genommen werden.

Kommentar der Redaktion

Einiges ist und bleibt bei den ganzen – mehr oder weniger harte nachgewiesenen – Fällen von Super- und Reinfektionen auffällig:

- Alle unstrittigen Fälle betreffen Patienten, die in der primären HIV-Infektion (teilweise noch vor der Serokonversion) diagnostiziert worden sind und anschließend antiretroviral behandelt wurden. Da aber nachweislich das Immunsystem eines so früh behandelten HIV-Infizierten sich von dem eines chronisch Infizierten (im allgemeinen definiert als länger als drei bis sechs Monate HIV-infiziert) unterscheidet, ist nicht abschätzbar, inwieweit diese Ergebnisse auf chronisch Infizierte übertragbar sind.
- Alle diese unstrittigen Fälle haben sich in der Phase einer STI superinfiziert.
- Bisher ist es nicht gelungen, eine Superinfektion bei einem chronisch HIV-Infizierten unstrittig nachzuweisen.
- Bisher ist es nicht gelungen, bei einem HIV-Infizierten, der erfolgreich eine HAART einnimmt, eine Superinfektion nachzuweisen.
- Bisher ist es nicht gelungen, im Rahmen des Nachweises einer Superinfektion die Übertragung eines medikamentenresistenten Stamms zu dokumentieren.

„Versteckte“ Mutanten können ein Salvageregime scheitern lassen

Eine nicht unerhebliche Zahl von Studien beschäftigt sich mit einer Angelegenheit, die auf den Resistenzworkshops immer und immer wieder für Diskussionen sorgt. So gut wie sie auch sein mögen, die derzeitigen Resistenztests sind nicht perfekt. Sie sind nicht in der Lage, minore Viruspopulationen, die sehr wohl eine Rolle beim Ansprechen auf die Therapie spielen können, zu detektieren oder missinterpretieren diese Populationen.

Eine nähere Betrachtung der Studie ACTG 398 ist hierfür ein gutes Beispiel [32]. John Mellors (University of Pittsburgh) beschäftigte sich mit den Ergebnissen dieser randomisierten Studie und stellte fest, dass NNRTI in der Lage sind, Resistenzmutationen zu selektieren, die von den genotypischen Standardassays nicht dargestellt werden. Diese Mutationen sind allerdings sehr wohl in der Lage, den Therapieerfolg eines späteren NNRTI-haltigen Regimes zu beeinträchtigen.

Seine Analyse umfasste 452 Patienten der ACTG 398, die Patienten mit und ohne NNRTI-Vorbehandlung randomisierte, entweder Efavirenz oder Amprenavir mit bzw. ohne einen zweiten PI einzunehmen. Mellors untersuchte, in welche Gruppen die Viruslasten anhaltend bestätigt über dem Wert von 200 Kopien/ml. lagen und kam zu überraschenden Ergebnisse:

- Patienten, die bereits mit NNRTIs vorbehandelt waren, jedoch im genotypischen Resistenztest keinerlei NNRTI-Mutationen zeigten, sprachen virologisch auf die Therapie nicht besser an, als Patienten, die *mit* NNRTI-Mutationen in die Studie eingeschleust wurden.
- Aber: von den Patienten, die bei Studienbeginn (Genotyp wurde am Tag 1 bestimmt) keine NNRTI-Mutationen zeigten, hatten die *nicht* mit NNRTIs vorbehandelten Patienten einen signifikant besseren virologischen Therapieerfolg zu den Auswertungszeitpunkten Woche 24 ($p = 0,015$) und Woche 48 ($p = 0,02$), als die bereits mit NNRTI vorbehandelten Patienten bei denen *keine* NNRTI-Mutationen festgestellt werden konnten.

Diese irritierenden Ergebnisse veranlassten Mellors zu dem Verdacht, dass die genotypischen Assays nicht in der Lage gewesen sind, bei den Patienten mit NNRTI-Vorbehandlung alle NNRTI-Mutationen zu entdecken. Wenn die Sequenzierung „versteckte“ Mutationen nicht entdeckt hat, kann davon ausgegangen werden, dass unter dem Selektionsdruck von Efavirenz diese Mutationen anfangen durchzuwachsen – was die Chance auf eine erfolgreiche Therapie zunichte macht.



Das Team der ACTG setzte zwei ultrasensitive Assays ein, um die Hypothese von Mellors zu testen. Sie verwendeten Blutproben, die vor dem Studienbeginn von zufällig ausgewählten Studienteilnehmern mit und ohne NNRTI-Vorbehandlung genommen worden sind. Das erste Verfahren (Single Genome RT-PCR and Sequencing – SGS) stellte bei 6 der 10 NNRTI-vorbehandelten aber nur bei 2 der 12 NNRTI-naiven Patienten NNRTI-Mutationen dar. Das zweite Verfahren (ein auf Hefe basierendes chimärisches Ty1/HIV-1RT Retrotransposon-System) detektierte bei 7 von 11 NNRTI-vorbehandelten aber nur bei 2 von 12 NNRTI-naiven Patienten NNRTI-Mutationen. Mittels eine Analyse der genetischen Sequenzen der neu identifizierten Mutationen bei Studienbeginn und dem Vergleich mit den genetischen Sequenzen zum Zeitpunkt des virologischen Therapieversagens, konnte Mellors bestätigen, dass bei 5 von 6 Patienten mit NNRTI-Vorbehandlung die genetischen Sequenzen identisch waren.

„Was man nicht sehen kann, kann einem schaden“, schlussfolgerte Mellors. Ein Überbewertung des Genotyps vor Beginn einer Salvage-Therapie in Kombination mit einer Unterbewertung der Therapiegeschichte scheinen kein gutes Rezept für eine erfolgreiche Salvage-Therapie zu sein, so Mellors. Ob vergleichbare Dinge auch in den anderen antiretroviralen Medikamentenklassen auftreten, fügte Mellors hinzu, ist eine wichtige aber ungeklärte Frage.

Um eine Bestätigung für Mellors Ergebnisse zu bekommen, musste man sich nur die Poster ansehen. Dort wurde eine Studie vorgestellt, die mit Hilfe eines Standardtestverfahrens bei 16 Patienten unter versagendem Nevirapin-Regime, die NNRTI-Mutation Y181C nachweisen konnte [33]. Allerdings konnte bei niemandem die NNRTI-Kreuzresistenz-Mutation K103N nachgewiesen werden. Alan Hance (Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris) stellte dar, dass Spezies mit der Y181C-Mutation üblicherweise in Zellkultur-Studien empfindlich gegenüber Efavirenz bleiben. Allerdings zeigte sich in der klinischen Praxis, dass ein überraschend hoher Anteil der mit Nevirapin vorbehandelten Patienten mit Y181C-Mutationen, nicht auf Efavirenz ansprachen. Ist es möglich, dass diese Patienten klandestine Viruspopulationen mit der K103N-Mutation haben? Offensichtlich. Untersuchungen mit einem Real-Time PCR- und einem klonalen Sequenzierungs-Assay ergaben bei 5 dieser 16 Patienten minore Viruspopulationen mit der K103N-Mutation.

Single Genome Sequencing (SGS) wurde auch bei einer Studie mit Population-based Sequencing verglichen. Hier wurden 20 Patienten mit versagender Therapie oder mit mehrfachmedikamentenresistenten Viren untersucht. Mary Kearney (National Cancer Institute) konnte zeigen, dass SGS in der Lage war, eine oder mehr Mutationen darzustellen, die die Standard-Sequenzierungsmethode bei allen 20 Patienten nicht darstellen konnte. Bei der Standardmethode werden regelmäßig Populationen „übersehen“, die nur einen Anteil von bis zu 10 – 35 % an der gesamten Viruspopulation haben. Diese Methode ist so gut wie nie in der Lage, Populationen, die einen geringeren Anteil als 10 % an der Gesamtpopulation ausmachen, nachzuweisen. Bei einem Patienten zeigte SGS 10 Mutationen die Medikamentenresistenz gegen alle Substanzklassen bedingen – die klassische Sequenzierung hat keine einzige dieser Mutationen entdeckt.

Neben der effektiven Detektion von minoren Mutanten, ist SGS exzellent in der Lage, Verbindungen zwischen Mutationen darzustellen, die eine hochgradige Resistenz bedingen. „Solche Verbindungen“, erklärte Kearney, „können von normalen Komposit-Genotyp-Assays nicht entdeckt werden.“

Wohin „verschwinden“ die minoren Mutanten, wenn sie im Plasma nicht mehr nachweisbar sind? Laut Lisa Frenkel (University of Washington, Seattle) in PBMCs – dem primären Reservoir. Sie war mit Hilfe eines Oligonucleotid Ligations Assays, oder OLA, in der Lage, dieses Reservoir genauer zu untersuchen [35]. Sie verglich – auf der Suche nach 91 „verschwundene“ Medikamentenresistenzmutationen, die im Plasma nicht mehr nachweisbar waren – OLA mit den Konsensussequenzen der Dideoxynukleotidketten-Terminatoren. OLA konnte 53,8 % davon in PBMCs entdecken – im Vergleich zu nur 23,1 %, die von der klassischen Sequenzierung entdeckt wurden.



Frenkel schlussfolgerte, dass „die Konzentrationen von medikamentenresistenten Mutanten in PBMCs höher ist, als im Plasma“, nachdem durch Umstellen der antiretroviralen Therapie der Selektionsdruck auf diese Mutanten aufgehoben wurde.

Schwierigkeiten bei dem Ergebnissen phänotypischer Resistenztests

Die Gensequenzierung war nicht das einzige Resistenztestverfahren, das in das Kreuzfeuer des Workshops geriet. Auch die phänotypischen Testverfahren hatten einige bange Momente zu durchleben, als zwei Arbeitsgruppen sich näher mit ihnen beschäftigten.

Hongmei Mo und Kollegen von Abbott untersuchten die Auswirkungen von Wild-Typ-Viren auf die FC (fold change) und die RC (replication capacity) mutierter Viren in Single-Cycle HIV phänotypischen Resistenzassays – mit anderen Worten: auf die Veränderung der Suszeptibilität des mutierten Virus auf Medikamente (FC) und die Replikationskapazität des mutierten Virus (RC) [36]. Diese phänotypischen Standardassays messen die FC, indem sie aus Plasma von Patienten gewonnene virale DNA auf Zielzellen auftragen. Werden verschiedene Virusvarianten zusammen aufgetragen – oder ko-transfiziert – können sie sich in einer Art und Weise vermischen, die die Testergebnisse beeinflusst, so Mo.

Was würde geschehen, fragte sich Mo, wenn minore Populationen von Wild-Typ-Viren zusammen mit einer majoren mutierten Population Zellkulturen ko-transfizieren? Das würde passieren, wenn ein Patient seine Therapie lange genug abgesetzt hat, so dass sich Wild-Typ-Viren gegen mutierte Varianten durchsetzen können. Ein ähnliches Phänomen würde man bei einer unzureichenden Adhärenz erwarten. Um den Effekt verschiedener Mutanten/Wild-Typ-Viren-Mischungen zu überprüfen, markierte Mo mutierte Klone mit dem Luziferase-Gen des Leuchtkäfers und Wild-Typ-Klone mit dem Luziferase-Gen der Renilla.

Mo konstruierte 11 Mutanten aus Virusisolaten von mit PIs vorbehandelten Patienten, die eine oder zwei primäre PI-Mutationen und zahlreiche sekundäre Mutationen hatten. Das erste, das sie herausfand, war, dass die Mischung dieser Klone eine eindeutige Auswirkung auf die Replikationskapazität der Mutanten hatte. Vier dieser konstruierten Mutanten vermischten sich nicht mit dem Wild-Typ und hatten eine Replikationskapazität, die im Vergleich zum Wild-Typ bei 5 % lag. Als sie eine Mischung aus 91 % Mutanten und 9 % Wild-Typ herstellte, stieg die Replikationskapazität der Mutanten um den Faktor 18 – 33. Erhöhte sie den Anteil der Wild-Typ-Viren in der Mischung auf 33 %, lag die Replikationskapazität um das 564-fache höher, als in einer Mischung, die ausschließlich aus Mutanten bestand. Bestand die Mischung zu gleichen Teilen aus Mutanten und Wild-Typ (50 : 50), lag die Replikationskapazität um das 690-fache über der des Ausgangsexperiments.

Mo verwendete die anderen sieben konstruierten Mutanten, um die Auswirkungen des Wild-Typs auf die Veränderung der Suszeptibilität zu untersuchen. Das Transfizieren von Zellkulturen ausschließlich mit mutierten Viren erhöhte – im Vergleich zum Wild-Typ – die inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Lopinavir um den Faktor 21,2 bis 276,9. Die Suszeptibilität erhöhte sich kontinuierlich, wenn Mo Mischungen mit einem Anteil von 9 %, 33 % und 50 % Wild-Typ-Viren untersuchte. Beispielsweise zeigte ein Klon in einer 100 %ig reinen mutierten Population eine Erhöhung der FC um das 54,5-fache. Sie sank auf das 24,4-fache ab, stieg der Anteil von Wild-Typ-Viren in der Population auf 9 %, auf das 5,0-fache bei einem Anteil von 33 % Wild-Typ und auf das 3,0-fache bei einem Anteil von 50 % Wild-Typ in der Gesamtpopulation. Mit anderen Worten: Sind Wild-Typ-Viren in der Population, sehen gegen Lopinavir resistente Viren suszeptibel aus. Ein behandelnder Arzt, der auf der Basis solcher phänotypischen Resistenztestergebnisse Lopinavir verschreibt, wird unter Umständen wenig zufrieden stellende Ergebnisse erzielen.

„Auf Grund der einzigartigen Ko-Transfektion in phänotypischen Assays“, schlussfolgerte Mo, „können selbst geringe Anteile an Wild-Typ-Viren in der viralen Gesamtpopulation die Replikationskapazität und die Veränderung der Suszeptibilität der mutierten Viren signifikant beeinflussen.“



Sie mahnte eine sehr zurückhaltende und sorgfältige Interpretation solcher Ergebnisse an, wenn die Proben von Patienten stammen, die keine Therapie (mehr) einnehmen oder eine schlechte Adhärenz haben.

Eine einjährige randomisierte Studie zum Vergleich genotypischer Resistenztests versus genotypischer plus phänotypischer Resistenztests bei der Identifikation eines Salvage-Therapie-Regimes, zeigte keine Überlegenheit der Kombination der beiden Resistenztestverfahren [37]. Diese Studie begann im Jahr 2000, als das Antivirogramm-Assay von Virco Behandlungsstandard war – also vor dem Zeitpunkt, als Virco medikamentenspezifische Grenzwerte für die FC implementierte. Das hat zur Folge, dass die Ergebnisse dieser Studie sich nicht auf die neueren Assays übertragen lässt. In einem Überblicksvortrag am Ende des Workshops stellte Daniel Kuritzkes (Brigham and Women's Hospital, Boston) dar, dass die Studienteilnehmer nur moderate Resistenzen gegen PIs hatten. Bei Studienbeginn waren – so die Testergebnisse – 40 % der Viren der Studienteilnehmer suszeptibel gegen Indinavir und Ritonavir. Ein noch größerer Anteil war suszeptibel gegen Nelfinavir, Saquinavir und Amprenavir. Möglicherweise – so Kuritzkes – hätten Patienten mit resistenteren Viren einen größeren Nutzen aus der Kombination von genotypischem und phänotypischen Resistenztest gehabt.

Zu Zeitpunkt der Randomisierung hatten die Studienteilnehmer im Durchschnitt bereits zwei PIs, einen NNRTI und annähernd 8 antiretrovirale Substanzen insgesamt eingenommen. Die beiden Studienarme waren bezüglich ihrer Ausgangs-Viruslasten (etwa 20.000 Kopien/ml) und ihrer CD4-Werte (266 Zellen/ μ l im Genotyp- und 284 Zellen/ μ l im Genotyp/Phänotyp-Arm) gut vergleichbar. Die Patienten der beiden Arme erhielten eine äquivalente Zahl neuer Substanzen bzw. auf Grund des genotypischen Untersuchungsergebnisse als aktiv definierte neue Substanzen. Die Behandler erhielten keinen Expertenrat bei der Interpretation der Testergebnisse, wurden aber darauf hingewiesen, sich vor Ort mit Experten zu beraten. Nach 12 Monaten Beobachtungszeit unterschieden sich die Viruslasten und CD4-Werte in den beiden Armen nur geringfügig:

- Veränderungen der Viruslast: Genotyp-Arm: -1,37 log; Genotyp/Phänotyp-Arm: -1,28 log
- Anteil der Patienten unter der Nachweisgrenze von 50 RNA-Kopien/ml.: Genotyp-Arm: 35 %; Genotyp/Phänotyp-Arm: 27 %
- Veränderungen der CD4-Werte: Genotyp-Arm: +36 Zellen/ μ l; Genotyp/Phänotyp-Arm: +35 Zellen/ μ l.

Der Studienleiter Clive Loveday (International Clinical Virology Center, UK) schlussfolgerte, dass der Genotyp/Phänotyp-Arm in dieser Studie nicht besser anschnitt als der Genotyp-Arm, weil „der Zugang zum phänotypischen Resistenztest die Zusammenstellung der neuen Medikamentenregime nicht signifikant beeinflusste.“



Literatur

- [10] Little SJ, Dawson K, Hellman NS, et al. Persistence of transmitted drug-resistant virus among subjects with primary HIV infection deferring antiretroviral therapy. 2003 Resistance Workshop abstract 115.
- [11] Brenner BG., Routy JP, Petrella M, et al. Persistence and fitness of multidrug resistant human immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection. *J Virol* 2002;76:1753-1761.
- [12] Chan KCW, Galli RA, Montaner JSG, Harrigan PR. Prolonged retention of drug resistance mutations and rapid disease progression in the absence of therapy after primary HIV infection. *AIDS* 2003;17:1256-1258.
- [13] Taylor S, Cane P, Hué S, et al. Identification of a transmission chain of HIV type 1 containing drug resistance-associated mutations. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:353-361.
- [14] Delaugerre C, Morand-Joubert L, Chaix ML, et al. Persistence of multidrug-resistant HIV-1 without any antiretroviral treatment 2 years after sexual transmission. 2003 Resistance Workshop abstract 80.
- [19] Hirsch MS, Brun-Vézinet F, D'Aquila RT, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2000;282:2417-2426.
- Das 2003-Update dieser Guidelines stimmt nicht mit dieser Liste der Resistenzmutationen überein: Hirsch MS, Brun-Vézinet F, Clotet B, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Clin Infect Dis* 2003;37:113-128.
- [21] Grant RM, Barbour JD, Wrin T, et al. Transmission of drug resistant HIV-1 exhibiting lower replication capacity is associated with higher CD4 cell counts. *Antiviral Ther* 2002;7(suppl 1):S53. Abstract 56.
- [22] de Mendoza C, Ortiz M, Pérez-Hoyos S, et al. Impact of transmission of drug-resistant HIV viruses on viral load, CD4 counts and CD4 decline in recent seroconverters. 2003 Resistance Workshop abstract 81.
- [23] Hecht FM, Grant RM, Petropoulos CJ, et al. Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors. *N Engl J Med* 1998;339:307-311.
- [24] Chaix ML, Descamps D, Deveau C, et al. Antiretroviral resistance, molecular epidemiology and response to initial therapy among patients with HIV-1 primary infection in 1999-2000 in France. *Antiviral Ther* 2002;7(suppl 1):S53. Abstract 166.
- [25] Grant RM, Hecht FM, Warmerdam M, et al. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA* 2002;188:181-188.
- [26] Little SJ, Holte S, Routy JP, et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl. J Med* 2002;347:385-394.
- [27] Altfeld M, Allen TM, Yu XG, et al. HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus. *Nature* 2002;420:434-439.
- [28] Jost S, Bernard MC, Kaiser L, et al. A patient with HIV-1 superinfection. *N Engl. J Med* 2002;347:731-736.
- [29] Koelsch KK, Smith DM, Little SJ, et al. Clade B HIV-1 superinfection with wild-type virus after primary infection with drug-resistant clade B virus. *AIDS* 2003;17:F11-F16.
- [30] Perrin L, Yerly S, Monnat M, et al. Co- and super-infection: persistent replication of both HIV-1 strains? 2003 Resistance Workshop abstract 63.



[31] Palmer S, Kearney M, Boltz V, et al. Population genetics in HIV-1 super-infection. 2003 Resistance Workshop abstract 62.

[32] Mellors J, Palmer S, Nissley D, et al. Low frequency of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI)-resistant variants contribute to failure of efavirenz-containing regimens in NNRTI-experienced patients with negative standard genotypes of NNRTI mutations. 2003 Resistance Workshop abstract 134.

[33] Lecossier D, Shulman N, Zolopa AR, et al. Resistance genotypes in patients failing nevirapine: co-existence of majority viral populations expressing Y181C and minority populations expressing K103N. 2003 Resistance Workshop abstract 143.

[34] Kearney M, Palmer S, Maldarelli F, et al. Comparison of single-genome sequencing with standard genotype analysis for detection of HIV-1 drug resistance mutations. 2003 Resistance Workshop abstract 86.

[35] Ellis GM, Mahalanabis M, Beck IA, et al. Drug-resistant mutants of HIV-1 persist at higher concentrations in peripheral blood mononuclear cells compared to plasma at a higher rate by OLA compared to consensus sequencing. 2003 Resistance Workshop abstract 87.

[36] Mo H, Lu L, Kempf D, Molla A. The impact of minor populations of wild-type HIV on the replication capacity and phenotype of mutant variants in a single-cycle HIV resistance assay. 2003 Resistance Workshop abstract 85.

[37] Loveday C, Dunn DT, Green H, et al. A 1-year randomized controlled trial of genotypic versus genotypic plus phenotypic resistance testing to guide antiretroviral therapy (the ERA trial). 2003 Resistance Workshop abstract 149.