

Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie
Charité, Campus Virchow-Klinikum
(Direktor: Professor Dr. Bertram Wiedenmann)

HABILITATIONSSCHRIFT

Chronische Hepatitis C – Therapeutische Strategien, molekulare Resistenzmechanismen und Relevanz neuer Hepatitis-assoziiierter Viren -

Zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Innere Medizin
Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität Berlin

Dr. med. Thomas Berg

Dekan: Professor Dr. Joachim Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Michael P. Manns
2. Prof. Dr. Guido Gerken

eingereicht: 06.09.2001
Datum der Promotion: 23.04.2002

Inhaltsverzeichnis

1.	Synopse	4
2.	Einleitung	7
2.1.	Genomorganisation des Hepatitis C Virus (HCV)	7
2.2.	HCV Genotypen	9
2.3.	Epidemiologie und Transmission der HCV-Infektion	9
2.4.	Wirkung der Interferone	11
2.5.	Interferon-Wirkung bei chronischer Hepatitis C	14
2.6.	Interferon-alpha-Therapie bei chronischer Hepatitis C	19
2.7.	Ribavirin bei chronischer Hepatitis C	20
2.8.	Amantadin bei chronischer Hepatitis C	20
2.9.	Kombinationstherapie (Interferon-alpha + Ribavirin) bei chronischer Hepatitis C	21
2.10.	Therapie der chronischen Hepatitis C mit pegylierten Interferonen (PEG-IFNa)	22
2.11.	Definition der Response	24
2.12.	Prognostische Faktoren für das Therapieansprechen bei chronischer Hepatitis C	25
2.13.	Neue Hepatitis-assoziierte Viren	27
2.14.	GB-Virus C/ Hepatitis G Virus	27
2.15.	Genom-Organisation des GBV-C/HGV	28
2.16.	TT-Virus (TTV)	29
2.17.	Genom Organisation	29
3.	Eigene Arbeiten	31
3.1.1.	Kinetik der Hepatitis C-Replikation	31
3.1.2.	Klinische Relevanz der HCV-Genotypen	32
3.1.3.	Langzeitprognose der chronischen Hepatitis C nach Interferon-Monotherapie	32
3.2.	Therapeutische Strategien bei chronischer Hepatitis C	32
3.2.1.	Ribavirin bei der Therapie der chronischen Hepatitis C	32
3.2.2.	Stellenwert von Amantadin bei der Therapie der chronischen Hepatitis C	33
3.3.	Ursachen der Nonresponse auf Interferon alpha bei chronischer Hepatitis C	34

3.3.1.	Relevanz der Interferon-alpha-Antikörperbildung im Rahmen der Interferon-Therapie bei chronischer Hepatitis C	34
3.3.2.	Bedeutung von Mutationen innerhalb der NS5A- und E2-Region des HCV für das Therapieansprechen bei chronischer Hepatitis C	34
3.4.	Einfluß der neu entdeckten Hepatitis-assoziierten Viren (GBV-C/HGV und TTV) für den Verlauf der chronischen Hepatitis C und das Therapieansprechen	35
3.4.1.	Amplifikation und Quantifizierung der GBV-C/HGV-RNA	35
3.4.2.	Prävalenz und klinische Relevanz der GBV-C/HGV-Infektionen	35
3.4.3.	Nachweis von GBV-C/HGV-Infektionen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C	36
3.4.4.	Untersuchungen zum Gewebetropismus von GBV-C/HGV	36
3.4.5.	Prävalenz und klinische Relevanz der TT-Virus (TTV)-Infektionen in Deutschland	36
4.	Relevante Originalarbeiten	38
4.1.	Kinetik der Hepatitis C-Replikation	38
4.2.	Klinische Relevanz der HCV-Genotypen	39
4.3.	Langzeitprognose der chronischen Hepatitis C nach Interferon-Monotherapie	40
4.4.	Therapeutische Strategien bei chronischer Hepatitis C	41
4.4.1.	Ribavirin bei der Therapie der chronischen Hepatitis C	41
4.4.2.	Stellenwert von Amantadin bei der Therapie der chronischen Hepatitis C	41
4.5.	Ursachen der Nonresponse auf Interferon alpha bei chronischer Hepatitis C	43
4.5.1.	Relevanz der Interferon-alpha-Antikörperbildung im Rahmen der Interferon-Therapie bei chronischer Hepatitis C	43
4.5.2.	Bedeutung von Mutationen innerhalb der NS5A- und E2-Region des HCV für das Therapieansprechen bei chronischer Hepatitis C	43
4.6.	Einfluß der neu entdeckten Hepatitis-assoziierten Viren (GBV-C/HGV und TTV) für den Verlauf der chronischen Hepatitis C und das Therapieansprechen	44
4.6.1.	Amplifikation und Quantifizierung der GBV-C/HGV-RNA	44
4.6.2.	Prävalenz und klinische Relevanz der GBV-C/HGV-Infektionen	44
4.6.3.	Nachweis von GBV-C/HGV-Infektionen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C	45
4.6.4.	Untersuchungen zum Gewebetropismus von GBV-C/HGV	45
4.7.	Prävalenz und klinische Relevanz der TT-Virus (TTV)-Infektionen in Deutschland	46

5.	Diskussion und Zusammenfassung	47
5.1.	Therapie der chronischen Hepatitis C	47
5.2.	Prognosefaktoren bei der Therapie der chronischen Hepatitis C	47
5.2.1.	Bedeutung der HCV-Genotypen	47
5.2.2.	Weitere Prognosefaktoren	48
5.3.	Wirkung von Ribavirin	50
5.3.1.	Einfluss von Ribavirin auf die HCV-Quasispeciesverteilung	50
5.4.	Kombinationstherapie bei chronischer Hepatitis C	52
5.5.	Neue therapeutische Strategien bei chronischer Hepatitis C	52
5.5.1.	Amantadin	52
5.5.2.	Triple-Therapie (IFNa plus Ribavirin und Amantadin)	53
5.6.	Nonresponse bei der Therapie der chronischen Hepatitis C	53
5.7.	Mechanismen der Nonresponse	54
5.7.1.	Relevanz der Interferon-alpha-Antikörperbildung im Rahmen der Interferon-Therapie bei chronischer Hepatitis C	55
5.7.2.	Bedeutung von Mutationen innerhalb der NS5A- und E2-Region des HCV für das Therapieansprechen bei chronischer Hepatitis C	56
5.8.	Bedeutung der neu entdeckten Hepatitis-assoziierten Viren (GBV-C/HGV undTTV) für den Verlauf der chronischen Hepatitis C und das Therapieansprechen	58
	Referenzen	61
	Danksagung	85
	Lebenslauf	87

1 Synopsis

Die vorliegende Habilitationsschrift befasst sich vor allem mit unterschiedlichen Aspekten bei der Therapie von Patienten mit chronischer Hepatitis C. Hierbei stehen zunächst Studien zur Evaluation verschiedener Therapiestrategien (Kurzzeit-Kombinationstherapie, Triple-Therapie, Hochdosis-Interferon-alpha-Therapie) und antiviraler Substanzen (Ribavirin, Amantadin) im Vordergrund. Die Arbeiten schliessen dabei bisher unvorbehandelte Patienten als auch solche Patienten ein, die keine Response auf eine Interferontherapie gezeigt hatten. Der Langzeitverlaufsdokumentation der Patienten gilt dabei besonderes Interesse. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen haben nicht nur zum Verständnis des Therapieansprechens bei Patienten mit chronischer Hepatitis C beigetragen, sondern lieferten außerdem Erkenntnisse über relevante prognostische Parameter für die Therapie-Response. Analysen zur Dynamik der Hepatitis C Virämie unter antiviraler Therapie ermöglichten es Einsichten über die Mechanismen der antiviralen Therapie zu gewinnen, und bilden zudem die Grundlage für eine an die individuellen Bedürfnisse des Patienten angepasste Therapie.

Die Erforschung von Mechanismen der Nonresponse auf die antivirale Therapie bilden einen weiteren Hauptaspekt der Habilitationsschrift. Die Arbeiten geben einen Einblick über mögliche molekulare Mechanismen der Therapieresponse bzw. Nonresponse und über den Stellenwert von Interaktionen bestimmter HCV-Proteine (NS5A, E2, sogenannte PKR-eIF2 α Phosphorylisations-Homologie-Domäne [PePHD]) mit den Interferon-alpha-induzierten Effektorproteinen. Außerdem wurde die Bedeutung der Antikörperbildung gegen rekombinantes Interferon-alpha (IFNa) als mögliche Ursache des Versagens der antiviralen Wirkung untersucht. Wir konnten zeigen, dass die Nonresponse auf IFNa keine generelle Folge einer Antikörperbildung gegen rekombinantes IFNa ist. Neutralisierende IFNa-Antikörper können aber in Einzelfällen für den IFNa-Wirkungsverlust unter Therapie (sogenanntes Breakthrough-Phänomen) ursächlich verantwortlich sein. Eine Umstellung der Therapie auf natürliches IFNa stellt in dieser Situation eine sinnvolle therapeutische Option dar. Eine zunehmende Anzahl von Mutationen innerhalb des viralen NS5A-Proteins (der sogenannten Interferon-Sensitivitäts-determinierenden Region [ISDR]) von HCV-Genotyp 1-Isolaten konnte eindeutig mit dem Therapieansprechen auf IFNa korreliert werden. Keiner der Patienten mit Wildtypsequenz (d.h. keine Mutation innerhalb der ISDR) hatte eine anhaltende Response. HCV-Isolate mit zahlreichen Mutation besitzen allerdings keine intrinsische Sensitivität gegenüber IFNa, wie HCV-Quasispezies-Analysen der NS5A-Region gezeigt haben. Die vorhandenen Daten belegen, dass Mutationen innerhalb des NS5A-Proteins eine prognostische Bedeutung für das Ansprechen einer IFNa-Therapie haben. Es wird in Zukunft durch prospektive Studien zu klären sein, inwiefern dieser Responseparameter bei der Etablierung individueller Therapiestrategien hilfreich sein könnte. Demgegenüber sind Sequenzierungen der E2-PePHD-Region nicht hilfreich, um das individuelle Therapieansprechen vorherzusagen, da die PePHD bei HCV-Genotyp 1-Isolaten hoch-konserviert ist und die wenigen Mutation, die sich in dieser Region nachweisen ließen, nicht mit der Response korreliert waren. Phylogenetische

Untersuchungen der E2-PePHD-Region ergaben ebenfalls keine Unterschiede zwischen IFNa-sensitiven und resistenten HCV-Isolaten. Bei Kinetik-Analysen konnten wir aber zeigen, dass HCV-Genotyp 1a-Isolate mit einer Mutation an Position 626 des E2-Proteins (ausserhalb der PePHD) einen signifikant steileren Abfall der Hepatitis C Virämie aufwiesen, als Isolate ohne diese Mutation. Diese Beobachtung könnte für eine Interaktion von E2 mit IFNa-induzierten Responsefaktoren sprechen.

Untersuchungen zur klinischen Relevanz der neu-entdeckten Hepatitis-assoziierten Viren, GB Virus-C/Hepatitis G Virus (GBV-C/HGV) und TT Virus (TTV) sowie deren Bedeutung für den Verlauf der chronischen Hepatitis C und das Therapieansprechen stellen einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit dar. Hierfür haben wir spezifische und sensitive Systeme zur Detektion und Quantifizierung der neuen Hepatitis-assoziierten Viren entwickelt. Phylogenetische Analysen der Virusisolate ermöglichten außerdem, die klinische Relevanz der unterschiedlichen GBV-C/HGV bzw. TTV-Genotypen/Subtypen zu untersuchen. Wir konnten zeigen, dass chronische GBV-C/HGV- bzw. TTV-Koinfektionen keinen erkennbaren Einfluss auf die Progredienz der chronischen Hepatitis C haben. Im Gegenteil, es ergaben sich Hinweise dafür, dass in bestimmten klinischen Situationen die GBV-C/HGV-Koinfektion den Verlauf günstig beeinflussen kann. Auch die Response der chronischen Hepatitis C auf eine IFNa-Therapie wurde weder durch GBV-C/HGV noch durch TTV negativ beeinflusst. GBV-C/HGV und TTV sind offenbar Interferon-sensitive Viren, wie die Verlaufsuntersuchungen bei koinfizierten Patienten belegen.

Untersuchungen zur Prävalenz, Transmission und klinischen Relevanz der GBV-C/HGV- und TTV-Infektion als mögliche Hepatitis-induzierende Agentien wurden bei Patienten mit fulminantem Leberversagen unklarer Ätiologie, kryptogener chronischer Hepatitis, bei Patienten vor und nach Lebertransplantation sowie gesunden Personen (Blutspendern) durchgeführt. Die Ergebnisse der Arbeiten zeigen, dass es sich bei GBV-C/HGV bzw. TTV um parenteral-übertragbare Viren handelt, welche eine hohe Prävalenz bei Patienten mit entsprechenden parenteralen Risikofaktoren aufweisen. Die umfangreichen Untersuchungen bei GBV-C/HGV- bzw. TTV-Trägern sprechen jedoch gegen eine Hepatitis-induzierende Potenz dieser Viren, da die Mehrzahl aller chronisch-infizierten Personen keine Zeichen einer chronischen Hepatitis aufwiesen. Es konnten auch keine extrahepatischen Erkrankungen mit der chronischen GBV-C/HGV- oder TTV-Infektion in Verbindung gebracht werden. Möglicherweise hat jedoch die GBV-C/HGV-Koinfektion einen günstigen Einfluss auf den Verlauf der HIV-Infektion. Der Hauptreplikationsort von GBV-C/HGV ist zudem nicht die Leber, wie Kinetikanalysen der GBV-C/HGV-Virämie vor und nach Lebertransplantation beweisen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass weder GBV-C/HGV noch TTV klassische Hepatitisviren darstellen. Infektionen mit diesen Viren führen zwar häufig zu einer persistierenden Infektion, jedoch nicht zu einer chronischen Hepatitis. Ein kausaler Zusammenhang von GBV-C/HGV und TTV-Infektionen und der Entwicklung einer milden Begleit-Hepatitis kann derzeit jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden. Bei der hohen Prävalenz dieser

Viren in der Bevölkerung ist die diagnostische Bedeutung im Falle eines Nachweises von GBV-C/HGV oder TTV bei einem Patienten mit unklarer Lebererkrankung schwer einzuschätzen. Für Patienten mit chronischer Hepatitis C stellt die Koinfektion mit diesen neuen Hepatitis-assoziierten Viren keinen gesonderten Risikofaktor dar, weder für den Verlauf der Hepatitis C, noch für die Therapieresponse.

2 Einleitung

2.1 Genomorganisation des Hepatitis C Virus (HCV)

1989 gelang Choo und weiteren Wissenschaftlern der Chiron Corporation (USA) (1) mittels moderner molekularbiologischer Verfahren die Identifizierung des gesuchten Non-A-Non-B Virus aus einem hochtitrig infektiösen Plasma (2) eines Schimpansen mit chronischer Non-A-Non-B-Hepatitis. Durch Sequenzierung sich überlappender cDNA Klone konnte schließlich die gesamte Nukleotid-Sequenz dieses Non-A-non-B Virus-Genoms dargestellt werden, welches als Hepatitis C Virus bezeichnet wurde (3). Es zeigte sich, dass bis zu 90% der akuten und chronischen Non-A-Non-B Hepatitiden auf eine Infektion mit dem HCV zurückzuführen sind (4-8). HCV wurde als separater Genus innerhalb der Familie der Flaviviridae klassifiziert (9, 10).

Tabelle 1: Taxonomische Einteilung der Flaviviridae

Familie	Genus	Spezies	Genotypen
Flaviviridae	Flaviviren	Gelbfieber Virus West Nile Virus FSME Virus Japanisches B Enzephalitis Virus Dengue	Dengue 1-4
	Hepaciviren	Hepatitis C Virus GB Virus B	HCV Typ 1-6
	neuer Genus?	GB Virus C/ HGV GB Virus A	(Typ 1-3)
	Pestiviren	BVDV HCHV	

Die Tabelle enthält nur die wichtigsten Spezies aus der Familie der Flaviviridae. FSME: Frühsommer Meningoenzephalitits Virus; BVDV: Bovine viral diarrhoea Virus; HCHV: Hog Cholera Virus

HCV enthält ein Einzel-(+)-Strang RNA-Genom von ca. 9.600 Nukleotiden, das in einem Nukleokapsid verpackt wird. Das Genom beginnt mit einer für alle Isolate hochkonservierten nicht-codierenden Region von 341 Nukleotiden (9), die eine interne Ribosomenbindungsstelle enthält und die Expression des HCV-Polyproteins steuert. Dem nicht kodierenden 5'-Ende folgt ein langer offener Leserahmen von ~ 9033 Nukleotiden Länge, der für ein, je nach Virustyp, 3010-3033 Aminosäuren großes Vorläufer-Polyprotein kodiert. Von diesem Polyprotein werden an bestimmten

Schnittstellen einzelne Proteine co- oder posttranslational von Wirts-kodierten Signalasen und Virus-kodierten Proteasen abgespalten (11-15). Das nicht-kodierende 3'-Ende ist je nach Isolat 27-55 Nukleotide lang (9, 16-18) und wird von einem poly(U)-Strang (17-19) gefolgt von einer hochkonservierten Region von 98 Nukleotiden beendet. Diese hochkonservierte Sequenz ist möglicherweise für die Replikation im Rahmen eines Selbstpriming von Bedeutung.

Das Polyprotein enthält drei Strukturproteine, das Kapsid ("core",C) und zwei Hüllproteine (E1 und E2) sowie die nicht-Strukturproteine p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B (15). Die Größe und Funktionen der einzelnen Proteine sind in Abb. 1 dargestellt.

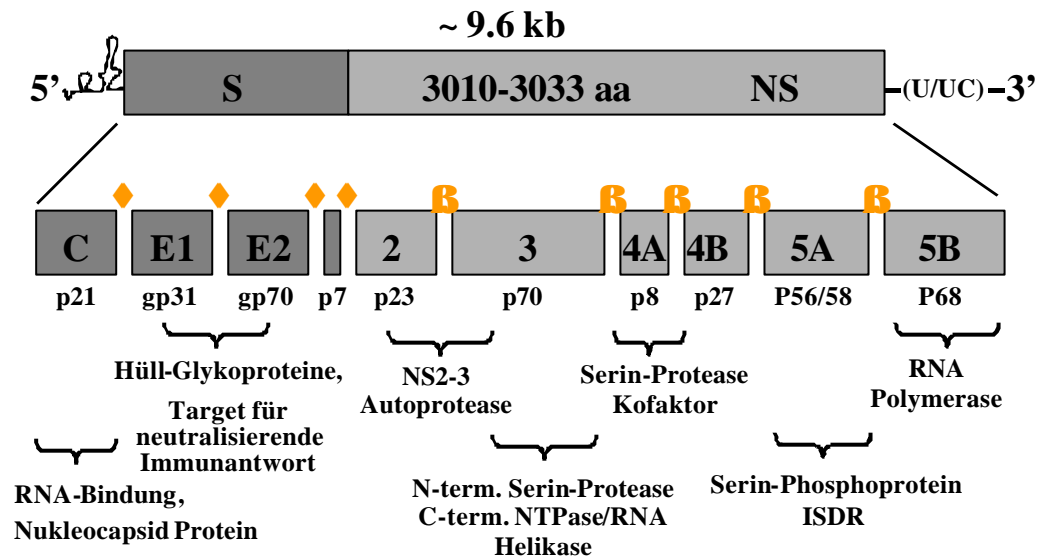


Abb. 1: Genomorganisation des Hepatitis C Virus (HCV) (modifiziert nach 14). Dargestellt ist das ca. 9,6 kb umfassende HCV-Genom, die verschiedenen strukturellen (C, E1, E2/p7) und nichtstrukturellen (NS2, 3, 4A, 5A und 5B) HCV-Gene im Kontext des offenen Leserahmens sowie die daraus resultierenden HCV-Proteine mit ihrem Molekulargewicht und den bekannten Funktionen. (ISDR = Interferon-Sensitivitäts-determinierende Region, nach Enomoto [91]).

Das 70 kDa große NS3-Protein vermittelt drei enzymatische Aktivitäten: eine Serin-Protease (im N-terminalen Drittel lokalisiert) und „downstream“ in den carboxyterminalen zwei Dritteln eine NTPase/Helikase-Kombination. Die kürzlich entschlüsselte kristallographische Struktur der Helikase erlaubt neue Einsichten in ihre Funktionsweise und macht das Enzym zu einer interessanten Zielsubstanz für neue anti-HCV-Medikamente. NS5A wird posttranslational phosphoryliert und liegt in einer 56 kDa und 58 kDa Form vor. Die Funktion des Proteins ist nicht

bekannt. Neben einer möglichen transaktivierenden Funktion wurden auch Interaktionen des NS5A Proteins mit den Interferon-induzierten Effektorproteinen wie z.B. der PKR nachgewiesen. Das NS5A-Protein hat daher möglicherweise eine Bedeutung für die Interferon-Response. Das NS5B-Protein besitzt eine RNA-Polymerase-Aktivität und stellt somit ein weiteres mögliches Zielprotein für neue antivirale Substanzen dar (20).

2.2 HCV Genotypen

Eine große Zahl verschiedener HCV-Isolate sind bis heute kloniert und sequenziert worden (16-18, 21-24). Es zeigte sich, daß das HCV eine ausgeprägte genetische Heterogenität aufweist, wie man es auch von anderen RNA Viren kennt, die keine replikativen Reparaturmechanismen besitzen und zu Fehlern neigende Replikasen enthalten. Aufgrund der Ungenauigkeit der HCV-RNA-Polymerase kommt es bei der Replikation zu ca. 2×10^{-3} Mutationen pro Nukleotidposition pro Jahr. Phylogenetische Analysen der Nukleotid- bzw. Aminosäure-Sequenz von HCV-Isolaten aus unterschiedlichen geographischen Regionen haben die Existenz von 6 verschiedenen HCV-Genotypen ergeben. Die HCV-Genotypen zeigen eine Homologie auf der Nukleotid- bzw. Aminosäureebene ca. 65-72% bzw. 75-86% (25-27). Diese 6 HCV-Typen können weiter in enger miteinander verwandte Subtypen (z.B. 1a, 1b, 1c,...) unterteilt werden. Während die HCV-Genotypen 1-3 eine weltweite Verbreitung zeigen, werden die Genotypen 4-6 nur in bestimmten geographischen Regionen gefunden. (Nord- und Zentral-Afrika (Typ 4), Süd-Afrika (Typ 5) und Hong-Kong, Vietnam (Typ 6).

Die HCV-Genotypen unterscheiden sich jedoch nicht nur in ihrer geographischen Verteilung sondern auch in ihren biologischen Effekten. Besonderes Interesse besteht derzeit in der Erforschung Genotypen-abhängiger Unterschiede bei der Virusreplikation, der Mutationsrate, des Krankheitsverlaufs der chronischen Hepatitis C und vor allem bei der Response auf eine antivirale Therapie (28-37).

2.3 Epidemiologie und Transmission der HCV-Infektion

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist weltweit verbreitet. Ca. 3% der Weltbevölkerung sind mit HCV infiziert, was ungefähr 170 Millionen chronischen Virusträgern entspricht (38). In der Allgemeinbevölkerung ist die HCV-Prävalenz geographisch unterschiedlich mit ca. 0.5% in nordeuropäischen Ländern und ca. 2% in den Mittelmeerländern (39, 40). In Deutschland sind etwa 0.5% der Bevölkerung chronisch mit HCV infiziert (ca. 350.000 Virusträger). Die Rate der jährlichen HCV-Neuinfektionen wird in Deutschland auf 5000 geschätzt.

Der Mensch ist für HCV der einzige natürliche Wirt. HCV wird parenteral durch Blut und Blutprodukte übertragen. HCV-Genom kann aber mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

auch in anderen Körperflüssigkeiten (Speichel, Sperma) nachgewiesen werden (41). Die Übertragung von HCV durch Bluttransfusionen und durch nicht inaktivierbare zelluläre Blutprodukte ist seit der Einführung des anti-HCV-Screenings von Blutspendern deutlich zurückgegangen und spielt heute nur noch eine untergeordnete Rolle. Für Vollblut-Transfusionen wird ein Restrisiko der HCV-Übertragung von etwa 1:100.000-200.000 angegeben. Durch die Einführung des HCV-Genomnachweises (PCR-Testung) bei Blutspendern wird dieses Restrisiko weiter gesenkt werden (42). Für tiefgefrorenes Frischplasma liegt das HCV-Übertragungsrisiko weit unterhalb dieser Angaben.

Intravenöser Drogenabusus stellt in den entwickelten Ländern den wichtigsten HCV-Transmissionsweg dar. Bis zu 80% der i.v. Drogenabhängigen sind anti-HCV positiv. Demgegenüber wird HCV in den Entwicklungsländern v.a. durch unhygienische Injektionspraktiken übertragen. Dialysepatienten sind in 10-30% mit HCV infiziert (43). Das Risiko einer vertikalen HCV-Transmission (von der Mutter auf das Kind) ist mit ca. 5% gering und ist abhängig von der HCV-Konzentration im mütterlichen Blut (44, 45). Bei gleichzeitiger HIV-Infektion steigt das Übertragungsrisiko an (bis ca. 20%) (46). Ein HCV-Übertragung durch Muttermilch konnte bisher nicht dokumentiert werden. Man muss HCV-infizierten Müttern daher nicht vom Stillen abraten. Die sexuelle Übertragung von HCV ist prinzipiell möglich; die epidemiologische Bedeutung bzw. das Ausmaß der sexuellen Transmission ist jedoch unklar (47). Bei heterosexuellen Partnern von Patienten mit chronischer Hepatitis C finden sich mit ca. 0-4% niedrige anti-HCV Prävalenzen. Demgegenüber zeigen sexuell promiskuitive Personen mit 2-12% deutlich höhere anti-HCV-Prävalenzen als die Normalbevölkerung. Beim medizinischen Personal ist die anti-HCV-Prävalenz gegenüber der Normalbevölkerung nicht erhöht. Bei bis zu 30% der Patienten mit chronischer Hepatitis C läßt sich keiner der bekannten Risikofaktoren nachweisen.

Verlauf der Hepatitis C Virus-Infektion

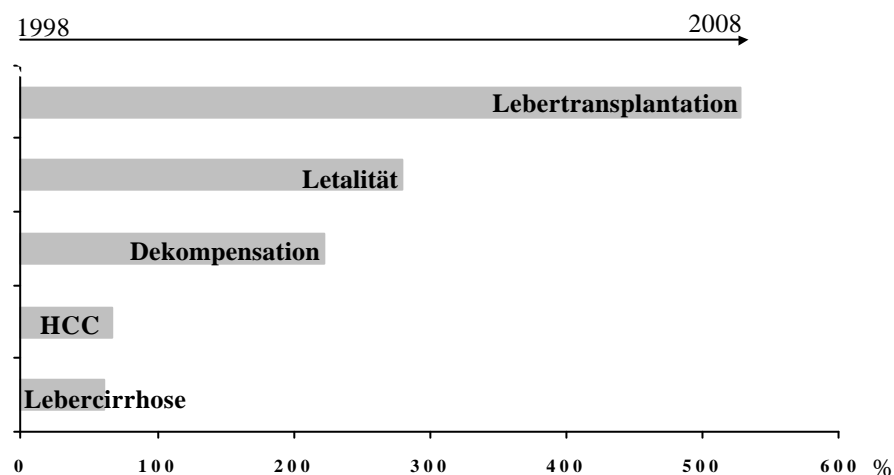
Die Infektion mit Hepatitis C-Viren (HCV) führt in der Regel zur Etablierung eines chronischen HCV-Carrierstatus, ohne daß eine akute Hepatitis vorausgeht (48). Auch in den wenigen Fällen, die enzymserologisch und histologisch das Bild einer akuten Hepatitis C entwickeln, fehlt meist der Ikterus. Dies ist der Grund dafür, daß die chronische HCV-Infektion erst nach Jahren und dann auch oft eher zufällig erkannt wird.

Patienten mit mehrjähriger HCV-Infektion haben kaum Chancen einer Spontanheilung bzw. spontanen HCV-Elimination. Dies bedeutet aber nicht zwangsläufig, daß die Prognose ungünstig sein muß. Langzeitbeobachtungen zum Spontanverlauf der chronischen Hepatitis C haben gezeigt, daß bei ca. 30 % der Patienten mit der Entwicklung einer Cirrhose zu rechnen ist (49-54). Demnach wird der überwiegende Teil der Patienten mit chronischer HCV-Infektion keine gravierende Lebererkrankung entwickeln und auch durch diese chronische Infektion zeitlebens nicht oder nur wenig in seiner Lebensqualität beeinträchtigt sein. Dennoch ist im Hinblick auf die relativ hohe Prävalenz der chronischen HCV-Infektion die Zahl der Patienten mit progredienter

chronischer Hepatitis und schließlich Entwicklung einer Cirrhose erheblich. Der Anteil der Patienten, die wegen einer HCV-induzierten dekompenzierten Cirrhose transplantiert werden, liegt in unserem Zentrum bei 18 % und in den USA bei 15-30 %. Hinzu kommt das hohe Risiko hinsichtlich der Entwicklung eines hepatozellären Carcinoms (HCC), wenn die chronische Hepatitis in eine Cirrhose übergegangen ist (52, 54, 55-57). Abbildung 2 zeigt mit welcher Zunahme von Komplikationen der chronischen HCV-Infektion im Jahre 2008 zu rechnen ist (58, 59).

Die chronische Hepatitis C stellt zunehmend ein epidemiologisches, ein klinisches und auch ein kostenträchtiges Problem dar. Die dringende Notwendigkeit einer effektiven Therapie liegt auf der Hand. Die Behandlungsergebnisse konnten in letzter Zeit deutlich verbessert werden.

Abb. 2: Zu erwartende Probleme durch die chronische Hepatitis C. Dargestellt ist die prozentuale Zunahme der jeweiligen Komplikation im Jahr 2008 (nach 58).



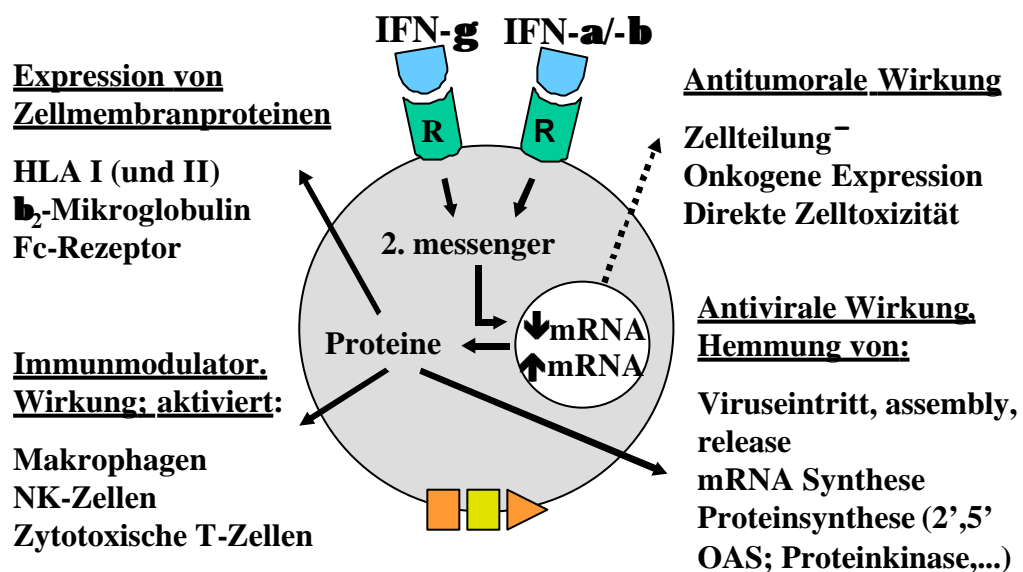
(HCC = Hepatozelluläres Karzinom)

2.4 Wirkung der Interferone

Interferone sind Proteine, die den Zytokinen zugeordnet werden und von Leukozyten und Fibroblasten als Reaktion auf eine Virusinfektion gebildet werden. Sie haben antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Wirkungen (Abbildung 3) (60-62). Der antivirale Effekt wurde 1957 von Isaacs und Lindenmann entdeckt (63, 64). Man unterteilt die Interferone in Alpha-, Beta- und Gamma-Interferone, die sich strukturell, biochemisch und auch in ihren antigenen

Eigenschaften unterscheiden. Alpha-Interferon wird von Monozyten und transformierten B-Zell-Linien als Antwort auf Virusinfektionen und Antigenstimulation produziert. Natürliches Interferon-alpha enthält mindestens 15 unterschiedliche Subfraktionen mit Molekulargewichten zwischen 16 und 27 kDa (65). Bislang wurden 23 verschiedene Gene für die Kodierung der menschlichen Alpha-Interferone gefunden, die alle auf Chromosom 9 lokalisiert sind (66). Beim klinischen Einsatz stehen rekombinante Alpha-Interferone im Vordergrund.

Abb. 3: Wirkung der Interferone (nach 62).



IFN = Interferon, NK-Zellen = natürliche Killerzellen, R = Rezeptor

Beta-Interferon wird von Fibroblasten gebildet und ist beim Menschen das Produkt eines einzigen Gens auf dem Chromosom 9 (66). Neben Virusinfektionen können auch synthetische Produkte, wie anionische Polymere, Lipide und Peptide Beta-Interferon induzieren (67). Die Alpha- und Beta-Interferone werden wegen ihrer Verwandtschaft als Typ-I-Interferone bezeichnet (68).

Im Gegensatz hierzu zeichnet sich das Gamma-Interferon (Typ-II-Interferon) durch einen anderen Genlocus und eine andere Struktur aus. Das entsprechende Gen befindet sich auf Chromosom 12 (69-71). Gamma-Interferon wird von T-Lymphozyten gebildet. Verschiedene Antigene und Mitogene induzieren die Bildung von Gamma-Interferon. Gamma-Interferon hat vor allem immunregulatorische Wirkungen (72).

Die Wirkungen von Interferonen werden durch Rezeptoren vermittelt. Die Interferone haben keine biologische Aktivität innerhalb der Zelle, in der sie gebildet werden. Sie werden zunächst sezerniert, um dann über spezifische Rezeptoren ihr Signal abzugeben (73, 74). Man unterscheidet zwei Interferonrezeptoren, einen für Typ-I-Interferone (IFNalpha/ beta) und einen für Typ-II-Interferone (IFN-gamma). Diese Interferon-Rezeptoren sind auf einer Vielzahl menschlicher Zellen exprimiert. Nach Bindung an den Rezeptor wird der Interferon-Rezeptorkomplex rasch durch rezeptorvermittelte Endozytose ins Zellinnere aufgenommen (75, 76). Innerhalb der Zelle wird die Interferonwirkung über sog. „Second Messengers“ vermittelt. Die Signalübermittlung führt in einem weiteren Schritt zur Aktivierung der Transkription von Genen. Unter den messenger RNAs und Proteinen, die durch das Interferon-System hochreguliert werden, gehören unter anderem die 2', 5'-Oligoadenylatsynthetase, 2', 5'-Phosphodiesterase, Doppelstrang-RNA-abhängige Protein-kinase, das Mx-Protein, HLA-Antigene, β -Microglobulin, der TNF-Rezeptor und verschiedene Enzyme (77-80).

Im Zusammenhang mit der Behandlung der chronischen Virushepatitis interessieren insbesondere die antivirale und die immunmodulatorische Wirkung. Die antiproliferative Wirkung ist für einige Nebenwirkungen verantwortlich, die man bei Patienten unter länger dauernder Interferon-Therapie beobachtet, wie z. B. Thrombozytopenie und Leukopenie sowie Haarausfall.

Der Virus-Replikationszyklus beginnt mit dem Kontakt des Virus auf der Zielzelle und endet mit der Ausschleusung („Release“) der kompletten Viruspartikel. Frühreplikative Momente beinhalten das Virusanheften („Attachment“), die Penetration der Zellmembran und das Freilegen („Uncoating“) der viralen Erbsubstanz. Darauf folgt die Replikation der viralen Proteine und Nucleinsäuren. Zum Schluß kommt der Zusammenbau („Assembly“, „Packaging“) und „Release“ der fertigen Viruspartikel. Interferone können jeden dieser Schritte in Abhängigkeit der Virus-Familie hemmen. Am besten untersucht ist der antivirale Wirkung auf die Translation des viralen Genoms durch die Induktion antiviraler Effektorproteine. Hierzu gehören die Doppelstrang-RNA-abhängige Proteinkinase (PKR) , die 2', 5'-Oligoadenylatsynthetase (2', 5'-OAS) und das Mx Protein (78). So führt die Induktion der 2', 5'-OAS zur Bildung von 2', 5'-Oligoadenylat, das wiederum eine Ribonuklease aktiviert, die bevorzugt virale einzelsträngige RNA abbaut und damit die Virusreplikation hemmt. (81, 82). Die Induktion und Bindung der PKR an Doppelstrang-RNA führt zu einer Aktivierung der PKR durch Dimerisation und Autophosphorylierung. Die Aktivierung der PKR führt wiederum zu einer Phosphorylierung des Initiationsfaktors der Proteinbiosynthese (eIF2 α), wodurch es zu einer Blockierung der Proteinbiosynthese und somit auch der Virusreplikation kommt.

Die immunmodulatorische Wirkung der Alpha-Interferone wird hauptsächlich über eine Aktivierung von natürlichen Killerzellen vermittelt, die wiederum selektiv die virusinfizierten Zellen abtöten. Außerdem induzieren Alpha-Interferone in den meisten Zellen des Körpers die Expression von MHC-Klasse-I-Proteinen und erhöhen so deren Resistenz gegen natürliche Killerzellen und ihre Anfälligkeit für cytotoxische CD8-T-Zellen.

2.5 Interferon-Wirkung bei chronischer Hepatitis C

Alpha-Interferone können verschiedene direkte und indirekte antivirale Mechanismen wie intrazelluläre virale RNA-Degradation, Hemmung der viralen RNA-Translation, Aktivierung des zellulären Immunsystems zur Erkennung virusbefallener Zellen und Prävention einer Virusinfektion von suszeptiblen Zellen induzieren (83, 84). Welcher Effekt bei der Interferon-alpha (IFNa)-Therapie von Patienten mit chronischer Hepatitis C im Vordergrund steht, ist nicht genau bekannt. Neue Erkenntnisse über die mögliche IFNa-Wirkung bei chronischer Hepatitis C wurden durch mathematische Berechnungen der Hepatitis C Viruskinetik unter IFNa-Therapie abgeleitet (Abb. 4). (85-87). Nach IFNa-Applikation kommt es mit einer Latenz von ca. 8 h bei nahezu allen Patienten zu einem raschen Abfall der Hepatitis C Virämie (Phase 1). Die Phase-1-Kinetik ist IFNa-dosisabhängig und offenbar das Resultat einer direkten IFNa-vermittelten HCV-Replikationshemmung durch Induktion der o.g. Effektor-Proteine (87). Der Abfall der HCV-RNA im Serum in Phase 2 (ca. 24-48 h nach Therapiebeginn) verläuft deutlich flacher, reflektiert die Abnahme der produktiv infizierten Hepatozyten und ist vermutlich durch immunmodulatorische Eigenschaften des IFNa bedingt. Die hohe Relapse-Rate nach initial erfolgreicher IFNa-Therapie ist wahrscheinlich damit zu erklären, daß es nicht zu einer Elimination aller HCV-infizierten Zellen gekommen ist. Demgegenüber scheint bei Patienten mit anhaltender Remission durch die IFNa-Therapie eine immunologische Kontrolle der HCV-Infektion induziert worden zu sein. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen gestützt, die zeigten, daß bei Langzeitrespondern auf eine IFNa-Therapie eine andauernde und starke T-Zell Response gegen HCV Proteine nachgewiesen werden kann, nicht hingegen bei Non-Respondern (88, 89).

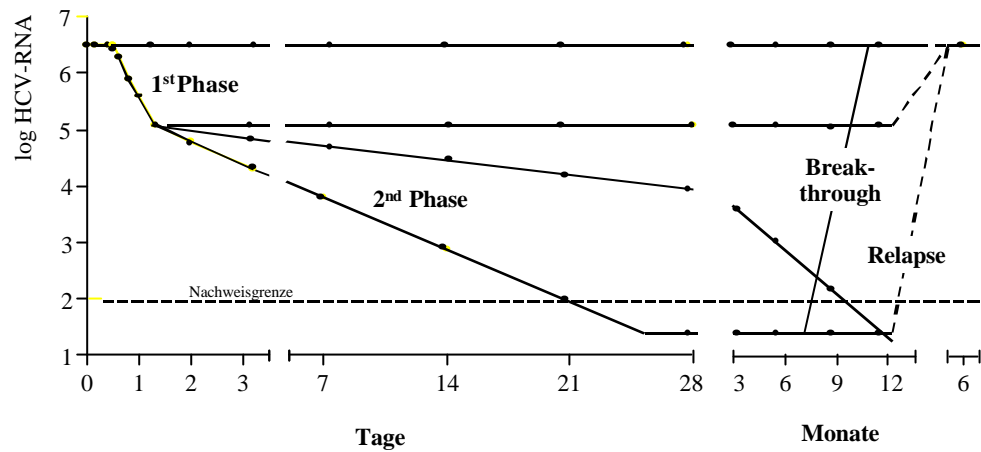


Abb. 4. Mathematisches Modell der Kinetik der Hepatitis C Virämie unter Interferon-alpha Therapie.

Warum Patienten mit chronischer Hepatitis C ein unterschiedliches IFN α -Responseverhalten zeigen, ist ungeklärt, und mehr als nur eine Ursache dürfte für diese Tatsache verantwortlich sein. Virologische Faktoren spielen hierbei sicher eine besondere Rolle, wie das unterschiedliche Responseverhalten der verschiedenen HCV-Genotypen beweist. Enomoto und Mitarbeiter waren die ersten, die versucht haben, HCV-genomische Regionen zu identifizieren, die mit der IFN α -Response korrelieren (90, 91). Die Autoren konnten zeigen, dass ≥ 4 Aminosäure-Mutationen innerhalb des carboxyterminalen Bereichs des NS5A-Proteins (Kodon 2209-2248) (= sog. „mutant type“, im Gegensatz zur HCV-1b Prototyp-Sequenz [HCV-J; = Wildtyp]), signifikant mit einer anhaltenden Response bei HCV-Genotyp 1b-infizierte Patienten korreliert waren (90-93). Diese Region wurde daraufhin die Interferon-Sensitivitäts-determinierende Region (ISDR) genannt (91). In ersten Studien aus Europa und USA konnten diese Assoziation jedoch zunächst nicht bestätigt werden (94-96).

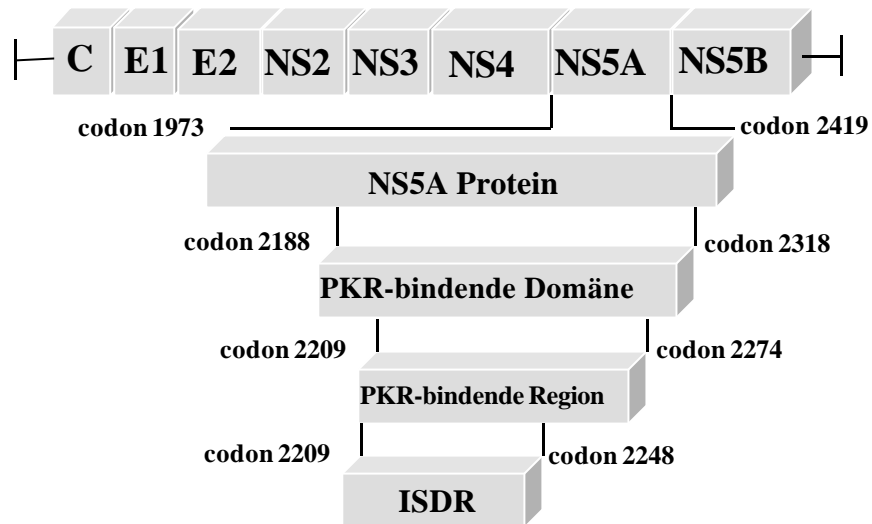


Abb. 5 Schematische Darstellung des NS5A-Proteins mit PKR-bindenden Domäne sowie PKR-bindenden Region und der von Enomoto und Mitarbeitern beschriebenen Interferon-Sensitivitäts-Determinierenden Region (ISDR). Die Anzahl der Mutation innerhalb der ISDR bei HCV-Genotyp 1b-Isolaten hat Relevanz für das Therapieansprechen (90, 91).

Die antivirale Wirkung von IFN α wird durch die Induktion der Transkription verschiedener antiviraler Gene vermittelt einschließlich der Doppelstrang-RNA-abhängigen Proteinkinase (PKR), die die Proteinsynthese durch Phosphorylierung des Translations-Initiationsfaktors eIF2 α hemmt (78). Viele Viren haben Strategien entwickelt, um den antiviralen Effekten der IFN α -induzierten Effektorproteine (z.B. der PKR) zu entgehen. Gale und Mitarbeiter konnten auf der Suche nach einer Erklärung für die oben genannten Beobachtungen von Enomoto zeigen, dass das Wildtyp-ISDR-Protein die PKR funktionell hemmen kann, jedoch Mutationen innerhalb der ISDR diese Interaktion aufheben (97-99). Die Autoren konnten weiter zeigen, dass die ISDR (NS5A2209-2248) zwar notwendig aber nicht ausreichend für die Interaktion zwischen NS5A und PKR ist. Die Region zwischen Kodon 2209 und 2274 konnte im Folgenden als die komplette PKR-bindende Region des NS5A-Proteins identifiziert werden (99) (Abb.5 und 6).

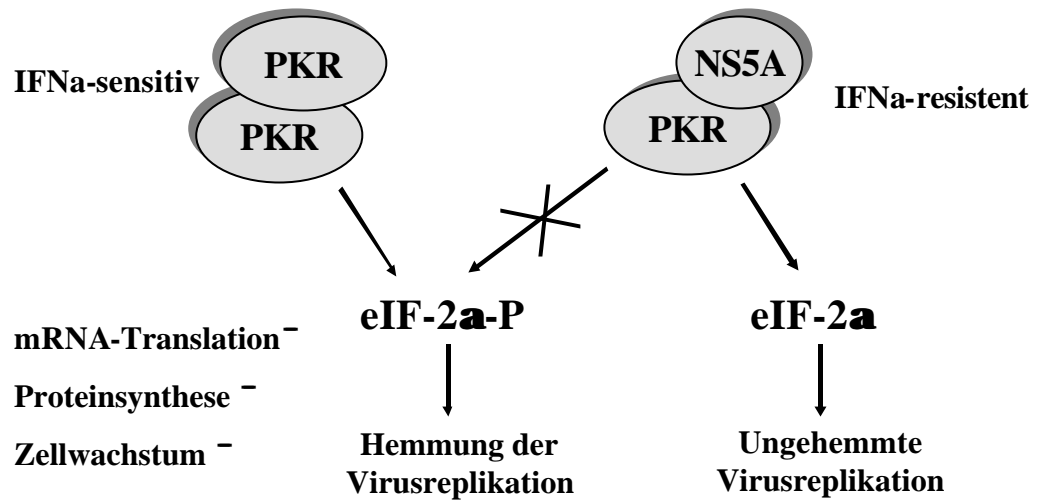


Abb. 6: Hemmung der Proteinkinase (PKR)-vermittelten anti-viralen Wirkung von Interferon-Alpha (IFN α) durch das Hepatitis C Virus (HCV)-NS5A-Protein (nach 99).

Die Expression der Doppelstrang-RNA-abhängigen Proteinkinase (PKR) wird vorwiegend durch Interferon-alpha/beta stimuliert. Nach Bindung der PKR an Doppelstrang-RNA kommt es intrazellulär zu einer Aktivierung der PKR durch Autophosphorylierung. Die aktivierte PKR phosphoryliert den Initiationsfaktor der Proteinbiosynthese (eIF2 α) an der α -Untereinheit. Normalerweise hat eIF-2 α die zentrale Aufgabe, Met-tRNA zur 40S-Untereinheit des Ribosoms zu transportieren und damit die Translation zu initiieren. Dabei wird jeweils an eIF-2 α -gebundenes GDP durch GTP mit Hilfe des Enzyms eIF2B ausgetauscht. Durch die Phosphorylierung von eIF-2 α entsteht jedoch ein inaktiver Komplex aus eIF2-GDP und eIF2B am Ribosom, der die Translation inhibiert. Es scheint dabei eine relative Selektivität für die Hemmung der viralen Translation zu bestehen, da einige wichtige zelluläre Proteine weiter exprimiert werden. Das NS5A-Protein von HCV-Genotyp 1-Isolaten besitzt eine Bindungsstelle für die Dimerisationsdomäne der PKR. Diese Bindung führt zu einer Inhibition der PKR und damit ungehemmten Translation der Virusproteine und Virusreplikation. Verschiedene Mutationen im NS5A-Protein verhindern in vitro die Bindung an die PKR. Interessant sind daher die Untersuchungen, dass die Zahl der Mutationen innerhalb der PKR-Bindungsregion des NS5A-Protein mit dem Ansprechen auf die Interferontherapie korreliert sind (90, 91).

eIF-2 α = Translations-Initiationsfaktor, P = Phosphorylierung.

Taylor und Mitarbeiter haben kürzlich ein 12 Aminosäuren großes Fragment innerhalb des HCV-Hüllproteins E2 identifiziert, das eine hohe Sequenzhomologie zu der Autophosphorylisationsstelle der PKR und der Translations-Initiationsfaktor (eIF2 α)-Phosphorylisationsstelle aufweist (Abb. 7) (100). Diese Region wurde als PKR-eIF2 α Phosphorylisations-Homologie-Domäne (PePHD) bezeichnet. Die Autoren zeigten, dass die PePHD von HCV-Genotyp 1-Isolaten, nicht jedoch von Typ 2 und 3-Isolaten, *in vitro* die PKR hemmt und dadurch ihre inhibitorischen Effekte auf die Proteinbiosynthese und das Zellwachstum aufhebt. Diese Daten lassen vermuten, dass HCV auf 2 Ebenen, nämlich NS5A und E2, über eine Interaktion mit den IFNa-induzierten Signaltransduktions-Pathway die antiviralen Effekte von IFNa umgehen kann.

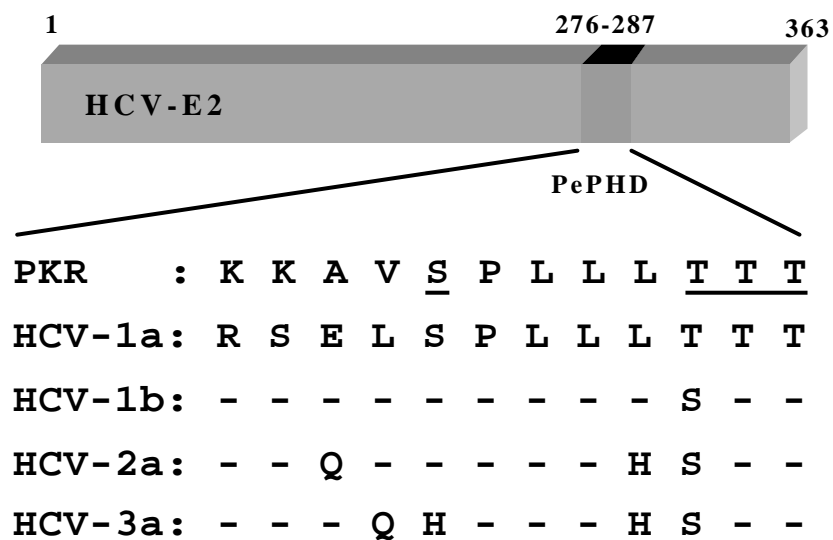


Abb 7. Schematische Darstellung der HCV-E2-Region mit der PKR-eIF2 α -Phosphorylierungs-Homologie-Domäne (PePHD). Dargestellt ist außerdem die homologe Aminosäuresequenz im Bereich der Autophosphorylisationsregion der PKR sowie die E2-Sequenz unterschiedlicher HCV-Isolate. Nur HCV-Genotyp 1-Isolate zeigen eine signifikante Aminosäuresequenz-Homologie zur PKR führten *in vitro* zu einer Inhibition der PKR (nach 100).

Für die Therapie der chronischen Hepatitis C sind bisher zwei rekombinant hergestellte alpha-Interferone, IFNa-2a (Roferon A[®], Hoffmann-La Roche) und IFNa-2b (Intron A[®], Essex-

Pharma) für die subcutane Applikation zugelassen. Consensus Interferon ist ebenfalls ein synthetisches Typ-1 Interferon und ist in Deutschland als Inferax[®] (Yamanouchi) in Dosierungen von 9 µg 3 x pro Woche s.c. für die Therapie der chronischen Hepatitis C zugelassen. Es setzt sich aus den jeweils am häufigsten vertretenen Aminosäuren der verschiedenen bekannten alpha-Interferone zusammen und enthält somit die Consensus-Sequenz der bekannten Typ-1 Interferone. Dieses sogenannte Consensus-Interferon ist zu 89% mit Interferon-alpha-2b identisch (101). Natürliches Interferon-alpha wird aus humanen lymphoblastoiden Zellkulturen gewonnen und enthält eine Mischung aus bis zu 20 der natürlich vorkommenden alpha-Interferone, die im Gegensatz zu den rekombinanten Interferonen zum Teil auch glykosyliert sind (102). Natürliches IFNa ist bisher nicht für die Therapie der chronischen Hepatitis C zugelassen.

Ein wesentlicher Fortschritt bei der Therapie der chronischen Hepatitis C stellt die Entwicklung der pegylierten Interferone (PEG-IFNa) dar. Durch die Kopplung von Polyethylenglykol an das rekombinante Interferon-alpha wird eine bis zu 10-fache Verlängerung der Halbwertszeit erreicht, so daß eine einmal wöchentliche Gabe ausreichend ist, um einen konstanten IFNa-Serumspiegel aufrecht zu erhalten.

Die Pegylierung therapeutischer Proteine (z.B. IFNa) hat folgende Vorteile:

- "Depoteffekt"
 - Verzögerung der Proteolyse
 - Verlängerung der Halbwertszeit $t_{1/2}$
 - Verzögerung der renalen Clearance
- Erhöhung der Substanzstabilität
- konstant verlängerte Wirkspiegel
- Verbesserung der Compliance (1x Gabe pro Woche)

Derzeit existieren 2 PEG-Interferone, die sich hinsichtlich Aufbau, Molekulargewicht, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik voneinander unterscheiden. PEG-Interferon-alfa-2b (PegIntron[®], Essex Pharma) ist inzwischen in Deutschland für die Therapie der chronischen Hepatitis C zugelassen. Die Zulassung von PEG-Interferon-alfa-2a (PEGASYS[®], Hoffmann-La Roche) wird 2002 erwartet.

2.6 Interferon-alpha-Therapie bei chronischer Hepatitis C

1986 wurden erstmals Patienten mit chronischer Non-A-Non-B-Hepatitis mit Interferon alfa (IFNa) behandelt. In dieser kleinen Gruppe kam es bei den meisten Patienten unter der Therapie zum Rückgang oder zur Normalisierung der Transaminasen (103). Mit der Entdeckung des HCV

und der Entwicklung diagnostischer Tests ließen sich die Patienten mit chronischer Hepatitis Non-A, Non-B bis auf eine kleine Restgruppe der chronischen Hepatitis C zuordnen. Daraufhin wurden zahlreiche randomisierte, kontrollierte Studien zur Behandlung der chronischen Hepatitis C mit IFNa durchgeführt, die übereinstimmend die Effektivität der IFNa-Therapie bei chronischer Hepatitis C belegten (104-110). Die publizierten Studien zur IFNa-Therapie der chronischen Hepatitis C haben in folgenden Punkten zu weitgehend übereinstimmenden Ergebnissen geführt:

1. Die Dosierung des IFN- a mit 3 x 5 bzw. 6 Mio. IE. pro Woche ist einer initialen Dosis von 3 x 3 Mio IE. überlegen und zeigte initiale Responder-Raten bis ca. 50 % und anhaltende Remissionen von < 20 %.
2. Eine Therapiedauer von 12 Monaten war einer kürzeren Therapiedauer, z.B. von 6 Monaten, überlegen.
3. Patienten mit anhaltender Response pflegen innerhalb der ersten drei Monate nach Therapiebeginn die Transaminasen zu normalisieren und HCV-RNA negativ zu werden.

2.7 Ribavirin bei chronischer Hepatitis C

Ribavirin (1-β-D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamid) gehört in die Gruppe der Nucleosidanaloga (Guanosin-Analogen) und besitzt ein relativ breites Wirkungsspektrum gegenüber einer Vielzahl von RNA- und DNA-Viren (111, 112). Als Wirkmechanismus des Ribavirins werden eine Depletion des intrazellulären Guanosin-Nucleotidpools durch Hemmung der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase und eine Hemmung der viralen RNA-abhängigen Polymerase diskutiert (113, 114). Der Wirkungsmechanismus von Ribavirin bei Patienten mit chronischer Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion ist jedoch unbekannt. Mehrere kontrollierte Studien, in denen Ribavirin als Monosubstanz in einer Dosierung von 1000-1200 mg per os täglich zur Therapie der chronischen Hepatitis C eingesetzt worden ist, zeigten zwar, daß sich unter dieser Therapie in ca. 30 % der behandelten Patienten die Transaminasen normalisierten, die Hepatitis C Virämie jedoch unbeeinflusst blieb (115-119).

2.8 Amantadin bei chronischer Hepatitis C

Amantadin (1-aminoadamantanamine) ist ein synthetisches trizyklisches Amin mit gut charakterisierter antiviraler Wirkung gegen Influenza A Virus (121). Der molekulare Wirkungsmechanismus beruht in erster Linie auf einer Inhibition der Frühphase der Virusreplikation, wahrscheinlich dem Virus „Uncoating“. (122, 123). Die antivirale Aktivität von Amantadin bei Patienten mit chronischer Hepatitis C ist bisher nicht charakterisiert. Eine dosisabhängige Hemmung der HCV-Replikation in kultivierten mononukleären Zellen (PBMC) von HCV-infizierten Patienten durch Amantadin wurde beschrieben (124). Eine erste klinische Pilot-

Studie zur Amantadin-Monotherapie bei IFNa-Nonresponder-Patienten mit chronischen Hepatitis C zeigte vielversprechende Ergebnisse mit virologischen Ansprechraten von ca. 20% (120). In der Folge wurden zahlreiche Studien zur Amantadin Mono- oder Kombinationstherapie sowohl bei unvorbehandelten als auch vorbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C durchgeführt, die widersprüchliche Ergebnisse lieferten. (125-133).

2.9 Kombinationstherapie (Interferon-alpha + Ribavirin) bei chronischer Hepatitis C

In einer ersten Pilotstudie zeigte sich 1994 ein günstiger Effekt der Kombination IFNa plus Ribavirin (Brillanti). Inzwischen belegen umfangreiche kontrollierte Studien die Überlegenheit der Kombinationstherapie gegenüber der IFNa-Monotherapie (134-138). Die Kombinationstherapie ist seit 1999 in Deutschland zugelassen und stellt heute die Standard-Therapie der chronische Hepatitis C dar.

Bei 1-jähriger Kombinationstherapie mit 3 x 3 Mio Einh. IFNa pro Woche plus 1000-1200 mg Ribavirin per os täglich können anhaltende Remissionen in bis zu 41 % erreicht werden. Abb. 8 faßt die Ergebnisse der beiden größten Multizenterstudien mit 1744 Patienten zusammen (136, 138). Aus diesen Studien geht eindeutig hervor, daß die bis dahin vor allem in den USA übliche Standardtherapie der chronischen Hepatitis C mit 3 x 3 Mio. Einh. IFNa pro Woche über 6 Monate kaum wirksam ist und auch eine Verlängerung der IFNa-Monotherapiedauer auf 1 Jahr mit 16 % anhaltenden Remissionen nur unbefriedigende Ergebnisse liefert. Außerdem zeigte sich mit der Kombination, daß, entgegen den bisherigen Erfahrungen mit der Monotherapie, auch nach Monat 3 der Therapie noch eine HCV-RNA Negativierung eintreten kann. Ca. 10 % der kombiniert behandelten Patienten mit anhaltender Remission wurden erst jenseits der 3-monatigen Kombinations-Therapie HCV-RNA negativ. Die Entscheidung zum Therapieabbruch wegen virologischer Nonresponse (HCV-RNA im Serum weiterhin positiv) wird zur Zeit daher bei Kombinationstherapie erst nach 6-monatiger Therapiedauer getroffen.

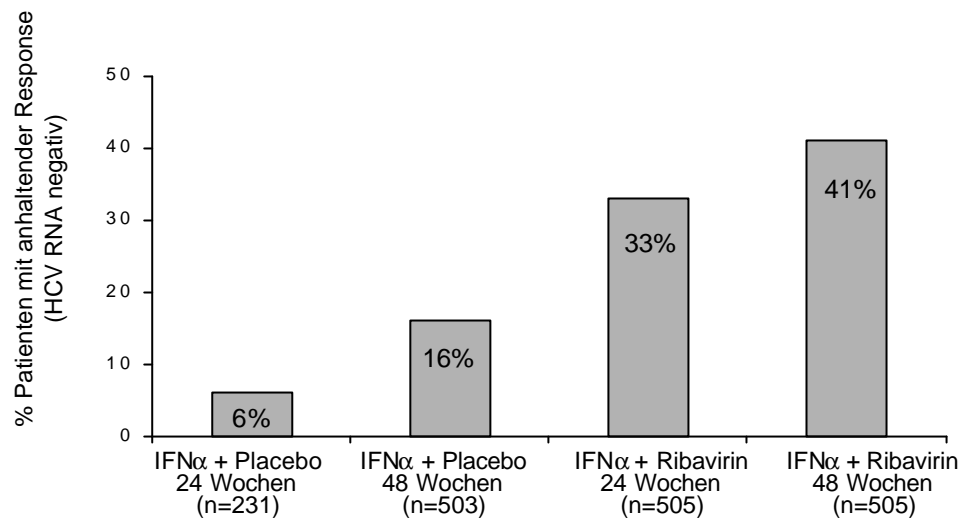


Abb. 8: Anhaltende virologische Responderaten nach Kombinationstherapie (24 bzw. 48 Wochen) mit IFN α -2b plus Ribavirin (1000-1200 mg/Tag) im Vergleich zu einer IFN α -Monotherapie (3 x 3 Mio. E/Woche; 24 bzw. 48 Wochen) bei unvorbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C (n=1744; nach 136 und 138).

2.10 Therapie der chronischen Hepatitis C mit pegylierten Interferonen (PEG-IFN α)

Die bisher publizierten Langzeitergebnisse zur Therapie der chronischen Hepatitis C mit PEG-IFN α sind in den Abb. 9 und 10 dargestellt. Hieraus geht eindeutig die verbesserte Wirksamkeit der PEG-IFN α gegenüber der Standard-IFN α Therapie hervor, die zu einer Verdopplung der anhaltenden Responderaten führt (139-142). Die verbesserte antivirale Wirkung der PEG-IFN α ist in erster Linie eine Folge der konstanten IFN α -Wirkspiegel, die, im Gegensatz zu den Standardinterferonen, zu einer kontinuierlichen Suppression der Hepatitis C Virämie führen. Vergleichende Untersuchungen zwischen PEG-IFN α -2a und -2b existieren bisher nicht.

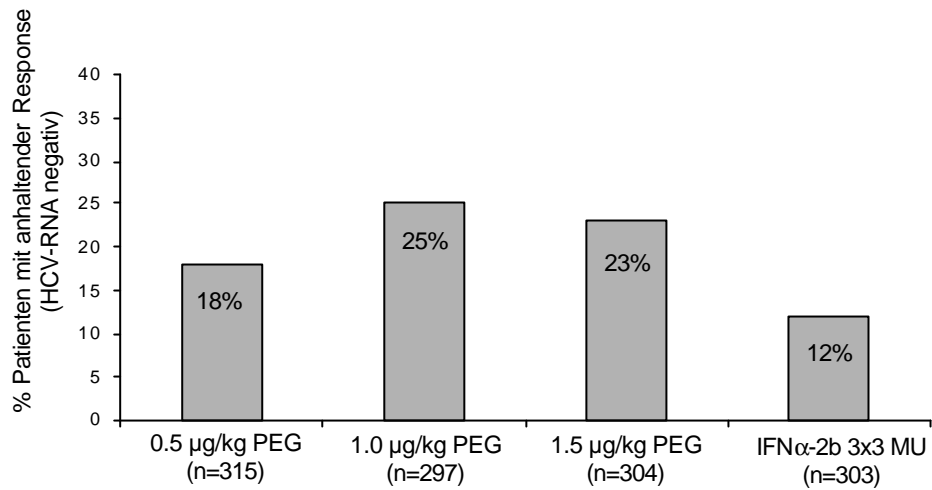


Abb. 9: Anhaltende virologische Responseraten nach PEG-IFNα-2b-Therapie in unterschiedlichen Dosierungen über 48 Wochen im Vergleich zu Standard-IFNα (IFNα-2b) bei unvorbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C (nach 139).

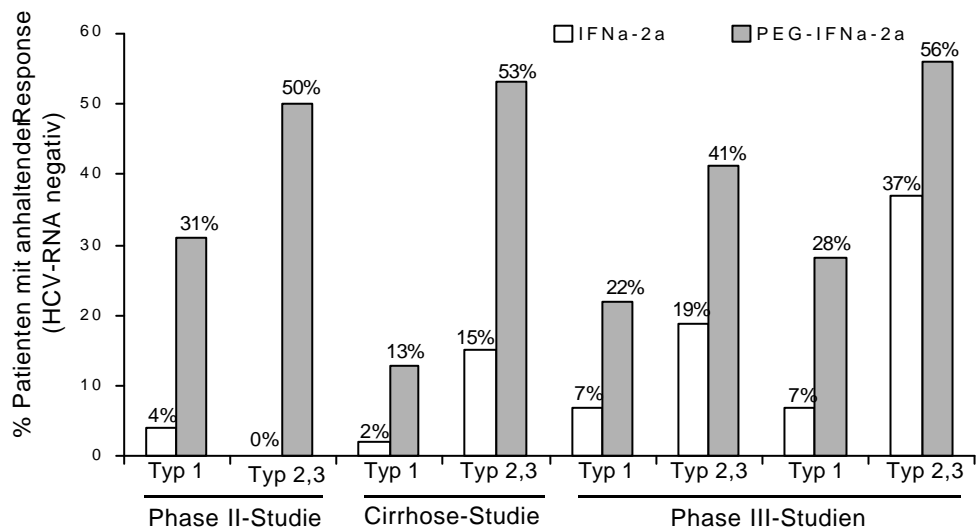


Abb. 10: Anhaltende virologische Responseraten nach PEG-IFNα-2a-Therapie (180 µg/Woche) im Vergleich zu Standard-IFNα (IFNα-2a) bei unvorbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C (n=1596, nach 140, 141).

Für die Kombinationstherapie von Ribavirin und PEG-IFNa wurden kürzlich erste Daten präsentiert, die in Analogie zur Standard-IFNa-Kombinationstherapie eine Steigerung der Remissionsraten zeigen (Abbildung 11) (143-145). Es zeichnet sich daher schon jetzt ab, daß die PEG-IFNa-Ribavirin Kombinationstherapie den neuen Standard in der Therapie der chronischen Hepatitis C darstellen wird.

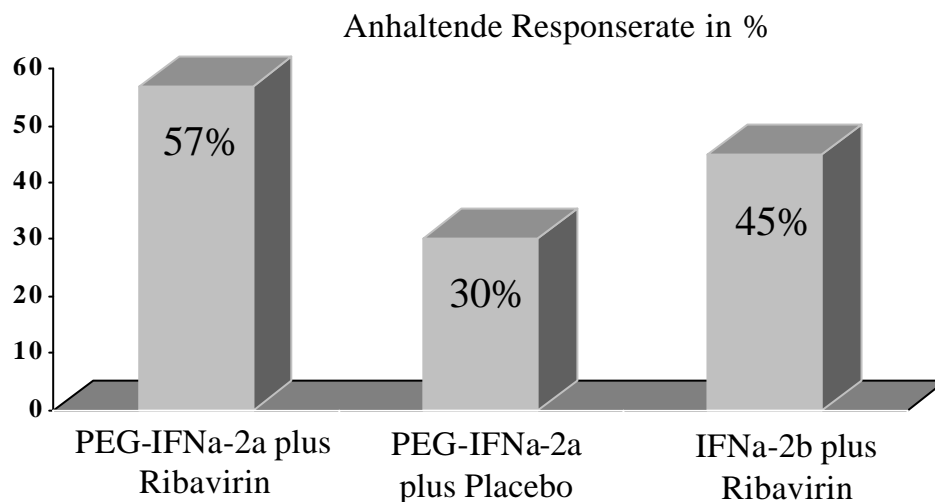


Abb. 11: Therapie der chronischen Hepatitis C mit PEG-IFNa-2a plus Ribavirin im Vergleich zur PEG-IFNa-2a-Monotherapie bzw. Standard-IFNa-Kombinationstherapie (n=1121) (unveröffentlichte Daten).

2.11 Definition der Response

Das Response-Verhalten auf eine antivirale Therapie mit IFNa mit oder ohne Ribavirin orientiert sich nach derzeitigem Stand weniger an den Transaminasen (biochemische Response) als vielmehr an der HCV-RNA im Serum (virologische Response) im zeitlichen Ablauf. Die verschiedenen Formen der Response sind exemplarisch in Abb. 12 dargestellt. Ziel der antiviralen Therapie ist, eine anhaltende virologische Response zu induzieren. Um von einer anhaltenden Response sprechen zu können, ist eine Nachbeobachtung von mindestens 6 Monaten notwendig. Sofern die Transaminasen durchgehend im Normbereich geblieben sind und die PCR zum Nachweis von HCV-RNA stets negativ war, darf von einer anhaltenden Response ausgegangen werden. Nonresponder sind als Patienten definiert, die unter einer mindestens 3-monatigen IFNa-Monotherapie bzw. 6-monatigen Kombinationstherapie nicht HCV-RNA negativ geworden sind.

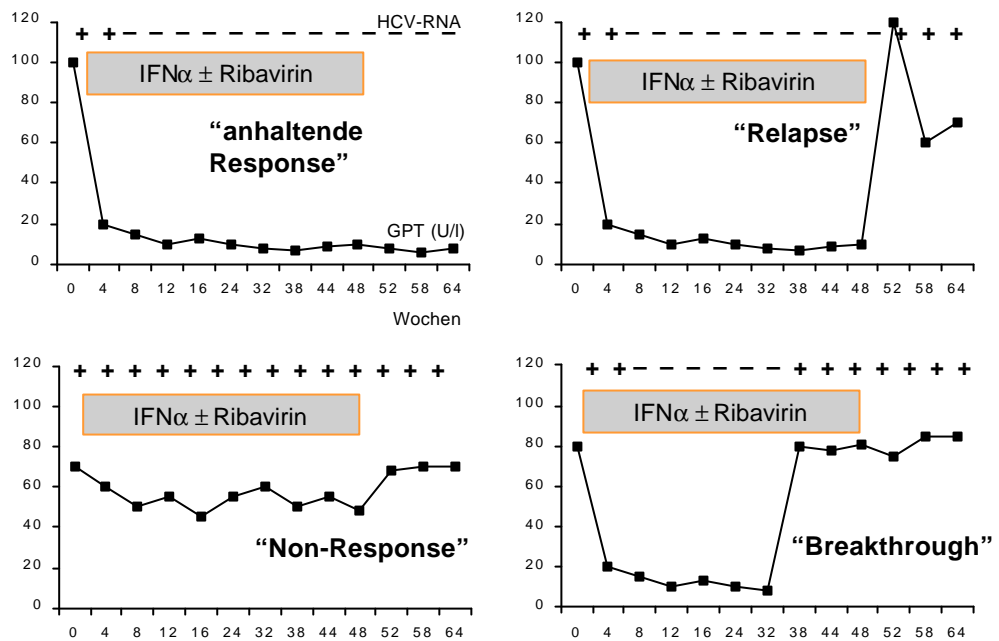


Abb. 12: Formen der Interferon-Response bei chronischer Hepatitis C.

2.12 Prognostische Faktoren für das Therapieansprechen bei chronischer Hepatitis C

Die Ursachen und Mechanismen für das unterschiedliche Responseverhalten von Patienten mit chronischer Hepatitis C auf die Interferon-Therapie sind bis heute unbekannt. Unter den Faktoren, die eine prognostische Relevanz hinsichtlich des Ansprechens auf eine antivirale Therapie haben, kann zwischen Wirtsfaktoren und viralen Faktoren unterschieden werden (Abb. 13). Auch die Höhe der Medikationsdosis und die Therapiedauer haben prognostische Bedeutung (146-152).

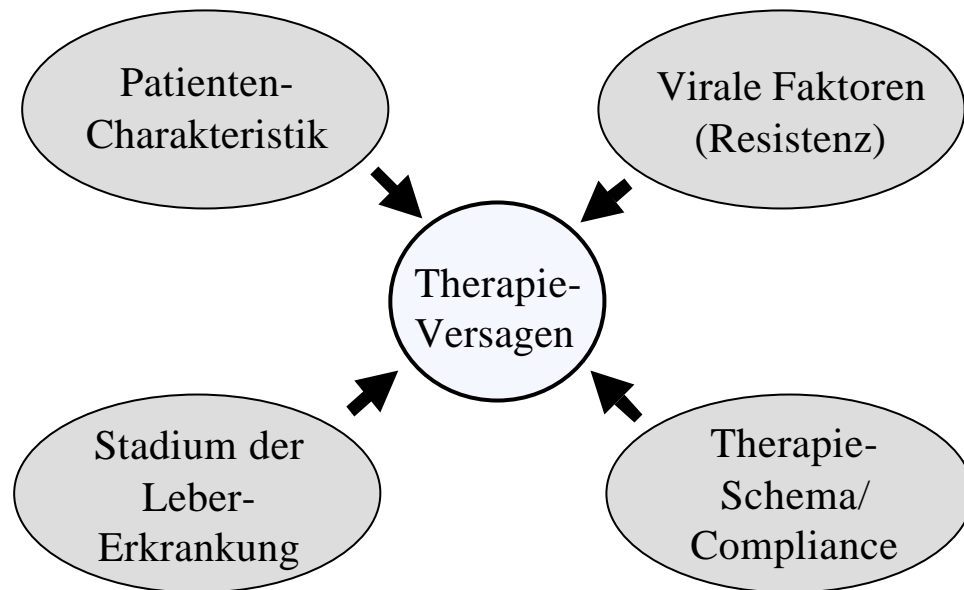


Abb. 13. Faktoren, die das Therapieansprechen beeinflussen.

Therapeutisch relevante, unabhängige prognostische Faktoren für die IFN α -Therapie bei chronischer Hepatitis C konnten im Rahmen der internationalen Multizenter-Studien zur Kombinationstherapie definiert werden (136, 138).

Prognostisch günstig sind:

- HCV-Genotyp 2 und 3-Infektion
- HCV-RNA < 2 Mio Kopien/ml (SuperquantTM von NGI) bzw. < 800.000 IU/ml
- Alter < 40 Jahre
- Weibliches Geschlecht
- Geringer Fibrosegrad in der Leberhistologie

Wenngleich durch die etablierten prognostischen Parameter eine Abschätzung der wahrscheinlichen Therapieresponse möglich ist, so kann keiner der prognostischen Parameter im Einzelfall eine Response oder Nonresponse verlässlich voraussagen. Die Aufdeckung der Mechanismen der Interferon-Response bzw. der Interferon-Resistenz ist daher eines der zentralen Forschungsthemen auf dem Gebiet der chronischen Hepatitis C. Hierbei ist vor allem die Bedeutung Virus-genomischer Merkmale („Response-Motifs“) für das Therapieansprechen von Interesse (90, 91, 100).

2.13 Neue Hepatitis-assoziierte Viren

Mit der Entdeckung des Hepatitis-C-Virus (HCV) konnte die Ursache von über 90% der bis dahin als Non-A, non-B bezeichneten Hepatitiden geklärt werden. Es verbleibt eine Gruppe von posttransfusionell und sporadisch (d.h ohne erkennbaren Übertragungsweg) vorkommenden, akuten und chronischen Hepatitiden, die keinem der bisher bekannten Hepatitisviren zugeordnet werden können (Tabelle 2) (153-155). Man vermutet daher, daß weitere Hepatitisviren existieren, die für die sogenannte Non-A-E-Hepatitis verantwortlich sind.

Tabelle 2: Häufigkeit von akuten und chronischen Lebererkrankungen unklarer Ätiologie

Lebererkrankung	Häufigkeit in %
Akute Hepatitis Non-A-E	3%
Akute Post-Transfusions-Hepatitis Non-A-E	16%
Fulminante Hepatitis Non-A-E	40%
Chronische Hepatitis Non-A-E	10%
Cryptogene Cirrhose	5-10%

2.14 GB-Virus C/ Hepatitis G Virus

1995 sind unabhängig voneinander zwei neue Viren entdeckt worden, das GB Virus C (GBV-C) und Hepatitis G Virus (HGV), die als mögliche Ursache akuter und chronischer Hepatitiden unklarer Ätiologie angesehen wurden (156, 157). Die Entdeckung des GBV-C geht auf Studien aus den sechziger Jahren von F. Deinhardt und Mitarbeitern zurück. Die Arbeitsgruppe um Deinhardt inokulierte Tamarins (kleine Primaten) mit Plasma eines an akuter Hepatitis (Non-A-C) erkrankten Chirurgen (mit den Initialien GB). Die Inokulationen führten bei den Tamarins zu einer Hepatitis. Mehrere Passagen in Nicht-Menschen-Affen zeigten, daß es sich um ein übertragbares Agens handelt, welches das „GB-Agens“ genannt wurde. Aus dem Plasma infizierter Tamarins gelang es 1995 Wissenschaftlern der Firma Abbott, zwei neue Viren zu isolieren, die als GB-Virus-A (GBV-A) und GBV-B bezeichnet wurden (158-160). GBV-A führt zu einer persistierenden, nicht-pathogenen Infektion bei verschiedenen Neue-Welt Nicht-Menschenaffen, während GBV-B bei diesen Affen eine Hepatitis induzieren kann. Durch Genamplifikation mittels Primer von gemeinsamen Sequenzen des GBV-A, GBV-B und HCV gelang schließlich die Isolation eines neuen humanen Virus, das GBV-C.

Zur gleichen Zeit isolierten Forscher der Firmen Genelabs/ Boehringer Mannheim in Zusammenarbeit mit den Centers of Disease Control aus dem Plasma eines Patienten mit chronischer Hepatitis ein neues Virus, das als Hepatitis-G-Virus (HGV) bezeichnet wurde (157). Sequenzanalysen des GBV-C- und HGV-Genoms zeigten eine Homologie auf der Nukleotidebene von 85% und auf der Aminosäureebene von 95%, so daß es sich bei den neu entdeckten Viren um Isolate oder Genotypen derselben Virusspezies handelt.

2.15 Genom-Organisation des GBV-C/HGV

GBV-C enthält ein Einzel-(+)-Strang RNA Genom von ca. 9.400 Nucleotiden Länge (161). Aufgrund seiner Genomorganisation und Länge wird es der Familie der Flaviviridae zugeordnet zu welcher auch das Hepatitis C Virus gehört (Tabelle 1) (Abbildung 14). Das GBV-C Genom enthält einen langen offenen Leserahmen (ORF) der für ein Polyprotein von 2842-2933 Aminosäuren kodiert. Der ORF hat eine variable Länge, da er in Abhängigkeit vom Isolat an unterschiedlichen Stellen „upstream“ des Signalpeptids für E1 beginnt. Ein Kapsid (core-Protein), wie man es von den anderen Flavivirin kennt, konnte bisher bei GBV-C Isolaten nicht gefunden werden. Diese Eigenart teilt das GBV-C mit dem GBV-A. Das hepatotrope GBV-B hat jedoch wie das HCV ein Nukleokapsidprotein.

Eine Unterteilung von GBV-C/HGV in mindestens fünf Genotypen bzw. Subtypen wurde aufgrund von phylogenetischen Sequenzanalysen verschiedener Virusisolate vorgeschlagen. Danach finden sich der Subtyp 1a und 1b vornehmlich in Westafrika, der Subtyp 2a und 2b in Nordamerika und Europa sowie der Genotyp 3 überwiegend in Südost-Asien (162).

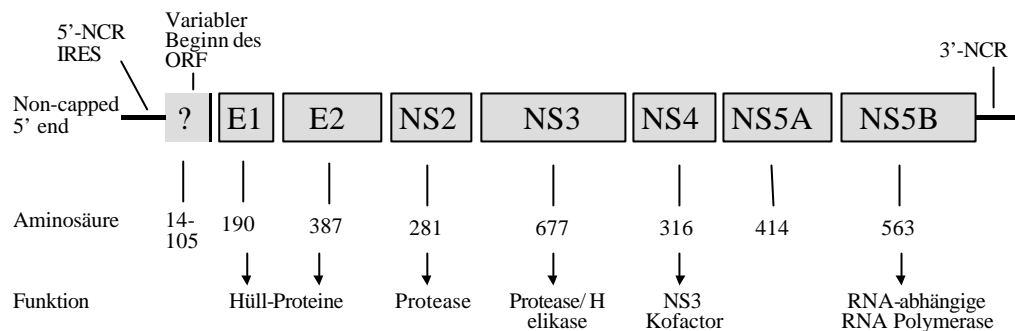


Abb. 14. Genomorganisation des GB-Virus-C/ Hepatitis G-Virus (nach 161).

2.16 TT-Virus (TTV)

Im Dezember 1997 wurde von japanischen Forschern ein neues DNA Virus, das TT-Virus (TTV), im Serum eines Patienten (mit den Initialien T.T.) mit anakterischer selbstlimitierender akuter Posttransfusions-Hepatitis unklarer Ätiologie (Non-A-G) identifiziert (163, 164). Im folgenden konnten TTV-Sequenzen bei mehr als 45% der Patienten fulminanter Hepatitis oder chronischer Lebererkrankung und auch bei Patienten mit parenteralen Risikofaktoren (Hämodialyse, Patienten mit Hämophilie, i.v-Drogenabhängige) gefunden werden (163, 164). Die Autoren folgerten, dass TTV neben GBV-C/HGV ein weiteres Kandidaten-Virus für akute und chronische Hepatitiden unklarer Ätiologie darstellen könnte.

2.17 Genom Organisation

TTV ist ein hüllenloses, Einzelstrang-DNA-Virus welches eine geschlossene zirkuläre DNA von 3.852 Nukleotiden Länge enthält, das für 2 offene Leserahmen von ca. 761-770 und 150-156 Aminosäuren kodiert (Abbildung 15). Das Virus hat einen Partikel-Durchmesser zwischen 30 and 50 nm (163-166). TTV zeigt Ähnlichkeiten mit der Familie der Circoviridae, Viren die Pflanzen und Wirbeltiere (z.B. Schweine, Vögel) infizieren. Sequenz-Homologie-Suchen in den vorhandenen Gen-Datenbanken konnten allerdings bisher keine Identitäten zwischen TTV und anderen bekannten Viren herstellen. Mushahwar und Mitarbeiter haben daher vorgeschlagen, TTV als ein

Mitglied einer neuen Virusfamilie, vorläufig bezeichnet als Circinoviridae, zu klassifizieren (166). Phylogenetische Analysen zeigten, dass TTV eine extrem weite Sequenz-Divergenz besitzt und daher in bis zu 16 Genotypen eingeteilt werden kann (168-173). Komplette Sequenzanalysen von 4 verschiedenen TTV-Isolaten wurden bisher publiziert: TA278 (164), GH1 (166), TUS01 (168) und SANBAN (167). GH1-, TUS01- und SANBAN-Isolate haben auf der Nukleotidsequenz-Ebene eine Homologie mit dem japanischen Prototyp-Isolat TA278 von nur 93%, 60,5%, and 56.7%. Aufgrund dieser ausgeprägten genetischen Diversität stellen einige TTV-Isolate eher eine neue TTV-ähnliche Virusspezies bzw. Genus als einen TTV-Genotyp dar (166).

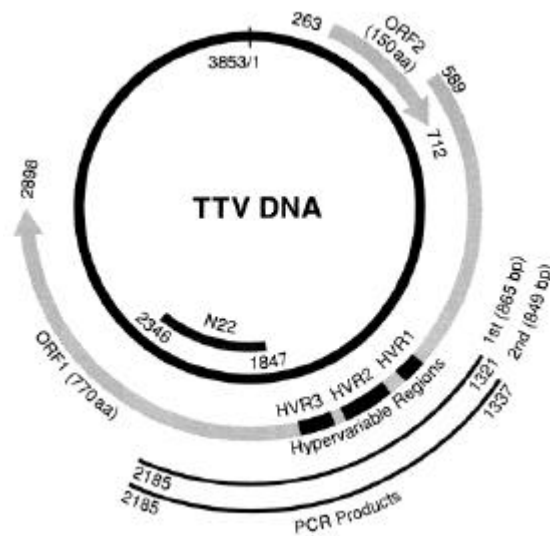


Abb. 15. Genomorganisation des TT-Virus (nach 172).

3 Eigene Arbeiten

Die eigenen Untersuchungen beschäftigen sich vor allem mit unterschiedlichen Aspekten bei der Therapie von Patienten mit chronischer Hepatitis C. Hierbei stehen zunächst Studien zur Evaluation verschiedener Therapiestrategien und antiviraler Substanzen im Vordergrund. Die Arbeiten schliessen dabei bisher unvorbehandelte Patienten als auch solche Patienten ein, die keine Response auf eine Interferontherapie gezeigt hatten. Der Langzeitverlaufsdokumentationen der Patienten gilt dabei besonderes Interesse. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen haben wesentlich zum Verständnis des Therapieansprechens bei Patienten mit chronischer Hepatitis C beigetragen und lieferten außerdem Erkenntnisse über relevante prognostische Parameter für das Therapieansprechen. Analysen zur Dynamik der Hepatitis C Virämie unter antiviraler Therapie ermöglichten Einsichten über die Mechanismen der antiviralen Therapie und bilden zudem die Grundlage für eine an die individuellen Bedürfnisse des Patienten angepasste Therapie.

Die Erforschung von Mechanismen der Nonresponse auf die antivirale Therapie bilden einen weiteren Hauptaspekt der vorliegenden Habilitationsschrift. Die Arbeiten geben einen Einblick über mögliche molekulare Mechanismen der Therapieresponse bzw. Nonresponse und über den Stellenwert von Interaktionen bestimmter HCV-Proteine (NS5A, E2) mit den Interferon-alpha-induzierten Effektorproteinen. Außerdem wurde die Bedeutung der Antikörperbildung gegen rekombinantes Interferon-alpha als mögliche Ursache des Versagens der antiviralen Wirkung untersucht.

Einfluß der GBV-C/HGV-Infektion mit den neuen Hepatitis-assoziierten Viren (GBV-C/HGV und TTV) für den Verlauf der chronischen Hepatitis C und das Therapieansprechen:

Umfangreiche Untersuchungen beschäftigen sich zunächst mit der phylogentischen Analyse der GBV-C/HGV- und TTV-Isolate und der Charakterisierung der GBV-C/HGV- bzw. TTV-Infektion. Im Vordergrund steht hierbei die Frage, inwieweit es sich bei diesen neu entdeckten Viren tatsächlich um Hepatitisviren handelt und inwieweit genotypische Unterschiede einen Einfluß auf den Infektionsverlauf haben. Die Auswirkungen der GBV-C/HGV bzw. TTV-Koinfektionen auf den Verlauf der chronischen Hepatitis C und vor allem auf das Ansprechen der antiviralen Therapie waren hierbei von besonderem Interesse.

3.1.1 Kinetik der Hepatitis C-Replikation

Die 1996 veröffentlichte Arbeit zeigte erstmals, dass die Hepatitis C Virionen im Serum einem extrem hohen „turn-over“ unterliegen mit einer Halbwertszeit von nur ca. 2-3 h. Zusätzlich belegten die Daten, dass die HCV-Replikation vornehmlich intrahepatisch stattfindet und die angenommenen extrahepatischen HCV-Replikationsorte (z.B. Lymphozyten, Milz, Knochenmark)

keine Rolle bei der Aufrechterhaltung einer nachweisbaren Virämie spielen. Untersuchungen zur Viruskinetik unter antiviraler Therapie konnten die eigenen Daten bestätigen und stellen heute die Basis für das Verständnis der Interferonwirkungen bei chronischer Hepatitis C dar. (Fukumoto T, Berg T, Ku Y, Bechstein WO, Knoop M, Lemmens HP, Lobeck H, Hopf U, Neuhaus P. *Viral dynamics of hepatitis C early after orthotopic liver transplantation: evidence for rapid turnover of serum virions. Hepatology* 1996; 24: 1351-1354).

3.1.2 Klinische Relevanz der HCV-Genotypen

Diese Arbeiten beschäftigen sich mit der Bedeutung der HCV-Genotypen für den Verlauf der chronischen Hepatitis C und das Ansprechen auf die Interferon-Therapie. Wir konnten zeigen, dass Patienten mit HCV-Genotyp 1 eindeutig eine schlechtere Prognose hinsichtlich der antiviralen Therpieresponse aufweisen als Patienten mit HCV-Genotyp 2 und 3-Infektion. Demgegenüber wurde jedoch der klinische Verlauf und Schweregrad der Hepatitis C Virusinfektion nicht vom HCV-Genotyp beeinflusst. (Berg T, König V, Küther S, Heuft HG, Wittmann G, Lobeck H, Hopf U. *Prognostische Relevanz der Hepatitis C Virus Genotypen für das Ansprechen auf Interferon-alpha. Z Gastroenterol* 1995; 33: 426-430; Berg T, Hopf U, Stark, Baumgarten R, Lobeck H, Schreier E. *Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters. J Hepatol* 1997; 26: 484-491).

3.1.3 Langzeitprognose der chronischen Hepatitis C nach Interferon-Monotherapie

Diese Arbeiten beschäftigen sich mit der Dauer der Response nach Interferon-Monotherapie. Verlaufsuntersuchungen bis zu sieben Jahre nach Therapieende belegen, dass eine Heilung der chronischen Hepatitis C möglich ist und Rückfälle im Langzeitverlauf nach erfolgreicher Therapie eine Rarität darstellen. (Hopf U, Küther S, König V, Heuft HG, Berg T, Soltani K, Lobeck H. *Langzeitbeobachtung der chronischen Hepatitis C nach Behandlung mit rekombinanten Interferon alpha-2a. Z Gastroenterol* 1994; 32: 425-430; Hopf U, Berg T, König V, Küther S, Heuft HG, Lobeck H. *Treatment of chronic hepatitis C with interferon alfa: long-term follow-up and prognostic parameters. J Hepatol* 1996; 24: 67-73; Berg T, Kaul T, Heuft HG, Naumann U, Lobeck H, Wiedenmann B, Hopf U. *Analysis of long-term efficacy of interferon-alpha treatment in chronic hepatitis C. J Hepatol* 1998; 28: 511-512).

3.2 Therapeutische Strategien bei chronischer Hepatitis C

3.2.1 Ribavirin bei der Therapie der chronischen Hepatitis C

In Multizenterstudien wurde die Effizienz einer 3-monatigen Induktions-Kombinationstherapie mit Ribavirin plus Interferon bei bisher unvorbehandelten Patienten und

Interferon-Nonrespondern untersucht. Im Rahmen dieser Studien konnten relevante prognostische Parameter für das Therapieansprechen definiert werden. Untersuchungen zur Viruskinetik bei Repondern und Nonrespondern unter Kombinations- bzw. Interferon-Monotherapie ermöglichten eine Charakterisierung der antiviralen Effekte von Ribavirin. Die Bestimmung der Dynamik der Hepatitis C Virämie während den ersten Behandlungswochen erlaubte zudem eine Nonresponse auf die antivirale Therapie frühzeitig nachzuweisen. Dies wird in Zukunft einen vorzeitigen Therapie-Abbruch bei Nonresponder-Patienten ermöglichen und hilft dadurch Nebenwirkungen und Kosten der Therapie zu verringern.

(Berg T, Hoffmann RM, Teuber G, Leifeld L, Lafrenz M, Baumgarten R, Spengler U, Zeuzem S, Pape GR, Hopf U. Efficacy of a short-term ribavirin plus interferon alfa combination therapy followed by interferon alfa alone in previously untreated patients with chronic hepatitis C: a randomized multicenter trial. Liver 2000; 20: 427-436; Teuber G, Berg T (contributed equally), Hoffmann RM, Leifeld L, Lafrenz M, Spengler U, Pape GR, Hopf U, Zeuzem S. Retreatment with interferon-alpha and ribavirin in primary interferon-alpha non-responders with chronic hepatitis C. Digestion 2000, 61: 90-97; Berg T, Kaul T, Naumann U, Wiedenmann B, Hopf U. Einfluß von Ribavirin auf die Dynamik der Hepatitis C Virämie bei Interferon-alpha behandelten Patienten mit primärer Response oder Nonresponse. Z Gastroenterol 2000; 38: 1-6).

3.2.2 Stellenwert von Amantadin bei der Therapie der chronischen Hepatitis C

Im Rahmen einer randomisierten Plazebo-kontrollierten Studie wurde der therapeutische Nutzen einer Amantadin-Interferon-Therapie bei bisher unvorbehandelten Patienten untersucht. Amantadin führt in dieser Studie nicht zu einer Steigerung der virologischen Responseraten. Eine weitere Plazebo-kontrollierte Studie mit Amantadin bei sogenannten Interferon-Nonrespondern konnte ebenfalls keine verbesserte Wirkung zeigen. Der therapeutische Effekt einer sogenannten „Triple-Therapie“ bestehend aus Amantadin, Ribavirin und hochdosiertem Interferon-alpha bei Nonrespondern wurde in einer Pilotstudie untersucht. *(Zeuzem S, Teuber G, Naumann U, Berg T, Raedle J, Hartmann S, Hopf U. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of interferon Alfa-2A with and without amantadine as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatology 2000; 32: 835-841; Teuber G, Berg T, Naumann U, Raedle J, Brinkmann S, Hopf U, Zeuzem S. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial with interferon-a (IFN-a) with and without amantadine sulfate in primary IFN-a nonresponders with chronic hepatitis C. J Viral Hepat 2001; 8: 276-283; Berg T, Naumann U, Wiedenmann B, Hopf U. Pilot study of interferon-alfa high-dose induction therapy in combination with ribavirin plus amantadine sulphate for nonresponder patients with chronic hepatitis C. Z Gastroenterol 2001; 39: 145-151).*

3.3 Ursachen der Nonresponse auf Interferon alpha bei chronischer Hepatitis C

3.3.1 Relevanz der Interferon-alpha-Antikörperbildung im Rahmen der Interferon-Therapie bei chronischer Hepatitis C

Die Arbeiten untersuchen, inwiefern eine Bildung neutralisierender anti-Interferon-alpha-Antikörper für den Responseverlust unter Therapie (sog. Breakthrough) verantwortlich sein könnte. Es zeigte sich, dass Interferon-alpha-Antikörper relativ häufig während einer Interferon-Therapie nachgewiesen werden können und in einigen Fällen, v.a. bei hohen Antikörperspiegeln, mit einem Wirkungsverlust der antiviralen Therapie korreliert sind. Die Umstellung der Therapie von rekombinantem Interferon auf ein natürliches Interferon-alpha kann in dieser Situation sinnvoll sein und erneut zu einem virologischen Ansprechen führen.

(Hoffmann RH, Berg T (contributed equally), Teuber G, Leifeld L, Prümmer O, Jung MC, Spengler U, Zeuzem S, Hopf U, Pape GR. Interferon antibodies and the breakthrough phenomenon during ribavirin interferon-combination therapy and interferon-monotherapy of patients with chronic hepatitis C. Z. Gastroenterol 1999, 37: 715-723; Berg T, Schuff-Werner P, Hopf U. Sustained remission of chronic hepatitis C after changing to human leucocyte interferon alfa (IFNa) in a difficult-to-treat patient with breakthrough phenomenon associated with antibodies against recombinant IFNa. Am J Gastroenterol 2001, 96: 612-614).

3.3.2 Bedeutung von Mutationen innerhalb der NS5A- und E2-Region des HCV für das Therapieansprechen bei chronischer Hepatitis C

In den vorliegenden Arbeiten wurde die Bedeutung Virus-genomischer Merkmale für die Interferon-Therapieresponse untersucht. Hierfür wurde die NS5A- und E2-Region bei HCV-Isolaten, die eine unterschiedliche Response auf eine antivirale Therapie gezeigt hatten sequenziert und das Mutationspattern mit der Therapieresponse korreliert. Es zeigten sich Unterschiede im Mutationsspektrum der NS5A-Region zwischen Genotyp 1a und 1b-Isolaten. Insgesamt war jedoch die Zahl der Mutationen mit der Therapieresponse korreliert. Untersuchungen zur Viruskinetik zeigten, dass nicht die initiale Response durch die Anzahl der Mutationen beeinflusst wurde, sondern die anhaltenden Responseraten. Diese Beobachtung spricht gegen die *in vitro* nachgewiesenen direkte Interaktion und Inhibition der Interferon-induzierten Effektorproteine (PKR) durch HCV-Proteine (NS5A). Keine Korrelation konnte für Mutationen im Bereich der E2-PePHD-Region und Therapieresponse etabliert werden. Die Region ist daher nicht hilfreich, um das individuelle Therapieansprechen vorherzusagen.

(Sarrazin C, Berg T, Lee J-H, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Zeuzem S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients

chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. J Hepatol 1999; 30; 1004-1013; Sarrazin S, Berg T, Lee J-H, Ruster B, Kronenberger B, Roth WK, Zeuzem S. Mutations in the protein kinase-binding domain of the NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 1a are associated with treatment response. J Infect Dis 2000; 181; 432-441; Berg T, Mas-Marques A, Höhne M, Wiedenmann B, Hopf U, Schreier E. Mutations in the E2-PePHD region of hepatitis C virus type 1 and the dynamics of hepatitis C viremia decline during interferon alfa treatment. Hepatology 2000; 32: 1386-1395).

3.4 Einfluß der neu entdeckten Hepatitis-assoziierten Viren (GBV-C/HGV und TTV) für den Verlauf der chronischen Hepatitis C und das Therapieansprechen

3.4.1 Amplifikation und Quantifizierung der GBV-C/HGV-RNA

Etablierung eines Systems zum quantitativen Nachweis von GBV-C/HGV-RNA und Vergleich der qualitativen PCR-Assays in Hinblick auf ihre Sensitivität und Spezifität. *(Künkel U, Höhne M, Berg T, Hopf U, Kekulé AS, Frösner G, Pauli G, Schreier E. Quality control study on the performance of hepatitis G virus (HGV) PCR. J Hepatol 1998; 28: 978-984).*

3.4.2 Prävalenz und klinische Relevanz der GBV-C/HGV-Infektionen

Die Arbeiten beschäftigen sich mit der Prävalenz, Transmission und Langzeitdokumentation der GBV-C/HGV-Infektionen bei unterschiedlichen Patientenpopulationen. Die Arbeiten belegen, dass es sich bei GBV-C/HGV um ein parenteral-übertragbares Virus handelt, welches eine hohe Prävalenz bei Patienten mit entsprechenden parenteralen Risikofaktoren aufweist. Umfangreiche Untersuchungen bei einer großen Zahl von chronischen GBV-C/HGV-Trägern zeigen jedoch, dass eine Hepatitis-induzierende Potenz dieses Virus unwahrscheinlich ist. Es konnten auch keine extrahepatischen Erkrankungen mit der chronischen GBV-C/HGV-Infektion in Verbindung gebracht werden. Interessant waren die Untersuchungen, dass die chronische GBV-C/HGV-Infektion einen günstigen Einfluss auf den Verlauf der HIV-Infektion zu haben scheint.

(Heuft H-G, Berg T, Schreier E, Künkel U, Tacke M, Schwella N, Hopf U, Salama A, Huhn D. Epidemiological and clinical aspects of hepatitis G virus (HGV) infection in blood donors and immunocompromised recipients of HGV-contaminated blood. Vox Sang 1998; 74: 161-167; Woelfle J, Berg T, Keller KM, Schreier E, Lentze MJ. Persistent hepatitis G virus infection after neonatal transfusion. J Pediatr Gastr Nutr 1998; 26: 402-407; Woelfle J, Berg T, Bialek R, Keller KM, Effenberger W, Wagner N. GB virus C/hepatitis G virus infection in HIV-infected haemophiliac patients despite treatment with virus-inactivated coagulation factors. Arch Dis Child 1999; 80:429-432; Schreier E, Höhne M, Künkel U, Berg T, Hopf U. Hepatitis GBV-C sequences in patients

infected with HCV contaminated anti-D immunoglobulin and among i.v. drug users in Germany. J Hepatol 1996, 25: 385-389).

3.4.3 Nachweis von GBV-C/HGV-Infektionen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C

Die Relevanz der GBV-C/HGV-Koinfektion für den Verlauf der chronischen Hepatitis C und das Ansprechen einer antiviralen Therapie wurde untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die chronische GBV-C/HGV-Koinfektion nicht zu einem progredienteren Verlauf der chronischen Hepatitis C führt. Es ergaben sich im Gegenteil sogar Hinweise, dass in bestimmten klinischen Situationen die GBV-C/HGV-Infektion einen günstigen Einfluss auf den Verlauf der chronischen Hepatitis C haben kann. Das Therapieansprechen der chronischen Hepatitis C wird ebenfalls nicht durch die Koinfektion beeinflusst. Außerdem zeigten die Untersuchungen, dass GBV-C/HGV ein Interferon-sensitives Virus ist.

(Berg T, Naumann U, Fukumoto T, Bechstein WO, Neuhaus P, Lobeck H, Höhne M, Schreier E, Hopf U. GB virus C infection in patients with chronic hepatitis B and C before and after liver transplantation. Transplantation 1996; 62: 711-714; Berg T, Dirla U, Naumann U, Heuft HG, Küther S, Lobeck H, Schreier E, Hopf U. Responsiveness of interferon alpha treatment in patients with chronic hepatitis C coinfecting with hepatitis G virus. J Hepatol 1996; 25: 763-768).

3.4.4 Untersuchungen zum Gewebetropismus von GBV-C/HGV

Der Einfluss der Hepatektomie bei orthotoper Lebertransplantation auf die GBV-C/HGV-RNA-Konzentrationen wurde bei Patienten mit chronischer GBV-C/HGV-Infektion untersucht. Die Analysen zeigen, dass der Hauptreplikationsort von GBV-C/HGV nicht die Leber ist. Diese Untersuchungen haben wesentliche Bedeutung für die klinische Einschätzung der GBV-C/HGV-Infektion und sprechen zusammen mit den anderen von uns durchgeführten Analysen gegen eine Hepatitis-induzierende Potenz des neu entdeckten Virus.

(Berg T, Müller AR, Platz KP, Höhne M, Bechstein WO, Hopf U, Wiedenmann B, Neuhaus P, Schreier E. Dynamics of GB virus C viremia after liver transplantation indicates extrahepatic tissues as the predominant site of GB virus C virus replication. Hepatology 1999, 29:245-249).

3.4.5 Prävalenz und klinische Relevanz der TT-Virus (TTV)-Infektionen in Deutschland

Die Arbeiten beschäftigen sich mit der Prävalenz der TTV-Infektionen bei unterschiedlichen Personengruppen und Patienten. Zum Nachweis der TTV-Infektionen wurde hierfür zunächst eine

PCR-System etabliert. Die Sequenzierung einer großen Zahl der amplifizierten TTV-Isolate ermöglichte eine phylogentische Einordnung der Isolate in unterschiedliche Genotypen und die Korrelation von TTV-Genotyp und klinischer Manifestation der Infektion. Die klinische Relevanz der TTV-Infektion als mögliches Hepatitis-induzierendes Agens wurde bei Patienten mit fulminantem Leberversagen unklarer Ätiologie, kryptogener chronischer Hepatitis, chronischer Hepatitis C und bei Patienten vor und nach Lebertransplantation untersucht sowie die Bedeutung der TTV-Infektion für die Therapieresponse bei chronischer Hepatitis C (*Höhne M, Berg T, Müller AR, Schreier E. Detection of sequences of a novel DNA virus (TTV) in German patients. J Gen Virol 1998; 79: 2761-2764; Berg T, Schreier E, Heuft HG, Höhne M, Bechstein WO, Leder K, Hopf U, Neuhaus P, Wiedenmann B. Occurrence of a novel DNA virus (TTV) infection in patients with liver diseases and its frequency in blood donors. J Med Virol 1999; 59: 117-121*).

4 Relevante Originalarbeiten

Im Folgenden sind die wichtigsten, relevanten Originalarbeiten aufgeführt.

4.1 Kinetik der Hepatitis C-Replikation

1. Fukumoto T, **Berg T**, Ku Y, Bechstein WO, Knoop M, Lemmens HP, Lobeck H, Hopf U, Neuhaus P. Viral dynamics of hepatitis C early after orthotopic liver transplantation: evidence for rapid turnover of serum virions. *Hepatology* 1996; 24: 1351-1354).

4.2 Klinische Relevanz der HCV-Genotypen

2. **Berg T**, König V, Küther S, Heuft HG, Wittmann G, Lobeck H, Hopf U. Prognostische Relevanz der Hepatitis C Virus Genotypen für das Ansprechen auf Interferon-alpha. Z Gastroenterol 1995; 33: 426-430;
3. **Berg T**, Hopf U, Stark, Baumgarten R, Lobeck H, Schreier E. Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters. J Hepatol 1997; 26: 484-491).

4.3 Langzeitprognose der chronischen Hepatitis C nach Interferon-Monotherapie

4. Hopf U, Küther S, König V, Heuft HG, **Berg T**, Soltani K, Lobeck H. Langzeitbeobachtung der chronischen Hepatitis C nach Behandlung mit rekombinanten Interferon alpha-2a. Z Gastroenterol 1994; 32: 425-430;
5. Hopf U, **Berg T**, König V, Küther S, Heuft HG, Lobeck H. Treatment of chronic hepatitis C with interferon alfa: long-term follow-up and prognostic parameters. J Hepatol 1996; 24: 67-73;
6. **Berg T**, Kaul T, Heuft HG, Naumann U, Lobeck H, Wiedenmann B, Hopf U. Analysis of long-term efficacy of interferon-alpha treatment in chronic hepatitis C. J Hepatol 1998; 28: 511-512).

4.4 Therapeutische Strategien bei chronischer Hepatitis C

4.4.1 Ribavirin bei der Therapie der chronischen Hepatitis C

7. **Berg T**, Hoffmann RM, Teuber G, Leifeld L, Lafrenz M, Baumgarten R, Spengler U, Zeuzem S, Pape GR, Hopf U. Efficacy of a short-term ribavirin plus interferon alfa combination therapy followed by interferon alfa alone in previously untreated patients with chronic hepatitis C: a randomized multicenter trial. *Liver* 2000; 20: 427-436;
8. Teuber G, **Berg T (contributed equally)**, Hoffmann RM, Leifeld L, Lafrenz M, Spengler U, Pape GR, Hopf U, Zeuzem S. Retreatment with interferon-alpha and ribavirin in primary interferon-alpha non-responders with chronic hepatitis C. *Digestion* 2000, 61: 90-97;
9. **Berg T**, Kaul T, Naumann U, Wiedenmann B, Hopf U. Einfluß von Ribavirin auf die Dynamik der Hepatitis C Vämie bei Interferon-alpha behandelten Patienten mit primärer Response oder Nonresponse. *Z Gastroenterol* 2000; 38: 1-6)

4.4.2 Stellenwert von Amantadin bei der Therapie der chronischen Hepatitis C

10. Zeuzem S, Teuber G, Naumann U, **Berg T**, Raedle J, Hartmann S, Hopf U. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of interferon Alfa-2A with and without amantadine as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 32: 835-841;
11. Teuber G, **Berg T**, Naumann U, Raedle J, Brinkmann S, Hopf U, Zeuzem S. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial with interferon-a (IFN-a) with and without amantadine sulfate in primary IFN-a nonresponders with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2001; 8: 276-;
12. **Berg T**, Naumann U, Wiedenmann B, Hopf U. Pilot study of interferon-alfa high-dose induction therapy in combination with ribavirin plus amantadine sulphate for

nonresponder patients with chronic hepatitis C. Z Gastroenterol 2001; 39: 145-151).

4.5 Ursachen der Nonresponse auf Interferon alpha bei chronischer Hepatitis C

4.5.1 Relevanz der Interferon-alpha-Antikörperbildung im Rahmen der Interferon-Therapie bei chronischer Hepatitis C

13. Hoffmann RH, **Berg T (contributed equally)**, Teuber G, Leifeld L, Prümmer O, Jung MC, Spengler U, Zeuzem S, Hopf U, Pape GR. Interferon antibodies and the breakthrough phenomenon during ribavirin interferon-combination therapy and interferon-monotherapy of patients with chronic hepatitis C. *Z. Gastroenterol* 1999, 37: 715-723;
14. **Berg T**, Schuff-Werner P, Hopf U. Sustained remission of chronic hepatitis C after changing to human leucocyte interferon alfa (IFNa) in a difficult-to-treat patient with breakthrough phenomenon associated with antibodies against recombinant IFNa. *Am J Gastroenterol* 2001, 96: 612-614.

4.5.2 Bedeutung von Mutationen innerhalb der NS5A- und E2-Region des HCV für das Therapieansprechen bei chronischer Hepatitis C

15. Sarrazin C, **Berg T**, Lee J-H, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Zeuzem S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999; 30; 1004-1013;
16. Sarrazin S, **Berg T**, Lee J-H, Ruster B, Kronenberger B, Roth WK, Zeuzem S. Mutations in the protein kinase-binding domain of the NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 1a are associated with treatment response. *J Infect Dis* 2000; 181; 432-441;
17. **Berg T**, Mas-Marques A, Höhne M, Wiedenmann B, Hopf U, Schreier E. Mutations in the E2-PePHD region of hepatitis C virus type 1 and the dynamics of hepatitis C viremia decline during interferon alfa treatment. *Hepatology* 2000; 32: 1386-1395.

4.6 Einfluß der neu entdeckten Hepatitis-assoziierten Viren (GBV-C/HGV und TTV) für den Verlauf der chronischen Hepatitis C und das Therapieansprechen

4.6.1 Amplifikation und Quantifizierung der GBV-C/HGV-RNA

18. Künkel U, Höhne M, **Berg T**, Hopf U, Kekulé AS, Frösner G, Pauli G, Schreier E. Quality control study on the performance of hepatitis G virus (HGV) PCR. *J Hepatol* 1998; 28: 978-984).

4.6.2 Prävalenz und klinische Relevanz der GBV-C/HGV-Infektionen

19. Heuft H-G, **Berg T**, Schreier E, Künkel U, Tacke M, Schwella N, Hopf U, Salama A, Huhn D. Epidemiological and clinical aspects of hepatitis G virus (HGV) infection in blood donors and immunocompromised recipients of HGV-contaminated blood. *Vox Sang* 1998; 74: 161-167.
20. Woelfle J, **Berg T**, Keller KM, Schreier E, Lentze MJ. Persistent hepatitis G virus infection after neonatal transfusion. *J Pediatr Gastr Nutr* 1998; 26: 402-407;
21. Woelfle J, **Berg T**, Bialek R, Keller KM, Effenberger W, Wagner N. GB virus C/hepatitis G virus infection in HIV-infected haemophilic patients despite treatment with virus-inactivated coagulation factors. *Arch Dis Child* 1999; 80:429-432;
22. Schreier E, Höhne M, Künkel U, **Berg T**, Hopf U. Hepatitis GBV-C sequences in patients infected with HCV contaminated anti-D immunoglobulin and among i.v. drug users in Germany. *J Hepatol* 1996, 25: 385-389.

4.6.3 Nachweis von GBV-C/HGV-Infektionen bei Patienten mit chronischer Hepatitis C

23. **Berg T**, Naumann U, Fukumoto T, Bechstein WO, Neuhaus P, Lobeck H, Höhne M, Schreier E, Hopf U. GB virus C infection in patients with chronic hepatitis B and C before and after liver transplantation. *Transplantation* 1996; 62: 711-714.
24. **Berg T**, Dirla U, Naumann U, Heuft HG, Küther S, Lobeck H, Schreier E, Hopf U. Responsiveness of interferon alpha treatment in patients with chronic hepatitis C coinfecting with hepatitis G virus. *J Hepatol* 1996; 25: 763-768.

4.6.4 Untersuchungen zum Gewebetropismus von GBV-C/HGV

25. **Berg T**, Müller AR, Platz KP, Höhne M, Bechstein WO, Hopf U, Wiedenmann B, Neuhaus P, Schreier E. Dynamics of GB virus C viremia after liver transplantation indicates extrahepatic tissues as the predominant site of GB virus C virus replication. *Hepatology* 1999, 29:245-249).

4.7 Prävalenz und klinische Relevanz der TT-Virus (TTV)-Infektionen in Deutschland

26. Höhne M, **Berg T**, Müller AR, Schreier E. Detection of sequences of a novel DNA virus (TTV) in German patients. J Gen Virol 1998; 79: 2761-2764;
27. **Berg T**, Schreier E, Heuft HG, Höhne M, Bechstein WO, Leder K, Hopf U, Neuhaus P, Wiedenmann B. Occurrence of a novel DNA virus (TTV) infection in patients with liver diseases and its frequency in blood donors. J Med Virol 1999; 59: 117-121)

5 Diskussion und Zusammenfassung

5.1 Therapie der chronischen Hepatitis C

In der Therapie der chronischen Hepatitis C sind innerhalb von 10 Jahren erhebliche Fortschritte erreicht worden. Während Anfang der 90iger Jahre nur ein geringer Prozentsatz (10-15%) der Patienten dauerhaft von der Therapie profitierten, können heute anhaltende Remissionsraten von ca. 50% erreicht werden. Zu diesen Fortschritten hat die Einführung der Kombinationstherapie aus Interferon-alpha plus Ribavirin und die Entwicklung der pegylierten Interferone wesentlich beigetragen.

Unsere Untersuchungen zum Langzeitverlauf nach antiviraler Therapie sprechen dafür, dass durch die Interferon-Therapie eine Heilung der chronischen Hepatitis C erzielt werden kann (175, 176). Ein Rückfall nach eingetretener anhaltender Remission (d.h. negatives Ergebnis der HCV-RNA PCR im Serum 6 Monate nach Therapieende) ist mit < 5% extrem selten (175). Diese Erfahrung wird auch von anderen Autoren geteilt (177-181). Unklar bleibt jedoch bis heute, inwiefern es mit der Heilung der chronischen Hepatitis C auch zu einer kompletten HCV-Elimination kommt. Der Nachweis einer anhaltenden starken-T-Zell-Antwort auf HCV-Proteine auch noch Jahre nach Ausheilung der HCV-Infektion könnte ein indirekter Hinweis dafür sein, dass HCV unter immunologischer Kontrolle im Körper persistiert (182).

5.2 Prognosefaktoren bei der Therapie der chronischen Hepatitis C

5.2.1 Bedeutung der HCV-Genotypen

Die Etablierung prognostischer Parameter, die zuverlässig das Ansprechen auf die antivirale Therapie vorhersagen, ist ein wesentliches Ziel bei der Therapie der chronischen Hepatitis C und wird in Zukunft die Basis für individuelle Therapiestrategien darstellen. Bereits 1992 vermuteten japanische Autoren, dass sich die verschiedenen HCV-Genotypen in ihrem Responseverhalten auf die Interferon-Therapie voneinander unterscheiden (30-32). Patienten mit Genotyp 2 hatten dabei eine signifikant bessere Prognose als Patienten mit Typ-1-Infektion. Die HCV-Genotypenverteilung in Deutschland und deren Responseverhalten auf IFNa war zu dieser Zeit noch unbekannt. Wir haben daher mit einer in unserem Labor etablierten Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse von HCV-PCR-Produkten der 5'-nicht kodierenden Region die Verteilung der HCV-Genotypen und die Response auf IFNa untersucht (183). Es zeigte sich, dass in Deutschland ca. 75% der Patienten mit chronischer Hepatitis C mit HCV-Genotyp-1 infiziert sind und die HCV-Genotypen 2 bzw. 3 mit 6% bzw. 18% eine relativ geringe Prävalenz aufweisen. Wir konnten eindeutig nachweisen, dass Patienten mit HCV-Typ 2- und 3-Infektion signifikant besser auf IFNa ansprechen als Patienten mit HCV-Typ 1. Es ist inzwischen durch zahlreiche Studien belegt, dass der HCV-Genotyp die grösste Bedeutung für die Therapieresponse

besitzt (136, 138, 184-186). Unter moderner Kombinationstherapie mit pegylierten Interferonen plus Ribavirin zeigen nahezu alle Patienten mit Typ 2 und 3 ein initiales Ansprechen, und anhaltende Remissionen werden in > 80% erreicht (143). Demgegenüber stellt die Therapie von Patienten mit HCV-Genotyp 1-Infektion weiterhin ein Problem dar.

Den Einfluss der HCV-Genotypen auf den Krankheitsverlauf der chronischen Hepatitis C haben wir in einer großen Studie bei 379 Patienten untersucht (187). Wenngleich Patienten mit HCV-Typ 1 einen signifikant höheren histologischen Aktivitätsindex in der Leberbiopsie zeigten als Patienten mit HCV-Typ 3, so war der HCV-Genotyp in der Multivarianzanalyse doch nicht signifikant mit dem Schweregrad der chronischen Hepatitis C korreliert. Die Tatsache, dass Patienten mit Genotyp 1 signifikant älter waren als Patienten mit Typ 3-Infektion, erklärt diese Diskrepanz bei der statistischen Auswertung. Außerdem zeigte sich, dass sich die Prävalenz der HCV-Genotypen in der deutschen Bevölkerung in Abhängigkeit des Alters verändert. Während Patienten mit einem Alter über 45 Jahre fast ausschließlich mit HCV-Typ 1b infiziert waren, fanden sich bei den jüngeren Patienten (< 45 Jahre) zunehmend die HCV-Genotypen 1a und 3a. Auch der Modus der HCV-Transmission wird durch den Genotyp reflektiert. So konnte eine HCV-Genotyp 3a-Infektion mit ca. 90% signifikant häufiger bei Patienten mit intravenösem Drogenabusus nachgewiesen werden.

Wenngleich die meisten publizierten Studien in Analogie zu unseren Untersuchungen, keinen signifikanten Einfluss der HCV-Genotypen auf den Verlauf und Schweregrad der chronischen Hepatitis C nachweisen konnten, so wird dieser Punkt weiterhin kontrovers diskutiert. Die Infektion mit dem HCV-Genotyp 1b war in mehreren Fall-Kontroll-Studien mit einem erhöhten relativen Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) assoziiert sowie mit einem schwereren Verlauf der HCV-Reinfektionshepatitis nach Lebertransplantation (188-194).

HCV-Genotypen-abhängige Interaktionen von bestimmten HCV-Proteinen mit Schlüsselenzymen der Signalkaskade der Apoptose könnten eine Erklärung für die höhere Rate von HCC bei Patienten mit HCV Typ-1-Infektion sein (78, 99, 100).

5.2.2 Weitere Prognosefaktoren

Neben dem HCV-Genotyp konnten weitere prognostische Marker für die Response bei Kombinationstherapie (IFNa plus Ribavirin) etabliert werden (136, 138). Zu den ungünstigen Faktoren zählen männliches Geschlecht, ein höheres Alter bzw. langer Verlauf der chronischen Hepatitis C und deutliche Fibrosebildung in der Leberhistologie bzw. das Vorhandensein einer Cirrhose sowie eine hohe prätherapeutische Hepatitis C Virämie (HCV-RNA Konzentration)

Es ist inzwischen Standard, anhand der Konstellation der prognostischen Parameter die Therapiedauer festzulegen (195). Die Empfehlungen der Europäischen Konsensuskonferenz zur Therapie der chronischen Hepatitis C lauten: Patienten mit HCV-Genotyp 2 und 3 sollten

unabhängig von der Höhe der Hepatitis C Virämie über 6 Monate, und Patienten mit HCV-Genotyp 1 und hoher Virämie ($\geq 2.000.000$ Kopien/ml) über 12 Monate behandelt werden. Patienten mit HCV-Genotyp 1 und niedriger Hepatitis C Virämie ($< 2.000.000$ Kopien/ml) sollten demgegenüber auch nur eine 6-monatige Therapie erhalten (195).

Umfangreiche eigene Untersuchungen haben sich mit der Etablierung prognostisch relevanter Responsefaktoren beschäftigt (183, 196-198). Unsere Daten zeigen zwar, dass durch die oben genannten prognostischen Parameter eine Abschätzung der wahrscheinlichen Therapieresponse möglich ist, keiner der prognostischen Parameter aber im Einzelfall eine Response oder Nonresponse verlässlich voraussagen kann. Neben dem HCV-Genotyp hat außerdem die Höhe der Gamma-Glutamyl-Transpeptidase (GGT) eine wesentliche prognostische Bedeutung. Im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen konnten wir jedoch keine klare Assoziation zwischen Höhe der Hepatitis C Virämie zum Therapiebeginn und zur Therapieresponse nachweisen. Die Abschätzung der Therapieresponse anhand der HCV-RNA Konzentration bzw. eines bestimmten Grenzwertes der Hepatitis C Virämie ist insofern problematisch, da die verschiedenen quantitativen Testsysteme nicht immer vergleichbare Ergebnisse lieferten. Durch die Einführung eines Internationalen WHO-Standards zur quantitativen Bestimmung der HCV-RNA in International Units (IU/ml) wird dieser Parameter in Zukunft besser definiert werden können. Der bisher etablierte Grenzwert der quantitativen HCV-RNA zur Abschätzung der Therapieresponse von 2.000.000 Kopien/ml entspricht etwa 800.000 IU/ml (199).

Wir haben daher in einer aktuellen Studie in Kooperation mit den Universitätskliniken Frankfurt, Kiel und München untersucht, welcher Grenzwert der Baseline-Hepatitis C Virämie, gemessen in IU/ml (Versant HCV-RNA 3.0 [bDNA-3.0], Bayer Diagnostics), eine sinnvolle Prognoseabschätzung bei der Kombinationstherapie der chronischen Hepatitis C erlaubt (Manuskript in Vorbereitung). Insgesamt wurden 355 Patienten in die Studie eingeschlossen (71% HCV-Typ 1). Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich nur bei Patienten mit HCV-Genotyp 1-Infektion die Höhe der Baselinevirämie zwischen Repondern und Nonrespondern unterscheidet. Allerdings liegt der cut-off-Wert für Patienten mit günstiger Prognose bei 100.000 IU/ml. Die entsprechenden anhaltenden Remissionsraten lagen bei Typ 1-infizierten Patienten mit einer Baselinevirämie $<$ bzw. ≥ 100.000 IU/ml bei 52% bzw. 32% ($p=0.01$). Diese Daten zeigen, dass der bisher etablierte cut-off Wert von 2 Mio Kopien/ml bzw. 800.000 IU/ml für die Prognose-Stratifizierung nicht geeignet ist. Patienten mit HCV-Genotyp 2 und 3 hatten demgegenüber unabhängig von der Höhe der Virämie eine exzellente Prognose. Das derzeit in der Europäischen Konsensus-Konferenz vorgeschlagene therapeutische Vorgehen, anhand der Höhe der Hepatitis C Virämie bei Patienten mit HCV-Genotyp 1-Infektion die Therapiedauer festzulegen, kann daher in dieser Form nicht akzeptiert werden. Hinzu kommt, dass diese therapeutische Empfehlung bisher nicht durch eine prospektive Studie evaluiert worden ist.

5.3 Wirkung von Ribavirin

Ribavirin (1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) gehört in die Gruppe der Nucleosidanaloga und besitzt ein relativ breites Wirkungsspektrum gegenüber einer Vielzahl von RNA- und DNA-Viren (111, 112). Als Wirkmechanismus des Ribavirins werden eine Depletion des intrazellulären Guanotin-Nucleotidpools durch Hemmung der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase und eine Hemmung der viralen RNA-abhängigen Polymerase diskutiert (113, 114). Der Wirkungsmechanismus von Ribavirin bei Patienten mit chronischer Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion ist jedoch unbekannt. Frühere Studien, in denen Ribavirin als Monosubstanz zur Therapie der chronischen Hepatitis C eingesetzt worden ist, zeigten zwar, daß sich unter dieser Therapie in ca. 50% der behandelten Patienten die Transaminasen normalisierten, die Hepatitis C Virämie jedoch unbeeinflusst blieb (115-119). In Übereinstimmung damit steht die Beobachtung, daß der initiale Abfall der Hepatitis C Virämie in den ersten Wochen nach Therapiebeginn sich ebenfalls nicht zwischen den kombiniert mit IFN α und Ribavirin bzw. mit IFN α -Monotherapie behandelten Patienten unterscheidet (200). Daraus läßt sich folgern, daß Ribavirin keine direkte antivirale Aktivität im Sinne einer messbaren Hemmung der HCV-Replikation hat. Neuere Untersuchungen legen nahe, daß Ribavirin immunmodulatorische Eigenschaften besitzt und es über die Freisetzung von Zytokinen zu einer Aktivierung von Th-1-Zellen kommt (201, 202).

Eigene Untersuchungen zur Viruskinetik bei Patienten mit IFN α -Monotherapie bzw. Kombinationstherapie zeigen, dass sich die therapeutische Wirkung von Ribavirin erst 2-4 Wochen nach Therapiebeginn einstellt und dieser Effekt sich nur in der Gruppe der Patienten nachweisen läßt, die unter einer alleinigen IFN α -Therapie nicht innerhalb von 12 Wochen HCV-RNA negativ wurden (204). Dieses Phänomen ist wahrscheinlich damit zu erklären, daß der IFN α -vermittelte antivirale Effekt bei Respondern gegenüber Ribavirin deutlich dominant ist. Bei Nonrespondern zeigte sich ebenso wie bei Respondern ein 2-phasiger Verlauf der Hepatitis C Virämie. In der ersten Therapiewoche (Phase 1; siehe Abb. 7) kam es bei den Nonrespondern unabhängig von der Therapieform zu einem raschen Abfall der Hepatitis C Virämie. Im weiteren Verlauf (Phase 2) zeigten jedoch nur die kombiniert behandelten Patienten einen weiteren Abfall der Hepatitis C Virämie während in der Monotherapiegruppe die Virämie wieder leicht anstieg. Dieser zusätzlich einsetzende Abfall der Hepatitis C Virämie bei Nonrespondern mit Kombinationstherapie darf im Sinne eines immunmodulatorischen Effektes von Ribavirin interpretiert werden, und spricht gegen eine ausgeprägte direkte antivirale Wirkung im Sinne einer rasch einsetzenden Hemmung der Virusreplikation.

5.3.1 Einfluss von Ribavirin auf die HCV-Quasispeciesverteilung

Man muß davon ausgehen, dass bei HCV-infizierten Patienten stets eine gemischte Viruspopulation aus unterschiedlichen genetisch eng miteinander verwandten Varianten vorliegt (sogenannte Quasispeziesverteilung) (205). Für die hohe Viruspersistenzrate dürfte die

Quasispeziesnatur des HCV verantwortlich sein, da sie die immunologische Selektion von HCV-Varianten (sog. Escape-Varianten) ermöglicht (206). Die hypervariable Region 1 (HVR-1) des E2-Gens (2. Hüllprotein) ist vermutlich das Target einer neutralisierenden Antikörperantwort. Kontinuierliche Sequenzvariationen der HVR-1 als Ausdruck eines kontinuierlichen Wechsels der Quasispeziesverteilung sind im Verlauf einer chronischen HCV-Infektion (207) aber auch unter einer IFNa-Therapie durch zahlreiche Studien dokumentiert (208, 209). Eine grössere Heterogenität in der HVR-1 Quasispezies vor IFNa-Therapie konnte zudem mit einer Nonresponse korreliert werden. Man vermutete daher, dass in der gemischten Viruspopulation Varianten mit unterschiedlicher Sensitivität auf IFNa vorkommen (209).

Inwiefern die Abnahme der Hepatitis C Virämie mit Änderungen der HCV-Quasispeziesverteilung einhergeht, und ob der 2-phasige Virämieverlauf durch die Selektion primär IFNa-resistenter HCV Varianten zu erklären ist, wurde bei 27 Nonrespondern mittels nicht-radioaktiver Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCP-Analyse) der HVR-1 des HCV-Genoms untersucht (203, 204). Insgesamt zeigte sich bei unseren Patienten keine Korrelation zwischen Dynamik der Hepatitis C Virämie und Änderungen der Viruspopulation innerhalb der ersten 12 Therapiewochen. Diese Daten sprechen gegen das Vorhandensein von primär IFNa-sensiblen bzw. -resistenten HCV Varianten als Erklärung für den auch bei Nonrespondern zu beobachtenden Abfall der Virämie. Nur bei Patienten mit einer Reduktion der Virämie von $\geq 90\%$ in den ersten Therapiewochen zeigten sich häufiger Änderungen der Quasispeziesverteilung. Die HCV-Quasispezies-Evolution scheint jedoch auch in dieser Situation nicht die Voraussetzung bzw. Erklärung für das Therapieansprechen zu sein, da es bei diesen Patienten nach initialer Abnahme der Virämie zu einer kontinuierlichen Variabilität der HCV-Quasispezies im Verlauf der Therapie kommt. Dieser Verlauf spricht zwar dafür, dass sich unter dem immunologischen Druck einer IFNa-Therapie häufiger Änderungen der Viruspopulation einstellen, nicht jedoch dafür, dass die neu entstandene HCV-Quasispezies IFNa resistent ist. Gegen die Vorstellung einer durch IFNa selektionierten, resistenten HCV-Quasispezies spricht auch die klinische Beobachtung, dass Patienten mit Relapse nach initial erfolgreicher IFNa-Therapie in der Regel auf eine Re-Therapie erneut ansprechen. Unsere Untersuchungen schließen aber nicht aus, dass HCV Varianten mit unterschiedlicher Kinetik bezüglich des IFNa-induzierten Abfalls der Virämie in der Viruspopulation vorhanden sein können. Die SSCP-Analyse der HVR als Screening-Methode zum Nachweis von Änderungen der HCV-Quasispeziesverteilung schließt außerdem nicht aus, dass möglicherweise Mutationen bzw. Variabilitäten in anderen Regionen des HCV-Genoms mit der IFNa-Response korrelieren.

Ein Zusammenhang zwischen IFNa-Mono- oder Kombinationstherapie und Mutationsfrequenz bzw. Viruspopulationsänderungen konnte nicht nachgewiesen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit kürzlich publizierten Studien (210-212). Ribavirin scheint daher keinen wesentlichen Effekt auf die HCV-Quasispezies-Evolution zu haben.

5.4 Kombinationstherapie bei chronischer Hepatitis C

Die Kombinationstherapie mit Interferon-alpha (IFNa) plus Ribavirin hat sich bei Patienten mit chronischer Hepatitis C gegenüber einer alleinigen IFNa-Therapie als überlegen erwiesen und stellt heute die Standardtherapie der chronischen Hepatitis C dar (136, 138, 195, 213). Die optimale Dauer der Kombinations-Therapie ist jedoch unbekannt.

In einer deutschen Multizenter-Studie haben wir die Effektivität einer auf drei Monate begrenzten Induktionsphase der Kombinationstherapie mit einer IFNa-Monotherapie verglichen (197). Die Daten zeigten, dass diese Kurzzeit-Kombinationstherapie bei Patienten mit HCV-Genotyp-1-Infektion verglichen mit einer 1-jährigen Kombinationstherapie unterlegen ist. Bei Patienten mit Typ 2 und 3 konnten allerdings vergleichbare Responseraten erzielt werden. Es wird daher eine wesentliche Aufgabe für die Zukunft sein, die Therapie auf die individuellen Erfordernisse abzustimmen. Dies wird wesentlich dazu beitragen, Kosten und Nebenwirkungen der Therapie zu verringern.

5.5 Neue therapeutische Strategien bei chronischer Hepatitis C

Trotz der therapeutischen Fortschritte bei Patienten mit chronischer Hepatitis C ist die Zahl der Patienten, die nicht dauerhaft von der Therapie profitieren, relativ gross. Mögliche Strategien zur Verbesserung der Therapieresponse sind neue Kombinationspartner für IFNa (z.B. Amantadin), Intensivierung der IFNa-Therapie (sogenannte Induktionstherapie), oder Verlängerung der Therapiedauer.

5.5.1 Amantadin

Amantadin (1-aminoadamantanamine) ist ein synthetisches trizyklisches Amin mit gut charakterisierter antiviraler Wirkung gegen Influenza A Virus (121). Der molekulare Wirkungsmechanismus beruht in erster Linie auf einer Inhibition der Frühphase der Virusreplikation, wahrscheinlich dem Virus „Uncoating“. (122, 123). Die antivirale Aktivität von Amantadin bei Patienten mit chronischer Hepatitis C ist bisher nicht charakterisiert. Eine dosisabhängige Hemmung der HCV Replikation in kultivierten PBMC von HCV-infizierten Patienten durch Amantadin wurde beschrieben (124). Eine erste klinische Pilot-Studie zur Amantadin-Monotherapie bei IFNa-Nonresponder-Patienten mit chronischer Hepatitis C zeigte vielversprechende Ergebnisse mit virologischen Ansprechraten von ca. 20% (120). Wir haben deshalb im Rahmen einer randomisierten Plazebo-kontrollierten Studie den therapeutischen Nutzen einer Kombinationstherapie aus IFNa plus Amantadin bei bisher unvorbehandelten Patienten untersucht (214). Amantadin führt in dieser Studie nicht zu einer Steigerung der virologischen Responseraten. Die anhaltenden Responseraten lagen mit der Kombinationstherapie bei 10% und bei der IFNa-Monotherapie bei 22%. Eine weitere von der Universitätsklinik Frankfurt und unserem Zentrum initiierte Plazebo-kontrollierten Studie mit Amantadin bei sogenannten

Interferon-Nonrespondern konnte ebenfalls keine verbesserte Wirkung zeigen (215). Jedoch zeigten in beiden Studien die Patienten, die kombiniert behandelt wurden, eine signifikante Verbesserung der Lebensqualität unter der Therapie im Vergleich zur IFNa-Monotherapie.

Unsere Daten stehen im Gegensatz zu Erfahrungen aus Italien. Die dort durchgeführten Studien zeigten eine signifikante Steigerung der Responseraten durch die Kombinationstherapie von Amantadin plus Interferon (125-132). Die Ursachen dieser Unterschiede sind schwer zu erklären. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die italienischen Studien nicht Plazebo-kontrolliert durchgeführt wurden. Außerdem verwendeten wir in unseren Studien Amantadin-Sulfat während in den italienischen Studien Amantadin-Hydrochlorid eingesetzt wurde. Der Stellenwert von Amantadin in der Therapie der chronischen Hepatitis C lässt sich daher zur Zeit noch nicht abschließend beurteilen.

5.5.2 Triple-Therapie (IFNa plus Ribavirin und Amantadin)

Der therapeutische Effekt einer sogenannten „Triple-Therapie“, bestehend aus Amantadin, Ribavirin und Interferon-alpha, wurde von uns in einer Pilotstudie bei Nonresponder-Patienten untersucht (216). Nur 14% der behandelten Patienten wurden unter dieser Therapie HCV-RNA negativ und keiner der Patienten erzielte eine anhaltende Remission. Brillanti und Mitarbeiter (126, 127) konnten allerdings durch die Triple-Therapie eine ca. 10-fache Steigerung der anhaltenden Responseraten bei Nonrespondern beobachten. In einer deutschen Multizenter-Studie haben wir randomisiert und Plazebo-kontrolliert bei 400 unvorbehandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C die Effektivität der Triple-Therapie mit der Kombinationstherapie (Ribavirin plus IFNa) verglichen (Berg et al. AASLD 2001, eingereicht). Aufgrund der grossen Fallzahl in dieser Studie erhoffen wir, nach Entblindung der Daten im August 2001, eine definitive Antwort auf die Frage nach dem therapeutischen Stellenwert von Amantadin bei Patienten mit chronischer Hepatitis C zu erhalten.

5.6 Nonresponse bei der Therapie der chronischen Hepatitis C

Die Definition der Nonresponse bezieht sich auf Patienten, die unter einer mindestens 3-monatigen IFNa-Monotherapie bzw. 6-monatigen Kombinationstherapie nicht HCV-RNA negativ geworden sind. Die Therapie der „IFNa-Nonresponder“ stellt ein besonderes Problem dar. Die bisher publizierten Daten zur Kombinationstherapie bei dieser Patientengruppe sind sehr heterogen und zeigen anhaltende Remissionsraten zwischen 0-30% (217-226). Nach unseren Erfahrungen sind jedoch die therapeutischen Möglichkeiten bei dieser Patientengruppe sehr gering (< 10%) und es profitieren offenbar vor allem Patienten mit günstigen prognostischen Parametern, z.B. Patienten mit HCV-Genotyp 2- oder 3-Infektion (198).

Unsere Untersuchungen zur Viruskinetik bei Nonrespondern zeigen, daß die sogenannte „Nonresponse“ auf eine IFNa-Mono- oder Kombinationstherapie sehr unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Ungefähr 20 % der Nonresponder zeigen einen Abfall der Hepatitis C Virämie von ≥ 90 % und weitere 55 % eine Reduktion von im Mittel 63 %. Nur 25 % der Nonresponder hatten im Therapieverlauf eine stabile Virämie (Abnahme im Mittel 4 %) (204). Man sollte daher nur für diese letzte Gruppe den Begriff Nonresponder verwenden.

Die Entscheidung zum Therapieabbruch wegen virologischer Nonresponse (HCV-RNA im Serum wiederholt nachweisbar) wird nach den aktuellen Empfehlungen nach einer 6-monatigen Therapiedauer getroffen (195). Diese generelle 6-monatige Primärtherapie ist jedoch umstritten, da 90 % der Patienten mit Langzeitremission innerhalb der ersten 3 Monate, meist bereits nach 4 Wochen der Therapie, eine komplette virologische Response zeigen. In Zukunft wird die Bestimmung der Viruskinetik unter Therapie eine differenziertere Aussage über das wahrscheinliche Therapieansprechen erlauben. Untersuchungen im Rahmen einer deutschen Multizenter-Studie (197) zeigen, daß eine Nonresponse bereits 4 Wochen nach Therapiebeginn verlässlich vorausgesagt werden kann, wenn der Abfall der Hepatitis C Virämie in dieser Phase < 75 % im Vergleich zum Ausgangswert beträgt. Schwieriger ist die individuelle Vorhersage einer anhaltenden Remission, da sowohl bei anhaltenden Respondern, als auch bei Relapse-Patienten die Virämie in der Regel rasch nach Therapiebeginn abfällt. Zeuzem und Mitarbeiter konnten aber zeigen, daß eine Abnahme der HCV-RNA Konzentrationen von ≥ 3 log-Stufen bzw. ein negatives HCV-RNA Ergebnis 4 Wochen nach Therapiebeginn signifikant mit einer anhaltenden Remission korreliert ist. (227, 228).

Eine aktuelle Studie in Kooperation mit den Universitätskliniken Frankfurt, München und Kiel untersuchte die Kinetik der Hepatitis C Virämie unter Kombinationstherapie bei 355 Patienten mit anhaltender Response oder Nonresponse. Wir konnten zeigen, dass 80% der Patienten mit anhaltender Response bereits zur Therapiewoche 4 HCV-RNA Konzentrationen < 500 IU/ml aufweisen und bei allen Responder zur Therapiewoche 12 die Hepatitis C Virämie < 30.000 IU/ml beträgt. Demgegenüber hatten 45% der Nonresponder zu diesem Zeitpunkt eine Hepatitis C Virämie > 50.000 IU/ml (Berg und Mitarbeiter, Manuskript in Vorbereitung). Die generelle, in der Europäischen Konsensus-Konferenz empfohlene 24-wöchige Initial-Therapie bis zur Entscheidung zum Therapieabbruch wegen Nonresponse, ist daher nicht gerechtfertigt, da durch Bestimmungen der Virusdynamik bei einem Teil der Patienten bereits zur Therapiewoche 12 eine eindeutige Differenzierung zwischen Responder und Nonresponder erfolgen kann. Diese Ergebnisse werden wesentlich dazu beitragen, die Kosten und auch die Nebenwirkungen der Therapie zu senken.

5.7 Mechanismen der Nonresponse

Die Ursachen und Mechanismen für das unterschiedliche Responseverhalten von Patienten mit chronischer Hepatitis C auf die Interferon-Therapie sind bis heute unbekannt. Unter

den Faktoren, die eine prognostische Relevanz hinsichtlich des Ansprechens auf eine antivirale Therapie haben, kann zwischen Wirtsfaktoren und viralen Faktoren unterschieden werden. Die Bedeutung der Bildung einer neutralisierenden Antikörperantwort gegen rekombinantes IFNa als Ursache des Wirkungsverlust der antiviralen Therapie wird kontrovers diskutiert.

5.7.1 Relevanz der Interferon-alpha-Antikörperbildung im Rahmen der Interferon-Therapie bei chronischer Hepatitis C

Bei ca. 10 % der Patienten mit initialer kompletter Response kommt es - meist in der 2. Hälfte des Therapiezyklus - zu einem Relapse, der sich durch einen Anstieg der Transaminasen und erneute Positivität der HCV-RNA im Serum äußert (229). Dieses Ereignis wird als „Breakthrough“ bezeichnet. Die Ursachen für diesen Wirkungsverlust der initial erfolgreichen IFNa-Therapie sind weitgehend unbekannt. Diskutiert wird das Auftreten bzw. die Selektion Interferon-resistenter HCV-Mutanten, „Downregulation“ spezifischer zellulärer Interferon-Rezeptoren, und die Bildung von Antikörpern gegen IFNa, die zu einer Abnahme bzw. Aufhebung der IFNa-Wirkung führen (229). In einigen Studien konnte eine Assoziation zwischen Breakthrough und Auftreten von IFNa-Antikörpern nachgewiesen werden (229-231).

Die eigenen Arbeiten untersuchen, inwiefern eine Bildung neutralisierender anti-Interferon-alpha-Antikörper für den Responseverlust unter Therapie (Breakthrough) verantwortlich sein könnte (232, 233). 29% der Patienten mit chronischer Hepatitis C entwickelten IFNa-Antikörper unter Therapie mit maximalen IFNa-Antikörper-Konzentrationen 24 Wochen nach Therapiebeginn. Es zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen der Bildung von bindenden und neutralisierenden IFNa-Antikörpern. Wir konnten weiterhin zeigen, dass, wenngleich bei vielen Patienten die Bildung von anti-IFNa-Antikörpern unter Therapie ohne Folgen für die IFNa-Response bleibt, zumindest bei einem Teil der Patienten der IFNa-Wirkungsverlust bei Breakthrough durch neutralisierende Antikörper gegen das verwendete IFNa verursacht sein kann. So hatten Patienten mit Breakthrough signifikant höhere IFNa-Antikörper Titer und auch der Zeitpunkt des Breakthrough war bei Patienten mit IFNa-Antikörperbildung signifikant früher. Wir konnten auch zeigen, dass im Falle eines Breakthrough bei Nachweis hoher IFNa-Antikörperspiegel die Umstellung von rekombinaten auf natürliches Interferon erneut eine Remission erzielen kann. Die Frequenz der Antikörper-Bildung war zwischen IFNa-Mono- oder Kombinations-Therapie nicht signifikant unterschiedlich. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Nonresponse auf IFNa keine generelle Folge einer Antikörperbildung gegen rekombinantes IFNa ist. Neutralisierende IFNa-Antikörper aber in Einzelfällen einen ursächlichen Faktor bei der Entstehung des Breakthrough-Phänomens darstellen. Eine Umstellung der Therapie auf natürliches IFNa stellt in dieser Situation eine sinnvolle therapeutische Option dar.

5.7.2 Bedeutung von Mutationen innerhalb der NS5A- und E2-Region des HCV für das Therapieansprechen bei chronischer Hepatitis C

Der erste Hinweis auf einen molekularen Mechanismus als mögliche Ursache der HCV-Nonresponse auf IFNa war die klinische Beobachtung einer signifikanten Korrelation zwischen Mutationen innerhalb des viralen NS5A-Proteins von HCV-Genotyp 1b-Isolaten mit dem Therapieansprechen auf IFNa (90, 91). Folgestudien, die die IFNa-Response mit Mutationen innerhalb des NS5A-Proteins Kodon 2209-2248, der sogenannten Interferon-Sensitivitäts-determinierenden Region (ISDR) korreliert haben, führten jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen (90-96). Wir haben daher in Kooperation mit der Universitätsklinik Frankfurt bei einer grösseren HCV 1b-infizierten Patientengruppe mit unterschiedlichem Responseverhalten auf IFNa die ISDR innerhalb des NS5A-Proteins (Kodon 2209-2248) sequenziert, und die Ergebnisse der Sequenzanalyse mit der Therapie-Response verglichen (234). Wir konnten zeigen, dass eine zunehmende Anzahl von Mutationen in der ISDR mit einer steigenden anhaltenden Remissionsrate korreliert. Keiner der Patienten mit Wildtypsequenz (d.h. keine Mutation innerhalb der ISDR) hatte eine anhaltende Response. HCV-Isolate mit zahlreichen Mutation besitzen allerdings keine intrinsische Sensitivität gegenüber IFNa, wie HCV-Quasispezies-Analysen der NS5A-Region gezeigt haben (234).

Inzwischen bestätigen auch andere Arbeiten aus Europa unsere Ergebnisse (235). In einer aktuellen Meta-Analyse wurde aus den bisher publizierten 675 individuellen ISDR-Sequenzen eine Datenbank erstellt, um anhand einer grösseren Fallzahl die Bedeutung der Aminosäuresubstitutionen in der ISDR für die IFNa-Response zu untersuchen (236). Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Aminosäuresubstitution und Therapieresponse und dies interessanterweise auch bei der kombinierten Analyse von Studien, die unabhängig voneinander keine Korrelation nachweisen konnten. Die anfänglichen Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen aus Japan und Europa bzw. USA sind offenbar auf die geringen Patientenzahlen in diesen Studien zurückzuführen, und auf die Tatsache, dass HCV-Isolate mit zahlreichen Mutationen innerhalb der ISDR in Europa und USA seltener vorkommen, als in Japan.

Das Responseverhalten von HCV-Genotyp 1a-Isolaten in Abhängigkeit der Aminosäuresubstitutionen innerhalb der NS5A-Region war bisher unbekannt. Inwieweit sich die Ergebnisse bei Patienten mit HCV-Typ 1b-Infektion auch auf solche mit Typ 1a-Infektion übertragen lassen, haben wir in einer aktuellen Studie bei 32 Patienten untersucht (237). Anders als bei HCV-Genotyp 1b-Isolaten korrelierte bei Typ 1a-infizierten Patienten die Zahl der Mutationen nur innerhalb der gesamten PKR-bindenden Region (Kodon 2209-2274) mit der Therapieresponse, nicht jedoch die Substitutionen im Bereich der ISDR (Kodon 2209-2248). Phylogentische und Konformationsanalysen der NS5A-Sequenzen erlaubten keine Differenzierung zwischen IFNa-sensitiven und resistenten Isolaten.

Gale und Mitarbeitern versuchten als erste die funktionellen Ursachen, weshalb Mutationen

im Bereich des viralen NS5A-Proteins einen Einfluss auf die IFNa-Response haben, zu entschlüsseln. Die Autoren konnten *in vitro* zeigen, dass das Wildtyp-NS5A-Protein (einschliesslich ISDR) mit der IFNa-induzierten PKR, einem Hauptmediator der IFNa-induzierten antiviralen Response, interagiert und diese funktionell hemmen kann (97-99). Mutationen innerhalb der ISDR führten jedoch zu einer Aufhebung dieser Interaktion. Die funktionelle Relevanz der NS5A-PKR-Interaktion wurde durch weitere Studien belegt, die zeigen konnten, dass die Expression von NS5A die antiviralen Effekte von IFNa auf die Replikation IFNa-sensitiver Viren (Enzephalomyokarditis Virus, Vesikular Stomatitis Virus) im Zellkultursystem inhibiert (238-241).

Neue Erkenntnisse über die mögliche IFNa-Wirkung bei chronischer Hepatitis C wurden durch mathematische Berechnungen der Hepatitis C Viruskinetik unter IFNa-Therapie abgeleitet (Abb. 4). (85-87). Nach IFNa-Applikation kommt es mit einer Latenz von ca. 8 h bei nahezu allen Patienten zu einem raschen Abfall der Hepatitis C Virämie (Phase 1). Die Phase-1-Kinetik ist IFNa-dosisabhängig und offenbar das Resultat einer direkten IFNa-vermittelten HCV-Replikationshemmung durch Induktion der antiviralen Effektor-Proteine (Neumann). Der Abfall der HCV-RNA im Serum in Phase 2 (ca. 24-48 h nach Therapiebeginn) verläuft deutlich flacher, reflektiert die Abnahme der produktiv infizierten Hepatozyten und ist vermutlich durch immunmodulatorische Eigenschaften des IFNa bedingt.

Wenn NS5A-Protein auch *in vivo* die direkten IFNa-induzierten antiviralen Effektorproteine inhibiert, so müsste durch diese Interaktion vor allem der initiale Abfall der Hepatitis C Virämie (Phase 1) unter Therapie beeinflusst werden. Wir haben daher in einer Folgestudie die Zahl der Mutation innerhalb der sogenannten PKR-bindenden Region (einschliesslich ISDR) bei HCV-Genotyp 1b und 1a-Isolaten mit der Dynamik der Hepatitis C Virämie unter IFNa-Therapie verglichen (242). Es zeigte sich hierbei jedoch keine Korrelation zwischen Substitutionen und Virämieabfall in der Phase 1. Die Phase 2-Kinetik der Hepatitis C Virämie und die anhaltenden Responseraten waren aber mit der Zahl der Mutationen korreliert.

Zusammengenommen belegen die vorhandenen Daten, dass Mutationen innerhalb des NS5A-Proteins eine prognostische Bedeutung für das Ansprechen einer IFNa-Therapie haben. Es wird in Zukunft durch prospektive Studien zu klären sein, inwiefern dieser Responseparameter bei der Etablierung individueller Therapiestrategien hilfreich sein könnte. Wenngleich inzwischen zahlreiche Untersuchungen bestätigen, dass NS5A die antiviralen Effekte von IFNa hemmen kann, so scheint der hierfür ursächliche Mechanismus jedoch nicht in der Inhibition der PKR durch NS5A zu liegen. Hierfür sprechen auch neuere *in vitro* Untersuchungen, die keine Kolo-kalisation von PKR und NS5A im Zellkultursystem nachweisen konnten (243, 244). Vielmehr könnte NS5A im Rahmen der IFNa-induzierten immunologischen Responsemechanismen eine Rolle spielen (245).

Eine Interaktion des HCV E2-Glykoproteins mit der PKR wurde ebenfalls vermutet. Diese Hypothese stammt ursprünglich von Taylor und Mitarbeitern, die kürzlich ein 12 Aminosäuren-großes Fragment innerhalb des HCV-Hüllproteins E2 identifiziert haben, das eine hohe

Sequenzhomologie zu der Autophosphorylisationsstelle der PKR und der Translations-Initiationsfaktor (eIF2 α)-Phosphorylisationsstelle aufweist (100). Diese Region wurde als PKR-eIF2 α Phosphorylisations-Homologie-Domäne (PePHD) bezeichnet. Die Autoren zeigten, dass die PePHD von HCV-Genotyp 1-Isolaten, nicht jedoch von Typ 2 und 3-Isolaten *in vitro* die PKR hemmt und dadurch ihre inhibitorischen Effekte auf die Proteinbiosynthese und das Zellwachstum aufhebt. Die Autoren vermuteten, dass diese Interaktion eine Erklärung für die intrinsische Resistenz des HCV-Genotyps 1 gegenüber IFNa darstellt.

In einer großen Studie bei 81 HCV-Genotyp 1-infizierten Patienten haben wir die E2-PePHD-Region analysiert und mit der Therapieresponse korreliert (242). Es zeigte sich, dass die PePHD bei HCV-Genotyp 1 Isolaten hoch-konserviert ist und die wenigen Mutation, die sich in dieser Region nachweisen ließen, waren nicht mit der Response korreliert. Patienten mit einer PePHD-Sequenz, die nach den Daten von Taylor und Mitarbeitern IFNa-Resistenz vermittelt, zeigten zudem eine gute Response auf IFNa mit anhaltender Remission. Phylogenetische Untersuchungen der E2-PePHD-Region ergaben ebenfalls keine Unterschiede zwischen IFNa-sensitiven und resistenten HCV-Isolaten. Ähnliche Ergebnisse wurden inzwischen auch von anderen Autoren publiziert (246-249). Sequenzierungen der PePHD-Region sind daher nicht hilfreich, um das individuelle Therapieansprechen vorherzusagen.

Bei Kinetik-Analysen konnten wir aber zeigen, HCV-Genotyp 1a-Isolate mit einer Mutation an Position 626 des E2-Proteins (ausserhalb der PePHD) einen signifikant steileren Abfall der Hepatitis C Virämie aufwiesen als Isolate ohne diese Mutation (242). Diese Beobachtung könnte für eine Interaktion von E2 mit IFNa-induzierten Responsefaktoren sprechen und belegt die Bedeutung einer exakten phänotypischen Charakterisierung bei Studien zum Nachweis HCV-genomischer Merkmale für die Therapieresponse.

5.8 Bedeutung der neu entdeckten Hepatitis-assoziierten Viren (GBV-C/HGV und TTV) für den Verlauf der chronischen Hepatitis C und das Therapieansprechen

Der Schwerpunkt unserer Untersuchungen befaßte sich mit der Relevanz von Koinfektionen mit den Hepatitis-assoziierten Viren GBV-C/HGV- bzw. TTV für den Verlauf der chronischen Hepatitis C, und ob diese Koinfektionen einen prognostisch ungünstigen Faktor für das Responseverhalten der Hepatitis C auf eine antivirale Therapie darstellen. In enger Kooperation mit dem Robert-Koch-Institut, Abteilung für molekulare Virologie (Prof. Schreiber) haben wir spezifische und sensitive Systeme zur Detektion und Quantifizierung der neuen Hepatitis-assoziierten Viren entwickelt. Phylogenetische Analysen der Virusisolate ermöglichten außerdem die klinische Relevanz der unterschiedlichen GBV-C/HGV bzw. TTV-

Genotypen/Subtypen zu untersuchen. Die Ergebnisse werden in den entsprechenden Arbeiten ausführlich diskutiert (250-259).

Wir konnten zeigen, dass chronische GBV-C/HGV- bzw. TTV-Koinfektionen keinen erkennbaren Einfluss auf die Progredienz der chronischen Hepatitis C haben. Im Gegenteil, es ergaben sich Hinweise dafür, dass in bestimmten klinischen Situationen die GBV-C/HGV-Koinfektion den Verlauf günstig beeinflussen kann. Auch die Response der chronischen Hepatitis C auf eine IFNa-Therapie wurde weder durch GBV-C/HGV noch durch TTV negativ beeinflusst. Die Untersuchungen zeigten außerdem, dass sowohl GBV-C/HGV als auch TTV Interferon-sensitive Viren sind.

Untersuchungen zur Prävalenz, Transmission und klinischen Relevanz der GBV-C/HGV- und TTV-Infektion als mögliche Hepatitis-induzierende Agentien wurden bei Patienten mit fulminantem Leberversagen unklarer Ätiologie, kryptogener chronischer Hepatitis, bei Patienten vor und nach Lebertransplantation sowie gesunden Personen (Blutspendern) durchgeführt. Die Arbeiten belegen, dass es sich bei GBV-C/HGV bzw. TTV um ein parenteral-übertragbares Virus handelt, welches eine hohe Prävalenz bei Patienten mit entsprechenden parenteralen Risikofaktoren aufweist. Zwei Prozent der Blutspender sind in Deutschland mit GBV-C/HGV chronisch infiziert, und die Prävalenz von TTV-Infektionen liegt bei dieser Personengruppe bei 7-20% (251, 259, 260). Die umfangreichen Untersuchungen bei GBV-C/HGV- bzw. TTV-Trägern sprechen jedoch gegen eine Hepatitis-induzierende Potenz dieser Viren, da die Mehrzahl aller chronisch-infizierten Personen (Blutspender) keine Zeichen einer chronischen Hepatitis aufwies. Es konnten auch keine extrahepatischen Erkrankungen mit der chronischen GBV-C/HGV- oder TTV-Infektion in Verbindung gebracht werden. Interessant sind Untersuchungen die zeigen, dass die chronische GBV-C/HGV-Infektion offenbar einen günstigen Einfluss auf den Verlauf der HIV-Infektion zu haben scheint (253, 261, 262). Wir konnten weiter zeigen, dass der Hauptreplikationsort von GBV-C/HGV nicht die Leber ist (257, 263-265). Diese Untersuchungen haben wesentliche Bedeutung für die klinische Einschätzung der GBV-C/HGV-Infektion und sprechen zusammen mit den anderen von uns durchgeführten Analysen gegen eine Hepatitis-induzierende Potenz des GBV-C/HGV.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass weder GBV-C/HGV noch TTV klassische Hepatitisviren darstellen (266-268). Infektionen mit diesen Viren führen zwar häufig zu einer persistierenden Infektion, jedoch nicht zu einer chronischen Hepatitis. Es ist auch nicht belegt, dass GBV-C/HGV eine akute Hepatitis verursachen könnte. Ein kausaler Zusammenhang von GBV-C/HGV und TTV-Infektionen und der Entwicklung einer milden Begleit-Hepatitis kann derzeit jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden. Bei der hohen Prävalenz dieser Viren in der Bevölkerung ist die diagnostische Bedeutung im Falle eines Nachweises von GBV-C/HGV oder TTV bei einem Patienten mit unklarer Lebererkrankung schwer einzuschätzen. Für Patienten mit chronischer Hepatitis C stellt die Koinfektion mit diesen neuen Hepatitis-assoziierten Viren keinen gesonderten Risikofaktor dar, weder für den Verlauf der Hepatitis C, noch für die

Therapieresponse. Eine generelle Testung von Blutspendern auf GBV-C/HGV oder TTV wird daher von der Arbeitsgemeinschaft Blut zur Zeit nicht empfohlen. Hauptreplikationsort von GBV-C/HGV ist wahrscheinlich nicht die Leber. Der Gewebe-Tropismus von TTV ist bisher nicht ausreichend untersucht (269-271). Auch nach der Entdeckung von GBV-C/HGV und TTV bleibt somit die Ursache der Mehrzahl aller Fälle von fulminanten, akuten und chronischen Non-A-E-Hepatitis ungeklärt. Die klinische Bedeutung des kürzlich entdeckten SEN-Virus ist in diesem Zusammenhang bisher offen (272). Eigene Untersuchungen von Patienten mit kryptogener Zirrhose und fulminanter Hepatitis Non-A-E legen die Vermutung nahe daß bei einem Teil dieser Patienten autoimmunologische Prozesse und nicht virale Faktoren für die Lebererkrankung verantwortlich sein könnten.

Referenzen

1. Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; **244**: 359-362.
2. Bradley DW, Maynard JE. Etiology and natural history of post-transfusion and enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Sem Liver Dis* 1986; **6**: 56-66.
3. European patent application (Europäisches Patentamt München, Nr. 0-318-216-A1).
4. Alter MJ, Coleman PJ, Alexander WJ, Kramer E, Miller JK, Mandel E, Hadler SC, Margolis HS. Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis. *JAMA* 1989; **262**: 1201-1205.
5. Alter MJ, Sampliner RE. Hepatitis C and miles to go before we sleep. *N Engl J Med* 1989; **321**: 1538-1540.
6. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PJ, Miller JK, Moyer LA, Fields HA, Bradley DW, Margolis HS. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA*.1990; **264**: 2231-2235.
7. Alter MJ. Inapparent transmission of hepatitis C: footprint in the sand. *Hepatology* 1991; **14**: 389-391.
8. Alter MJ, Margolis HD, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE, Meeks EL, Beach MJ. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992; **327**: 1899-1905.
9. Han JH, Shyamala V, Richmann KH, Brauer MJ, Irvine B, Urdea MS, Tekamp-Olson P, Kuo G, Choo Q-L, Houghton M. Characterisation of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: Identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc. Natl Acad Sci* 1991; **88**: 1711-1715.
10. Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F. Classification of nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 1991 (*Suppl* 2); 223.
11. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo Q-L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: Implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991; **14**: 381-388.

12. Choo Q-L, Kuo G, Weiner A, Wang K-S, Overby L, Bradley D, Houghton M. Identification of the major, parenteral non-A, non-B hepatitis agent (hepatitis C virus) using a recombinant cDNA approach. *Sem Liv Dis* 1992; 12: 279-288.
13. Reed KE, Rice CM. Molecular characterization of hepatitis C virus. In Reesnick HW (Editor): *Hepatitis C Virus*, 2nd revised and enlarged edition. Current Studies in Hematology and Blood Transfusion. Basel, Karger 1998; No 62: 1-37.
14. Bartenschlager R. The NS3/4A proteinase of the hepatitis C virus: unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy. *J Viral Hepat* 1999; 6: 165-181.
15. Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 242: 55-84.
16. Choo Q-L, Richmann KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby A, Barr PJ, Weiner AJ, Bradley DW, Kuo G, Houghton M. Genetic organisation and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Nat Acad Sci* 1991; 88: 2451-2455.
17. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 9524-9528.
18. Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Murakami S, Fujita J, Onishi E, Andoh T, Yoshida I, Okayama H. Structure and organisation of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 1991; 65: 1105-1113
19. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, Miyakawa Y, Mayumi M. Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: Comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* 1991; 72: 2697- 2704.
20. Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO* 1996; 15: 12-22.
21. Chen PJ, Lim MH, Tai KF, Liu PC, Lin CJ, Chen DS. The Taiwanese hepatitis C virus genome: sequence determination and mapping the 5' termini of viral genomic and antigenomic RNA. *Virology* 1992; 188: 102-113.
22. Ogata N, Alter HJ, Miller R, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 3392-3396.
23. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, Miyakawa Y, Mayumi M. Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: Comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* 1991;

- 72: 2697- 2704.
24. Okamoto H, Kurai K, Okada S-I, Yamamoto K, Lizuka H, Tanaka T, Fukuda S, Tsuda F, Mishiro S. Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: Comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 1992; 188: 331-341.
 25. Simmonds P, McOmish F, Yap PL, Chan SW, Lin CK, Dusheiko G, Saeed AA, Holmes EC. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: Identification of a new virus type and restriction on sequence diversity. *J Gen Virol* 1993; 74: 661-668.
 26. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74: 2391-2399.
 27. Simmonds P, Rose KA, Graham S, Chan S-W, McOmish F, Dow BC, Follett EAC, Yap PL, Marsden H. Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of hepatitis C virus (HCV): Use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2, and 3. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1493-1503.
 28. Pozzato G, Moretti M, Franzin F, Croce LS, Tiribelli C, Masayu T, Kaneko S, Unoura Kobayashi K. Severity of liver disease with different hepatitis C viral clones. *Lancet* 1991; 338: 509.
 29. McOmish F, Chan SW, Dow BC, Gillon J, Frame WD, Crawford RJ, Yap PL, Follett EAC, Simmonds P. Detection of three types of hepatitis C virus in blood donors: investigation of type-specific differences in serologic reactivity and rate of alanine aminotransferase abnormalities. *Transfusion* 1993; 33: 7-13.
 30. Takada N, Takase S, Enomoto N, Takada A, Date T. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genomes. *J Hepatol* 1992; 14: 35
 31. Kanai K, Kako M, Okamoto H. HCV genotypes in chronic hepatitis-C and response to interferon. *Lancet* 1992; 339: 1543.
 32. Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Takayanagi M, Higashi Y, Shibata M, Morishima T. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-* therapy: Relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992; 16: 293-299.
 33. Berg T, König V, Küther S, Heuft HG, Wittmann G, Lobeck H, Hopf U. Prognostic importance of hepatitis C virus genotypes for the responsiveness to interferon-alpha Z *Gastroenterol* 1995; 33: 426-430.
 34. Qu D, Li JS, Vitvitski L, Mechai S, Berby F, Tong SP, Bailly F, Wang QS, Martin JL, Trepo C. Hepatitis C virus genotypes in France: comparison of clinical features of patients infected

- with HCV type I and II. *J Hepatol* 1994; 21: 70-75.
35. Driesel G, Wirth D, Stark K, Baumgarten R, Sucker U, Schreier E. Hepatitis C virus (HCV) genotype distribution in German isolates: studies on the sequence variability in the E2 and NS5 region. *Arch Virol* 1994; 139: 379-388.
 36. Pistello M, Maggi F, Vatteroni L, Cecconi N, Panicucci F, Bresci GP, Gambardella L, Taddei M, Bionda A, Tuoni M, Bendinelli M. Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Italy. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 232-234.
 37. Mondelli MU, Silini E. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl. 1): 65-70.
 38. Cohen J. The scientific challenge of hepatitis C. *Science* 1999; 285: 26-30.
 39. Trépo C, Pradat P. Hepatitis C virus infection in Western Europe. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl. 1): 80-83.
 40. Naoumov NV. Hepatitis C virus infection in Eastern Europe. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl. 1): 84-87.
 41. Couzigou P, Richard L, Dumas F, Schouler L, Fleury H. Detection of HCV-RNA in saliva of patients with chronic hepatitis C. *Gut* 1993; 34 (Suppl): S59-S60.
 42. Van der Poel CL. Hepatitis C virus and blood transfusion: past and present risks. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl. 1): 101-106.
 43. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26: 62S-65S.
 44. Dienstag JL. Sexual and perinatal transmission of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26: 665-705.
 45. Zanetti AR, Tanzi E, Newell ML. Mother-to-Infant transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl. 1): 96-100.
 46. Thomas DL, Villano SA, Riestler KA, Hershow R, Mofenson LM, Landesman SH, Hollinger FB, Davenny K, Riley L, Diaz C, Tang HB, Quinn TC. Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. Women and infants transmission study. *J Infect Dis* 1998; 177: 1480-1488.
 47. Wejstal R. Sexual transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl. 1): 92-95.
 48. Alter MJ, Mast EE. The epidemiology of viral hepatitis in the United States. *Gastroenterology Clinics of North America* 1994; 23: 437.
 49. Hopf U, Möller B, Küther S, Stemerovicz R, Lobeck H, Lüdtker-Handjery A, Walter E, Blum H.E, Roggendorf M, Deinhardt F. Long-term follow-up of posttransfusion and sporadic

- hepatitis non-A, non-B and frequency of circulating antibodies to hepatitis C virus. *J Hepatol* 1990; 10: 69.
50. Alberti A, Realdi G. Parenterally acquired non-A, non-B (type C) hepatitis. In: McIntyre, N., J-P. Benhamou, J. Bircher, M. Rizzetto, J. Rodes (ed.): *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. Oxford University Press, Oxford (1991).
 51. Kiyosawa K, Akahane Y, Nagata A, Koike Y, Furuta S. Significance of blood transfusion in non-A, non-B chronic liver disease in Japan. *Vox Sanguinis* 1982; 43: 45.
 52. Tong MJ, El-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *New Engl J Med* 1995; 332: 1463.
 53. Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, Hashimoto E, Lefkowitz JH, Ludwig J, Ukuda K. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 23: 1334.
 54. Marcellin P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl. 1): 9-16.
 55. Nishigushi S, Kuroki T, Nakatani S, Morimoto H, Takeda H, Nakajima S, Shiomi S, Seki S, Kobayashi K, Otani S. Randomised trial of the effects of interferon-a on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C. *Lancet* 1995; 346: 1051.
 56. Resnick RH, Koff R. Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. Prevalence and significance. *Arch Int Med* 1993; 153: 1672.
 57. Nishigushi S, Shiomi S, et al. Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *Lancet* 2001; 357: 196-197.
 58. Davis GL, Albright JE, Cook S, Rosenberg D. Projecting the healthcare burden from hepatitis C in the United States. *Hepatology* 1998; 28 (No.4; Pt.2): 390A.
 59. Seef LB, Natural history of hepatitis C Postgraduate Course 2000: Update on viral hepatitis. *AASLD 2000*: 112-118.
 60. Joklik WK. Interferons. In: Fields, N., D. M. Knipe (Editor): *Virology*. Raven Press, New York 1990; 383.
 61. Kirchner H. Interferons, a group of multiple lymphokines. *Springer Semin Immunopathol* 1984; 7: 347.
 62. Peters M. Mechanisms of action of interferon. *Sem Liv Dis* 1989; 9: 5.
 63. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferons. *Proc R Soc Lond* 1957; 147: 258.

64. Lindenmann J. Induction of chick interferon: procedures of the original experiments. *Method Enzymol* 1981; 78: 181-188.
65. Weissmann C, Weber H. The interferon genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1986; 33: 251.
66. Owerbach D, Rutter WJ, Shows TB, Gray P, Goeddel DV, Lawn RM. Leucocyte and fibroblast interferon genes are located on human chromosome 9. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 126: 3123-3127.
67. Seghal PB, Pfeffer LM, Tamm I. Interferon and its inducers. In: Carme PE, Calicuin LA (ed.): *Viral Infection* 1982; 205.
68. Ohlsson M, Feder J, Cavalli-Sforza LL, v. Gabain A. Close linkage of alpha and beta interferons and infrequent duplication of beta interferon in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 4473.
69. Taniguchi T, Sakai M, Fujii-Kuriyama Y, Muramatsu M, Kobayashi S, Sudo T. Construction and identification of a bacterial plasmid containing the human fibroblast gene sequence. *Proc Jpn Acad (Ser B)* 1979; 55: 464.
70. Gray PW, Goeddel DV. Structure of the human immune interferon gene. *Nature* 1982; 298: 859-863.
71. Naylor SL, Sakaguchi AY, Schows TB, Law ML, Goeddel DV, Gray PW. Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J Exp Med* 1983; 157: 1020-1027.
72. Vilcek J, Kelker H, Le J, Yip YK. Structure and function of human interferon-gamma. In: Ford, R., A. Maizel (ed.): *Mediators in cell growth and differentiation*. Raven Press, New York 1985; 299.
73. Huez G, Silhol M, Lebleu B. Microinjected interferon does not promote an antiviral response in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 110: 155.
74. Vengris VE, Stollar BD, Pitha PM. Interferon externalization by producing cell before induction of antiviral state. *Virology* 1975; 65: 410.
75. Aguet M, Blanchard B. High affinity binding of ¹²⁵J-labeled mouse interferon to a special cell surface receptor: II. Analysis of binding properties. *Virology* 1981; 115: 249.
76. Evans T, Secher D. Kinetics of internalisation and degradation of surface bound interferon in human lymphoblastoid cells. *EMBO* 1984; 3: 2975.
77. Pestka S. Interferons and their actions. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 727.
78. Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silvermann RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 227.

79. Samuel CE. Mechanisms of the antiviral action of interferons. *Proc Nucl Acid Res* 1988; 35: 27.
80. Samuel CE. Progress toward the understanding of the molecular mechanism of interferon action. *Prog Clin Biol Res* 1987; 246: 209.
81. Johnston M, Torrence P. The role of interferon-induced proteins, double stranded RNA and 2', 5'-oligoadenylate in the interferon-mediated inhibition of viral translation. In: Friedman, RM (ed) *Interferon: Mechanism of production and action*. Elsevier Science Publishers 1984; 190-297.
82. Whitaker-Dowling P, Younger JS. Characterization of specific kinase inhibitory factor produced by vaccinia virus which inhibits the interferon induced protein kinase. *Virology* 1984; 137: 171.
83. Guttermann JU. Cytokine therapeutics: lessons from interferon-alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1198.
84. Sarrazin C, Zeuzem C. Wirkungsweise von Interferonen und Nukleosidanaloga. *Verdauungskrankheiten* 2000; 18: 102-113.
85. Zeuzem S, Schmidt JM, Lee J-H, Rüster B, Roth WK. Effect of interferon alfa on the dynamics of hepatitis C virus turnover in vivo. *Hepatology* 1996; 23: 366.
86. Lam N, Neumann A, Gretch D, Wiley T, Perelson A, Layden T. Dose-dependent acute clearance of hepatitis genotype 1 virus with interferon alfa. *Hepatology* 1997; 26: 226.
87. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS. Hepatitis C viral dynamics and the antiviral efficacy of interferon-a therapy. *Science* 1998; 282: 103.
88. Diepolder HM, Hoffmann RM, Gerlach JT, Zachoval R, Jung MC, Pape GR. Immunopathogenesis of HCV infection. In H. W. Reesink, Editor; *Hepatitis C Virus*, 2nd Edition 1998; 135.
89. Hoffmann R, Diepolder H, Zachoval R, Zwiebel F-M, Jung M-C, Scholz S, Nitschko H, Riethmüller G, Pape GR. Mapping of immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes of hepatitis C virus antigens and their relevance during the course of chronic infection. *Hepatology* 1995; 21: 632.
90. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b: Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995; 96 224.
91. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to

- interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996; 334: 77.
92. Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Okamoto K, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, et al. Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1997; 25: 745-749.
93. Kurosaki M, Enomoto N, Murakima T, Sakuma I, Asahina Y, Yamamoto C, Ikeda T, et al. Analysis of genotypes and amino acid residues 2209-2248 of the NS5A region of hepatitis C virus in relation to the response to interferon-beta therapy. *Hepatology* 1997; 25: 750-753.
94. Zeuzem S, Lee H-J, Roth WK. Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa. *Hepatology* 1997;25:740-744.
95. Hofgärtner WT, Polyak SJ, Sullivan DG, Carithers RL, Jr., Gretch DR. Mutations in the NS5A gene of hepatitis C virus in North American patients infected with HCV genotype 1a or 1b. *J Med Virol* 1997;53:118-126.
96. Squadrito G, Leone F, Sartori M, Nalpas B, Berthelot P, Pol S, Brechot C. Mutations in the nonstructural 5A region of hepatitis C virus and response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Gastroenterology* 1997;113:567-572.
97. Gale MJ, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997; 230: 217.
98. Gale MJ, Korth MJ, Katze MG. Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol* 1998; 10: 157.
99. Gale MJ, Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dosset M, Tang NM, Korth MJ, Katze MG. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 5208.
100. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MMC. Inhibition of the interferon-inducible kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999; 285: 107.
101. Pfeffer LM, Dinarello CA, Hebermann RB, Williams BRG, Borden EC, Borden R, Walter MR, Nagabhushan TL, Trotta PP, Pestka S. Biological properties of recombinant α -interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res* 1998; 58: 2489-2499.
102. Zoon KC, Miller D, Bekicz J, zur Nedden D, Enterline JC, Nguyen NY, Hu R. Purification and characterization of multiple components of human lymphoblastoid interferon- α . *J Biol Chem* 1992; 267: 15210.

103. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie AM, Peters M, Waggoner JG. Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon: a preliminary report. *N Engl J Med* 1986; 315: 1575.
104. Davis GL, Balart LA, Schiff ER, Lindsay K, Bodenheimer HC, Perrillo RP, Carey W, Jacobsen IM, Payne J, Dienstag JL, Van Thiel DH, Tamburro C, Lefkowitz J, Albrecht J, Meschivitz C, Ortego TJ, Gibas A. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. *N Engl J Med* 1989; 321: 1501.
105. Causse X, Godinot H, Chevallier M, Chossegros P, Zoulim F, Ouzan D, Heyraud JP, Fontanges T, Albrecht J, Meschivitz C. Comparison of 1 or 3 MU of interferon alfa 2b and placebo in patients with chronic non-A, non-B hepatitis. *Gastroenterology* 1991; 101: 497.
106. Di Bisceglie AM, Martin P, Kassianides C, Lisker-Melan M, Murray L, Waggoner J, Goodman Z, Banks SM, Hoofnagle JH. Recombinant interferon alfa therapy for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1989; 321: 1506.
107. Hoofnagle JH, Peters M, Mullen KD. Randomized, controlled trial of recombinant human alpha-interferon in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1998; 95: 1318.
108. Hopf U, Möller B, König V, Küther S, Lobeck H, Huhn D. Langzeitbehandlung der kryptogenen chronischen Hepatitis C mit rekombinantem Interferon alpha. *Z Gastroenterol* 1990; 28: 453.
109. Hopf U, Küther S, König V, Heuft HG, Berg T, Bauditz J, Soltani K, Lobeck H, Huhn D. Langzeitbeobachtung der chronischen Hepatitis C nach Behandlung mit rekombinantem Interferon alpha-2a. *Z Gastroenterol* 1994; 32: 425.
110. Marcellin P, Boyer N, Giostra E, Degott C, Lournonce AM, Degos F, Coppere H, Cales P, Couzigou P, Benhamou JP. Recombinant human alpha-interferon in patients with chronic non-A, non-B hepatitis: a multicenter randomized controlled trial from France. *Hepatology* 1991; 13: 393.
111. Patterson JL, Fernandez-Larsson R. Molecular mechanisms of action of ribavirin. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 1139.
112. Sidwell RW, Huffman JH, Kharp L, Allen LB, Witkowski JT, Robins RK. Broad spectrum activity of virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,3-triazole-3-carboxamide. *Science* 1972; 117: 705.
113. Ilyin GP, Langouet S, Rissel M, Delcros JG, Guillouzo A, Guguen GC. Ribavirin inhibits protein synthesis and cell proliferation induced by mitogenic factors in primary human and rat hepatocytes. *Hepatology* 1998; 27: 1687.
114. Montero C, Duley JA, Fairbanks LD, McBride MB, Micheli V, Cant AC, Morgan G.

- Demonstration of induction of erythrocyte inosine monophosphate dehydrogenase activity in ribavirin-treated patients using a high performance liquid chromatography linked method. *Clin Chem Acta* 1995; 238: 169.
115. Di Bisceglie AM, Conjeevaram HS, Fried MW, Sallie R, Park Y, Yurdaydin C, Swain MG, Kleiner DE, Maheaney K, Hoofnagle JH. Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1995; 123: 897.
116. Bodenheimer HC, Lindsay KL, Davis GL, Lewis IH, Thung SN, Seef KLB. Tolerance and efficacy of oral ribavirin treatment of chronic hepatitis C: a multicenter trial. *Hepatology* 1997; 26: 473.
117. Dusheiko G Main J, Thomas H, Reichard O, Lee C, Dhillon A, Rassam S, Fryden A, Reesink H, Bassendine M, Norkrans G, Cuypers T, Lelie N, Telfer P, Watson J, Weegink C, Sillikens P, Weiland O. Ribavirin treatment for patients with chronic hepatitis C: results of a placebo controlled study. *J Hepatol* 1996; 25: 591.
118. Reichard O, Andersson J, Schvarcz R, Weiland O. Ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *Lancet* 1991; 337: 1058.
119. Reichard O, Yun Z-B, Sönnernborg A, Weiland O. Hepatitis C viral RNA titers in serum prior to, during, and after oral treatment with ribavirin for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1993; 41: 99.
120. Smith JP. Treatment of chronic hepatitis C with amantadine. *Dig Dis Sci* 1997;42:1681-87.
121. Dolin R, Reichmann RC, Madore HP, Maynard R, Linton PN, Webber-Jones J. A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection. *N Engl J Med* 1982;307:580-84.
122. Hay AJ, Wolstenholme AJ, Skehel JJ, Smith MH. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J* 1985;4:3021-24.
123. Wang C, Takeuchi K, Pinto LH, Lamb RA. Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J Virol* 1993;76:5585-94.
124. Martin J, Navas S, Fernández M, et al. In vitro effect of amantadine and interferon-2a on hepatitis C virus markers in cultured peripheral blood mononuclear cells from hepatitis C virus infected patients. *Antiviral Res* 1999;42:59-70.
125. Brillanti S, Levantesi F, Foli M, Di Tomaso M, Bolondi L. Amantadine and RebetronTM exert a synergistic antiviral effect on HCV replication in interferon-a non-responders with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 116 (Suppl 1): 212 [Abstract].
126. Brillanti S, Foli M, Di Tomaso M, Gramantieri L, Masci C, Bolondi L. Pilot study of triple

- antiviral therapy for chronic hepatitis C in interferon alpha non-responders. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31: 130-4.
127. Brillanti S, Levantesi F, Masi L, Foli M, Bolondi L. Triple antiviral therapy as a new option for patients with interferon nonresponsive chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 32: 630-634.
128. Khalili M, Denham C, Perillo R. Interferon and ribavirin versus interferon and amantadine in interferon nonresponders with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1284-1289.
129. Hubert IF, Lunel F, Cadranel J-F, Oberti F, Calès P. Treatment of chronic hepatitis C with amantadine. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2316-2317.
130. Zeuzem S., G. Teuber, U. Naumann, T. Berg, J. Raedle, S. Hartmann, U. Hopf. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interferon alfa2a with and without amantadine as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 32: 835-841.
131. Caronia S, Crossey M, Murray-Lyon I, Lypsynyi D, Main J, Thomas HC, Foster G. A pilot study of interferon plus amantadine versus interferon alone in the treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 30 (Suppl 1): 138 [Abstract].
132. Younossi ZM, Perillo RP. The roles of amantadine, rimantadine, ursodeoxycholic acid, and NSAIDs, alone or in combination with alpha interferons, in the treatment of chronic hepatitis C. *Sem Liver Dis* 1999; 19 (Suppl 1): 95.
133. Brillanti S, Garson J, Foli M, Whitby K, Deaville R, Masci C, Miglioli M, Barbara L. A pilot study of combination therapy with ribavirin plus interferon alfa for interferon alfa-resistant chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1994; 107: 812.
134. Chemello L, Cavaletto L, Bernardinello E, Guido M, Pontisso P, Alberti A. The effect of interferon alfa and ribavirin combination therapy in naive patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1995; 23 (Suppl 2): 8.
135. Lai MY, Kao JH, Yang PM, Wang JT, Chen PJ, Chan KW, Chu JS, Chen DS. Long-term efficacy of ribavirin plus interferon alfa in the treatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1996; 111: 1307.
136. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZG, Ling MH, Albrecht JK for the Hepatitis Interventional Therapy Group (HIT). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998; 339: 1485.
137. Reichard O, Norkrans G, Frydén A, Braconier JH, Sönnnerborg A, Weiland O, for the Swedish Study Group. Randomised, double blind, placebo-controlled trial of interferon-a-2b with and without ribavirin for chronic hepatitis C. *Lancet* 1998; 351: 83.
138. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk G, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem

- S, Trépo C, Albrecht J, for the International Hepatitis Interventional Group (IHIT). Randomized trial of interferon a2b plus ribavirin for 48 weeks or 24 weeks versus interferon a2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1998; 352: 1426.
139. Trépo C, Lindsay K, Niederau C, Schiffman M, Gordon S, Hoefs J, Schiff ER, Marcellin P, Bacon B, Fang J, Garaud J, Albrecht J, for the Hepatitis Interventional Therapy Group: Pegylated interferon alfa-2B (Peg-Intron) monotherapy is superior to interferon-alfa-2B (Intron A) for the treatment of chronic hepatitis C [Abstract]. *J Hepatol* 2000; 32 (Suppl 2): 29.
140. Zeuzem S, Feinmann SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai M-Y, Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffmann J, Brunda MJ. Peg-Interferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2000; 343: 1666-1672.
141. Heathcote EJ, Shiffmann ML, Cooksley GE, Dusheiko GM, Lee SS, Balart L, Reindollar R, Reddy RT, Wright TL, Lin A, Hoffmann J, De Pamphilis J. Peg-Interferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1673-1680.
142. Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, et al. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon a-2a compared with interferon a-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001; 33: 433-438.
143. Manns MP, McHutchison JG, Gordon S, Rustgi V, Shiffmann ML, Lee WM, Ling ML, Cort S, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared to interferon alfa-2b plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C: 24 week treatment analysis of a multicenter, multinational phase III randomized controlled trial. *Hepatology* 2000; 32 (No.4 Pt 2): 297 [Abstract].
144. Glue P, Rouzier-Panis R, Raffanel C, Sabo R, Gupta SK, Jacobs S, Clement RP, Ingravallo P, Thomg W, Hong Z, Garaud JJ, Lau J. A dose-ranging study of PEG-Intron and ribavirin in chronic hepatitis C – safety, efficacy, and virologic rationale. *Hepatology* 1999; 30 (No.4, Pt 2): 303A.
145. Sulkowski M, Reindollar R, Yu J. Combination therapy with Peginterferon a-2A (PEG-IFN) and ribavirin in the treatment of patients with chronic hepatitis C (CHC): a phase II open-label study [Abstract]. *Hepatology* 1999; 30 (No.4, Pt 2): 197A.
146. Benhamou JP, U. Hopf, Rizzetto M, Sanchez-Tapias JM, Braconier JH, Buhler H, Spacey B. and Non-A, non-B (C) Study Group: Long-term lymphoblastoid interferon enhances sustained responses and improves histological activity up to 12 months post-treatment. *Hepatology* 1995; 22: 151A.
147. Chemello L, Bonetti P, Cavaletto L, Talato F, Donadon V, Casarin P, Belussi F, Frezza M,

- Noventa F, Pontisso P, Benvegna L, Casarin C, Alberti A, and the TriVeneto Viral Hepatitis Group. Randomized trial comparing three different regimens of alpha-2a-interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995; 22: 700.
148. Davis J. Prediction of response to interferon treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1994; 21: 1.
149. Kasahara A, Hayashi N, Hiramatsu N, Oshita M, Hagiwara H, Katayama K, Kato M, Masuzawa M, Yoshihara H, Kishida Y. Ability of prolonged interferon treatment to suppress relapse after cessation of therapy in patients with chronic hepatitis C: a multicenter randomized controlled trial. *Hepatology* 1995; 21: 291.
150. Lin R, Roach E, Zimmermann M, Strasser S, Farrell GC. Interferon-alfa-2b for chronic hepatitis C: effects of dose increment and duration of treatment on response rates. Results of the first multicenter Australian trial. Australia Hepatitis C Study Group. *J Hepatol* 1995; 23: 487.
151. Poynard T, Bedossa P, Chevallier M, Mathurin P, Lemonnier C, Trépo C, Couzigou P, Payen JL, Sajus M, Costa JM, Vidaud M, Chaput JC, and the Multicenter Study Group. A comparison of three interferon alfa-2b regimens for the long-term treatment of chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1995; 332: 1457.
152. Reichard O, Foberg U, Frydén A, Mattsson L, Norkrans G, Sönnernborg A, Wejstal R, Yun Z-B, Weiland O. High sustained response rate and clearance of viremia in chronic hepatitis C after treatment with interferon-a2b for 60 weeks. *Hepatology* 1994; 19: 280.
153. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *New. Engl. J. Med.* 1989; 321: 1494-1500.
154. Peters T, Schlayer HJ, Preisler S, Kopp B, Berthold H, Gerok W, Rasenack J. Frequency of hepatitis C in acute post-transfusion hepatitis after open-heart surgery: a prospective study in 1,476 patients. *J. Med. Virol.* 1993; 39: 139-145.
155. Thiers V, Lunel F, Valla D, Azar N, Fretz C, Frangeul L, Huraux JM, Opolon P, Bréchet C. Post-transfusional anti-HCV-negative non-A, non-B hepatitis (II) serological and polymerase chain reaction analysis for hepatitis C virus and hepatitis B virus. *J. Hepatol.* 1993; 18: 34-39.
156. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar IK. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature Medicine* 1995; 1: 564-569.
157. Linnen J, Wages Jr J, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyannis S, Karayiannis P, Fung K, Nakatsuji Y, Shih J W-K,

- Young L, Piatak M Jr, Hoover C, Fernandez J, Chen S, Zou JC, Morris T, Hyams KC, Ismay S, Lifson JD, Hess G, Fong SKH, Thomas H, Bradley D, Margolis H, Kim JP. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271: 505-508.
158. Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Dawson GJ, Erker JC, Chalmers ML, Schlauder GG, Mushahwar IK. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* 1995; 69: 5621-5630.
159. Schlauder GG, Dawson GJ, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Gutierrez RA, Heynen CA, Knigge MF, Kurpiewski GS, Buijk SL, Leary TP. Molecular and serologic analysis in the transmission of the GB hepatitis agents. *J Med Virol* 1995; 46: 81-90.
160. Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, Muerhoff AS, Erker JC, Buijk SL, Chalmers M, Van Sant CL, Mushahwar IK. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3401-3405.
161. Kim JP, Fry KE. Molecular characterisation of the hepatitis G virus. *J Viral Hepat* 1997; 4: 77-79.
162. Muerhoff AS, Simons JN, Leary TP, et al. Sequence heterogeneity within the 5'-terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes. *J Hepatol* 1996; 25: 379-384.
163. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241:92-97.
164. Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol Res* 1998; 10:1-16.
165. Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, Yamada A, Khan MA, Murakami J, Kamahora T, Shiraki K, Hino S. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol* 1999; 73: 3582-3586.
166. Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Birkenmeyer LG, Chalmers ML, Pilot-Matias TJ, Desai SM. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3177-3182.
167. Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S. Complete circular DNA genome of TT virus variant (isolate name Sanban) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* 1999; 260: 17-22.

168. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* 1999; 259: 428-436.
169. Naoumov NV, Petrova EP, Thomas MG, Williams R. Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* 1998; 352:195-197.
170. Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol* 1998; 56:128-132.
171. Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott LE, MacDonald DM, Ellender J, Yap PL, Ludlam CA, Haydon GH, Gillon J, Jarvis LM. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* 1998; 352:191-195.
172. Nishizawa T, Okamoto H, Tsuda F, Aikawa T, Sugai Y, Konishi K, Akahane Y, Ukita M, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J Virol* 1999; 73: 9604-9608.
173. Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, Ohno T, Nakano T, Kato T, Mukaide M, Park YM, Kim BS, Ueda R. New genotypes of TT virus (TTV) and a genotyping assay based on restriction fragment length polymorphism. *FEBS Letter* 1998, 437:201-206.
174. Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M, Takahashi M, Fukuda M, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M. The entire nucleotide sequence of a TT virus isolate from the United States (TUS01): comparison with reported isolates and phylogenetic analysis. *Virology* 1999; 259: 437-448.
175. Berg T, Kaul T, Heuft HG, Naumann U, Lobeck H, Wiedenmann B, Hopf U. Analysis of long-term efficacy of interferon-alpha treatment in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998; 28: 511-512.
176. Hopf U, Küther S, König V, Heuft HG, Berg T, Soltani K, Lobeck H. Langzeitbeobachtung der chronischen Hepatitis C nach Behandlung mit rekombinanten Interferon alpha-2a. *Z Gastroenterol* 1994; 32: 425-430;
177. Shindo M, Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Long-term follow-up of patients with chronic hepatitis C treated with alpha-interferon *Hepatology* 1992; 15: 1013-1016.
178. Reichard O, Glaumann H, Fryden A, Norkrans G, Schvarcz R, Sonnerborg A, et al. Two-year biochemical, virological and histological follow-up in patients with chronic hepatitis C responding in a sustained fashion to interferon alfa-2b treatment. *Hepatology* 1995; 21: 918-922.

179. Teuber G, Dienes HP, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. Long-term follow-up of patients with chronic hepatitis C after interferon-alpha treatment. *Digestion* 1996; 57: 464-471.
180. Marcellin P, Boyer N, Gervais A, Martinot M, Pouteau M, Castelnau C, et al. Long-term improvement and loss of detectable intrahepatic HCV RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon-a therapy. *Ann Intern Med* 1997; 127: 875-881.
181. Tsubota T, Kumada H, Chayama K, Arase Y, Saitoh S, Koida I, Suzuki Y, Kobayashi M, Murashima N, Ikeda K. Time course of histological changes in patients with a sustained biochemical and virological response to interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1997; 27: 49-55.
182. Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 2000; 6: 578-82.
183. Berg T, König V, Küther S, Heuft HG, Wittmann G, Lobeck H, Hopf U. Prognostische Relevanz der Hepatitis C Virus Genotypen für das Ansprechen auf Interferon-alpha. *Z Gastroenterol* 1995; 33: 426-430;
184. Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Pouteau M, Castelnau C, Boyer N, Polquin M, Degott C, Descombes I, Le Breton V, Milotova V, Benhamou JP, Erlinger S. Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995; 22: 1050.
185. Yoshioka K, Higashi Y, Yamada M, Aiyama T, Takayanagi M, Tanaka K, Okumura A, Iwata K, Kakumu S. Predictive factors in the response to interferon therapy in chronic hepatitis C. *Liver* 1995; 15: 57.
186. McHutchison JG, Poynard T. Combination therapy with interferon plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis* 1999; 19 (Suppl 1): 57.
187. Berg T, Hopf U, Stark, Baumgarten R, Lobeck H, Schreier E. Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters. *J Hepatol* 1997; 26: 484-491.
188. Silini E, Botelli R, Asti M, Bruno S, Candusso ME, Brambilla S, et al. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma: a case control study. *Gastroenterology* 1996; 111: 199-205.
189. Hatzakis A, Katsoulidou A, kaklamani E, Touloumi G, Koumantaki Y, Tassopoulos NC et al. Hepatitis C virus 1b is the dominant genotype in HCV-related carcinogenesis: a case control

- study. *Int J Cancer* 1996; 68: 51-53.
190. Donato F, Tagger A, Chiesa R, Ribero ML, Tomasoni V, Fasola M, et al. For the Brescia HCC Study. Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking and hepatocellular carcinoma: a case control study in Italy. *Hepatology* 1997; 26: 579-584.
191. Naoumov NV, Chokshi S, Metivier E, Maertens G, Johnson PJ, Williams R. Hepatitis C virus infection in the development of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 27: 331-336.
192. Féray C, Gigou M, Samuel D, Paradies V, Mishiro S, Maertens G, Reynes M, Okamoto H, Bismuth H, Bréchet C. Influence of the genotypes of hepatitis C virus on the severity of recurrent liver disease after liver transplantation. *Gastroenterology* 1995; 108: 1088-1096.
193. Gane EJ, Portmann BC, Naoumov NV, Smith HM, Underhill JA, Donaldson PT, Maertens G, Williams R. Long-term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation. *N Engl J Med* 1996; 334: 815-820.
194. Berg T, Hopf U, Bechstein WO, Müller AM, Fukumoto T, Neuhaus R, Lobeck H, Neuhaus P. Pretransplant virological markers hepatitis C virus genotype and viremia level are not helpful in predicting the individual outcome after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 225-228.
195. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C: Consensus statement. *J Hepatol* 31 Suppl 1 (1999) 3-8.
196. Hopf U, Berg T, König V, Küther S, Heuft HG, Lobeck H. Treatment of chronic hepatitis C with interferon alfa: long-term follow-up and prognostic parameters. *J Hepatol* 1996; 24: 67-73;
197. Berg T, Hoffmann RM, Teuber G, Leifeld L, Lafrenz M, Baumgarten R, Spengler U, Zeuzem S, Pape GR, Hopf U. Efficacy of a short-term ribavirin plus interferon alfa combination therapy followed by interferon alfa alone in previously untreated patients with chronic hepatitis C: a randomized multicenter trial. *Liver* 2000; 20: 427-436;
198. Teuber G, Berg T, Hoffmann RM, Leifeld L, Lafrenz M, Spengler U, Pape GR, Hopf U, Zeuzem S. Retreatment with interferon-alpha and ribavirin in primary interferon-alpha non-responders with chronic hepatitis C. *Digestion* 2000, 61: 90-97.
199. Pawlotsky J-M, Bouvier-Alias M, Hezode C, Darthuy F, Remire J, Dhumeaux D. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. *Hepatology* 2000; 32: 654-659.
200. Zeuzem S, Schmidt SM, Lee JH, Wagner M, Teuber G, Roth WK. Hepatitis C virus dynamics in vivo: effect of ribavirin and interferon alfa. *Hepatology* 1998; 28: 245-52.
201. Ning Q, Brown D, Parodo J, et al. Ribavirin inhibits viral induced macrophage production of

- TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol* 1998; *160*: 3487-93.
202. Hultgren C, Milich DR, Weiland O, Sallberg M. The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol* 1998; *79*: 2381.
203. Binder T, Berg T, Hopf U, Siegert W, Schmidt CA. PCR-SSCP: Nonradioactive detection with biotinprimers and streptavidine-alkaline phosphatase conjugates. *BioTechniques* 1995; *18*:780-781.
204. Berg T, Kaul T, Naumann U, Wiedenmann B, Hopf U. Einfluß von Ribavirin auf die Dynamik der Hepatitis C Virämie bei Interferon-alpha behandelten Patienten mit primärer Response oder Nonresponse. *Z Gastroenterol* 2000; *38*: 1-6.
205. Martell M, Esteban JI, Quer J, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; *66*: 3225-29
206. Forns X, Purcell RH, Bukh J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends in Microbiology* 1999; *7*: 402-410.
207. Kao J-H, Chen P-J, Lai M-Y, Wang T-H, Chen D-S. Quasispecies of hepatitis C virus and genetic drift of the hypervariable region in chronic type C hepatitis. *J Infect Dis* 1995; *172*: 261-64
208. Shindo M, Hamada K, Koya S, Arai K, Sokawa Y, Okuno T. The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hypervariable region 1 in chronic hepatitis C with interferon therapy. *Hepatology* 1996; *24*: 1018-23
209. Pawlotsky J-M, Germanidis G, Frainais P-O, et al. Evolution of hepatitis C virus second envelope protein hypervariable region in chronically infected patients receiving alpha interferon therapy. *J Virol* 1999; *73*: 6490-99
210. Gerotto M, Sullivan DG, Polyak SJ, et al. Effect of retreatment with interferon alone or interferon plus ribavirin on hepatitis C virus quasispecies diversification in nonresponder patients with chronic hepatitis C. *J Virol* 1999; *73*: 7241-7
211. Lee JH, von Wagner M, Roth WK, Teuber G, Sarrazin C, Zeuzem S. Effect of ribavirin on virus load and quasispecies distribution in patients infected with hepatitis C virus. *J Hepatol* 1998; *29*: 29-35
212. González-Peralta RP, Liu WZ, Davis GR, Qian KP, Lau JYN. Modulation of hepatitis C virus quasispecies heterogeneity by interferon-a and ribavirin therapy. *J Viral Hepat* 1997; *4*: 99-106

213. Booth JCL, O'Grady J, Neuberger J, on behalf of the Royal College of Physicians of London and the British Society of Gastroenterology. Clinical guidelines on the management of hepatitis C. *Gut* 2001; *49 (Suppl 1)*: i1-i21.
214. Zeuzem S, Teuber G, Naumann U, Berg T, Raedle J, Hartmann S, Hopf U. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of interferon Alfa-2A with and without amantadine as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; *32*: 835-841.
215. Teuber G, Berg T, Naumann U, Raedle J, Brinkmann S, Hopf U, Zeuzem S. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial with interferon-a (IFN-a) with and without amantadine sulfate in primary IFN-a nonresponders with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2001; *8*: 276-283.
216. Berg T, Naumann U, Wiedenmann B, Hopf U. Pilot study of interferon-alfa high-dose induction therapy in combination with ribavirin plus amantadine sulphate for nonresponder patients with chronic hepatitis C. *Z Gastroenterol* 2001; *39*: 145-151.
217. Kakumu S, Yoshioka K, Wakita T, Ishikawa T, Takayanagi M, Higashi Y. A pilot study of ribavirin and interferon beta for the retreatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1993; *105*: 507-12
218. Brillanti S, Migliolo M, Barbara L. Combination antiviral therapy with ribavirin and interferon alfa in interferon alfa relapsers and nonresponders: Italia experience. *J Hepatol* 1995; *23 (Suppl 2)*: 13-6
219. Schvarcz R, Yun ZB, Sonnerborg A, Weiland O. Combined treatment with interferon alpha-2b and ribavirin for chronic hepatitis C in patients with a previous non-response or non-sustained response to interferon alone. *J Med Virol* 1995; *46*: 43-7.
220. Schalm SW, Brouwer JT, Chemello L, et al. Interferon-ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1996; *41 (suppl)*: 131-4.
221. Bellobuono A, Mondazzi L, Tempini S, Silini E, Vicari F, Ideo G. Ribavirin and interferon-alpha combination therapy vs. interferon-alpha alone in the treatment of chronic hepatitis C: a randomized clinical trial. *J Viral Hepat* 1997; *4*: 185-91
222. Wedemeyer H, Jäckel E, Wedemeyer J, et al. Is combination therapy of chronic hepatitis C with interferon alpha and ribavirin in primary interferon nonresponders indicated? An analysis of personal experiences and review of the literature. *Z Gastroenterol* 1998; *36*: 819-27
223. Salmeron J, Ruiz-Extremera A, Torres C, et al. Interferon versus ribavirin plus interferon in chronic hepatitis C previously resistant to interferon: a randomized trial. *Liver* 1999; *19*: 275-80
224. Andreone P, Gramenzi A, Cursaro C, et al. Interferon-alpha plus ribavirin in chronic hepatitis

- C resistant to previous interferon-alpha course: results of a randomized multicenter trial. *J Hepatol* 1999; 30: 788-93
225. Pol S, Couzigou P, Bourliere M, et al. A randomized trial of ribavirin and interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C who were nonresponders to a previous treatment. Multicenter Study Group under the coordination of Necker Hospital, Paris, France. *J Hepatol* 1999;31:1-7.
226. Tromm A, Greving I, Griga T, Mankel K, Huppe D. Interferon-alpha-2b + ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in non-responders to interferon-alpha-monotherapy. *Z Gastroenterol* 2000; 38: 159-64.
227. Zeuzem S, Lee J-H, Franke A, Rüster B, Prümmer O, Herrmann G, Roth WK. Quantification of the initial decline of serum hepatitis C virus RNA and response to interferon alfa. *Hepatology* 1998; 27: 1149.
228. Civeira M-P, Prieto J. Early predictors of response to treatment in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1999; 31 (Suppl 1): 237.
229. Roffi L, Mels GC, Antonelli G, et al. Breakthrough during recombinant interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: prevalence, etiology, and management. *Hepatology* 1995;21:645-49.
230. Milella M, Antonelli G, Santantonio T, et al. Neutralizing antibodies to recombinant alpha-interferon and response to therapy in chronic hepatitis C. *Liver* 1993;13:146-50
231. Leroy V, Baud M, de Traversay C, et al. Role of anti-interferon antibodies in breakthrough occurrence during alpha 2a and 2b therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998;28:375-81.
232. Hoffmann RH, Berg T, Teuber G, Leifeld L, Prümmer O, Jung MC, Spengler U, Zeuzem S, Hopf U, Pape GR. Interferon antibodies and the breakthrough phenomenon during ribavirin interferon-combination therapy and interferon-monotherapy of patients with chronic hepatitis C. *Z. Gastroenterol* 1999, 37: 715-723.
233. Berg T, Schuff-Werner P, Hopf U. Sustained remission of chronic hepatitis C after changing to human leucocyte interferon alfa (IFNa) in a difficult-to-treat patient with breakthrough phenomenon associated with antibodies against recombinant IFNa. *Am J Gastroenterol* 2001, 96: 612-614.
234. Sarrazin C, Berg T, Lee J-H, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Zeuzem S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999; 30; 1004-1013.

235. Saiz JC, López-Labador FX, Ampurdanés S, Dopazo J, Forns X, Sánchez-Tapias JM, Rodés J. The prognostic relevance of the nonstructural 5A gene interferon sensitivity determining region is different in infections with genotype 1b and 3a isolates of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 1998; **177**:839-847.
236. Witherell GW, Beineke P. Statistical analysis of combined substitutions in nonstructural region of hepatitis C virus and interferon response. *J Med Virol* 2001; **63**: 8-12.
237. Sarrazin S, Berg T, Lee J-H, Rüster B, Kronenberger B, Roth WK, Zeuzem S. Mutations in the protein kinase-binding domain of the NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 1a are associated with treatment response. *J Infect Dis* 2000; **181**: 432-441.
238. Paterson M, Laxton CD, Thomas HC, Ackrill AM, Foster GR. Hepatitis C virus NS5A protein inhibits interferon antiviral activity, but the effects do not correlate with clinical response. *Gastroenterology* 1999; **117**: 1187-1197.
239. Polyak SJ, Paschal DM, McArdle S, Gale MJ, Moradpur D, Gretch D. Characterization of the effect of hepatitis C virus nonstructural 5A protein expression in human cell lines and on interferon-sensitive virus replication. *Hepatology* 1999; **29**: 1262-1271.
240. Song J, Fuji SJ, Wang F, Itoh M, Hotta H. The NS5A protein of hepatitis C virus partially inhibits the antiviral activity of interferon. *J Gen Virol* 1999; **80**: 879-886.
241. Aizaki H, Saito S, Ogino T, Miyajima N, Harada T, Matsuura Y, Miyamura T, Kohase M. Suppression of interferon-induced antiviral activity in cell lines expressing hepatitis C virus proteins. *J Interferon Cytokine Res* 2000; **20**: 1111-1120.
242. Berg T, Mas-Marques A, Höhne M, Wiedenmann B, Hopf U, Schreier E. Mutations in the E2-PePHD region of hepatitis C virus type 1 and the dynamics of hepatitis C viremia decline during interferon alfa treatment. *Hepatology* 2000; **32**: 1386-1395.
243. Podevin P, Sabile A, Gajardo R, Delhem N, Abadie A, Lozach P-Y, Beretta L, Bréchet C. Expression of hepatitis C virus NS5A natural mutants in a hepatocytic cell line inhibits the antiviral effect of interferon in a PKR-independent manner. *Hepatology* 2001; **33**: 1503-1511.
244. Tan S-L, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 2001; **284**: 1-12.
245. Polyak SJ, Khabar KSA, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8 leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001; **75**: 6095-6106.
246. Sarrazin C, Kornetzky I, Rüster B, Lee J-H, Kronenberger B, Bruch K, Roth WK, et al. Mutations within the E2 and NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 3a and correlation with treatment response. *Hepatology* 2000; **31**: 1360-1370.

247. Chayama K, Suzuki F, Tsubota, et al. Association of the amino acid sequence in the PKR-eIF2 phosphorylation homology domain and response to interferon therapy. *Hepatology* 2000; 32: 1138-1144.
248. Cochrane A, Orr A, Shaw M, Mills PR, McCrudden EA. The amino acid sequence of the PKR-eIF2 α phosphorylation homology domain of hepatitis C virus envelope 2 protein and response to interferon alpha. *J Infect Dis* 2000; 182: 1515-1518.
249. Polyak SJ, Noursbaum JB, Larson AM, Cotler S, Carithers RL, Gretch DR. The protein kinase-interacting domain in the hepatitis C virus envelope glycoprotein-2 gene is highly conserved in genotype 1-infected patients treated with interferon. *J Infect Dis* 2000; 182: 397-404.
250. Künkel U, Höhne M, Berg T, Hopf U, Kekulé AS, Frösner G, Pauli G, Schreier E. Quality control study on the performance of hepatitis G virus (HGV) PCR. *J Hepatol* 1998; 28: 978-984.
251. Heuft H-G, Berg T, Schreier E, Künkel U, Tacke M, Schwella N, Hopf U, Salama A, Huhn D. Epidemiological and clinical aspects of hepatitis G virus (HGV) infection in blood donors and immunocompromised recipients of HGV-contaminated blood. *Vox Sang* 1998; 74: 161-167.
252. Woelfle J, Berg T, Keller KM, Schreier E, Lentze MJ. Persistent hepatitis G virus infection after neonatal transfusion. *J Pediatr Gastr Nutr* 1998; 26: 402-407.
253. Woelfle J, Berg T, Bialek R, Keller KM, Effenberger W, Wagner N. GB virus C/hepatitis G virus infection in HIV-infected haemophiliac patients despite treatment with virus-inactivated coagulation factors. *Arch Dis Child* 1999; 80:429-432.
254. Schreier E, Höhne M, Künkel U, Berg T, Hopf U. Hepatitis GBV-C sequences in patients infected with HCV contaminated anti-D immunoglobulin and among i.v. drug users in Germany. *J Hepatol* 1996, 25: 385-389.
255. Berg T, Naumann U, Fukumoto T, Bechstein WO, Neuhaus P, Lobeck H, Höhne M, Schreier E, Hopf U. GB virus C infection in patients with chronic hepatitis B and C before and after liver transplantation. *Transplantation* 1996; 62: 711-714.
256. Berg T, Dirla U, Naumann U, Heuft HG, Küther S, Lobeck H, Schreier E, Hopf U. Responsiveness of interferon alpha treatment in patients with chronic hepatitis C coinfecting with hepatitis G virus. *J Hepatol* 1996; 25: 763-768.
257. Berg T, Müller AR, Platz KP, Höhne M, Bechstein WO, Hopf U, Wiedenmann B, Neuhaus P, Schreier E. Dynamics of GB virus C viremia after liver transplantation indicates extrahepatic tissues as the predominant site of GB virus C virus replication. *Hepatology* 1999, 29:245-249.

258. Höhne M, Berg T, Müller AR, Schreier E. Detection of sequences of a novel DNA virus (TTV) in German patients. *J Gen Virol* 1998; 79: 2761-2764.
259. Berg T, Schreier E, Heuft HG, Höhne M, Bechstein WO, Leder K, Hopf U, Neuhaus P, Wiedenmann B. Occurrence of a novel DNA virus (TTV) infection in patients with liver diseases and its frequency in blood donors. *J Med Virol* 1999; 59: 117-121.
260. Mphahlele MJ, Lau GKK, Carman WF. HGV: the identification, biology and prevalence of an orphan virus. *Liver* 1998; 18: 143-155.
261. Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Morand-Joubert L, Petit JC, Lerable J, Thauvin M, Mariotti M. Carriage of GB virus C hepatitis G virus RNA is associated with slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. *J Infect Dis* 1999; 179: 783-789.
262. Heringlake S, Ockenga J, Tillmann HL, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1998; 177: 1723-1726.
263. Pessoa MG, Terrault NA, Detmer J, Kolberg J, Collins M, Hassoba HM, Wright TL. Quantitation of Hepatitis G and C viruses in the Liver: evidence that hepatitis G is not hepatotropic. *Hepatology* 1998; 27: 877-880.
264. Fogeda M, Navas S, Martin J, Casqueiro M, Rodriguez E, Arocena C, Carreno V. In vitro infection of human peripheral blood mononuclear cells by GB virus C/hepatitis G virus. *J Virol* 1999; 73: 4052-4061.
265. Lefrere JJ, Ferec C, Roudot-Thoraval F, Loiseau P, Cantaloube JF, Biagini P, Mariotti M, LeGac G, Mercier B. GBV-C/hepatitis G virus (HGV) RNA load in immunodeficient individual and in immunocompetent individuals. *J Med Virol* 1999; 59: 32-37.
266. Alter HJ: The cloning and clinical implications of HGV and HGBV-C. *New Engl J Med* 1996; 334: 1536-1537.
267. Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, Wages J, Wesley R, Shih WK, Kim JP: The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl J Med* 1997; 336: 747-754.
268. Alter MJ, Gallagher M, Morris T, Moyer LA, Meeks EL, Krawczynski K, Kim JP, Margolis HS: Acute non-A-E hepatitis in the United States and the role of hepatitis G virus infection. *N Engl J Med* 1997; 336: 741-746.
269. Okamura A, Yoshioka M, Kubota M, Kikuta H, Ishiko H, Kobayashi K. Detection of a novel DNA virus (TTV) sequences in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 1999; 58: 174-177.

270. Lopez-Alcorocho JM, De Lucas S, Mariscal LF, Castillo I, Bartolome J, Herrero M, Manzano ML, Pardo M, Carreno V. Detection of TTV DNA in paired serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 1999; 30 (No.4, Pt 2): 287A.
271. Rodriguez-Inigo E, Casqueiro M, Bartolome J, Ortiz-Movilla N, Lopez-Alcorocho JM, Herrero M, Manzarbeitia F, Oliva H, Carreno V. Detection of TT virus in liver biopsies by in situ hybridization. *Hepatology* 1999; 30 (No.4, Pt 2): 283A.
272. Umemura T, Yeo AET, Sottini A, Moratto D, Tanaka Y, Wang R Y-H, Shih J W-K, Donahue P, Primi D, Alter HJ. SEN virus infection and its relationship to transfusion associated hepatitis. *Hepatology* 2001; 33: 1303-1311.

Danksagung

Eine umfassende klinische und wissenschaftliche Ausbildung bedarf umfangreicher Anregung, Hilfe und Unterstützung von verschiedenen Seiten.

Mein besonderer Dank gilt vor allem Herrn Professor Dr. U. Hopf, Medizinische Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie, Charité, Berlin, für seine stets großzügige Unterstützung meiner wissenschaftlichen und klinischen Tätigkeit. Ich verdanke ihm eine grundlegende hepatologische Ausbildung und aufgrund seiner wissenschaftlichen und hochschuldidaktischen Arbeit wird er mir stets Vorbild sein.

Herrn Professor B. Wiedenmann, Direktor der Medizinischen Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie, Charité, Berlin, bin ich für zahlreiche wissenschaftliche Anregungen sowie Bereitstellung optimaler wissenschaftlicher Arbeitsbedingungen zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. D. Huhn, ehemaliger Direktor der Medizinischen Klinik m. S. Hämatologie und Onkologie, Charité, Berlin, danke ich für eine gute und menschliche klinische Ausbildung und für seine großzügige Unterstützung einer hepatologischen Arbeitsgruppe in seiner Abteilung.

Professor Dr. P. Neuhaus, Direktor der Chirurgischen Klinik, Charité, Berlin, danke ich für die großzügige Unterstützung. Die Zusammenarbeit mit den Kollegen der chirurgischen Klinik insbesondere Frau PD Dr. Müller, PD Dr. WO Bechstein, Frau Dr. R. Neuhaus, war stets erfrischend und effizient.

Besonders möchte ich Herrn Professor Dr. E. Schreier, Leiter der molekularen Virologie des Robert Koch-Instituts in Berlin, sowie dessen MitarbeiterInnen Frau Dr. Höhne, Herrn Dr. Künkel und Herrn Alexander MasMaques, danken. Uns verbindet eine jetzt schon acht Jahre andauernde Kooperation. Viele der vorgestellten Projekte und Arbeiten wären ohne diese enge und freundschaftliche Zusammenarbeit nicht in dieser raschen und erfolgreichen Form umzusetzen gewesen.

Bedanken möchte ich mich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit im Rahmen zahlreicher klinischer und wissenschaftlicher Studien mit den Universitätskliniken Frankfurt, München, Kiel, Hamburg und Bonn. Besonders möchte ich die enge Kooperation mit Herrn Professor Dr. S. Zeuzem, leitender Oberarzt der Medizinischen Klinik der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt sowie Frau Dr. Teuber und Herrn Dr. C. Sarrazin aus der gleichen Abteilung erwähnen.

Meinen Mitarbeitern Frau Krössin, Frau Schellbach, Herrn F. Behr sowie Frau Malik und Herrn T. Kaul, deren Tätigkeiten durch Drittmittel finanziert wurden, danke ich herzlich für ihre Mitarbeit.

Meiner Familie, und natürlich ganz besonders meiner Frau, danke ich für fortwährende geistige und moralische Unterstützung. Sie alle bilden meinen sicheren Hintergrund aus liebevollem

Verständnis und Geduld, ohne den eine klinische und wissenschaftliche Tätigkeit nicht möglich wäre.

Nicht zuletzt möchte ich den vielen Patienten mit chronischer Hepatitis C danken, die durch Ihre selbstlose Bereitschaft zur Teilnahme an klinischen Studien die therapeutischen Erfolge bei der Behandlung der chronischen Hepatitis C erst ermöglicht haben.

Die Arbeit möchte ich meinem Vater zum 70. Geburtstag widmen.

Seine ernsthafte und fleissige Auseinandersetzung mit klinischer und wissenschaftlicher Arbeit war und ist mir stets ein Vorbild. Sein wissenschaftlicher Rat hat mich von Anfang an liebevoll begleitet und so freut es mich besonders, dass auch einige Untersuchungen in Kooperation mit seinem immunpathologischen Labor stattfinden konnten.