

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

**Entwicklung einer HPLC-Methode zur Bestimmung des Ribavirinplasmaspiegels
bei Patienten mit chronischer Hepatitis-C-Infektion**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Alexandra Böckenhoff

aus Würzburg

Würzburg, Juli 2010

Referent: Professor Dr. med. H. Klinker

Korreferent: Professor Dr. med. U. Vogel

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2011

Die Promovendin ist Ärztin

Man braucht nichts im Leben zu fürchten,
man muss nur alles verstehen

Marie Curie (1867 – 1934)

Den Menschen mit Hepatitis-C-Infektion gewidmet.

Möge diese Arbeit einen Beitrag zur

Verbesserung der Heilungschancen leisten

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Hepatitis C.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Transmission	1
1.1.2 Das Virus.....	2
1.1.3 Pathogenese und Klinik.....	4
1.1.4 Therapie der chronischen Hepatitis C.....	5
1.2 Ribavirin	13
1.2.1 Wirkmechanismen und klinischer Einsatz.....	13
1.2.2 Chemische Eigenschaften	14
1.2.3 Pharmakodynamik	15
1.2.4 Pharmakokinetik	15
1.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	17
1.3.1 Allgemeines	17
1.3.2 Funktionsweise.....	18
1.3.3 Aufbau der HPLC-Apparatur.....	18
1.3.4 Lösungsmittel – die mobile Phase.....	19
1.3.5 Säulen und stationäre Phasen.....	19
1.3.6 Pumpen	20
1.3.7 Detektoren	20
1.3.8 Das Chromatogramm	20
1.4 Zielsetzung	22
1.5 Abkürzungen	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Materialien und Geräte	25
2.2 Methodik.....	26
2.2.1 Probenvorbereitung.....	26
2.2.2 HPLC	27
2.3 Statistik.....	27

3	Ergebnisse	28
3.1	Patientenkollektiv	28
3.2	Methodische Ergebnisse	33
3.2.1	Standards und Kalibration.....	33
3.2.2	Beispielchromatogramme	37
3.2.3	Qualitätssicherung	38
3.2.4	Modifikation der Methoden von Larrat et al und Homma et al	39
3.3	Auswertung der Patientenproben	41
3.3.1	Plasmaspiegelverlauf von Ribavirin in den ersten sechs Therapiewochen ...	41
3.3.2	Ribavirinplasmaspiegelverlauf in den ersten sechs Therapiewochen nach Geschlecht getrennt betrachtet.....	42
3.3.3	Ribavirinplasmaspiegelverlauf in den ersten sechs Therapiewochen nach Interferon alfa-2a und alfa-2b getrennt betrachtet.....	44
3.3.4	Verlauf bei initial unterdurchschnittlichen RBV-Plasmakonzentrationen.....	46
3.3.5	Ribavirinplasmaspiegel-Tageskinetiken	53
3.3.6	Ribavirinplasmaspiegel-Tageskinetik zu Therapiebeginn	53
3.3.7	Ribavirinplasmaspiegel-Tageskinetik vor Erreichen des steady state	54
3.3.8	Ribavirinplasmaspiegel-Tageskinetik im steady state	56
3.3.9	HCV-Kombinationstherapie bei terminaler Niereninsuffizienz – ein individueller Heilversuch	58
4	Diskussion	62
4.1	Auswahl der Methode	62
4.1.1	Probenvorbereitung	63
4.1.2	Methodenentwicklung und Optimierung	64
4.1.3	Standards und Kalibrierung.....	66
4.1.4	Methodenvalidierung und Messqualität	67
4.2	Der Stellenwert des Ribavirinplasmaspiegels in der HCV-Therapie	68
4.3	Ribavirinplasmaspiegelverlauf in den ersten sechs Therapiewochen.....	73
4.3.1	Geschlechtsabhängigkeit der RBV-Plasmakonzentration.....	75
4.3.2	Interferon alfa-2a/alfa-2b	75
4.4	Ribavirinplasmaspiegel-Tageskinetiken.....	76

4.5 Ribavirintherapie bei terminaler Nierensuffizienz.....	77
5 Zusammenfassung.....	79
6 Anhang.....	81

1 Einleitung

1.1 Hepatitis C

1.1.1 Epidemiologie und Transmission

Die Hepatitis-C-Virusinfektion (HCV-Infektion) hat weltweit eine große medizinische, epidemiologische und gesundheitsökonomische Bedeutung. Schätzungen zufolge sind weltweit etwa 180 Millionen Menschen mit dem Hepatitis-C-Virus infiziert, das entspricht ca. 3% der Weltbevölkerung (1), (2), (3). Die Zahl der Neuinfektionen wird jährlich auf 3 – 4 Millionen geschätzt (4). Schon gegenwärtig ist die chronische Hepatitis-C-Infektion eine der Hauptursachen für chronische Lebererkrankungen und ein häufiger Grund für Lebertransplantationen (5). Modellrechnungen zeigen allerdings, dass aufgrund der langen Latenzzeit bis zum Auftreten schwerwiegender Krankheitssymptome, der Häufigkeitsgipfel der HCV-bedingten chronischen Lebererkrankungen erst in einigen Jahren auftreten wird. Man erwartet sogar eine Verzwei- bis Verdreifachung der Mortalitätsrate durch die chronische Infektion (5), (6). Die Übertragung des HCV erfolgt in den allermeisten Fällen durch das Eindringen virushaltigen Blutes in die Blutbahn oder das Gewebe des Empfängers. Dies geschieht sowohl auf horizontalem als auch auf vertikalem Weg. Der Übertragungsweg spiegelt sich in bestimmten Risikokonstellationen wider, und wird somit an den unterschiedlich hohen Durchseuchungsraten (Antikörper positiv) verschiedener Bevölkerungsgruppen (Tab. 1) deutlich.

BEVÖLKERUNGSGRUPPE	HCV-DURCHSEUCHUNG
Menschen mit Bluterkrankheit (Hämophilie) (Blutgerinnungsfaktoren vor 1987 erhalten)	80 – 90 %
Intravenös injizierende Drogenkonsumenten	60 – 80 %
Organtransplantierte	5 – 15 %
Dialysepatienten	4 – 10 %
Kinder von Müttern, die während der Schwangerschaft/ Entbindung HCV-infiziert waren	3 – 5 %
Allgemeinbevölkerung (Erwachsene)	0,5 – 0,7 %

(7), (8), (9), (10)

Tab. 1: HCV-Durchseuchungsraten in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen in Deutschland

Die hohen Durchseuchungsraten der iatrogen infizierten Patienten resultieren aus der Zeit bevor es eine Überprüfungsmöglichkeit für HCV in der Transfusionsmedizin gab. Seit 1991 gibt es eine verbindliche Untersuchung aller Spender auf HCV-Antikörper, die im Jahre 1999, wie vom Paul-Ehrlich-Institut angeordnet, auf einen direkten Nachweis des Virus mittels NAT (Nukleinsäure-Amplifikationstechniken) erweitert wurde (11).

Neben den oben angeführten Kollektiven sind die Infektionen mit unbekannter Infektionsquelle zu nennen, da sich in bis zu 30 % aller Hepatitis-C-Fälle keine eindeutigen Hinweise auf den Übertragungsweg feststellen lassen. Sie werden unter dem Begriff der sporadischen Hepatitis oder auch als „community acquired“ zusammengefasst (12).

1.1.2 Das Virus

Nach den ersten Beschreibungen der Hepatitisviren A und B in den 70er Jahren und der routinemäßigen Testung aller Blutspender auf HBV, blieben dennoch viele, insbesondere nach Bluttransfusionen, aufgetretenen Hepatitisfälle in ihrer Ursache ungeklärt. Mit dem HCV konnte 1989 der wichtigste Erreger der damals so genannten Non-A, Non-B-Hepatitis identifiziert werden.

Das HCV ist ein schnell replizierendes (13), kleines (40nm) Virus und gehört zur Gattung der Hepaciviren in der Familie der Flaviviridae (14). Seine Form wird von der kubischen Symmetrie eines sphärischen Icosaeders bestimmt (Abb. 1) (15), (16). Die Sequenzierung des Genoms zeigt, dass es sich um ein Einzelstrang-RNA-Virus mit (+)-Strang-Polarität und einer Länge von etwa 9400 Nukleotiden handelt.

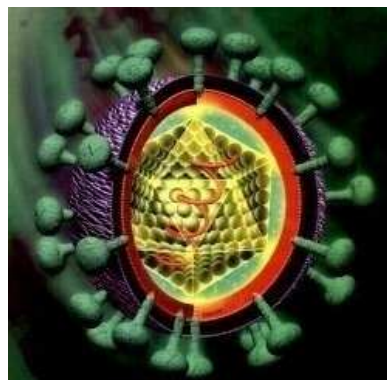


Abb. 1: Das Hepatitis C Virus (17)

Nach der Klassifikation von Simmonds et al. (Abb. 2) (18) existieren nach phylogenetischen Merkmalen sechs HCV-Genotypen und mehr als 80 Subtypen, welche sich in der Nukleotidsequenz zum Teil erheblich unterscheiden. Diese Einteilung entspricht den internationalen Konsensus-Empfehlungen zur Nomenklatur der HCV-Varianten (19).

Liste von HCV-Subtypen (nach Simmonds et al. 2005)

Genotyp	Subtyp (total=82)
1	<i>a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m</i> (13)
2	<i>a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r</i> (18)
3	<i>a,b,c,d,e,f,g,h,i,k</i> (10)
4	<i>a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s,t,u</i> (21)
5	<i>a</i> (1)
6	<i>a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p,q,r,s</i> (19)

Abb. 2: HCV-Subtypen nach Simmonds P, et al. (Hepatology, 2005), fett geschriebene Subtypen sind bestätigt, schräg geschriebene bislang vorläufig zugeordnet (19)

In Deutschland prädominieren derzeit die Genotypen 1 (Subtyp 1b) und 3 (Subtyp 3a). Doch den Genotyp 1 betreffend findet derzeit eine Verschiebung der Subtypen statt. Patienten mit einer Subtyp 1b Infektion sind durchschnittlich älter als 50 Jahre, während bei Jüngeren, insbesondere auch bei Neuinfektionen vermehrt der Subtyp 1a auftritt (20), (21), (22). Dies wird die epidemiologische Verteilung der HCV-Infektion in Zukunft wohl entscheidend beeinflussen. Neben dem Alter gibt es eine Korrelation zwischen dem Genotyp und dem Übertragungsweg. So sind die Genotyp 3a und 1a Infektionen signifikant häufig mit einem intravenösen Drogenmissbrauch assoziiert, während der Subtyp 1b bei Post-Transfusions-Infizierten und Patienten mit unbekanntem Übertragungsweg dominiert (23).

Eine klinische Bedeutung erlangt die Kenntnis des Genotyps vor allem als prädiktiver Faktor hinsichtlich des Therapieerfolgs (s.u. Therapieansprechen), da die Ansprechraten beim Genotyp 1 um bis zu 50 % schlechter sind als bei den Genotypen 2 und 3 (24). Die frühere Vermutung, dass eine Infektion mit dem Genotyp 1b generell mit einem schwereren Verlauf der Erkrankung korrelieren könnte, hat sich nicht bestätigt. Allerdings beobachtet man bei Patienten mit Genotyp 1b häufiger weiter fortgeschrittene Stadien der Lebererkrankung (25). Dies könnte aber daraus

resultieren, dass Patienten mit einer Subtyp 1b Infektion aufgrund des durchschnittlich erheblich höheren Lebensalters eine weit längere Erkrankungszeit aufweisen. Darüber hinaus zeichnet sich das HCV durch seine hohe Mutagenität und einer demzufolge ständigen Entstehung von Virusvarianten aus. Diese „Quasispezies“ sind wahrscheinlich auch die Ursache dafür, dass der Körper oft nicht in der Lage ist, eine langfristige, protektive Immunität aufzubauen („immune escape“), was wiederum den hohen Prozentsatz an chronischen Infektionen bedingt (26), und auch eine Re-Infektion möglich macht.

1.1.3 Pathogenese und Klinik

Die Zielzellen des HCV sind vor allem die Hepatozyten und wahrscheinlich auch die B-Lymphozyten. Der hepatozelluläre Schaden der chronischen HCV-Infektion entsteht allerdings vermutlich nicht durch einen direkten zytopathogenen Effekt des Virus, sondern ist eher auf die immunologische Reaktion des Körpers zurückzuführen, bei der natürliche Killerzellen und CD8+-T-Zellen eine zentrale Rolle spielen (27), (28). So weisen viele virämische Patienten histologisch nur geringe Leberveränderungen auf, bzw. korreliert die Viruslast (bei immunsupprimierten Personen) nicht mit dem Ausmaß der Leberzellschädigung oder der Transaminasenaktivität (25). Die Inkubationszeit beträgt 15 – 150 Tage. Die akute Infektion verläuft meist klinisch inapparent, seltener mit unbestimmten Krankheitszeichen wie Müdigkeit und Abgeschlagenheit, einen Ikterus entwickeln lediglich ein Viertel der Patienten (29).

Bei 55 – 85 % der Betroffenen wird die Infektion chronisch. Diese ist definiert durch nachweisbare HCV-RNA über mehr als sechs Monate (30). Ca. 30 % der Patienten mit einer chronischen Infektion bekommen nach 20 -30 Jahren eine Leberzirrhose (31). Davon entwickeln wiederum etwa 1 – 4 % ein hepatozelluläres Carcinom (32). Morbidität und Mortalität der chronischen Hepatitis-C werden ganz entscheidend durch das Vorliegen einer Leberzirrhose bzw. eines hepatozellulären Carcinoms beeinflusst. Die 5-JÜL für Patienten mit einer Zirrhose liegt je nach Stadium bei 50 – 80 % (33), das mittlere Überleben des HCC liegt nach Diagnosestellung lediglich bei ca. 6 Monaten (34).

In der Literatur wird neben den bereits genannten Krankheitsbildern über einen Zusammenhang der chronischen Hepatitis-C mit Erkrankungen außerhalb der Leber berichtet. Hier sind besonders die gemischte Kryoglobulinämie, die membranoproliferative Glomerulonephritis und die Porphyria cutanea tarda zu nennen. Eventuell besteht ein epidemiologischer Zusammenhang mit dem Diabetes mellitus (35).

1.1.4 Therapie der chronischen Hepatitis C

Interferon alfa (INF alfa) als Monotherapie wurde für die Therapie der HCV-Infektion bereits Anfang der neunziger Jahre zugelassen. Es handelt sich um ein Zytokin, welches eine wichtige Rolle bei der körpereigenen Immunabwehr spielt (36). Durch Interaktion mit oberflächenständigen Zellrezeptoren bewirkt INF alfa die Aktivierung von Janus-Kinasen, Signaltransduktoren und Transkriptionsaktivatoren (37). Diese sorgen für die Induktion von Genen, welche sowohl hemmend auf die virale Proteintranslation wirken, als auch die virale Messenger RNA destabilisieren. Außerdem führt INF zur Expression von einigen Genen, die in der Immunantwort eine Rolle spielen und unterstützt auf diesem Weg die Aktivierung von natürlichen Killerzellen, die Ausbildung von dendritischen Zellen, die Proliferation von T-Gedächtnis-Zellen und eine Verringerung der T-Zell-Apoptose (38). Eine Monotherapie mit INF alfa bringt jedoch, was die dauerhafte Viruselimination betrifft, nur Erfolgsraten von unter 20 % (39). Die alleinige Gabe von Ribavirin wiederum bewirkt zwar eine Senkung der Transaminasen, interessanterweise ohne jedoch einen signifikanten Abfall der HCV-Viruslast herbeizuführen (40). Gegen Ende der neunziger Jahre wurde INF alfa erstmals in Studien mit dem oralen Virostatikum Ribavirin kombiniert, was zu einer Verbesserung der dauerhaften Viruselimination auf 40 bis 45 % führte (im Mittel für HCV Genotyp 1,2 und 3) (41), (42). Die Kombinationstherapie INF alfa plus Ribavirin wurde in Deutschland 1999 zugelassen (43).

Ein weiterer entscheidender Fortschritt in der Hepatitis-C-Therapie wurde durch die Entwicklung moderner Depot-Interferone, sogenannter pegylierter Interferone (Peginterferone) erreicht. Diese Substanzen zeichnen sich dadurch aus, dass Interferon alfa-2a oder alfa-2b kovalent an Polyäthylenglykol als inerten Träger gebunden wird,

und damit bei gleicher antiviraler Aktivität eine verlängerte Plasmahalbwertszeit besitzt (25). Die Zulassung der Therapie von Peginterferon kombiniert mit Ribavirin erfolgte im Jahre 2001, und führte zu einer weiteren Verbesserung der dauerhaften Viruselimination. Die Kombination aus Peginterferon alfa plus Ribavirin ist bis heute Standardtherapie der chronischen Hepatitis C (44), wobei INF alfa-2a oder 2b gleichwertig eingesetzt werden.

Eine Behandlungsindikation besteht für alle Erwachsenen mit einer chronischen Hepatitis C, bei denen HCV-RNA nachweisbar ist, die symptomatisch sind, eine Erhöhung der Transaminasen besteht (45), (46), eine kompensierte Lebererkrankung vorliegt und man von einer Compliance des Patienten sowie dessen Abstinenz von Alkohol und Drogen ausgehen kann (41), (44), (47), (48). Bezüglich der Lebererkrankung sollten Patienten mit einer Zirrhose Stadium Child A und in ausgewählten Fällen auch im Stadium Child B behandelt werden (49). Eine Leberzirrhose im Child C Stadium hingegen stellt eine Kontraindikation dar. Die Leberbiopsie hilft, das Ausmaß der bestehenden entzündlichen Aktivität (Grading), sowie den Fibrosegrad und Architekturzerstörung der Leber (Staging) beurteilen zu können (50). Die Einteilung der Leberhistologie erfolgt nach Ishak- (51) oder Metavir-Score (52) durch die histologischen Merkmale: keine Fibrose, portale Fibrose ohne Septen, portale Fibrose mit Septen bei erhaltener Architektur, portale Fibrose mit Septen und Architekturzerstörung und portale Fibrose mit Septen, Architekturzerstörung, Regeneratknoten sowie zirrhotischem Umbau. Die Kombinationstherapie wird normalerweise für Patienten mit mehr als nur portaler Fibrose empfohlen was einem Ishak Score von ≥ 3 und einem Metavir Score von ≥ 2 entspricht (44). Sinnvoll ist die Durchführung einer Leberbiopsie vor Therapiebeginn besonders bei Patienten mit Genotyp 1 Infektion, oder wenn es klinisch Hinweise auf ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium gibt (50), (53).

Die wichtigsten Faktoren, die über einen Therapieerfolg entscheiden, sind der HCV-Genotyp und die HCV-Viruslast vor Beginn der Therapie, daher sollten diese bei der Therapieplanung berücksichtigt werden. Ein frühes virologisches Ansprechen nach 12

Wochen, definiert als Abfall der Viruslast um mindestens 2 dekadische Logarithmen, kann zur Prognose eines anhaltenden Ansprechens herangezogen werden, da eine fehlende Reduktion der Viruslast in dieser Größenordnung einen Nonresponse zu 98 % wahrscheinlich macht (54), (55), (56), (57). Aufgrund dessen wird nach gültigen Leitlinien ein Therapieabbruch nach 12 Wochen empfohlen, sollte die Viruslast nicht um 2 log-Stufen abgefallen sein. Wird länger behandelt, ist eine rein qualitativ nachweisbare HCV-RNA in Therapiewoche 24 ein weiteres Abbruchkriterium, da hier der negative prädiktive Wert für einen Behandlungserfolg bei > 98 % liegt (58), (59). Diese Kriterien besitzen aufgrund der insgesamt sehr hohen Ansprechraten bei den HCV-Genotyp 2 und 3 Infektionen, vor allem für Genotyp 1 infizierte Patienten eine klinische Relevanz. Ein weiterer prognostischer Faktor ist der Rapid Response, der mit einer Viruslast -Negativierung innerhalb der ersten vier Therapiewochen einhergeht. In einem solchen Fall wird aktuellen Studien zufolge eine Beendigung der Therapie in Woche 12 – 16 für die HCV-Genotypen 2 und 3 (60), (61), (62), und in Woche 24 für Genotyp 1 empfohlen (63). Bei Genotyp 1 allerdings mit der Einschränkung einer niedrigen Ausgangsviruslast von <600 000 IU/ml.

Diese große prädiktive Bedeutung die eine frühe virologische Antwort auf die Therapieeffizienz hat, war auch richtungsweisend für die Themenauswahl bei der Auswertung der eigenen RBV-Plasmaspiegelmessungen. Hier ging es unter anderem darum, möglichst viele Informationen über Entwicklung der RBV-Konzentrationen in der Therapieanfangsphase zu bekommen.

Therapieschema:

Grundlage der Behandlung ist eine Kombination aus der einmal wöchentlichen subkutanen Injektion von pegyliertem INF alfa (2a oder 2b) und der zweimal täglichen oralen Gabe von Ribavirin (Tab. 2), (44), (47), (48), (63), (60), (61), (62):

THERAPIE DER CHRONISCHEN HEPATITIS C - STAND 2006:

Genotyp	Peginterferondosis	Ribavirindosis	Dauer (Wo)	Gründe für frühere Beendigung der Therapie
1	alfa-2a: 180µg/Wo alfa-2b: 1.5µg/kg/Wo	1000mg bei ≤75kg 1200mg bei >75kg	48	Nonresponse: Abbruch, wenn in Woche 12 die HCV-RNA nicht um 2 log-Stufen abgefallen, oder in Woche 24 noch nachweisbar ist Rapid Response: Beendigung In Woche 24 wenn die Ausgangsviruslast <600 000 IU/ml und HCV-RNA in Woche 4 nicht mehr nachweisbar
2 oder 3	wie oben	800mg/Tag unabhängig vom Körpergewicht	24	Nonresponse: unwahrscheinlich Rapid Response: Beendigung In Woche 12-16, wenn HCV-RNA in Woche 4 nicht mehr Nachweisbar ist

Tab. 2: Therapie der chronischen Hepatitis C nach Hoofnagle et al. (6)

Dosisempfehlungen sowie Therapiedauer sind für Patienten mit HCV-4, -5, -6 – Infektion nicht ausreichend evaluiert. Vorläufige Daten sprechen dafür, diese wie HCV-1-Infizierte zu behandeln (64), (65).

Aktuell erfolgt die Festlegung der RBV-Dosis, wie in Tab. 2 zu sehen ist, nur unter Berücksichtigung des Patientengewichts und des HCV-Genotyps. Es gibt derzeit jedoch Hinweise, dass man aufgrund der verabreichten Dosis nicht auf den entstehenden RBV-Plasmaspiegel schließen kann (siehe ausführlich im Kapitel „Stellenwert des RBV-Plasmaspiegels in der HCV-Therapie“). Insgesamt sind noch viele wichtige Fragen zu dem Medikamentenspiegel offen. Ein therapeutischer Bereich für RBV ist nicht bekannt, ein minimal erforderlicher Plasmaspiegel für ein virologisches Ansprechen ebenfalls nicht, genauso wenig wie eine Toxizitätsgrenze. Ein Therapeutic Drug Monitoring (TDM) ist nicht etabliert. Auch die Einflussnahme von Geschlecht, oder Wahl des Interferons ist nicht bekannt. Der tatsächlich vorhandene RBV-Spiegel scheint aber erheblichen Einfluss auf einen Verlauf der Therapie, vor allem hinsichtlich der Kontrolle der Nebenwirkungen, sowie auf den Therapieerfolg zu haben. So

versprochen wir uns von der Entwicklung einer einfachen und schnellen Methode den Medikamentenspiegel im Klinikalltag messen zu können, Aufschlüsse über die Dosis-Plasmaspiegel-Wirkbeziehung zu erhalten. Letztendlich mit dem Ziel die HCV-Therapie sicherer und erfolgreicher zu machen.

Zwei Patientengruppen sind die Therapie betreffend noch gesondert zu erwähnen, da die Behandlung bei ihnen mit besonderen Risiken verbunden ist: das sind zum einen HCV-HIV-Koinfizierte und Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion. Beide Parameter wurden bei der Datenerhebung für diese Arbeit berücksichtigt, und zudem ein Patient mit einer terminalen Niereninsuffizienz im Rahmen eines individuellen Heilversuchs mit RBV behandelt. Aufgrund dessen soll hier kurz auf diese beiden Gruppen eingegangen werden:

HCV-HIV-Koinfektion: Eine HIV-Koinfektion führt zu einer Progression des klinischen Verlaufs (66), (67). Bei HIV-Patienten unter hochaktiver antiretroviraler Therapie (HAART) sind, bei erheblich rückläufiger HIV-assoziiertes Morbidität und Mortalität, bis zu 50 % der Todesfälle auf lebererkrankungsbedingte Komplikationen (meist durch HCV-Infektion) zurückzuführen (68). Daher ist es sinnvoll, bei Patienten mit HCV-HIV-Koinfektion die Indikation zur Kombinationstherapie, ungeachtet einer Transaminasenerhöhung oder der Leberhistologie, großzügig zu stellen (53). Die ersten randomisierten, kontrollierten Studien zu diesem Thema sind APRICOT und RIBAVIC (69), (70); hier wurden die Patienten ohne Berücksichtigung des HCV-Genotyps über 48 Wochen mit 800mg Ribavirin pro Tag behandelt. Die Rate für eine dauerhafte Viruselimination lag mit durchschnittlich 40 % unter der bei HCV-Monoinfektion (71), wobei hierfür auch die relativ geringe Tagesdosis ursächlich sein könnte. Auffällig war eine erhöhte Toxizität der Kombinationstherapie in Verbindung mit HAART, die sich in Form von akutem Leberversagen (vornehmlich bei Patienten mit fortgeschrittener Zirrhose), einer Hyperlaktämie oder Laktatazidose, sowie vereinzelt in Fällen akuter Pankreatitiden äußerte. Hier schien vornehmlich eine Komedikation des Inosinanalogs Didanosin (ddl) problematisch zu sein (siehe unten unter Wechselwirkungen von Ribavirin) (72). Etwas bessere Ergebnisse bezüglich der Viruselimination zeigten sich in einer kürzlich veröffentlichten spanischen Studie (73),

bei welcher die Patienten mit der Standarddosis von 800 – 1200 mg Ribavirin pro Tag behandelt wurden. Hier wurde bei HCV Genotyp 1 eine SVR-Rate von 44 %, und bei HCV Genotyp 2 und 3 ein SVR von 53% erzielt.

Anwendung bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion: Das empfohlene Dosierungsschema von RBV (siehe Tab. 2) verursacht bei Patienten mit einem Serumkreatininwert > 2mg/dl oder einer Kreatinin-Clearance < 50ml/min einen erheblichen Anstieg der Plasmakonzentration von Ribavirin (Area under curve, AUC und Maximalkonzentration, C_{max}) (74). Daher ist die Gabe von Ribavirin bei einer Kreatinin-Clearance von <50ml/min kontraindiziert. Bruchfeld et al. (75), sowie Dumortier et al. (76) beschreiben ebenfalls eine Einflussnahme der Nierenfunktion auf den Plasmaribavirinspiegel. Es existieren jedoch noch nicht genügend Daten, um mit Sicherheit eine Empfehlung für eine Dosisanpassung geben zu können. Generell sollte Ribavirin bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion mit besonderer Vorsicht und unter intensiver Überwachung vor allem der Nierenfunktion und der Hämoglobinkonzentration erfolgen. Gegebenenfalls sind wiederholt Korrekturen der Ribavirindosis notwendig (77), (74), (78).

Therapieansprechen:

Den Therapieerfolg beurteilt man anhand drei verschiedener Verlaufsformen:

1. Die dauerhafte Viruselimination (Sustained Virologic Response, SVR) welche definitionsgemäß einen negativen HCV-RNA-Nachweis sechs Monate nach Therapieende voraussetzt und einer Heilung entspricht.
2. Die vorübergehende Viruselimination, dazu gehören Relapse und Breakthrough.
3. Das Nichtansprechen (Nonresponse).

Ein SVR ist bei Patienten die mit HCV-Genotyp 2 oder 3 infiziert sind in 75 – 80 % zu erreichen. Dagegen bei Genotyp 1 nur in 40 – 50 %. Für einen Therapieerfolg sprechen außer dem HCV-Genotyp 2 oder 3, eine Initial niedrige Viruslast (<600 000IU/ml), geringe fibrotische Veränderungen in der Leberhistologie, weibliches Geschlecht, ein Alter unter 40 Jahren (79) und neueren Studienergebnissen zufolge auch der Ribavirinplasmaspiegel. Ein dauerhaftes Therapieansprechen ist zumeist mit einem schnellen Viruslastabfall verknüpft, sodass in Therapiewoche 4 – 24 keine HCV-

RNA mehr nachweisbar ist. Auch die Transaminasen fallen normalerweise schnell, während sich der histologische Leberbefund im Verlauf bessert (80), (24), (81). Doch nicht alle Patienten, bei denen die Viruslast unter die Nachweisbarkeitsgrenze fällt, haben ein dauerhaftes Ansprechen. Bei einem Breakthrough (10 %) ist HCV-RNA bereits unter der Therapie erneut nachweisbar, während bei Relapse-Patienten (20%) erst nach Therapieende wiederum ein Anstieg der Viruslast zu verzeichnen ist. Die Transaminasen steigen in einem solchen Fall ebenso wieder an. Zu einem Relapse kommt es häufiger bei kurzer Therapiedauer und einem verzögerten Initialen Virusabfall (81). Bei Nonrespondern kann die Viruslast zwar sinken, bleibt aber während der gesamten Therapiedauer messbar und die ALT erhöht. Ein Nichtansprechen kommt bei Patienten mit Genotyp 2 oder 3 selten, bei Genotyp 1 in mindestens 30 % der Fälle vor (6).

Nebenwirkungen der Kombinationstherapie: Die Kombinationstherapie birgt zahlreiche, teilweise gravierende Nebenwirkungen, welche durch die Möglichkeit einer RBV-Plasmaspiegelkontrolle während der Therapie und einer dementsprechenden Dosisanpassung besser unter Kontrolle zu bekommen wären: Die Patienten leiden vor allem zu Beginn der Therapie unter grippeartigen Symptomen wie Muskelschmerzen, Abgeschlagenheit und Fieber, welche man durch Paracetamolgaben bessern kann. Desweiteren gehören psychische Störungen wie Depressionen, Angstsymptomatik, Schlaf- und Konzentrationsstörungen zu den Nebenwirkungen von INF alfa. Hier wird bei Bedarf die Verordnung von Antidepressiva, z. B. Selektiven Serotonin-Reuptake-Hemmern (SSRI) empfohlen (82).

RBV reichert sich in den Erythrozyten an, was zu einer Hämolyse führt, zudem übt INF alfa einen suppressiven Effekt auf das Knochenmark aus (83). Vor allem durch die Hämolyse entsteht eine Anämie, die ein erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt oder einen Apoplex mit sich bringt, besonders bei Patienten, die kardiovaskulär vorerkrankt sind. Zudem ist sie der häufigste Grund für eine Dosisreduktion oder einen Therapieabbruch (bei ca. 10 % der Patienten) (42), (41). Die Anämie kann durch Gabe von Erythropoetin gemindert werden (84), (85). RBV ist teratogen, so dass eine effektive Kontrazeption unter der Therapie und sechs Monate danach streng geachtet

werden muss. In einigen genotoxischen Untersuchungen hat es sich zudem als mutagen erwiesen, so dass man eine potenziell kanzerogene Wirkung nicht ausschließen kann (74). Ernsthaftige Nebenwirkungen der Kombinationstherapie mit dauerhaften Beeinträchtigungen oder Todesfolge treten in 1 – 2 % der Fälle auf.

HAUPTNEBENWIRKUNGEN DER KOMBINATIONSTHERPIE MIT RIBAVIRIN UND PEGINTERFERON

Häufigkeit	Nebenwirkung
> 5 %	Müdigkeit, grippeartige Symptome, Pyrexie, Kopfschmerzen, , Übelkeit, Anorexie, Abdominalschmerzen, Diarrhoe Arthralgien, Myalgien, Asthenie, Nausea, Kurzatmigkeit, Husten Angst, Depression, Schlaflosigkeit, Gefühlsschwankungen, Kon- zentrationstörungen, Benommenheit, Reizbarkeit Alopezie, Pruritus, Hauttrockenheit, Hautausschlag Anämie, Thrombozytopenie, Neutropenie, Hämolyse, Veränderungen und Entzündung an der Injektionsstelle
1 – 5 %	schwerere Depression oder Angst, Aggressivität, Somnolenz Impotenz, Hitzewallungen, Durstempfindung Rückfall in Drogen- oder Alkoholsucht Herpes simplex, Infektion der oberen Atemwege, Bronchitis Orale Candidamykose, Augenzündung, Belastungsdyspnoe Hypo- und Hyperthyreose Ekzem, Nachtschweiß, Lichtempfindlichkeitsreaktion, Urtikaria
1%	Akute Psychose, Panikattacken, Suizidabsicht, Zorn Hörstörungen/Hörverlust, Tinnitus, Hornhautulkus, Verlust des Sehvermögens, Optikusneuropathie Synkope, Koma, periphere Neuropathie, Renale-, kardiale-, oder pulmonale Insuffizienzen Myokardinfarkt, Angina pectoris, Apoplex Idiopathische thrombozytopenische Purpura, Thyreoiditis, Diabetes, Psoriasis, rheumatoide Arthritis systemischer Lupus erythematodes, Sarkoidose, Anaphylaxie Leberversagen, Leberfunktionsstörungen, Leberkarzinom peptisches Ulkus, Pankreasreaktion mit Anstieg von Amylase und Lipase

Tab. 3: Hauptnebenwirkungen der Kombinationstherapie (6), (74)

Nach Beendigung der Therapie sind die Nebenwirkungen weitgehend reversibel.

Überwachung der Kombinationstherapie:

Aufgrund des Nebenwirkungsprofils sollte auf eine gute Praxisanbindung der Patienten während und auch nach der Therapie geachtet werden. Während der Therapie empfiehlt sich alle acht Wochen eine klinische Untersuchung, sowie eine Kontrolle des Blutbilds (Leukozyten, Hämoglobin, Thrombozyten), der Transaminasen und der

Glukose (49). Des Weiteren sollte hier ein Monitoring der Nierenretentionsparameter stattfinden, da sowohl Ribavirin als auch INF alfa renal eliminiert werden. Eine HCV-RNA-Bestimmung wird quantitativ vor Therapiebeginn und in Woche 12 empfohlen, eine qualitative Bestimmung sollte in Woche 24 erfolgen. Bei 30 – 40 % der Patienten, die eine 48-Wochen-Therapie erhalten, wird im Verlauf eine Dosisanpassung von Ribavirin notwendig, in 20 % sogar ein Therapieabbruch (80), (24), (47). In jedem Fall sollte die Therapie engmaschig überwacht, und die Medikamentendosis nur zurückhaltend reduziert werden, um eine dauerhafte Viruselimination nicht zu gefährden (86).

1.2 Ribavirin

1.2.1 Wirkmechanismen und klinischer Einsatz

Durch die Einführung von RBV in die antivirale Behandlung der chronischen Hepatitis-C Ende der 90er Jahre konnte eine erhebliche Verbesserung der Therapieergebnisse erzielt werden. RBV hat ein breites Wirkspektrum gegen virale Krankheitserreger (36), es inhibiert sowohl RNA- als auch DNA-Viren und hat sich neben der HCV-Therapie auch in der Anwendung gegen RNA-Viren wie z. B. Respiratory Syncytial Virus und Bunyavirus bewährt. In der HCV-Therapie darf Ribavirin ausschließlich als Teil einer Kombinationsbehandlung mit INF alfa angewendet werden (74). Eine RBV-Monotherapie führt nicht zu einer signifikanten Reduktion der Viruslast (VL). Die in Tabelle 2 aufgeführte ausgewählte Tagesdosis wird auf zwei Dosen verteilt zu einer Mahlzeit eingenommen.

Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln und sonstige Wechselwirkungen:

Interaktionen mit anderen Medikamenten entstehen im Wesentlichen durch drei Mechanismen: Phosphorylierung, Änderung der Enzymaktivität und durch Veränderung der zellulären Nukleosidaufnahme (87).

So werden nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) die maßgeblich in der antiviralen Therapie bei HIV verwendet werden und unter anderem Bestandteile des HAART-Regimes sind, durch Ribavirin unterschiedlich beeinflusst: die Phosphorylierung der Thymidinanaloga Zidovudin (AZT) und Stavudin (D4T) zum aktiven Metaboliten wird gehemmt (88), (89), (90), wohingegen die Bildung des

aktiven Triphosphats des Inosinanalogs Didanosin (ddl) beschleunigt wird (90), (91), (92). Da sich dadurch das Risiko für Hyperlaktatämien/Laktatazidosen, Pankreatitiden und Neuropathien erhöht, wird eine gleichzeitige Gabe von Ribavirin und Didanosin nicht empfohlen (74). Die Plasmaverfügbarkeit von Ribavirin selber scheint von NRTIs nicht beeinflusst zu werden. Da Ribavirin durch den es-Nukleosidtransporter in die Zellen gelangt, wird seine intrazelluläre, phosphorylierte und damit aktive Form durch Substanzen gemindert, die mit ihm am Transporter konkurrieren. Das sind vornehmlich Adenosin-Aufnahmeinhibitoren wie beispielsweise Dipyridamol. Eine gleichzeitige Anwendung empfiehlt sich nicht, da die Wirksamkeit von Ribavirin geschmälert wird (87). Zwischen INF alfa und Ribavirin bestehen Studienergebnissen zufolge keine Wechselwirkungen (93). Ribavirin stellt weder ein Substrat für Cytochrom-P450-Enzyme dar, noch hemmt es diese. Auch für die Induktion von Leberenzymen ergaben Toxizitätsstudien keinen Hinweis (74), (94).

1.2.2 Chemische Eigenschaften

Die chemischen Eigenschaften eines Medikaments spielen bei der Auswahl und Entwicklung einer geeigneten Methode zur Plasmaspiegelmessung eine ganz entscheidende Rolle. Ribavirin (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamid) ist ein synthetisch hergestelltes Nukleosidanalogen und weist eine hohe Strukturähnlichkeit mit Guanosin auf (Abb. 3). Die Summenformel lautet $C_8H_{12}N_4O_5$, die molare Masse beträgt 244,206 g/mol und der Schmelzpunkt liegt bei 174-176°.

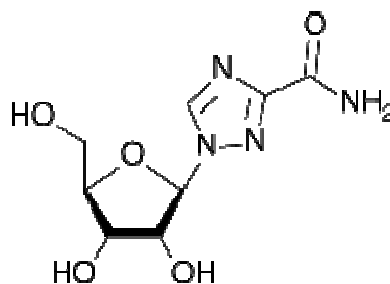


Abb. 3: Strukturformel von Ribavirin (95)

Ribavirin hat demnach drei Hauptkomponenten in seiner Strukturformel: saure Amide, Triazole und Pentose mit drei Hydroxylgruppen. Aufgrund der unterschiedlichen Elektronegativität von Sauerstoff (3.5) und Wasserstoff (2.1) bestehen sowohl kovalente als auch ionische Bindungen. Der Ionencharakter in Prozent berechnet sich wie folgt: $16 (X_a - X_b) + 3,5(X_a - X_b)^2$, wobei hier X_a 3.5 und X_b 2.1 betragen (96), (97),

(98). Für die Sauerstoff-Wasserstoff-Bindung erhält man daraus einen ionischen Anteil von 29,1 % und einen kovalenten von 70,9 %. Tests, wie Änderung des Urin-pH-Wertes und Lösung von Ribavirin in destilliertem Wasser, haben gezeigt, dass Ribavirin bei einem mittleren pH Wert von 5.9 saure Eigenschaften besitzt (99).

1.2.3 Pharmakodynamik

RBV gehört zur pharmakotherapeutischen Gruppe der direkt wirkenden Virostatika, doch der genaue Mechanismus, durch den RBV in Kombination mit INF alfa seine Wirkung gegen HCV entfaltet, ist nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt (100). Ein möglicher Wirkmechanismus von RBV besteht im direkten hemmenden Einfluss auf die HCV-Replikation (101).

Daneben ist unter mehreren möglichen Inhibierungsmechanismen die Blockade des Enzyms Guanylyltransferase hervorzuheben, wodurch die virale RNA-Synthese behindert wird. Dieses Enzym ist an der Ausbildung der 5'-cap- Struktur von eukaryoten und einigen viralen mRNAs beteiligt, indem es an das 5'-Ende der RNA ein Guanosintriphosphat bindet, wobei eine unübliche 5'-5' C-Atombrücke unter Beibehaltung der drei Phosphatgruppen entsteht (102), (103). RBV blockiert die cap-Bildung generell, so dass auch die Wirtszelle massiv geschädigt wird (104).

1.2.4 Pharmakokinetik

RBV wird nach oraler Aufnahme rasch resorbiert (Zeitpunkt der maximalen Serumkonzentration nach Gabe, $T_{max} = 1,5$ Stunden), darauf folgen eine schnelle Verteilung und eine lange Eliminationszeit. Die Halbwertszeit liegt nach einer Einzeldosis im Bereich von ungefähr 80 Stunden. RBV wird umfassend resorbiert, wobei von einer radioaktiv markierten verabreichten Dosis ca. 10 % mit dem Fäzes ausgeschieden werden. Die absolute Bioverfügbarkeit beträgt allerdings nur etwa 50 %, was wahrscheinlich auf einen ausgeprägten First-Pass-Metabolismus zurückzuführen ist (105), (106), (107). Das Verhältnis zwischen der Dosis und der area under curve (AUC) ist nach Einzeldosen von 200 – 1200 mg RBV linear. Nach oralen Einzeldosen weisen die pharmakokinetischen Größen von RBV eine hohe inter- und intraindividuelle Variabilität von ca. 30 % auf, die ihre Ursache neben dem extensiven First-Pass-Metabolismus wohl auch im Transfer innerhalb und über das

Blutkompartiment hinaus hat (108). Nach Mehrfachdosierung akkumuliert Ribavirin so stark im Plasma, dass die AUC_{12h} das 6fache der Einzeldosis beträgt (93). Nach oraler Einnahme von 600 mg zweimal täglich wird ein steady state nach vier Wochen erreicht, bei einer mittleren Plasmakonzentration von ca. 2 200ng/ml. Nach Absetzen der Behandlung beträgt die Halbwertszeit 300 Stunden, wohl bedingt durch die langsame Eliminierung aus Nicht-Plasma-Kompartimenten (74). Bis die Substanz vollständig aus dem Körper entfernt ist (complete washout), vergehen sechs Monate, was 15 Halbwertszeiten entspricht (87). Zu beachten ist, dass sowohl die Wechselwirkungen als auch die Teratogenität infolgedessen bis weit über das Therapieende hinaus bestehen bleiben.

Nach oraler Gabe wird RBV im proximalen Dünndarm von einem natriumabhängigen Nukleosidtransporter (N1) durch aktiven Transport aufgenommen (109). Anschließend wird es schnell und in großem Umfang in fast alle Körperzellen transportiert (110). Sein Verteilungsvolumen liegt bei ungefähr 4500 Litern. RBV bindet nicht an Plasmaproteine. Der Transport in Nicht-Plasma-Kompartimenten erfolgt dann primär über einen äquilibrierenden Nucleosid-Transporter des e_s -Typs (111). Dieser benötigt im Gegensatz zum gastrointestinalen N1 Transporter einen Konzentrationsgradienten und verläuft bidirektional. Er ist auf fast allen Körperzellen vorhanden und damit wahrscheinlich für das große Verteilungsvolumen von RBV verantwortlich (74). Innerhalb der Zellen liegt RBV stets in phosphorylierter Form vor (112). Der e_s – Transporter ist allerdings nur in der Lage, die unphosphorylierte Form zu transportieren, daher muss der Metabolit dephosphoryliert werden, um die Zelle wieder verlassen zu können (113), (114). Dieser Prozess bedingt die extrem lange terminale Halbwertszeit des Medikaments. Einen Sonderfall der langsamen Eliminationskinetik stellt die Akkumulation von RBV in den Erythrozyten dar. Das Verhältnis von Vollblut- zu Plasma-RBV-Konzentration beträgt nach Mehrfachdosis annähernd 60:1, bedingt durch die Kumulation von RBV-Nukleotiden in den Erythrozyten (115), (116). Die Eliminationshalbwertszeit in den Erythrozyten beträgt ungefähr 40 Tage (117). Ursächlich für die Akkumulation ist die fehlende Eigenschaft der kernlosen Erythrozyten, aufgrund mangelnder Enzyenausstattung RBV wie

kernhaltige Zellen zu dephosphorylieren und in dieser Form aus den Erythrozyten zu transportieren (113). Die phosphorylierten Metaboliten wiederum sind die Ursache für eine Abnahme des intrazellulären ATP-Anteils der Erythrozyten (118). Dadurch werden diese beschädigt (vermutlich durch eine Membrandestabilisierung) und verstärkt im Sinne einer Hämolyse im retikuloendothelialen System der Milz abgebaut (119). Die Folgen sind eine damit einhergehende Anämie und die Freisetzung des RBV (117), (120).

Die Metabolisierung erfolgt über zwei Wege: 1. Durch reversible Phosphorylierung (zu Mono-, Di-, und Triphosphaten) und 2. Durch einen Abbauweg mit Deribosylierung und Amidhydrolyse, so dass ein Triazolcarbonsäure-Metabolit entsteht (114), (121). Die Kinetik der Phosphorylierung wurde in vitro an verschiedenen menschlichen Zellen untersucht und festgestellt, dass vorwiegend Triphosphatmetaboliten entstehen (113). RBV sowie seine beiden Triazolcarbamid- und Triazolcarbonsäure-Metaboliten werden renal, vorwiegend in Form der Metaboliten eliminiert (117), (106).

1.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

1.3.1 Allgemeines

Die Flüssigchromatographie ist eine analytische Methode aus der Chemie, die in der Lage ist, Moleküle aller Art qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Die Vielfalt der Trennverfahren ermöglicht sowohl die Untersuchung von niedermolekularen organischen Molekülen (wie z. B. Arzneistoffen und Hormonen), als auch von großen Biomolekülen (wie z. B. Peptiden und Kohlenhydraten). Für eine wirksame Chromatographie sind sehr kleine Teilchen für die stationäre Phase und damit ein hoher Druck für die mobile Phase notwendig. Daher wurde die HPLC in den Anfangszeiten auch Hochdruckflüssigchromatographie (=High Pressure Liquid Chromatographie) genannt. Die Hochleistungsflüssigchromatographie (= High Performance Liquid Chromatography = HPLC) entwickelte sich in den 60er Jahren aus der Säulenchromatographie (122).

Folgende Flüssigchromatographische Trennverfahren werden heute unterschieden:

METHODE	CHARAKTERISTIK
Adsorptionschromatographie	stationäre Phase relativ polar, mobile Phase relativ apolar, daher eluiert ein apolares Lösungsmittel langsamer als ein stärker polares und polare Stoffe werden später eluiert als apolare
Umkehrphasenchromatographie = Reversed-phase-Chromatographie	es gilt das Umgekehrte der Adsorptionschromatographie
Ausschluss-Chromatographie	Trennung nach Molekülgröße
Chromatographie an chemisch gebundenen Phasen	stationäre Phase kovalent an Trägermaterial gebunden
Ionenaustausch-Chromatographie	stationäre Phase enthält ionische Gruppen
Ionenpaar-Chromatographie	ähnlich der Ionenaustauschchromatographie
Ionenchromatographie	zur Auftrennung starker Säuren und Basen

Tab. 4: Flüssigchromatographische Trennmethoden (123)

1.3.2 Funktionsweise

Die Chromatographie ist ein Trennprozess, bei welchem das Probengemisch in einer Trennsäule (chromatographisches Bett) zwischen zwei Phasen, der stationären (= ruhenden) Phase und der mobilen Phase verteilt wird. Die ruhende Phase dient der Adsorption und besteht aus festen, kleinen Teilchen unterschiedlicher Porengröße. Die mobile Phase ist mit Ausnahme der Gaschromatographie stets flüssig. Der Trennvorgang beruht darauf, dass Substanzen, die stark mit der stationären Phase in Wechselwirkung treten, relativ lange in der Säule verbleiben, während Substanzen mit einer Affinität zur mobilen Phase schnell hindurch wandern. Beschreibend für die Tendenz, sich bevorzugt in der einen oder der anderen Phase aufzuhalten sind der Verteilungskoeffizient K und der Retentionsfaktor k' (früher Kapazitätsfaktor). Damit ein Stoffgemisch aufgetrennt werden kann, müssen sich die Komponenten folglich sowohl in Verteilungskoeffizient als auch im Retentionsfaktor unterscheiden.

1.3.3 Aufbau der HPLC-Apparatur

Ein HPLC-Instrument besteht aus den folgenden abgebildeten Elementen: Vorrat an mobiler Phase, anschließend an den Lösemittelvorrat Zuleitung mit Fritte,

Hochdruckpumpe mit Manometer, Injektionsport (zur Probenaufgabe), Säule, Detektor und Datenerfassung. Diese Komponenten sind entweder in ein Kompaktgerät eingebaut, oder werden modular aus Einzelgeräten zusammengestellt.

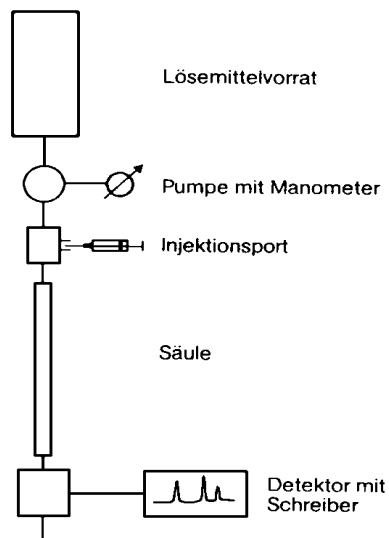


Abb. 4: Schema einer HPLC-Apparatur (124)

1.3.4 Lösungsmittel – die mobile Phase

Darunter versteht man eine Flüssigkeit, in der die zu messende Substanz gelöst wird und sich dann mit Hilfe einer Pumpe durch das chromatographische System bewegt. Bei der Auswahl der mobilen Phase gilt es, Lösungsmittel zu finden, die das Gemisch in Wechselwirkung mit einer geeigneten stationären Phase möglichst schnell und optimal trennen. Dabei sind bestimmte Eigenschaften des Lösungsmittels wie beispielsweise dessen Viskosität, UV-Durchlässigkeit, Brechungsindex und Siedepunkt entscheidend (125). Zudem eluieren die Lösungsmittel die Probenmoleküle unterschiedlich schnell. Dies wird als die jedem Stoff typische Elutionsstärke bezeichnet. In der elutropen Reihe werden die Lösungsmittel gemäß ihrer Elutionsstärke von schwachen (z. B. Fluoralkan FC-78, n-Pentan) bis starken (z. B. Methanol, Wasser, Salzlösungen, Puffer) Lösungsmitteln eingeordnet (126).

1.3.5 Säulen und stationäre Phasen

Eine HPLC-Säule besteht aus einem Rohr welches meist aus einem Stahl gefertigt wird dem Chrom, Nickel und Molybdän zulegiert werden, wodurch ein austenitisches Gefüge entsteht. Das heißt, dieser Stahl ist rostfrei und nicht ferromagnetisch. An

beiden Enden ist die Säule durch Verschraubungen und Stahlritten verschlossen, damit das Packungsmaterial in der Säule verbleibt. Für ein anhaltend gutes Trennergebnis werden zum Schutz der stationären Phase der analytischen Trennsäule Vorsäulen benutzt (125). Die stationäre Phase ist das Packungsmaterial, also die Füllung der Säule. Sie besteht meist aus festen, porösen, kugelförmigen oder unregelmäßig geformten Teilchen, vergleichbar mit einem Schwamm. Materialien sind beispielsweise Silicagel, Aluminiumoxid, poröses Glas oder Hydroxylapatit (127), (128). Die Mikroteilchen besitzen unterschiedliche Körnergrößen, am häufigsten verwendet man eine Porengröße von 3 – 10 μm (129).

1.3.6 Pumpen

Um Flüssigkeiten gegen den Widerstand der feinkörnigen stationären Phase mit annehmbarer Geschwindigkeit (Flußrate) durch die Säule bewegen zu können, wird eine Pumpe benötigt, die einen relativ hohen Druck aufbauen kann. Der erforderliche Druck liegt bei bis zu 500 bar, dabei gilt je kleiner die Körnergröße des Packungsmaterials, desto größer der notwendige Druck (123).

1.3.7 Detektoren

Der Detektor ist der Säule nachgeschaltet und registriert, wann eine Substanzbande aus der Säule eluiert wird. Er erkennt demnach Änderungen in der Zusammensetzung der mobilen Phase und wandelt diese Information in ein elektrisches Signal um. Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Detektion, beispielsweise durch Brechungsindexdetektoren, Ablenkungsrefraktometern, Fluoreszenzdetektoren und die am häufigsten verwendeten UV-Detektoren.

1.3.8 Das Chromatogramm

Die elektrischen Signale mit den Informationen über die eluierten Stoffe werden in Form einer Gaußkurve, dem Peak, aufgezeichnet. Die Peaks in Gesamtheit ergeben das Chromatogramm. An der Position des Peaks im Chromatogramm kann man einen bestimmten Stoff identifizieren, da jede Substanz ihre charakteristische Retentionszeit besitzt. Das ist die Zeit die vom einspritzen des Stoffes vor der Säule bis zur Aufzeichnung des Peakmaximums vergeht. Die Fläche und Höhe des Peaks sind der

Stoffmenge proportional. Das Chromatogramm liefert folglich sowohl qualitative als auch quantitative Informationen über den untersuchten Stoff. Auf Abb. 5 ist ein Beispielchromatogramm der Stofftrennung von Substanz 1 und Substanz 2 mit den wichtigsten Kenngrößen abgebildet:

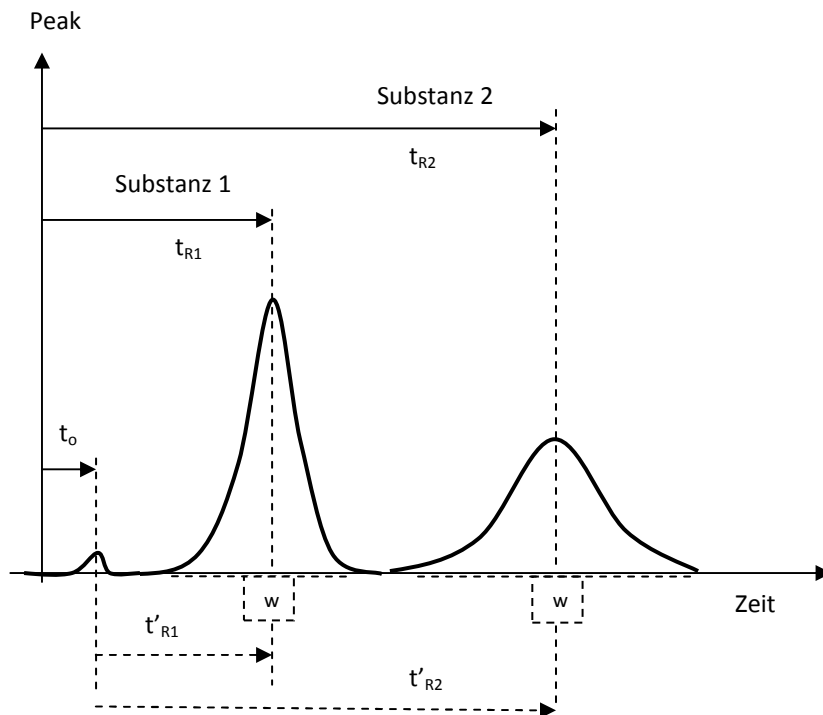


Abb. 5: Beispielchromatogramm (130)

t_R = Retentionszeit, Zeit von Injektion eines Stoffes bis zum Peakmaximum t_0 = Totzeit, die Zeit die, die mobile Phase benötigt um ohne festgehalten zu werden durch die Trennsäule zu wandern, d. h. für alle Stoffe gleich, Zeit eines Stoffes in der mobilen Phase

t'_R = Netto-Retentionszeit, Differenz zwischen Retentionszeit und Totzeit, Zeit eines Stoffes in der stationären Phase

w = Basisbreite eines Peaks

1.4 Zielsetzung

Diese Arbeit wurde an der Universitätsklinik Würzburg mit folgenden Zielen erstellt:

1. Entwicklung einer standardisierbaren und reproduzierbaren HPLC-Methode zur Messung des Plasmaribavirinspiegels und Beschreibung der Methodik.
2. Darstellung und Analyse des RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlaufes während der ersten sechs Therapiewochen und Betrachtung der Einflussfaktoren Geschlecht und Auswahl von Interferon alfa-2a oder 2b.
3. Beschreibung und Interpretation von RBV-Plasmaspiegeltageskinetiken zu verschiedenen Therapiezeitpunkten (zu Therapiebeginn, vor Erreichen des steady state und im steady state).
4. Beschreibung des RBV-Plasmaspiegelverlaufes bei einem Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz unter Therapie mit INF alfa und RBV.
5. Herausarbeitung der Bedeutung des RBV-Plasmaspiegels in der HCV-Therapie und Entwicklung von Empfehlungen für die klinische Praxis.

1.5 Abkürzungen

Abb	Abbildung
ACN	Acetonitril
AFP	Alpha-Fetoprotein
ALT	Alanin-Aminotransferase = GPT, Glutamat-Pyruvat- Transaminase
API	Luftdruckionisation = Atmospheric Pressure Ionization
AST	Aspartat-Aminotransferase = GOT, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
AUC	Area under the curve
BMI	body mass index (kg/m^2)
BSA	Bovine serum albumin
CE	Capillary Electrophoresis = Kapillarelektrophorese
C_{max}	maximale Serumkonzentration
d	die = Tag
DNA	= DNS = Desoxyribonukleinsäure
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
ESI	Elektrosprayionisation = Electrospray Ionization
Gew	Körpergewicht in Kilogramm
GFR = MDRD	glomeruläre Filtrationsrate (mg/dl)
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HBV	Hepatitis B Virus
Hb	Hämoglobin
HCC	Hepatozelluläres Carcinom
HCV	Hepatitis C Virus
Hep-Net	Kompetenznetz-Hepatitis
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie = High Performance Liquid Chromatography
IfSG	Infektionsschutzgesetz
INF	Interferon
INR	International Normalized Ratio
ISTD	= IS = Interner Standard
IQR	interquartile range
JÜL	Jahresüberlebenszeit
Kat	Kategorie
Kg	Kilogramm
Krea	Kreatinin
LLQ	lower limit of quantification (untere Grenze für quantitative Bestimmung)
LOD	limit of detection (Nachweisgrenze)
Lsg	Lösung
McMs	3-Methylcytidin Methosulfat

MW	Mittelwert
NAT	Nukleinsäure-Amplifikationstechnik
NI	Niereninsuffizienz
NNRTI	Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NR	Nonresponse
NRTI	nukleosidische und nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (Nukleosid- und Nukleotidanaloga)
PBA	phenylboronic acid = Phenyl-Boronsäure
Pat	Patient
Peginterferon	pegyliertes Interferon
PCR	polymerase chain reaction
RBV	Ribavirin
RNA	Ribonukleinsäure
RP	reversed phase = Umkehrphasenchromatographie
RR	Blutdruckangabe nach indirekter Messung (Riva Rocci)
s. c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SPE	Solid Phase Extraction = Festphasenextraktion
SSRI	Selektive Serotonin-Reuptake-Hemmer
SVR	Sustained Virologic Response
Tab.	Tabelle
TDM	Therapeutic Drug Monitoring
term.	terminale
T_{max}	Zeitpunkt der max. Serumkonzentration
TPZ	Thromboplastinzeit
TSH	thyreoideastimulierendes Hormon
TW	Therapiewoche
ULQ	upper limit of quantification (obere Grenze für quantitative Bestimmung)
VC	Variationskoeffizient
VL	Viruslast
WHO	World Health Organisation

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

Geräte

Festphasenextraktion-BAKERBOND
spe 12G-Vakuumentraktionseinheit

Mallinckrodt Baker/Griesheim

SPE-Säule: Bond Elut LRC-PBA, 100mg

Varian Deutschland GmbH/Darmstadt

HPLC-Anlage System Gold
126 Pumpenmodul, 168 Photodiodendetektor,
508 automatischer Probengeber, 32 Karat Software
für Windows NT

Firma Beckman-Coulter/Unterschleißheim

Säule: Packungsmaterial Reprosil-PUR
C18-AQ 250 x 2mm ID, Partikelgröße 5µm

Dr. Maisch-GmbH/Ammerbruch

Chemische Substanzen

Ammoniumacetat

Baker Analyzed HPLC Reagent

Phosphorsäure 85 %

Baker grade, Mallinckrodt Baker/Griesheim
(Germany)

Acetonitril

Gradient grade, Merck/Darmstadt

Methanol

Gradient grade, Merck/Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat

Merck/Darmstadt

Wasser für Chromatographie

Merck/Darmstadt

Ribavirin

Sigma-Aldrich/Steinheim

3-Methylcytidin Methosulfat 98 %

Sigma-Aldrich/Steinheim

Albumin, Bovine serum 5 %

Sigma-Adrich/Steinheim

Sonstiges

S-Monovetten 7,5 ml für Serum, Monovette®-Kanülen

Sarstedt, Nümbrecht

Neo-Kodan farblos Desinfektionsspray

Schülke & Mayr, Norderstedt

Mullkompressen, unsteril

NOBA GmbH, Neuwied

Leukosilk S® Heftpflaster

Fa. Beiersdorf, Hamburg

SPSS für Windows, Version 11.0

Excel für Microsoft Office 2007

STATISTICA Version 7.1, © StatSoftOrigin

Krankenakten der Patienten

2.2 Methodik

Das zur Ribavirinplasmaspiegelbestimmung per Venenpunktion entnommene Blut wurde zentrifugiert, der Serumüberstand abpipettiert, in ein neues Gefäß überführt und bis zur Messung bei -20°C asserviert. Die weitere Probenaufbewahrung erfolgte ebenso bei -20°C.

Richtungsweisend für die Festphasenextraktion = solid phase extraction (SPE) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie = high performance liquid chromatography (HPLC)-Methodik, waren Arbeiten von Larrat et al. und Homma et al. (131), (132).

2.2.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte durch SPE mittels einer Bakerbond spe 12G-Vakuumextraktionseinheit (Mallinckrodt Baker, Griesheim, Germany) mit SPE-Säule, Bond Elut LRC-PBA (phenylboronic acid = Phenyl-Boronsäure), 100mg (Varian, Darmstadt, Germany). Zuerst wurden die Säulchen zur Probenvorbereitung mit 2x2 ml 250mM Ammoniumacetatpuffer pH 8,5 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$, Baker Analyzed HPLC Reagent, Mallinckrodt Baker/Griesheim) vorkonditioniert. Anschließend wurden 250 μl Serum mit 20 μl des internen Standards (ISTD) 3-Methylcytidin Methosulfat (McMs, Sigma-Aldrich/Steinheim) und mit 1ml $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH 8,5) versetzt und gemischt. Diese Probenmischung wurde auf die bereits vorkonditionierte SPE-Säule aufgegeben und bei langsamer Fließrate durch das Säulensorbents geleitet. Es folgten eine einmalige Spülung mit 2ml $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, sowie vier weitere Spülungen mit jeweils 1ml $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ bei einem pH von 8,5. Um möglichst wenig wässrige Anteile der Spülphase ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) in die organische Elutionsphase einzubringen, wurden die Säulen vor der Elution von RBV in einem durch ein Vakuum erzeugten Luftstrom getrocknet. Die Elution fand mit 2x1 ml 0,5 % Phosphorsäure (H_3PO_4 , Baker grade, Mallinckrodt Baker/Griesheim) in Methanol (Gradient grade, Merck/Darmstadt), (v/v) bei einem pH von 2.2 statt. Das Eluat wurde bei 37° C im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht. Der trockene Rückstand wurde mit 300 μl Laufmittel aufgenommen, direkt in Autosampler Vials überführt und 50 μl des gelösten Rückstands auf die analytische Trennsäule injiziert.

2.2.2 HPLC

Für die Analyse wurde eine HPLC-Anlage System Gold bestehend aus einem automatischen Probengeber Modell 508, einem Pumpenmodul Modell 126, einem Photodiodendetektor Modell 168 und einer 32 Karat Software für Windows NT für Steuerung und Auswertung verwendet (Beckmann-Coulter, Unterschleißheim, Germany). Die Chromatographie wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Als analytische Trennsäule diente eine Reprosil-PUR C18-AQ Säule mit einer Partikelgröße von 5 µm und einer Säulendimension von 250 x 2 mm (ID), (Dr. Maisch-GmbH, Ammerbruch, Germany). Das Laufmittel bestand aus 150 mM KH₂PO₄-Puffer : ACN gradient grade 99 : 1 (v/v), End-pH 4.5. Die Trennung erfolgte im isokratischen Lauf bei einer Flussrate von 0,2 ml/min und einer Detektionswellenlänge von 230 nm.

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung, sowie die Erstellung der Abbildungen erfolgte mit den Programmen STATISTICA Version 7.1 von StatSoftOrigin und SPSS für Windows Version 11.0. Die Messwerte wurden mittels deskriptiver Statistik dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Untersucht wurden insgesamt 155 konsekutive Patienten mit chronischer HCV-Infektion, die zwischen Oktober 2004 und Oktober 2006 in der Infektionsambulanz der Universitätsklinik Würzburg behandelt wurden. Während dieser Zeit wurden 627 Serumproben zur Ribavirinplasmaspiegelmessungen asserviert. Besonderer Wert wurde darauf gelegt, ein gut charakterisiertes Patientenkollektiv zu erhalten, sodass neben dem RBV-Plasmaspiegel stets das zeitliche Intervall zur Medikamenteneinnahme, das Alter des Patienten, die RBV-Dosis, die Therapiewoche zum Abnahmezeitpunkt, das Vorhandensein einer HIV-Koinfektion, das Geschlecht und das Gewicht des Patienten, die RBV-Dosis pro kg Körpergewicht, der HCV-Genotyp, der Hämoglobinwert, sowie die Transaminasen dokumentiert wurden.

Die Patienten erhielten das in Tab. 2 angegebene Therapieregime der Kombinationstherapie nach den aktuellen Leitlinien. Neben der täglichen oral eingenommenen Ribavirindosis (Tab. 5), wurde einmal pro Woche Peginterferon subkutan (s. c.) verabreicht.

Ribavirin (mg)	Häufigkeit	Prozent
200	3	1,9
400	2	1,3
600	8	5,2
800	29	18,7
1000	75	48,4
1200	38	24,5
Gesamt	155	100

Tab. 5 RBV-Dosis/die bei 155 antiviral behandelten Patienten mit chronischer Hepatitis C

Vor Beginn der Therapie wurde bei allen Patienten im Rahmen der Routinediagnostik ein Differential-Blutbild, die Transaminasen (AST, ALT), Bilirubin, Lebersyntheseparameter (TPZ/INR, Albumin), Glukose, Harnsäure, Nierenfunktionswerte (Kreatinin, Harnsäure, Glomeruläre Filtrationsrate = GFR = MDRD) und ein AFP-Wert bestimmt. Die virologische Diagnostik umfasste den

Nachweis von Anti-HCV-Antikörpern, HCV-RNA (quantitativ) und die Bestimmung des HCV-Genotyps. Außerdem wurden die Patienten in Bezug auf Koinfektionen (HBV, HIV), Schilddrüsenfunktionsstörungen und weitere Lebererkrankungen untersucht. Zum Ausschluss eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) wurde bei jedem Patienten eine Oberbauchsonographie durchgeführt.

Patienten mit HCV-Genotyp 1 Infektion bekamen routinemäßig eine Leberpunktion, alle anderen nur bei Verdacht auf ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium. In achtwöchentlichen Abständen fanden neben einer klinischen Untersuchung, Blutbild- und Transaminasenkontrollen statt. Eine Überprüfung der Viruslast erfolgte standardmäßig in den Therapiewochen 12, 24 und gegebenenfalls 48.

Deskriptive Analyse des Patientenkollektivs

Die gesamten erhobenen Daten finden sich tabellarisch im Anhang.

Die Geschlechterverteilung unseres Patientenkollektivs (Tab. 6) entsprach weitgehend den epidemiologischen Daten des Robert Koch Instituts (RKI) zur Verteilung der chronischen Hepatitis-C in Deutschland (133). Es sind durchschnittlich doppelt so viele Männer als Frauen betroffen.

Geschlecht	Häufigkeit	Prozent
männlich	107	69
weiblich	48	31
Gesamt	155	100

Tab. 6: Geschlechterverteilung der untersuchten Patienten

Der Häufigkeitsgipfel der Altersgruppe mit im Mittel 40 Jahren (Tab. 7), entsprach ebenso dem durch das RKI ermittelten Bundesdurchschnitt in der Prävalenz (133).

Der Hb-Wert zeigte sich normalverteilt (Tab. 7).

Bio-metrische Daten	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	Gültige N
Alter	38	38,4	11,1	21	72	155
Größe (cm)	175	174	9,1	150	193	154
Gewicht (kg)	75	75,9	13,8	49	116	154
BMI	24	24,6	3,9	18	40	154
Hb (mg/dl)	15,3	15,3	1,5	11,1	18,1	154
GOT (U/l)	50,9	61,4	35,8	21	233,1	154
GPT (U/l)	82	102,5	70,8	12	447	154
Krea (mg/dl)	0,8	0,83		0,4	1,41	154

Tab. 7: Biometrische Daten (vor Therapiebeginn). **Anmerkung:** Pat. 55 ist hämodialysepflichtig aufgrund einer terminalen Niereninsuffizienz, und wurde aus den Daten für Tabelle 7 herausgenommen.

Die Transaminasen vor Therapiebeginn, vor allem die GPT-Werte mit $102,5 \pm 70,8$ U/l, waren im Mittel deutlich erhöht. Hier lag keine Normalverteilung vor (Abb. 6).

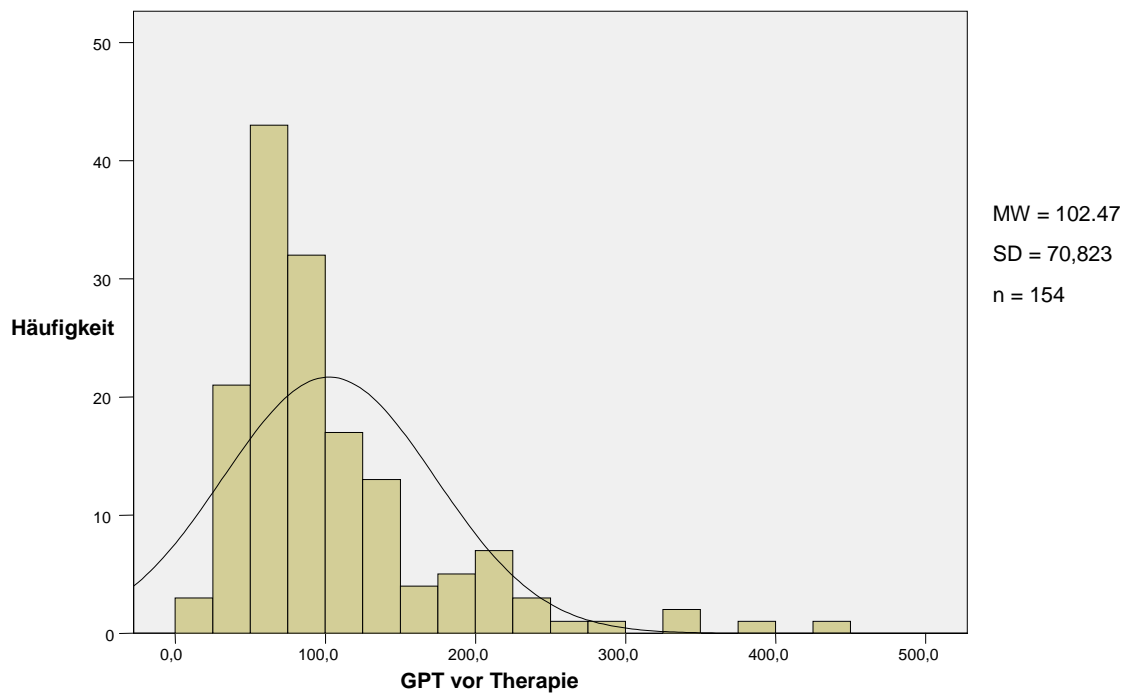


Abb. 6: Histogramm der GPT-Werte vor Therapiebeginn

Die Kenntnis der Nierenfunktion der Patienten vor Beginn der HCV-Kombinationstherapie ist deshalb von besonderer Relevanz, da diese durch die Ausscheidung die Ribavirin-Plasmaspiegelhöhe entscheidend beeinflusst. Bei unseren Patienten lagen die Parameter für die Nierenfunktion weitestgehend im Normalbereich. Die Kreatininwerte (Krea-Werte) von sechs Patienten lagen über 1,1 mg/dl, der maximale Wert betrug 1,4 mg/dl (Abb. 7).

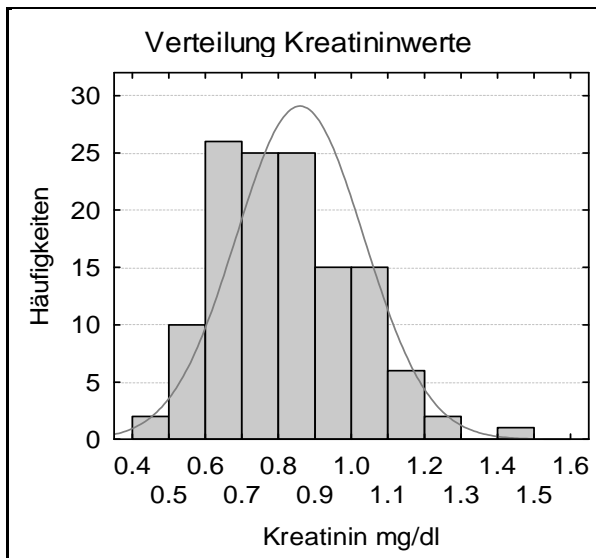


Abb. 7: Histogramm der Kreatininwerte (mg/dl) im Gesamtkollektiv

Mit Hilfe der Formel von Cockroff und Goult wurde die endogene Kreatininclearance näherungsweise abgeschätzt (134):

$$Cl_{\text{Krea}} = \frac{(150 - LA) \times KG}{\text{Serumkrea } (\mu\text{mol/l})} - a$$

Cl_{Krea} = Kreatininclearance

LA = Lebensalter (Jahre)

KG = Körpergewicht (kg)

a = 10 % für Männer, 15 % für Frauen

Die endogene Kreatininclearance entspricht annähernd der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Diese zeigte sich normalverteilt und ohne gravierende Einschränkungen von unter 50 ml/min, welche einen starken Anstieg des RBV-Plasmaspiegels nach sich ziehen würden (Abb. 8).

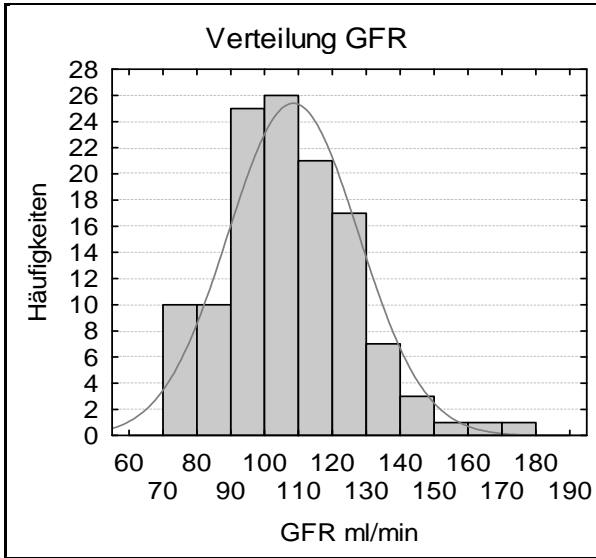


Abb. 8: Histogramm der GFR (ml/min) im Gesamtkollektiv, geschätzt nach der Formel zur Berechnung der endogenen Kreatinin-clearance von Cockroff und Goult

Mit rund 62 % dominierte der HCV-Genotyp 1 (Tab. 8), dies entspricht den Angaben des statistischen Bundesamtes zur HCV-Genotyp-Verteilung in Deutschland (135).

HCV-Genotyp	Häufigkeit	Prozent
1	96	61,9
2	14	9
3	42	27,1
4	3	1,9
Gesamt	155	100

Tab. 8: HCV-Genotyp der untersuchten Patienten

Von unseren Patienten waren knapp 10 % HIV/HCV-koinfiziert (Tab. 9). Dieser Wert liegt rund 5 % unter dem Vergleichskollektiv im Bundesgebiet (136).

HIV	Häufigkeit	Prozent
negativ	140	90,3
positiv	15	9,7
Gesamt	155	100

Tab. 9: HIV-Koinfektion im untersuchten Patientenkollektiv

Probenanzahl	Häufigkeit	Prozent
1	33	21,3
2	26	16,8
3	29	18,7
4	16	10,3
5	13	8,4
6	8	5,2
7	12	7,7
8	7	4,5
9	1	0,6
11	3	1,9
12	1	0,6
13	2	1,3
14	2	1,3
16	1	0,6
19	1	0,6
Gesamt	155	100

Tab. 10: Anzahl der untersuchten Proben pro Patient

3.2 Methodische Ergebnisse

3.2.1 Standards und Kalibration

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte durch Peakhöhenintegration mittels eines internen Standards (ISTD). Man erhielt die Konzentration der Substanz durch den Vergleich des Quotienten von Standard-Konzentrationsverhältnis zu Standard-Signalverhältnis mit dem Quotienten von Proben-Konzentrationsverhältnis zu Proben-Signalverhältnis (123).

Zur Veranschaulichung der Peakhöhenintegration:

$$\frac{RBV}{ISTD} = c$$

Der resultierende Faktor wurde als x in die lineare Geradengleichung eingesetzt.

Die Eichgeraden wurden aus dem Quotienten von Ribavirin zum ISTD mittels linearer Geradengleichung errechnet. Als ISTD kam McMs 10 mg in 100 ml KH_2PO_4 zur Anwendung.

Zur Erstellung der Eichproben wurden zunächst drei Ribavirin-Lösungen hergestellt (Tab. 11):

RBV-Lösung	RBV in mg	Stammlösung I in ml	Kaliumdihydrogenphosphat in ml
I = Stammlösung	1	-	100
II = Gebrauchslösung I	0,05	5	100
III = Gebrauchslösung II	0,005	0,5	100

Tab. 11: RBV-Lösungen

Dann erfolgte unter Verwendung des Pipettierschemas aus Tabelle 12 die Herstellung der Eichproben. Als Plasmaersatzmedium diente dabei 5 % Bovine serum albumin (BSA) mit einer Probeneinsatzmenge von 250 μl . Der Anteil des ISTD pro 250 μl Probenansatz betrug 20 μl (= 8000 ng/ml). Für die Patientenproben galt somit ebenfalls ein Probenvolumen von 250 μl .

Nummer	RBV ng/ml	RBV in ng/250 μl Probeneinsatzmenge	RBV-Lösung	Pipettiervolumen in μl
1	100	25	II	50
2	400	100	I	10
3	1000	250	I	25
4	3000	750	I	75
5	6000	1500	I	150

Tab. 12: Pipettierschema RBV zur Erstellung der Eichproben

Qualitätskontroll-Chromatogramme:

Es folgen drei RBV-Eichchromatogramme in den Konzentrationsbereichen 100, 1000 und 6000 ng/ml (Abb. 9-11).

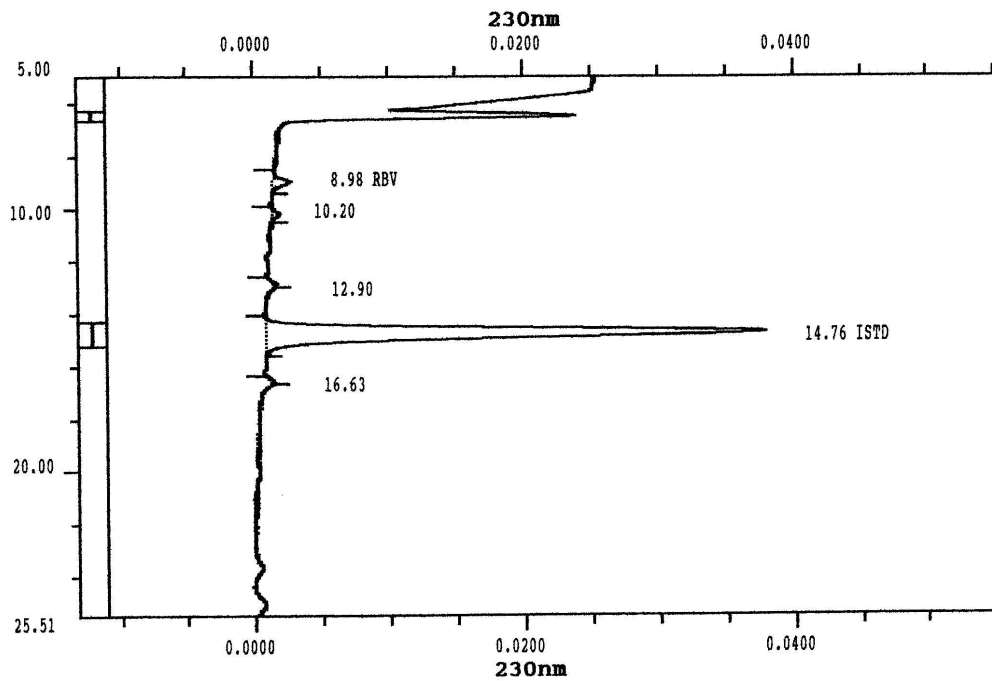


Abb. 9: Eichchromatogramm 100 ng/ml

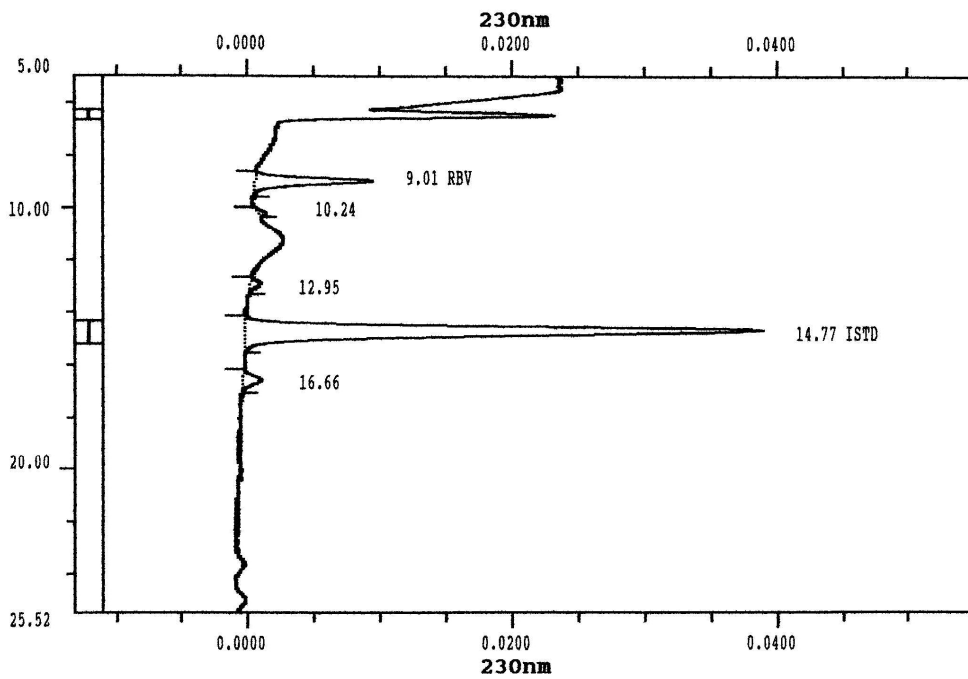


Abb 10: Eichchromatogramm 1000 ng/ml

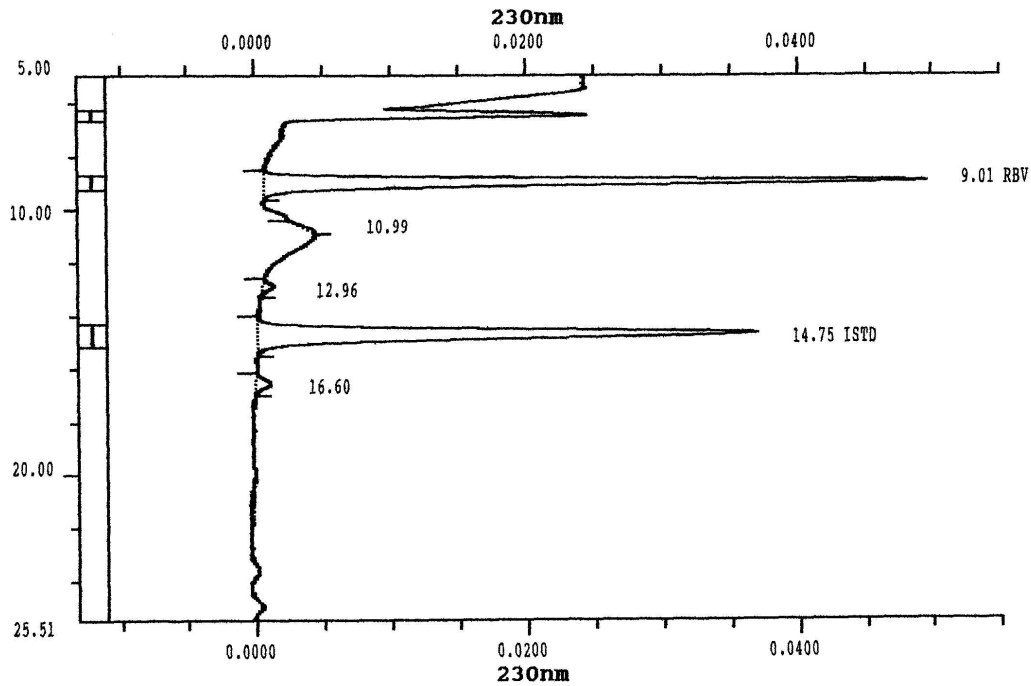


Abb. 11: Eichchromatogramm 6000ng/ml

Eichkurve für Ribavirin:

Die RBV-Eichkurve (Abb. 12) zeigte einen linearen Verlauf in dem für die RBV-Plasmaspiegelmessung interessanten Konzentrationsbereich von 100 – 6000 ng/ml. In der linearen Geradengleichung betrug die RBV-Konzentration in ng/ml $y = 5896,67x - 7,76573$ (x = Peakhöhe im Chromatogramm); der als r^2 bezeichnete Korrelationskoeffizient r^2 war 0,997248.

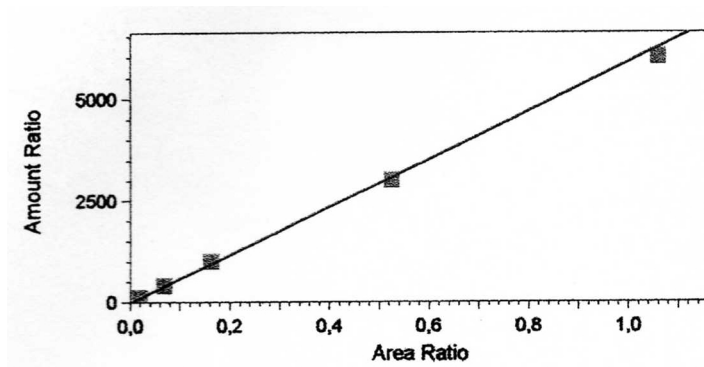


Abb. 12: Eichkurve Ribavirin

3.2.2 Beispielchromatogramme

Hier dargestellt sind zwei Patienten-Chromatogramme im unteren (Abb. 13) und mittleren (Abb. 14) RBV-Konzentrationsbereich. Patient Nr. 88 mit einer RBV-Serumkonzentration von 418 ng/ml bei einer RBV-Einnahme von 1000 mg/d:

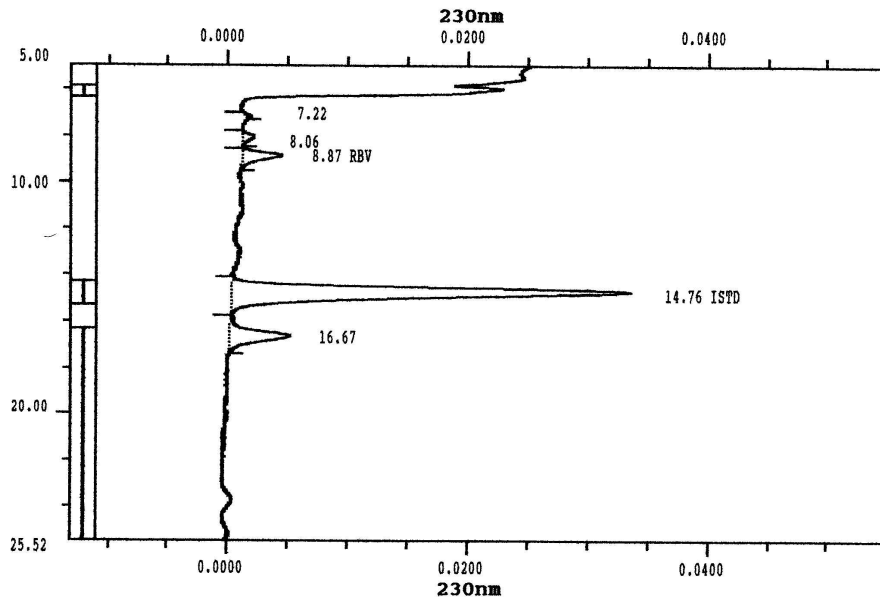


Abb. 13: Chromatogramm Patient 88

Patient Nr. 68 (Abb. 14) mit einer RBV-Serumkonzentration von 2034 ng/ml bei einer RBV-Einnahme von 1000 mg/d.

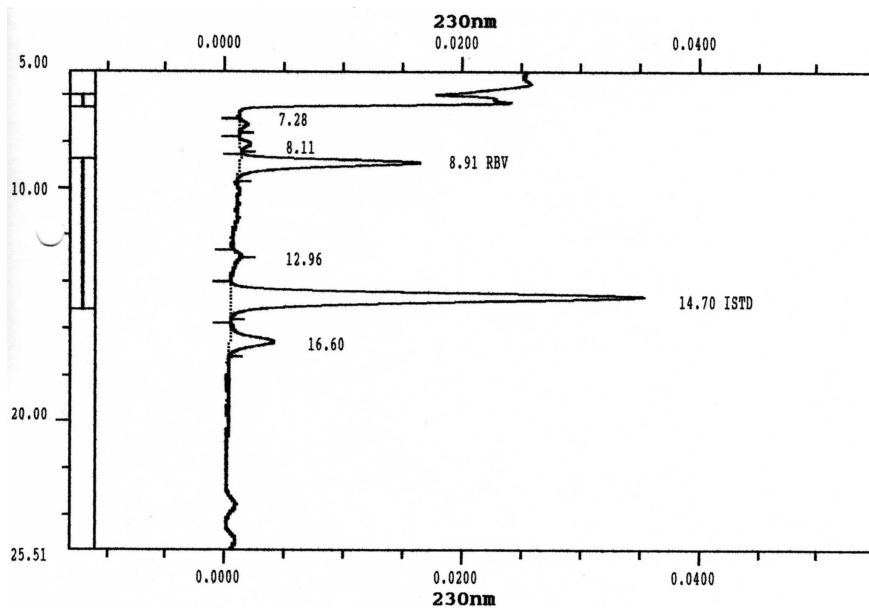


Abb. 14: Chromatogramm Pat. 68

3.2.3 Qualitätssicherung

Tabellen zur Methodenvalidierung befinden sich im Anhang.

Die Validität wurde anhand von folgenden Kriterien untersucht:

Spezifität (specificity): Die Spezifität ist die Anfälligkeit eines Analyseverfahrens gegenüber Störkomponenten. Eine Methode arbeitet spezifisch, wenn sie die zu bestimmende Substanz ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten erfasst. Zu ihrer Überprüfung wurden folgende Medikamente in BSA getestet: Saquinavir, Indinavir, Ritonavir, Lopinavir, Atazanavir, Fosamprenavir, Tripranavir, Efavirenz und Nevirapin. Es gab keine Interferenzen.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze: die untere quantitative Nachweisgrenze (lower limit of quantification = LLQ) von RBV lag bei 10 ng/ml und die obere Nachweisgrenze (upper limit of quantification = ULQ) bei 18 000 ng/ml. Die Detektionsnachweisgrenze für RBV (limit of detection = LOD) betrug 0,042 ng/ml. Der Variationskoeffizient (VC) lag bei 9,39 % bzw. 8,84 %.

Linearität (linearity): Die Kalibrationskurve war linear und besaß eine geringe Achsenabweichung von $y = 5896,67x - 7,76573$. Der Korrelationskoeffizient hatte einen Wert von $r^2 = 0,997248$.

Präzision/Richtigkeit (precision, accuracy of the mean/trueness, Oberbegriff: accuracy = Genauigkeit): hier wird untersucht, wie stark die Analysewerte aufgrund zufälliger Fehler streuen. Unterschieden werden Intra- und Interday Präzision, welche statistisch als relative Standardabweichung beschrieben werden und Intra- und Interday Richtigkeit als Prozentsatz einer vorgegebenen Konzentration (Richtigkeit in % = gemessene Konzentration/vorgegebene Konzentration x 100). Empfohlen wird ein VC von maximal 15 %, beziehungsweise maximal 20 % für LLQ (137). Überprüft wurden die RBV-Intraday Präzision und Richtigkeit anhand dreier vorgegebener Konzentrationen (100, 3000, 6000 ng/ml) und jeweils zwölf Messungen pro Tag. Der VC lag im Mittel bei 7,73 %. Eben solche RBV-Konzentrationen wurden zur Testung der

Interday Präzision und Richtigkeit verwendet. Gemessen wurde an sieben verschiedenen Tagen. Hier betrug der VC einschließlich LLQ im Mittel 5,6 %.

Wiederfindung (recovery): die Übereinstimmung zwischen tatsächlichem und gemessenem Wert, lag nach PBA-Säulenextraktion bei 81,5 %. Sie wurde bei Proben mit unterschiedlichen RBV-Konzentrationen (100, 3000, 6000 ng/ml) untersucht.

Methodenstabilität (stability): Zur Testung der stability wurden fünf verschiedene Ansätze (A – E) hergestellt. Die Ansätze wurden nach Aufbewahrung bei Temperaturen zwischen + 4° Celsius (7 Tage, Ansatz C), Raumtemperatur (24h, Ansatz D) und – 20° C (30 Tage, Ansatz A) untersucht, sowie auf Wärmeempfindlichkeit bei 56° C (60 Min., Ansatz E) getestet. Außerdem erfolgten Messungen nach drei Gefrier-Auftauzyklen (freeze/thawed) bei einer siebentägigen Lagerung bei -20° C (Ansatz B). Die Variationskoeffizienten waren wie folgt: Ansatz A 3,86 %, Ansatz B 7,56 %, Ansatz C 10,59 %, Ansatz D 3,78 %, Ansatz E 0,67 %.

3.2.4 Modifikation der Methoden von Larrat et al und Homma et al

Die hier entwickelte HPLC-Methode zur Bestimmung des RBV-Plasmaspiegels, basiert auf Arbeiten von Larrat et al und Homma et al. Die von ihnen beschriebene Methodik wurde als Grundlage gesehen, und hinsichtlich Retention, Selektivität und System modifiziert und optimiert.

Larrat et al: Für die Messung des RBV-Spiegels wurde ebenfalls Serum verwendet. Die Probenvorbereitung erfolgte in gleicher Weise wie in der vorliegenden Arbeit mittels SPE-Säule und Bond Elute LRC-PBA (hier von Varian Harbor City, California). Für die HPLC wurde mit einer M-510 HPLC-Pumpe, sowie eine C18-Silica-Säule mit einer Partikelgröße von 5µm, und einer Säulendimension von 300 mm x 3,9 mm (Novapak) gearbeitet. Das Laufmittel bestand aus 10mM Ammoniumphosphatpuffer und Phosphorsäure, End-pH 2,5. Als Flussrate wurden 0,7 ml/min gewählt. Außerdem wurde auch hier die UV-Detektion angewandt, allerdings mit einem L4000 UV-Detektor (Merck, Darmstadt) und einer Wellenlänge von 207 nm. Als ISTD wurde ebenfalls McMs verwendet, jedoch ohne die Zugabe von 10 ml KH₂PO₄. Die lineare Geradengleichung betrug $y = 0,977 (\pm 0,161)x - 0,0173 (\pm 0,095)$, Korrelationskoeffizient r

= $0,988 \pm 0,007$. Das LOD betrug $0,2 \mu\text{g/ml}$, beziehungsweise $0,06 \mu\text{g/ml}$ für extrahierte Proben. Der VC betrug $44 - 48 \%$. Die Wiederfindung lag bei 87% .

Homma et al: Hier wurde Vollblut zur Messung verwendet, um die Konzentration der phosphorylierten Metaboliten des Ribavirins in den Erythrozyten bestimmen zu können. Um eine Messung durchführen zu können, mussten die RBV-Metaboliten zuerst mit Phosphorsäure nach der Methode von Robbins et al (138) hydrolysiert (und damit dephosphoryliert) werden. Dann wurde wie bei Larrat et al und in der vorliegenden Arbeit, eine Probenvorbereitung mittels SPE und Bond Elute PBA (wie bei Larrat et al von Varian Harbor City, California) vorgenommen. Die HPLC wurde als reversed phase (RP-HPLC) HPLC, also als Umkehrphasenchromatographie angewendet. Bei dieser Methode werden entgegengesetzt zur Adsorptionschromatographie, polare Stoffe früher eluiert als Apolare. Dafür wurde eine M-510 HPLC Pumpe (Waters Associates, Milford, Massachusetts), ein automatischer Probengeber mit der Modellnummer 717 und eine C18 RP-Säule (Novapak) mit der Säulendimension von $300 \text{ mm} \times 3,9 \text{ mm}$ verwendet. Das Laufmittel bestand aus 10 mM Ammoniumacetatpuffer, End-pH $6,5$. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von $0,7 \text{ ml/min}$. Die Detektion wurde ebenso mittels UV-Detektion, mit dem Spectroflow 783 (Kratos Analytical, Ramsey, New York), hier bei einer Wellenlänge von 235 nm durchgeführt. Als ISTD wurde ebenfalls McMs ohne KH_2PO_4 -Zusatz angewandt. Die lineare Geradengleichung betrug bei dieser Methode $y = 0,0188x + 0,0524$, mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,999$. Die LOD betrug $0,2 \mu\text{M}$ für Vollblut. Die Wiederfindung lag bei nur 63% für niedrige RBV-Konzentrationen ($1,67 \mu\text{M}$), und bei 93% für Höhere (zwischen 10 und $40 \mu\text{M}$). Die Präzision und Richtigkeit war ebenso stark konzentrationsabhängig. Hier lag der VC für die Intra- und Interday Präzision bei über 10% für geringe RBV-Konzentrationen ($1,67 \mu\text{M}$), und bei weniger als 7% für Höhere (zwischen $10 - 40 \mu\text{M}$).

3.3 Auswertung der Patientenproben

3.3.1 Plasmaspiegelverlauf von Ribavirin in den ersten sechs Therapiewochen

Die Charakteristika der RBV-Plasmaspiegelentwicklung während der ersten sechs Therapiewochen sind in Tabelle 14 ersichtlich. Der Mittelwert des Plasmaspiegels stieg von 928,43 ±785,93 ng/ml in Woche eins auf 1574,52 ±501,82 ng/ml in Woche sechs unter Annahme eines steady state (nach ca. vier Therapiewochen, siehe Kapitel Pharmakokinetik), (jeweils Mittelwert ±Standardabweichung). Die großen Spannbreiten der Standardabweichungen zeigen hohe interindividuelle Schwankungen des RBV-Plasmaspiegels.

Ribavirin (mg)	Häufigkeit	Prozent
200	3	1,9
400	2	1,3
600	8	5,2
800	29	18,7
1000	75	48,4
1200	38	24,5
Gesamt	155	100

Tab. 13: Verteilung der RBV-Dosierung (s. auch Kapitel Patientenkollektiv)

Therapiewoche	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	N
1	903,000	928,429	785,9304	27,0000	2410,000	7
2	919,000	1118,444	715,1317	119,0000	3102,000	45
3	1122,000	1242,414	565,7122	577,0000	2928,000	29
4	1541,000	1544,077	583,8145	58,0000	2981,000	65
5	1552,500	1761,500	732,3608	758,0000	3439,000	12
6	1654,000	1574,522	501,5817	435,0000	2557,000	23
Alle	1367,000	1384,398	657,5868	27,0000	3439,000	181

Tab. 14: Explorative Datenanalyse zur Ribavirinplasmaspiegeldynamik in den ersten sechs Therapiewochen, RBV-Spiegel in ng/ml

Im nachfolgenden Boxplot (= Box-Whisker-Plot) (Abb. 15) sind die numerischen Daten graphisch dargestellt. Anhand des Quantils Median zeigt sich die zentrale Tendenz der

RBV-Plasmaspiegeldynamik in Form einer stetigen Zunahme während der ersten vier Therapiewochen, mit nachfolgender Einstellung auf einen relativ konstanten steady state. Der hohe Grad der Streuung ist an der Länge der Boxen (Interquartilabstand = IQR) und der Länge der Whisker abzulesen. Bei den dargestellten Box-Plots gilt: die Boxen sind das 1. und 3. Quartil (25-75% = IQR), positive Ausreißer sind Werte die größer sind als $75\% + 1,5 \times \text{IQR}$, negative Ausreißer sind Werte die kleiner sind als $25\% - 1,5 \times \text{IQR}$, positive Extremwerte sind Werte die größer sind als $75\% + 2 \times 1,5 \times \text{IQR}$ und negative Extremwerte sind Werte die kleiner sind als $25\% - 2 \times 1,5 \times \text{IQR}$.

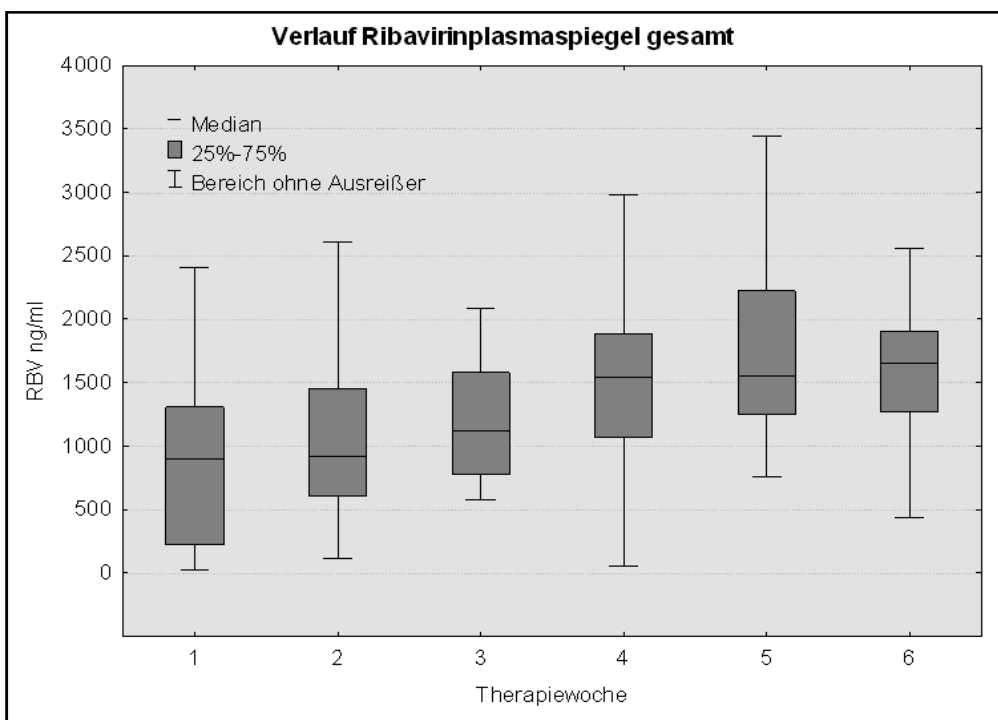


Abb. 15: Box-Whisker-Plot der Ribavirinplasmaspiegeldynamik in den ersten sechs Therapiewochen

3.3.2. Ribavirinplasmaspiegelverlauf in den ersten sechs Therapiewochen nach Geschlecht getrennt betrachtet

Bei einer Betrachtung der der RBV-Plasmaspiegeldynamik in den ersten sechs Therapiewochen mit einer Trennung nach dem Geschlecht der Patienten (Tab. 15/Abb. 16) zeigten sich keine starken Unterschiede in der Höhe des Medikamentenspiegels. Dabei ist allerdings anzumerken, dass das männliche Kollektiv durch eine höhere Fallzahl besser repräsentiert ist.

Geschlecht	Therapiewoche	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	N
männlich	1	801,000	927,667	860,941	27,000	2410,000	6
männlich	2	919,500	1102,219	645,231	172,000	2607,000	32
männlich	3	1177,000	1304,174	602,824	577,000	2928,000	23
männlich	4	1473,500	1429,119	574,838	58,000	2658,000	42
männlich	5	1552,500	1646,700	545,049	758,000	2444,000	10
männlich	6	1654,000	1571,176	556,053	435,000	2557,000	17
weiblich	1	933,000	933,000	0,000	933,000	933,000	1
weiblich	2	892,000	1158,385	892,888	119,000	3102,000	13
weiblich	3	922,000	1005,667	329,273	686,000	1579,000	6
weiblich	4	1642,000	1754,000	551,738	872,000	2981,000	23
weiblich	5	2335,500	2335,500	1560,585	1232,000	3439,000	2
weiblich	6	1565,000	1584,000	342,639	1198,000	2054,000	6
Alle Gruppen		1367,000	1384,398	657,587	27,000	3439,000	181

Tab. 15: Explorative Datenanalyse zur Ribavirinplasmaspiegeldynamik in den ersten sechs Therapiewochen mit Differenzierung nach dem Geschlecht

Im nachfolgenden rechten Plot bei den RBV-Spiegeln der Frauen sind sowohl Therapiewoche eins als auch fünf aufgrund der geringen Fallzahl nicht repräsentativ.

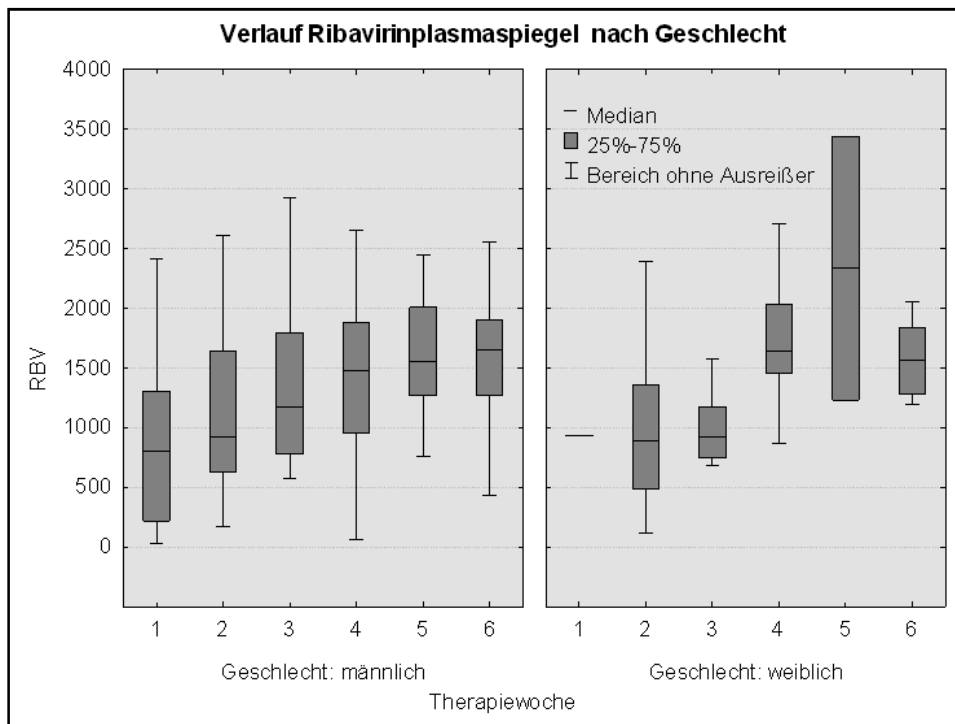


Abb. 16: Box-Whisker-Plot der Ribavirinplasmaspiegeldynamik in den ersten sechs Therapiewochen mit Geschlechterdifferenzierung

Bei der Betrachtung der gemittelten RBV-Plasmaspiegel über den Therapieverlauf ab Woche sieben (Tab. 16/Abb. 17) zeigten sich die Spiegel bei den Frauen um rund 300 ng/ml höher als die des männlichen Vergleichskollektivs.

Geschlecht	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	N
männlich	1811,500	1892,459	704,6144	194,0000	5480,000	294
weiblich	2116,000	2245,357	760,4497	212,0000	4589,000	141
Alle	1951,000	2006,847	740,9931	194,0000	5480,000	435

Tab. 16: Deskriptive Statistik Ribavirinplasmaspiegel (ng/ml) nach Therapiewoche 6 mit Geschlechterdifferenzierung

Im Box-Whisker-Plot (Abb. 17) erfolgt eine graphische Darstellung der RBV-Plasmaspiegel mit Geschlechtertrennung ab Therapiewoche sieben. Dabei zeigt Box eins die Spiegel der Männer, zwei die der Frauen.

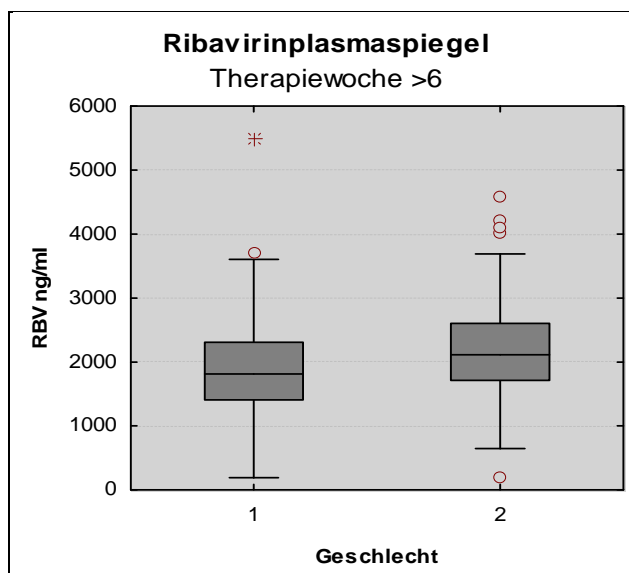


Abb. 17: Ribavirinplasmaspiegel nach Therapiewoche 6 mit Geschlechterdifferenzierung, 1 = männlich, 2 = weiblich, Darstellung mit Ausreißern

3.3.3 Ribavirinplasmaspiegelverlauf in den ersten sechs Therapiewochen nach Interferon alfa-2a und alfa-2b getrennt betrachtet

Nachfolgend werden die RBV-Plasmaspiegel den beiden in der modernen HCV-Kombinationstherapie angewandten pegylierten Interferonen alfa-2a (Pegasys©) und alfa-2b (Pegintron©) zugeordnet.

Zuerst wurde die Entwicklung der Spiegel während der ersten sechs Therapiewochen aufgezeigt (Tab. 17/Abb. 18). Hier traten keine besonderen Unterschiede hervor.

Interferon	Therapie- woche	Median	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum	N
alfa-2a	1	918,000	840,750	452,808	220,000	1307,000	4
alfa-2a	2	648,000	793,304	655,825	119,000	3102,000	23
alfa-2a	3	778,000	907,800	354,422	577,000	1964,000	15
alfa-2a	4	1471,000	1404,577	579,470	474,000	2932,000	26
alfa-2a	5	1847,000	1944,000	1049,759	758,000	3439,000	5
alfa-2a	6	1760,500	1657,571	437,221	694,000	2381,000	14
alfa-2b	1	1554,500	1554,500	1209,860	699,000	2410,000	2
alfa-2b	2	1287,000	1458,364	619,769	599,000	2607,000	22
alfa-2b	3	1579,000	1704,556	608,223	851,000	2928,000	9
alfa-2b	4	1708,000	1723,387	523,791	884,000	2981,000	31
alfa-2b	5	1733,500	1794,000	530,050	1272,000	2437,000	4
alfa-2b	6	1484,000	1645,571	474,060	1185,000	2557,000	7
Alle Gruppen		1326,500	1373,628	668,671	27,000	3439,000	172

Tab. 17: Explorative Datenanalyse zur Ribavirinplasmaspiegelentwicklung in den ersten sechs Therapie Wochen mit Differenzierung nach Interferon alfa-2a und Interferon alfa-2b

Im Box-Whisker-Plot (Abb. 18) ist Entwicklung der RBV-Plasmaspiegel zu dem jeweiligen Interferon zugeordnet gut zu betrachten.

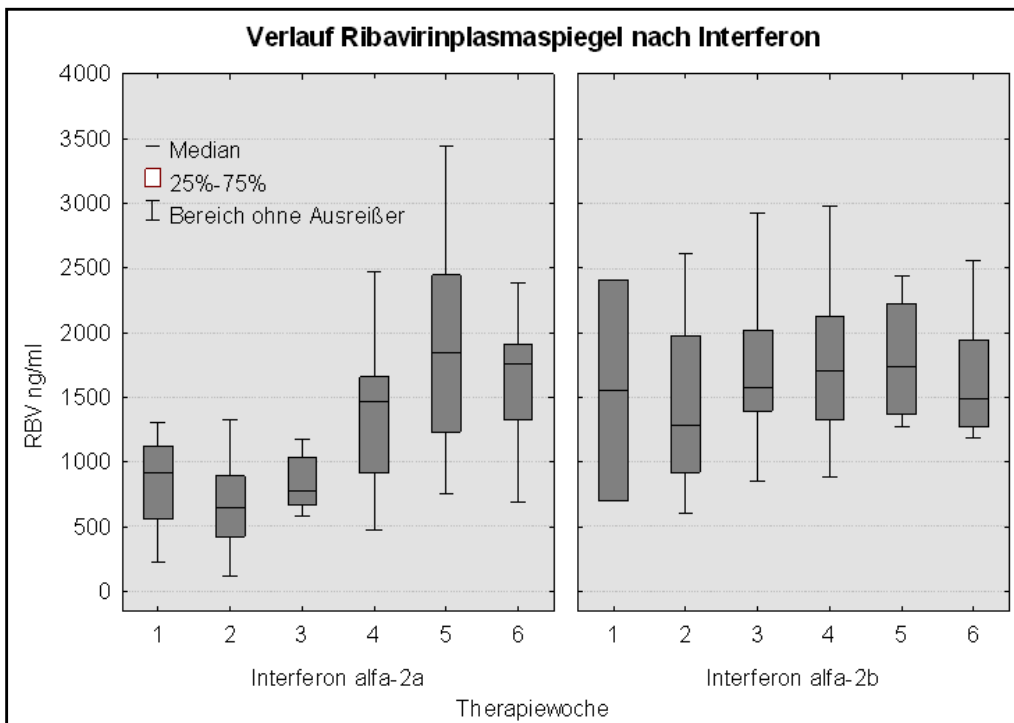


Abb. 18: Entwicklung des Ribavirinplasmaspiegels in den ersten sechs Therapie Wochen mit Differenzierung nach Interferon alfa-2a und Interferon alfa-2b

Im weiteren Therapieverlauf lagen die RBV-Plasmaspiegel der Patienten mit Peginterferon alfa-2b geringfügig höher (Tab. 18, Abb. 19).

Interferon	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	N
Interferon alfa-2b	2038,000	2094,449	738,7560	194,0000	4219,000	178
Interferon alfa-2a	1820,000	1871,319	610,2475	491,0000	4589,000	167
Alle	1877,000	1986,441	687,7417	194,0000	4589,000	345

Tab. 18: Deskriptive Statistik Ribavirinplasmaspiegelentwicklung (ng/ml) nach Therapiewoche 6 mit Differenzierung nach Interferon alfa-2b und Interferon alfa-2a

Diese zentrale Tendenz wird im Boxplot (Abb. 19) der RBV-Plasmaspiegelentwicklung über den Therapieverlauf ab Woche sieben graphisch sichtbar.

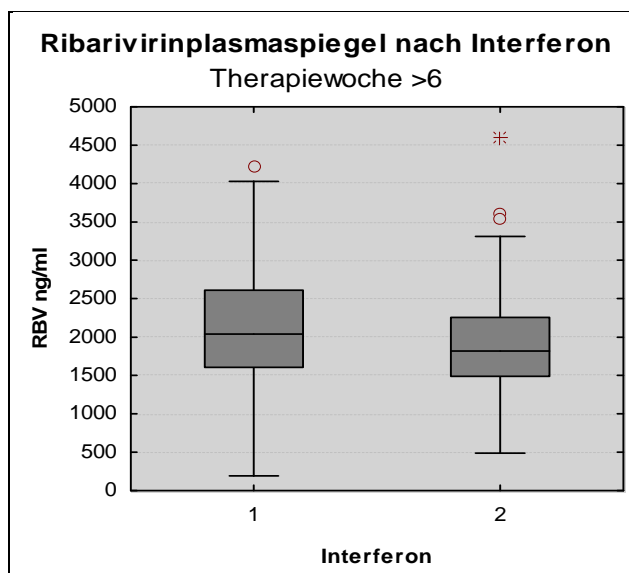


Abb. 19: Ribavirinplasmaspiegelentwicklung (ng/ml) nach Therapiewoche 6 mit Differenzierung nach Interferon alfa-2b (= 1) und Interferon alfa-2a (= 2)

3.3.4 Verlauf bei initial unterdurchschnittlichen RBV-Plasmakonzentrationen

Wie in Tabelle 14 und Abbildung 15 ersichtlich, zeigte sich, dass sich die RBV-Plasmaspiegel einiger Patienten auch nach sechs Therapiewochen noch weit unter den mittleren steady state Plasmaspiegelkonzentrationen lagen. Dabei wurden von Therapiewoche sechs ausgehend (Pfeil im Diagramm), zwei verschiedene Entwicklungstendenzen deutlich. Einige wenige Patienten blieben über die gesamte

Therapiedauer auf einem relativ niedrigen Plasmaspiegelniveau (Abb. 20-22), während die RBV-Konzentration bei der Mehrheit später als erwartet noch anstieg (Abb. 23-27). Trotz der geringen mittleren RBV-Plasmaspiegel konnte die Therapie bei einigen Patienten mit SVR abgeschlossen werden.

Beispieldiagramme

Allen Beispieldiagrammen gemeinsam ist die hohe intraindividuelle Variabilität des RBV-Plasmaspiegels.

Proband 22 (Abb. 20): Männlich, 42 Jahre, BMI 18, HCV-Genotyp 3, RBV-Tagesdosis 1000 mg, HIV negativ

Mittlerer RBV-Plasmaspiegel: 844 ng/ml, RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlauf: konstant niedriges Niveau, Therapieerfolg: SVR

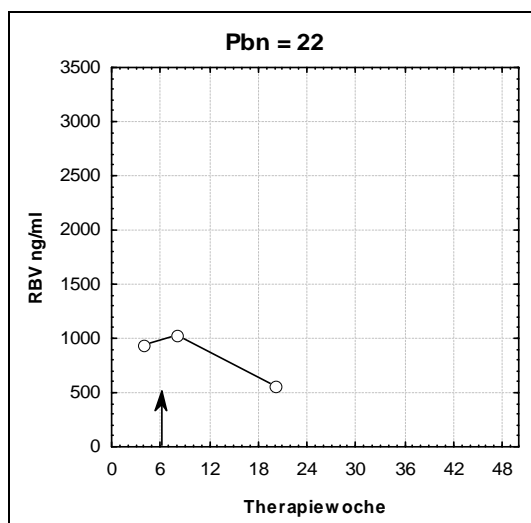


Abb. 20: Proband 22 mit stetig niedrigem RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlauf

Proband 57 (Abb. 21): Männlich, 33 Jahre, BMI 25, HCV-Genotyp 1, RBV-Tagesdosis 1000 mg/d, HIV negativ

Mittlerer RBV-Plasmaspiegel: 1038 ng/ml, RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlauf: mit Ausreißer nach oben, relativ niedriges Niveau, Therapieerfolg: SVR

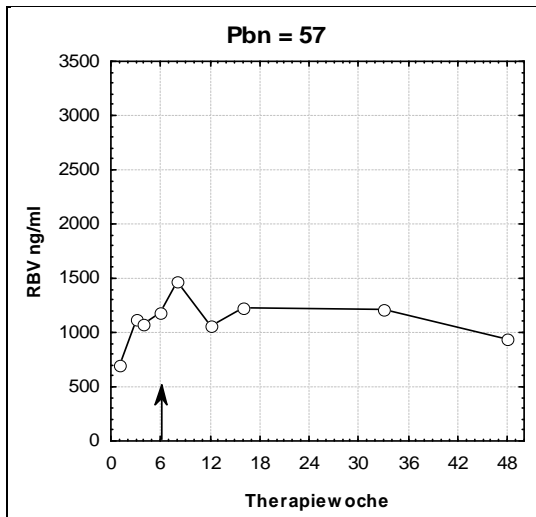


Abb. 21: Proband 57 mit niedrigem RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlauf

Proband 66 (Abb. 22): Männlich, 28 Jahre, BMI 30, HCV-Genotyp 1, RBV-Tagesdosis 1200 mg, HIV negativ

Mittlerer RBV-Plasmaspiegel: 732 ng/ml, RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlauf: konstant niedriges Niveau, Therapieerfolg: SVR

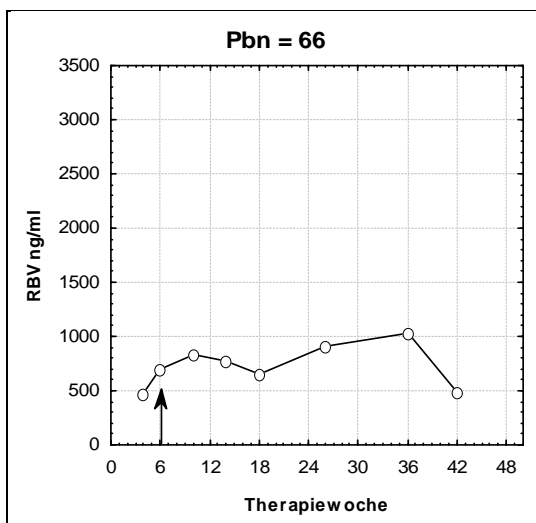


Abb. 22: Proband 66 mit stetig niedrigem RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlauf

Proband 2 (Abb. 23): Männlich, 50 Jahre, BMI 25, HCV-Genotyp 1, RBV-Tagesdosis 1000 mg, HIV negativ

Mittlerer RBV-Plasmaspiegel: 1619 ng/ml, RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlauf: nach Therapiewoche sechs stark ansteigend, Therapieerfolg: Non-Response

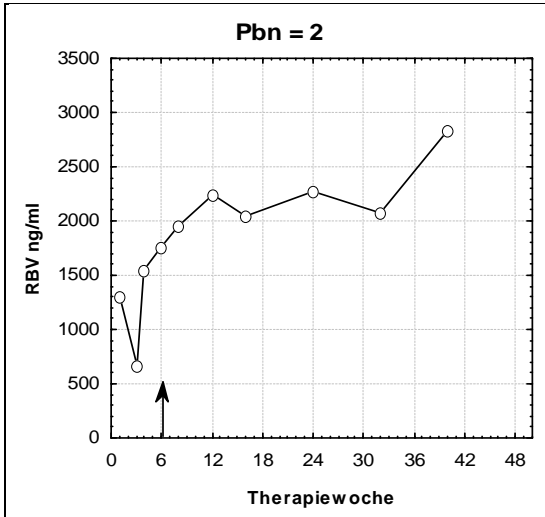


Abb. 23: Proband 2 mit spät ansteigender RBV-Plasmaspiegelkonzentration

Proband 77 (Abb. 24): Männlich, 43 Jahre, BMI 23, HCV-Genotyp 1, RBV-Tagesdosis 1200 mg, HIV negativ

Mittlerer RBV-Plasmaspiegel: 1173 ng/ml , RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlauf: deutlicher Anstieg nach Therapiewoche sechs, Therapieerfolg: Relapse

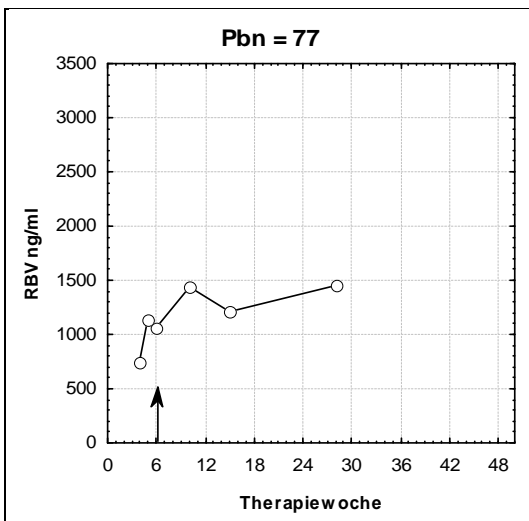


Abb. 24: Proband 77 mit spät ansteigender RBV-Plasmaspiegelkonzentration

Proband 94 (Abb. 25): Männlich, 41 Jahre, BMI 28, HCV-Genotyp 2, RBV-Tagesdosis 800 mg, HIV positiv

Mittlerer RBV-Plasmaspiegel: 732 ng/ml, RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlauf: Anstieg auf RBV-Konzentrationen über 1000 ng/ml erst nach Therapiewoche sechs Therapieerfolg: SVR

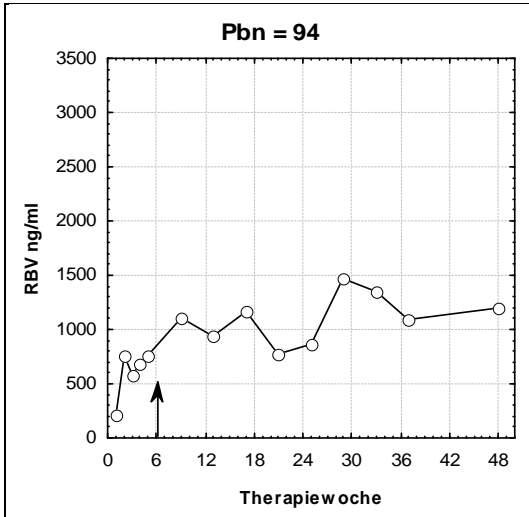


Abb. 25: Proband 94 mit spät ansteigender RBV-Plasmaspiegelkonzentration

Proband 104 (Abb. 26): Männlich, 30 Jahre, BMI 26, HCV-Genotyp 3, RBV-Tagesdosis 1200 mg, HIV negativ

Mittlerer RBV-Plasmaspiegel 1302 ng/ml, RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlauf: konstante Werte über 1000 ng/ml werden erst nach Therapiewoche sechs erreicht
Therapieerfolg: SVR

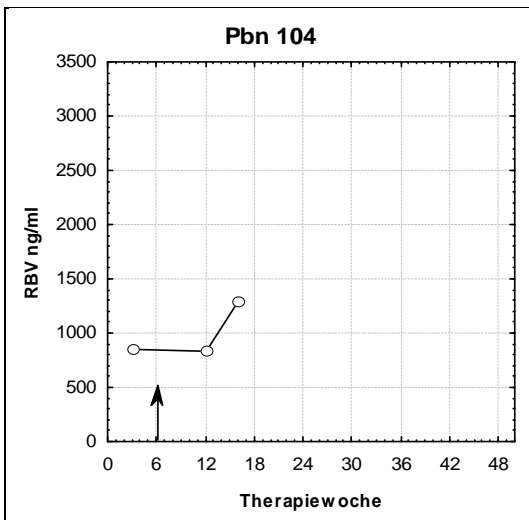


Abb. 26: Proband 104 mit spät ansteigender RBV-Plasmaspiegelkonzentration

Proband 124 (Abb. 27): Weiblich 26 Jahre, BMI 19, HCV-Genotyp 1, RBV-Tagesdosis 200 mg, HIV negativ

Mittlerer RBV-Plasmaspiegel: 1385 ng/ml, RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlauf: starker Anstieg nach Therapiewoche sechs, Anmerkung: auffällig ist ein relativ hoher RBV- Spiegel trotz geringer Tagesdosis, Therapieerfolg: SVR

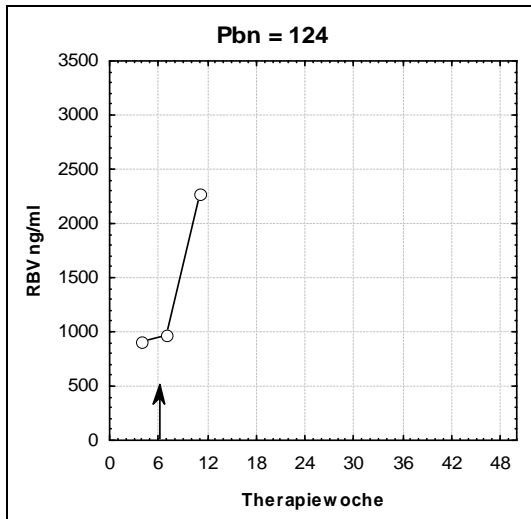


Abb. 27: Proband 124 mit spät ansteigender RBV-Plasmaspiegelkonzentration

Proband 130 (Abb. 28): Männlich, 43 Jahre, BMI 23, HCV-Genotyp 1, RBV-Tagesdosis 1000 mg, HIV positiv

Mittlerer RBV-Plasmaspiegel: 1290 ng/ml, RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlauf: starker Anstieg erst nach Therapiewoche sechs, Therapieerfolg: Relapse

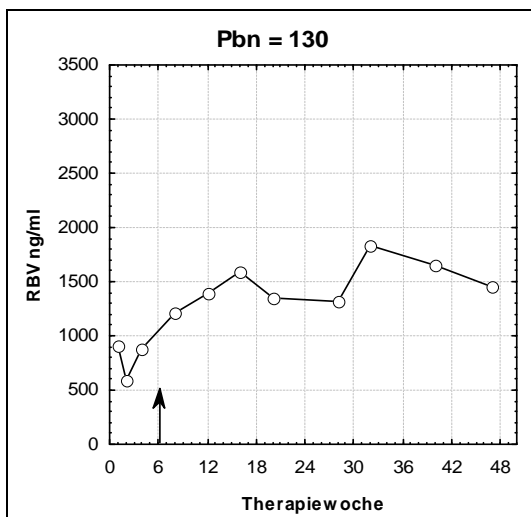


Abb. 28: Proband 130 mit spät ansteigender RBV-Plasmaspiegelkonzentration

Proband 146 (Abb. 29): Weiblich, 53 Jahre, BMI 35, HCV-Genotyp 1, RBV-Tagesdosis 1200 mg, HIV negativ

Mittlerer RBV-Plasmaspiegel: 1243 ng/ml, RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlauf: starker Anstieg nach Therapiewoche sechs, Therapieerfolg: Relapse

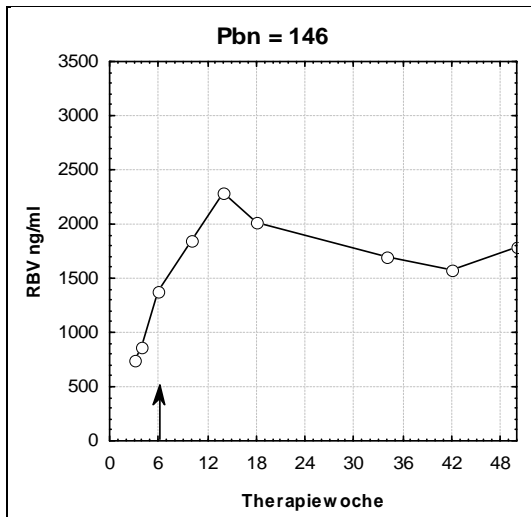


Abb. 29: Proband 146 mit spät ansteigender RBV-Plasmaspiegelkonzentration

Proband 148 (Abb. 30): Männlich, 37 Jahre, BMI 20, HCV-Genotyp 1, RBV-Tagesdosis 1000 mg, HIV positiv

Mittlerer RBV-Plasmaspiegel: 1422 ng/ml, RBV-Plasmaspiegelkonzentrationsverlauf: starker Anstieg erst ab Therapiewoche 12, Therapieerfolg: Non-Response

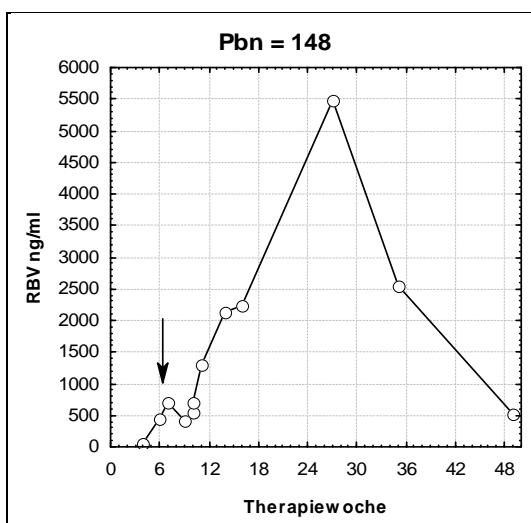


Abb. 30: Proband 148 mit spät ansteigender RBV-Plasmaspiegelkonzentration

3.3.5 Ribavirinplasmaspiegel-Tageskinetiken

Um das Verhalten des RBV-Plasmaspiegels in Bezug zum Dosierungsintervall und zur Therapiewoche untersuchen zu können, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Tageskinetiken abgenommen. Unmittelbar zu Therapiebeginn, vor Erreichen des steady state in den Therapiewochen zwei und drei und im steady state in Woche 36 und 38. In den Tabellen zu den jeweiligen Probanden sind die Intervalle in Stunden zwischen der letzten RBV-Einnahme und der Messung aufgelistet, wobei der Talspiegel immer zuoberst steht. Ihnen folgen zur anschaulichen Darstellung Diagramme mit dem Spiegelverlauf.

3.3.6 Ribavirinplasmaspiegel-Tageskinetik zu Therapiebeginn

Proband 48 (Tab. 19/Abb. 31): Männlich, 40 Jahre, BMI 26, HCV-Genotyp 1, RBV-Tagesdosis 1000 mg, HIV negativ

Mittlerer RBV-Plasmaspiegel über 12h nach erstmaliger Gabe: 371 ng/ml, Therapieerfolg: SVR

Tabelle 19 zeigt die RBV-Plasmaspiegelentwicklung in den zwölf Stunden nach erstmaliger Einnahme von 1000 mg RBV.

Blutentnahmen	Zeit (h)	Ribavirinplasmaspiegel (ng/ml)
1	0	0
2	2	531
3	4	586
4	8	194
5	12	172
Insgesamt	N	5

Tab. 19: Proband 48 Ribavirinspiegel im Verlauf von zwölf Stunden zu Therapiebeginn

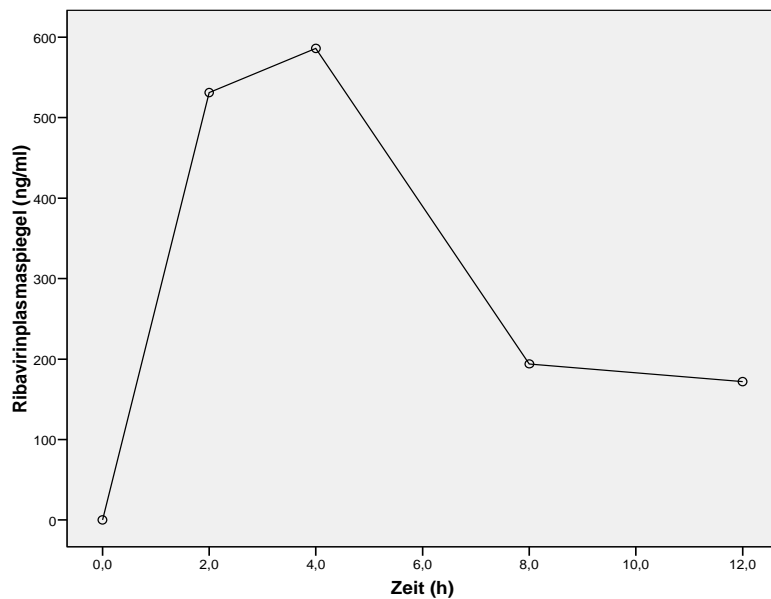


Abb. 31: Proband 48 Diagramm der Ribavirinplasmaspiegeltageskinetik nach erstmaliger RBV-Einnahme

3.3.7 Ribavirinplasmaspiegel-Tageskinetik vor Erreichen des steady state

Proband 57 (Tab. 20/Abb. 32): 33 Jahre, BMI 25, HCV-Genotyp 1, RBV-Tagesdosis 1000 mg, HIV negativ

Mittlerer RBV-Plasmaspiegel in Therapiewoche zwei, Therapietag neun: 874 ng/ml

Therapieerfolg : SVR

Blutentnahmen	Zeit (h)	Ribavirinplasmaspiegel (ng/ml)
1	12	792
2	1	752
3	2	955
4	3	995
Insgesamt	N	4

Tab. 20: Proband 57 Ribavirinspiegelentwicklung bis zwölf Stunden nach Einnahme in Therapiewoche zwei, Therapietag neun, vor Erreichen des steady state

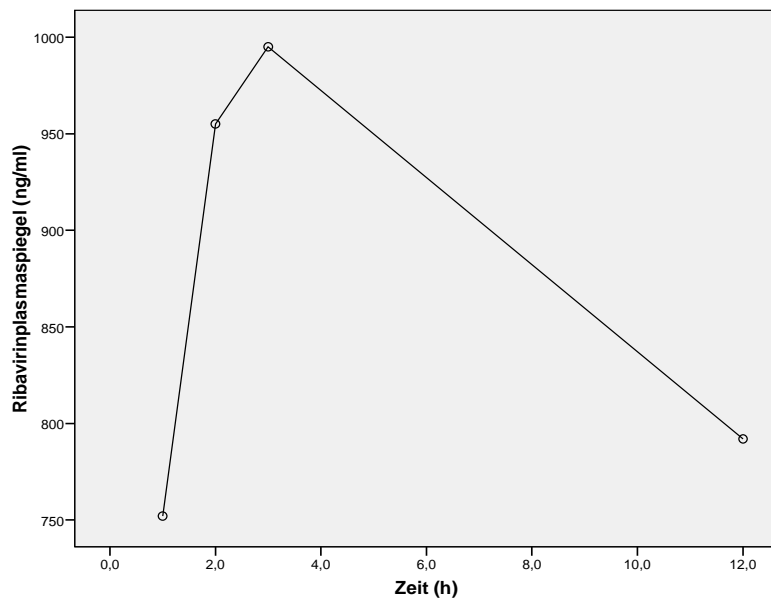


Abb. 32: Proband 57 Diagramm der Ribavirinplasmaspiegeltageskinetik in Therapiewoche zwei, Therapietag neun, vor Erreichen des steady state

Proband 104 (Tab. 21/Abb. 33): männlich, 30 Jahre, BMI 26, HCV-Genotyp 3, RBV-Tagesdosis 1200 mg, HIV negativ

Mittlerer RBV-Plasmaspiegel in Therapiewoche drei, Therapietag 18: 1420 ng/ml

Therapieerfolg: SVR

Blutentnahmen	Zeit (h)	Ribavirinplasmaspiegel (ng/ml)
1	10,5	852
2	1	1442
3	2	1793
4	3	1594
Insgesamt	N	4

Tab. 21: Proband 104 Ribavirinplasmaspiegeltageskinetik in Therapiewoche drei, Therapietag 18, vor Erreichen des steady state

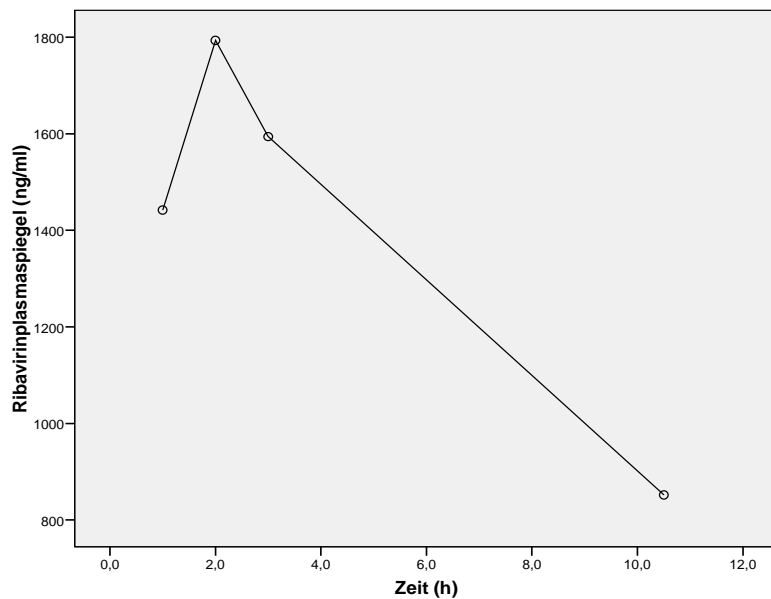


Abb. 33: Proband 104 Diagramm der Ribavirinplasma Spiegel Tageskinetik in Therapiewoche drei, Therapietag 18, vor Erreichen des steady state

3.3.8 Ribavirinplasma Spiegel Tageskinetik im steady state

Proband 85 (Tab. 22/Abb. 34): Männlich, 62 Jahre, BMI 26, HCV-Genotyp 1, RBV-Tagesdosis 600 mg, HIV negativ, Dosisreduktion aufgrund der hämatologischen Situation

Mittlerer RBV-Spiegel in Therapiewoche 36: 1255 ng/ml, Therapieerfolg: SVR

Blutentnahmen	Zeit (h)	Ribavirinplasma Spiegel (ng/ml)
1	12	941
2	0,5	1051
3	1,5	1382
4	2,5	1646
Insgesamt	N	4

Tab. 22: Proband 85 Ribavirinplasma Spiegel Dynamik über zwölf Stunden nach Einnahme im steady state

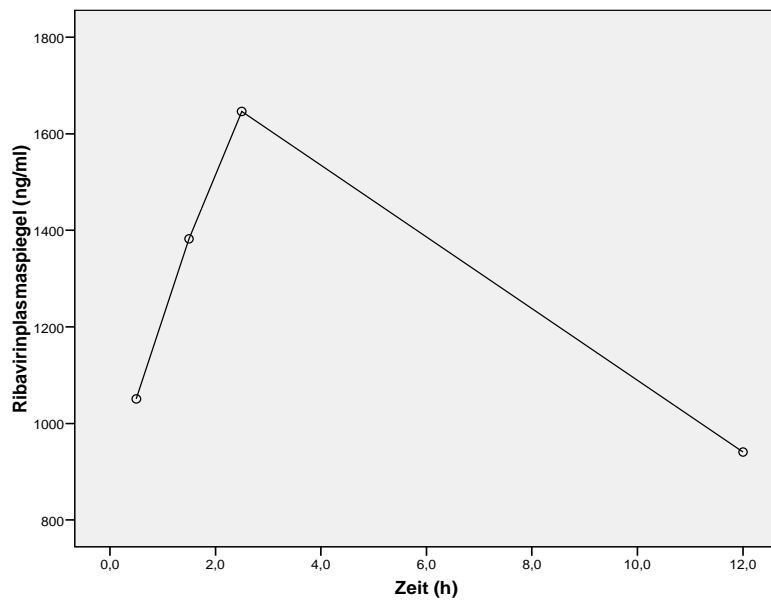


Abb. 34: Proband 85 Diagramm der RBV-Plasmaspiegeltageskinetik im steady state

Proband 65 (Tab. 23/Abb. 35): Weiblich, 57 Jahre, BMI 25, HCV-Genotyp 1, RBV-Tagesdosis 1200 mg, HIV negativ

Mittlerer RBV-Spiegel in Therapiewoche 38: 1948 ng/ml, Therapieerfolg: Relapse

Blutentnahmen	Zeit (h)	Ribavirinplasmaspiegel (ng/ml)
1	14	1599
2	0,5	1855
3	1	2258
4	2	2078
Insgesamt	N	4

Tab. 23: Proband 65 Ribavirinplasmaspiegelentwicklung über 14 Stunden nach Einnahme im steady state

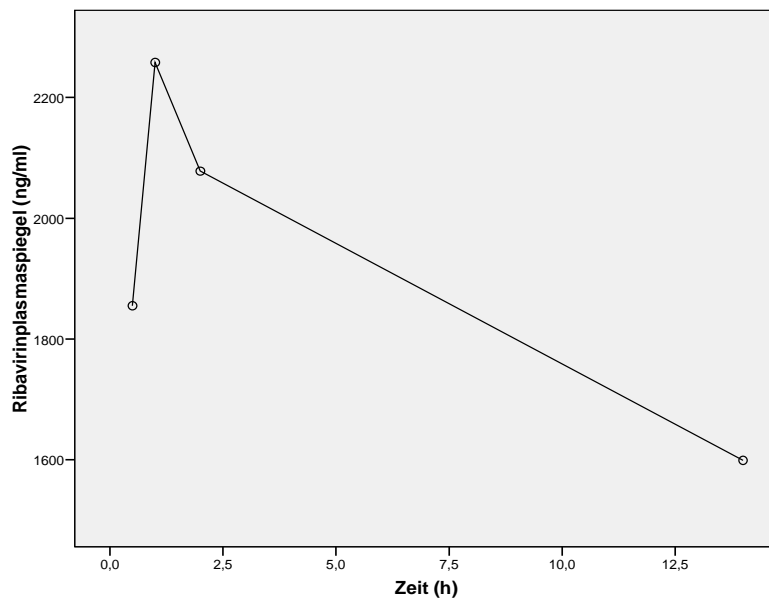


Abb. 35: Proband 65 Diagramm der Ribavirinplasma Spiegel Tageskinetik im steady state

3.3.9 HCV-Kombinationstherapie bei terminaler Niereninsuffizienz – ein individueller Heilversuch

Hier beschrieben ist ein 56-jähriger, männlicher Patient (Proband 55) mit terminaler Niereninsuffizienz. Er ist 1,88m groß und wiegt 77 kg bei einem BMI von 22. Sonstige Daten: Histologie: Grading = 3, Staging = 1, GFR (MDRD) 5 ml/min/1,73qm, Hb 13,1 mg/dl, AST 44,8 U/l, ALT 56,8 U/l. Seit 1990 ist der Patient hämodialysepflichtig. Die Primärdiagnose der chronischen Hepatitis C Infektion erfolgte 1992. Er ist mit dem HCV-Genotyp 1b infiziert und hat keine Koinfektionen. Initial erfolgte die Therapie mit Ribavirin 400 mg/d über sieben Tage, sowie Peginterferon alfa-2a 180 µg in 9-tägigem Abstand. Die anschließende Ribavirindosis betrug 200 mg/d und wurde bis zum Ende der Therapie über 47 Wochen beibehalten. Die Peginterferondosis wurde in Woche fünf aufgrund einer renalen Anämie 135 µg 1x wöchentlich reduziert. Darüber hinaus erfolgte eine Substitution von Erythropoetin und die Gabe von Erythrozytenkonzentraten (EK). Die gesamte Therapiezeit erstreckte sich über 48 Wochen.

RBV-Plasmaspiegel in den ersten zwei Therapiewochen:

Aufgrund der geringen Datenlage zu dem Thema RBV-Therapie bei Dialysepatienten, wurde bei Proband 55 eine engmaschige Kontrolle des Plasmaspiegels zu Beginn der

Therapie durchgeführt. In der ersten Therapiewoche fanden sechs Messungen statt, in der Zweiten nach Dosishalbierung fünf Messungen (Tab. 24). Trotz der geringen RBV-Dosis entwickelte der Proband schon in der ersten Therapiewoche Plasmaspiegel von über 1000 ng/ml.

Therapiewoche	Median	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	N
1	614	676,67	211,03	424	1016	6
2	1014	1005	331,597	696	1531	5
Insgesamt	747	825,91	309,274	424	1531	11

Anmerkung: eingenommene Ribavirindosis betrug in Woche eins 400 mg/d, in Woche zwei 200 mg/d.

Tab. 24: Plasmaspiegeldynamik in den ersten zwei Therapiewochen von Proband 55 mit terminaler Niereninsuffizienz

Abb. 36 zeigt den Verlauf des RBV-Plasmaspiegels des niereninsuffizienten Patienten während der ersten zwei Therapiewochen.

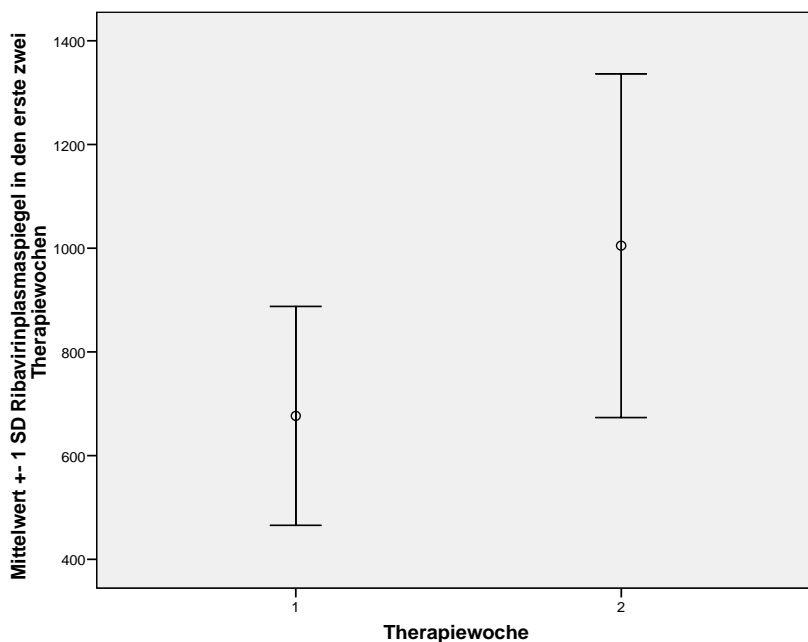
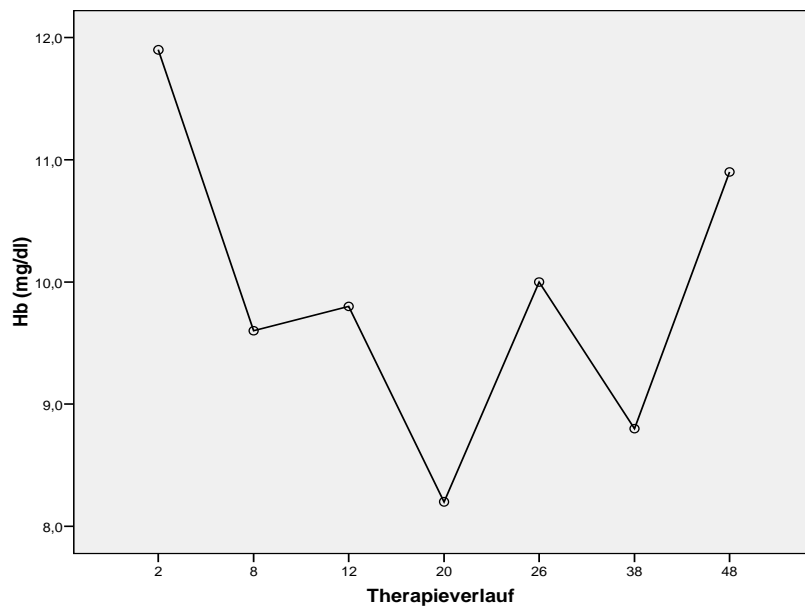


Abb. 36: Mittelwert plus/minus Standardabweichung des Ribavirinspiegel von Proband 55 mit terminaler NI in den ersten zwei Therapiewochen

Verlauf von Hb, Transaminasen und Viruslast im Therapieverlauf (Abb. 37-39):

Der Hb-Wert fiel innerhalb von acht Therapiewochen von 13,1 mg/dl auf 9,6 mg/dl (Abb. 37). Therapeutisch wurden Erythrozytenkonzentrate eingesetzt und Erythropoetin substituiert.



Anmerkung: es erfolgten Erythropoetingaben

Abb. 37: Diagramm des Hb-Wertes (mg/dl) von Proband 55 mit terminaler NI im Therapieverlauf

Abb. 38 zeigt den Verlauf der sich im Therapieverlauf normalisierenden Transaminasen.

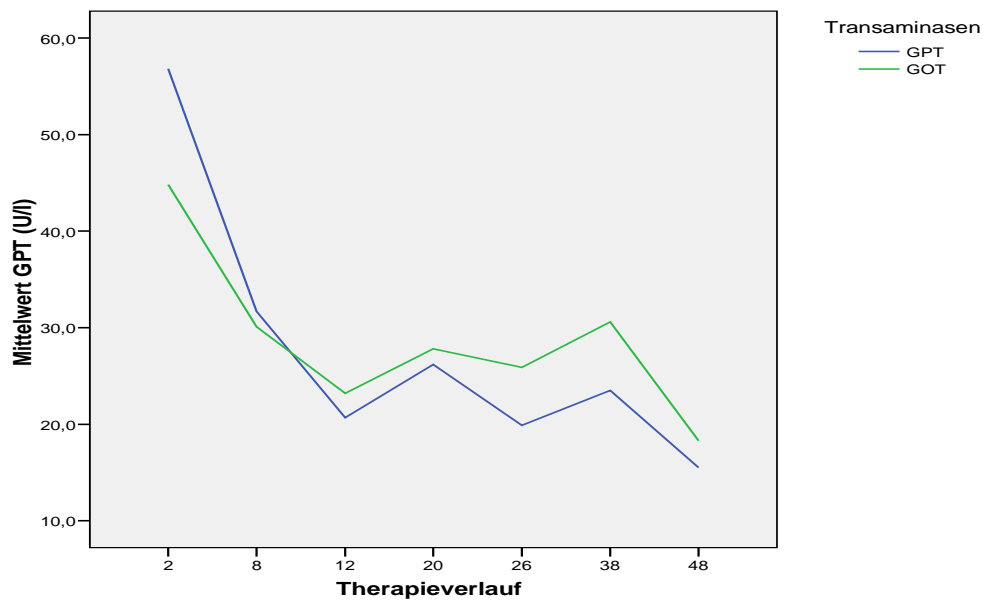
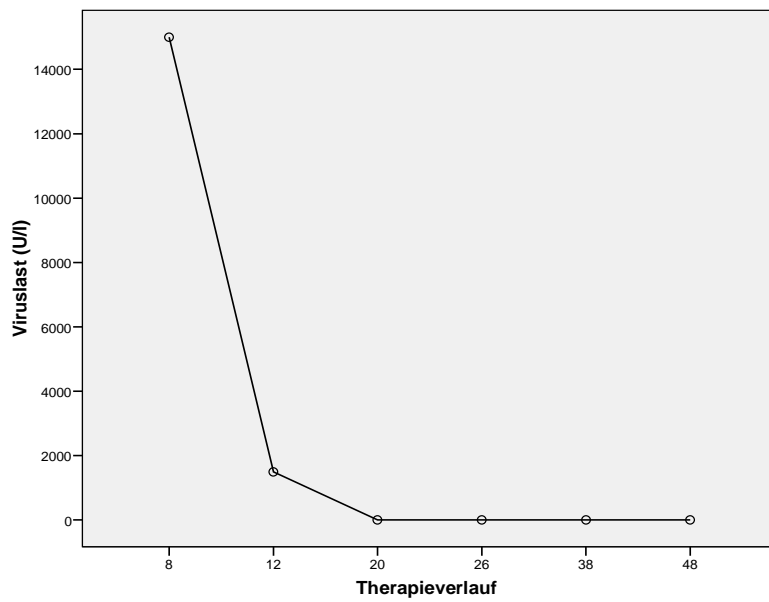


Abb. 38: Diagramm der Transaminasen (U/l) von Proband 55 mit terminaler NI im Therapieverlauf

Auf Abb. 39 wird das Verhalten der Viruslast veranschaulicht. Sie war erstmals in Therapiewoche 20 negativ und blieb dies auch bis zum Therapieende. Zwei Monate später kam es zu einem Relapse.



Anmerkung: VL erstmals in Therapiewoche 20 negativ.

Abb. 39: Diagramm der Viruslast (U/l) von Proband 55 mit terminaler NI im Therapieverlauf

Insgesamt ist darauf hinzuweisen, dass die Ergebnisse aufgrund der Fallzahl deskriptiven Charakter haben, und durch die hohe interindividuelle Varianz der Daten eingeschränkt sind.

4 Diskussion

Die Therapie der chronischen Hepatitis-C besteht derzeit aus einer Kombination von Ribavirin und pegyliertem Interferon alfa-2a oder -2b. Die Länge der Therapie richtet sich nach dem HCV-Genotyp (1 über 48 Wochen, 2 und 3 über 24 Wochen), die Höhe der RBV-Dosierung nach dem Gewicht des Patienten (1000mg RBV/die bei ≤ 75 kg, 1200mg RBV/die bei >75 kg Körpergewicht). RBV ist ein chemisch hergestelltes Nucleosidanalogen, mit besonderen pharmakokinetischen Eigenschaften. Auffällig sind eine hohe inter- und intraindividuelle Variabilität, und eine sehr lange Halbwertszeit von 80 Stunden nach Einzelgabe und 300 Stunden im steady state. Dieser wird nach vier Therapiewochen erreicht.

In aktuellen Studien hat sich zunehmend gezeigt, dass sowohl der Therapieerfolg, als auch das Auftreten von Nebenwirkungen eng an die Höhe des RBV-Plasmaspiegels geknüpft sind. Dabei scheinen vor allem der RBV-Spiegel zu Beginn der Therapie und die initiale Viruskinetik eine entscheidende Rolle zu spielen.

Gegenstand dieser Arbeit war es, eine Messmethode für den RBV-Plasmaspiegel zu entwickeln, um die nebenwirkungsreiche Therapie der chronischen HCV-Infektion, hinsichtlich Therapiesicherheit und Therapieerfolg zu optimieren. Ausgewählt wurde die High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Dies ist eine flüssigkeitschromatographische Trennmethode aus der analytischen Chemie, die in der Lage ist, verschiedenste Moleküle qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Sie funktioniert durch das unterschiedliche Verteilungsverhalten von Stoffen in der stationären und mobilen Phase durch das Entstehen von Wechselwirkungen.

4.1 Auswahl der Methode

Bei der Auswahl des Messverfahrens zur Ribavirinplasmaspiegelbestimmung spielte vor allem eine Rolle, eine Methode zu entwickeln, etablieren und validieren, die als Standardmethode für Routineuntersuchungen in Kliniklabors geeignet sein sollte. Obwohl bereits einige Verfahren zu RBV-Messung entwickelt wurden, hat sich noch kein Standardverfahren etabliert. Vorbeschrieben sind Untersuchungsmethoden mittels Radioimmunoassay (RIA) (139), (140), (141), Kapillarelektrophorese (CE) mit

(142), (143) oder ohne Probenvorbereitung (144), HPLC mit UV-Detektion (145), (146), (147), (148), (149), (150), HPLC mit Massenspektrometrie (151), (152), (153) und Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (154), sowie zwei Methoden die sich der Tandemmassenspektrometrie bedienen. Eine davon koppelt die Flüssigkeitschromatographie mit Luftdruckionisation (LC/API/MS/MS), (155), die andere mit Elektrosprayionisation (LC/ESI/MS/MS) (156). All diese Methoden erschienen zu aufwendig für ein routinemäßiges Therapeutic Drug Monitoring (TDM), zu kompliziert, zu wenig spezifisch, zu wenig sensitiv, oder zu teuer. Um für den Klinikalltag tauglich zu sein, ist es wichtig, dass eine Messmethode möglichst praktikabel im Sinne einer schnellen, einfachen Durchführung ist und sich möglichst viele Arbeitsschritte automatisieren lassen. Außerdem sollte ein System für die Routineanalytik hoch spezifisch, sensitiv, zuverlässig und stabil sein. Es sollte mit der technischen Ausstattung eines normalen Kliniklabors durchführbar sein und möglichst mit handelsüblichen Reagenzien arbeiten. Für die Spiegelmessung erschien zudem wichtig, dass die gewählte Methode neben qualitativen auch genaue quantitative Ergebnisse liefert.

Die HPLC schien am ehesten allen Anforderung zu entsprechen. Nun musste unter den verschiedenen flüssigchromatographischen Trennverfahren die am besten passende Methode mit einem geeigneten Phasenpaar ausgewählt werden. Dabei erwies sich eine weitreichende Kenntnis der physikalischen und chemischen Daten von RBV als unerlässlich. Wir entschieden uns für die Umkehrphase, da RBV ein kleines Molekül ist (molare Masse 244,206 g/mol) und wasserlöslich, aber nicht ionisch ist. Für die Umkehrphasenchromatographie galt es dann, eine apolare stationäre Phase und eine relativ polare flüssige Phase zu verwenden.

4.1.1 Probenvorbereitung

Um RBV von der Matrix zu extrahieren, Interferenzen zu minimieren und um einen passenden Detektionsbereich zu schaffen, musste die Probe zunächst für die eigentliche HPLC vorbereitet werden.

Die vorbeschriebene Proteinpräzipitationsmethode (156), (142) zur Probenkonditionierung erwies sich aufgrund schlechter Sensitivität und Selektivität als

ungeeignet für die RBV-Analyse. Eine Flüssig-Flüssig-Extraktion war aufgrund der hydrophilen Eigenschaften von RBV nicht möglich. Daher wurde die Methode der aufwendigeren Festphasenextraktion = Solid Phase Extraction (SPE) ausgewählt (148), (145), (147), (150). Diese wurde mit einer Phenyl-Boronsäure = Phenyl Boronic Acid (PBA)-Säule durchgeführt, bei der PBA kovalent an eine Oberfläche aus Silicagel gebunden ist. Der Vorteil der kovalenten Retention besteht darin, dass im Vergleich zu anderen Trennmethoden Wechselwirkungen mit einer 10 -100 fach höheren Energie verursacht werden. Substanzen werden fester an die Oberfläche gebunden und daraus resultiert eine bessere Trennung. Ein weiterer Vorteil der PBA-Säule ist, dass die enthaltenen Boronatgruppen eine hohe Spezifität für Stoffe mit cis-Diolen haben. Daher werden RBV und der ISTD McMs mit den cis-ständigen Hydroxylgruppen sehr spezifisch gebunden und für eine fast 100 % Erkennung von RBV und für eine Minimierung der Interferenzen im Chromatogramm gesorgt.

Zu beachten war, dass die Bindung der Hydroxylgruppen an PBA nur bei hohem pH funktioniert (157), (158). Zu diesem Zweck wurde Ammoniumacetat als Puffer eingesetzt. Zur nachfolgenden Elution musste der pH folglich wieder gesenkt werden, was mit Phosphorsäure erreicht werden konnte. Dadurch wurde RBV wieder frei und konnte eluiert werden. Als Fließmittelzusatz wurde Methanol verwendet, da sich aufgrund der stark hydrophilen Eigenschaften so eine bessere Löslichkeit zeigte.

Eine bis zu zehnmahlige Wiederverwendung der SPE-Säulen stellte sich als problemlos heraus. Es empfiehlt sich allerdings, diese vor der Lagerung mit Methanol zu spülen.

4.1.2 Methodenentwicklung und Optimierung

Ziel war es, eine RBV-Messmethode zu entwickeln, die hinsichtlich Retention, Selektivität und System bestmöglich optimiert ist. Dabei zeigte sich unter anderem, dass eine Änderung des pH-Wertes den Trennvorgang stark beeinflusst. Als optimal haben sich die im Ergebnisteil angeführten pH-Werte herausgestellt:

1. Probenvorbereitung

- Vorkonditionierung der Säulchen pH 8,5

- Mischung des internen Standards (McMs) mit Serum ebenfalls bei einem pH von 8,5
- Spülung der Säule bei einem pH von 8,5
- Elution bei einem pH von 2,2

2. HPLC

- Laufmittel pH 2,2

Mobile Phase

Das Laufmittel betreffend zeigte sich Kaliumdihydrogenphosphat mit ACN 99:1 (v/v) bei einem pH von 4,5 im isokratischen Lauf als ideal (isokratisch = unter konstanten Trennbedingungen, also ohne Lösungsmittelgradient). Bei der Auswahl des Laufmittels wurden einige Überlegungen miteinbezogen: Das polare RBV musste darin löslich sein, folglich durfte der organische Anteil des Elutionsmittels nicht zu hoch sein, was zudem auch den Anforderungen der klassischen RP-Chromatographie entspricht. Auf der anderen Seite durfte der organische Anteil in Form von ACN auch nicht zu gering sein, da dies zu Lasten der Peakhöhe und -form ging. Das Laufmittel musste inert gegenüber RBV sein und es durfte auch keine Reaktionen mit der stationären Phase eingehen. Dann musste es aufgrund der Wahl einer UV-Detektionsmethode, im Bereich der eingestellten Wellenlänge vollständig transparent sein (159), und schließlich sollte es zugunsten des Säulenvordrucks, der Trenngeschwindigkeit und der Trennleistung nicht zu viskös sein.

Säule und stationäre Phase

Bei der Entscheidung eine mit Silicagel gepackte C18 Säule der Dimension 250 x 2 mm Innendurchmesser (ID) für ein bestes Trennergebnis zu wählen, spielte die Auslotung zwischen benötigtem Druck, Partikeldurchmesser und Säulenlänge die entscheidende Rolle. Die Säule durfte nicht so lang sein, dass das Retentionsvolumen zum Nachteil der RBV-Konzentration im Eluat zunahm. Auf der anderen Seite wurde für eine kurze Säule eine stationäre Phase mit einem kleinen 5 µm Partikeldurchmesser benötigt, die wiederum einen höheren Arbeitsdruck erforderlich machte. Die Mikroteilchen erwiesen sich aber auch zum Erzielen einer guten Trennstufenzahl als hilfreich. Allerdings ließ sich mit Silicagel nur in Kombination mit ACN eine ausreichende

Retention erzielen. Auch die kurze Säule mit dem kleinen ID bot weitere Vorteile: zum einen lag ein besseres Verhältnis der Probenmenge zur Signalhöhe vor, da sich die Peakmaximumkonzentration proportional zum reziproken Quadrat des Säulendurchmessers verhält und zum anderen wurde erheblich weniger Lösungsmittel verbraucht.

Zur Säulenregeneration bot sich ein „Nachwaschen“ mit einer Phase mit hohem organischen Anteil an, um hydrophobe Substanzen zu lösen. Auf diese Weise ist die Säule nach einem Messzyklus problemlos aufzubewahren.

Detektion

Die Wahl fiel auf die UV-Detektion, da diese einfach zu handhaben und nicht teuer ist. Zudem hat sie einen großen linearen Bereich, der auch kleine Probenvolumina bestimmbar macht. Der Nachteil der UV-Detektion war, dass sie nicht ohne die oben beschriebene, aufwendige Probenvorbereitung funktionierte. Ohne eine vorausgehende SPE war kein passender Detektionsbereich zu schaffen und es gab vermehrt Interferenzen. Wurde die Probe in angemessener Weise präpariert, erwies sich eine Detektions-Wellenlänge von 230 nm als optimale Größe für Lichtabsorption und optische Durchlässigkeit.

4.1.3 Standards und Kalibrierung

In der Flüssigchromatographie ist das Detektorsignal sehr stark von speziellen Stoffeigenschaften abhängig und kann stark variieren. Daher ist es unerlässlich vor der quantitativen Analyse eine Kalibrierung durchzuführen (160), (161), (162). Aufgrund der Notwendigkeit der komplizierten Probenvorbereitung erschien die Kalibration durch einen externen Standard zu fehleranfällig. Die deutlich bessere Wahl war, dies mittels eines internen Standards (ISTD) zu tun. Als ISTD wurde 3-Methylcytidin Methosulfat (McMs) verwendet, da dieser die Probenvorbereitung, die chromatographische Trennung und die Detektion betreffend ähnliche Eigenschaften wie RBV aufweist und an günstiger, überlagerungsfreier Position eluiert wird. McMs besitzt ebenfalls die für die SPE wichtigen cis-ständigen Hydroxylgruppen. Da der ISTD ganz zu Beginn, noch bevor der erste Schritt der Probenvorbereitung erfolgte, zugegeben wurde, kann man die Kalibrierung hier als besonders genau und sicher

betrachten. Auch kleine Schwankungen des Injektionsvolumens beeinträchtigten die Qualität der Messungen nicht. Trotzdem wurden zur noch weiteren Erhöhung der Genauigkeit der quantitativen Analyse fünf Datenpunkte (100, 400, 1000, 3000, 6000 RBV ng/ml) in die Kalibrierung aufgenommen. Der Kalibrationsbereich von 100 – 6000 ng/ml bestätigte sich nach Erhalt der Messergebnisse als ausreichend.

4.1.4 Methodvalidierung und Messqualität

Durch die Validierung wird überprüft, ob die angewendete Methode mit einer angemessenen Zuverlässigkeit und Präzision wirklich die Daten liefert, die man von ihr erwartet (163). Bei uns ergab die Prüfung, dass die Validitätskriterien Spezifität, Sensitivität, Linearität der Kalibrationskurve, Präzision und Richtigkeit, sowie Robustheit den für bioanalytische Methoden empfohlenen Anforderungen entsprechen (164), (165). Der Bereich von RBV und dem ISTD im Chromatogramm zeigte sich gut aufgelöst, frei von Interferenzen und Koelutionen. Insbesondere auch die vermutete Annahme, dass andere Nukleosidanaloga (wie beispielsweise eine HIV-Komedikation) aufgrund ihrer fehlenden Hydroxylgruppen, dank der PBA in der Probenvorbereitung, die Messungen nicht beeinträchtigen würden, bestätigte sich in den Chromatogrammen. Die Sensitivität betreffend wurden Ergebnisse mit einer akzeptablen Genauigkeit erzielt, da der Variationskoeffizient (VC) für alle Parameter unter 10 % lag. Für die Nachweisbarkeit (LOD), also die kleinste Menge die gerade noch nachweisbar ist, gilt ein VC von unter 20 % als ausreichend (166). Für die quantitativ gerade noch genau bestimmbare Unter- und Obergrenze, dem lower and upper limit of quantification, differieren in der Literatur die Angaben für einen maximal tolerablen VC von 15 % (166) bis 20 % (167).

Die Linearität der Kalibrationskurve sollte einen Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,990 besitzen (166). Dies wurde bei uns mit einem r^2 von 0,997248 erfüllt. Die Fähigkeit, eine Analyse mit möglichst kleinen Abweichungen erneut durchführen zu können, gelang mit einer hohen Präzision, was ein gemittelter VC für Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit von 7,73 % bestätigt. Das Maß für die Wiederfindung ist mit 81 % als tolerabel zu bezeichnen. Bei der Untersuchung auf Robustheit der Methode, das heißt bei der Überprüfung auf Unempfindlichkeit

gegenüber Umwelteinflüssen (168), (169) zeigten sich gewisse Einschränkungen. Eine Messung gelingt vor allem bei tiefgefrorenen Plasmaproben mit validierter Stabilität. Ein Auftauen und Wiedereinfrieren sollte vermieden werden, da der VC ansonsten eventuell die die maximal zulässigen 15 % überschreitet.

Neben der Validierung sind der Gerätetest und der Systemeignungstest Maßnahmen, um eine hohe Messqualität sicherzustellen. Wir konnten durch sachgerechte Umsetzung der drei ineinandergreifenden qualitätssichernden Maßnahmen Gerätetest, Validierung und Systemeignungstest erfolgreich eine zuverlässige, richtige und präzise Analytik sicherstellen. Ineinandergreifend deswegen, da zuerst im der Gerätetest die richtige Arbeitsweise der Instrumente überprüft wurde, dann anhand der Validierung die Methode mit den Anforderungen verglichen wurde und schließlich der Systemeignungstest als Summe der beiden anderen Qualitätstests das ganze System umfasst hat. Sowohl die Ergebnisse des Gerätetests als auch die Validierung entsprachen den Anforderungen, daher war die Systemeignung gewährleistet. Es ist abschließend anzumerken, dass zur Wahrung der Messqualität bei allen verwendeten Substanzen immer auf höchste Reinheit zu achten ist.

Insgesamt wurde die Umsetzbarkeit der entwickelten HPLC-Methode mit vorausgehender Probenvorbereitung mittels SPE, als Standarduntersuchungsmethode für den Klinikalltag, mit über 600 Messungen im Zeitraum von zwei Jahren gut untersucht. Sie wäre auch geeignet für eine Anwendung im Rahmen eines TDM. Ihre Vorteile liegen in der einfachen und schnellen Durchführung bei gleichzeitiger Gewährleistung eines hohen, konstanten Qualitätsstandards in der qualitativen und quantitativen Analyse.

4.2 Der Stellenwert des Ribavirinplasmaspiegels in der HCV-Therapie

Das Auftreten von Nebenwirkungen und die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolgs werden derzeit vor allem mit der Höhe der täglichen Ribavirindosis in Verbindung gebracht. Die empfohlene RBV-Dosierung erfolgt im derzeitigen Klinikalltag nach dem Körpergewicht des Patienten und variiert zwischen Asien, Europa und den USA (170).

So wird in Japan beispielsweise eine Maximaldosis von 800 mg/d nicht überschritten, während dieser Wert in Deutschland eher als Untergrenze gilt.

Aktuellen Studien zufolge spielt jedoch **weniger die Dosis/Tag** als vielmehr der **tatsächlich vorhandene Ribavirinplasmaspiegel** eine ganz **ausschlaggebende Rolle für das Auftreten von Nebenwirkungen und den Therapieerfolg**.

Lindahl et al. und einige andere Studien untersuchten den Zusammenhang des Ribavirinplasmaspiegels mit der Hb-Konzentration. Sie kamen übereinstimmend zu dem Ergebnis, dass sich der Plasmaspiegel und der gemessene Hb-Wert negativ proportional verhalten (171), (76), (170), (99), (172), (6). Die RBV-Konzentration im Plasma korreliert linear mit dem Hb-Wert. In einer weiteren Studie konnte diese Aussage mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.506 ($p < 0.001$) bestätigt werden (173).

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass der gemessene Plasmaribavirinspiegel in hohem Maße mit dem Therapieerfolg korreliert. Für ein dauerhaftes virologisches Ansprechen (SVR) wiederum hat besonders der initiale Viruslastabfall eine hohe prädiktive Bedeutung (174), (175). So führt eine Reduktion der Viruslast in Therapiewoche zwölf um mindestens 2 log-Stufen zu einer Wahrscheinlichkeit eines SVR von 65 %, ein fehlender Abfall in dieser Höhe im Vergleich zur Ausgangsvirämie hat im Gegensatz dazu einen negativen prädiktiven Wert von 97 - 98 % (56), (57). Dies unterstreicht die Relevanz der frühen RBV-Spiegel.

Außerdem werden zu diesem Thema folgende Zusammenhänge beschrieben: bei Patienten, die auf die Therapie anhaltend ansprechen, nehmen die HCV-RNA-Level biphasisch ab, wobei die erste Abnahme 24 – 36 Stunden nach Beginn der Kombinationstherapie eintritt, gefolgt von der zweiten Phase der Abnahme, die über die nächsten 4 bis 16 Wochen fort dauert (74). Es existiert eine Verbindung zwischen hohen RBV-Plasmaspiegeln in Therapiewoche vier und hohen Responseraten (170), ein SVR ist meist mit einem raschen Virusabfall (rapid response) verknüpft (6), und ein verspätetes virales Ansprechen führt zu höheren Relapse-Raten (81).

In anderen Studien werden die Spiegel im steady state mit einem Therapieerfolg und dem Auftreten von Nebenwirkungen verglichen. Larrat et al. beschreiben, dass bei den von ihnen behandelten HCV-Patienten die Plasmaspiegel bei Patienten mit SVR grundsätzlich deutlich höher waren als bei jenen ohne Therapieansprechen. Sie berichten von bei einem durchschnittlichen Plasmaribavirinspiegel von 2670 ± 1060 ng/ml in Woche zwölf und 3240 ± 1350 ng/ml in Woche 24 (176). Dieser Zusammenhang zeigt sich beispielsweise auch bei Jen et al. (177). Er beschreibt eine Korrelation zwischen dem Ribavirinplasmaspiegel im steady state und der SVR-Rate in Kombination mit Standard-INF-2b. Bei Rendón et al. (172) wurde in einer größer angelegten Studie mit 98 HCV/HIV-koinfizierten Patienten, die täglich 800 – 1200 mg Ribavirin erhielten, in den Therapiewochen vier und zwölf die Plasmaspiegel bestimmt. Die mittlere Konzentration betrug in Woche vier 2710 ± 1070 ng/ml und in Woche zwölf 2720 ± 890 ng/ml, mit großer interindividueller, aber mäßiger intraindividuelle Variabilität. Hier wurde nicht nur eine signifikante Korrelation des Plasmaspiegels mit der Dosierung pro Kilogramm Körpergewicht beobachtet, sondern auch wieder der Zusammenhang mit einer ribavirinassoziierten Anämie und einem frühen virologischen Therapieansprechen als unabhängiger Prädiktor, und zwar sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Analyse.

Die entscheidende Frage, die sich demnach in Erwägung eines Therapieverlaufs stellt ist: Wie hoch ist der RBV-Plasmaspiegel meiner Patienten und welche Faktoren beeinflussen ihn?

Die Höhe des RBV-Spiegels wird von mehreren Faktoren bestimmt (siehe auch Kapitel Pharmakokinetik). Sehr wichtig ist neben der eingenommenen Dosis pro Kilogramm Körpergewicht die Nierenfunktion. Das vorwiegend renal eliminierte RBV verbleibt bei eingeschränkter glomerulärer Filtration erheblich länger im Körper und damit entstehen hohe Plasmaspiegel. Maeda et al. und andere, zum Teil mit über 1100 Patienten angelegte, klinische Untersuchungen bestätigen den engen Zusammenhang von Kreatininclearance und RBV-Spiegel (170), (178), (177). In einer Studie mit

niereninsuffizienten Patienten zeigten Dumortier et al., dass die Patienten mit geringer glomerulärer Filtrationsrate trotz der niedrigeren täglichen Dosis RBV (im Schnitt 500 mg/d versus 1000 mg/d) dieselben Plasmaspiegel von durchschnittlich 2300 ng/ml aufbauten. Die Ansprechraten mit SVR waren in beiden Kollektiven bei nahezu **gleichem Plasmaspiegel**, trotz **geringerer täglicher RBV-Dosis**, vergleichbar. Auch die Hämoglobinspiegel und die ALT-Werte entsprachen sich in beiden Patientengruppen weitgehend (76). Um RBV zielgerichtet dosieren zu können, sollte daher die Nierenfunktion des Patienten miteinbezogen werden. Dafür sprechen auch die hohe interindividuelle Variabilität der eigenen Messergebnisse (siehe dazu deskriptive Statistik und Box-Whisker-Plots), und beispielhaft die Plasmaspiegelentwicklung des Probanden 55 mit terminaler Niereninsuffizienz. Umgesetzt werden könnte dies beispielsweise mittels Berechnung durch eine von Maeda et al. (170) beschriebenen Formel, die zwischen dem gewünschten Medikamentenspiegel, der Kreatinin-Clearance des Patienten und der Dosis/kg eine Beziehung herstellt: $Dosis (mg/kg/d) = [C_{pss} (ng/ml) \times 24 \times 60] \times [0,038 \times CL_{er} (ml/min) - 0,212] / 1\ 000\ 000$. Dabei bezeichnet C_{pss} den gewünschten RBV-Spiegel (hier auf Werte zwischen 2500 und 3500 ng/ml ausgelegt) und CL_{er} die Kreatinin-Clearance. Generell gilt, je höher die Krea-Clearance, desto höher die notwendige RBV-Dosis, um einen ausreichenden Plasmaspiegel zu erhalten.

Desweiteren beeinflusst der Urin-pH die Ribavirinplasmaspiegelkonzentration wie durch Arase et al. beschrieben (99). Basierend darauf, dass Ribavirin saure Eigenschaften besitzt, führt eine Urinalkalisierung zur Erhöhung des ionischen Anteils, senkt die passive Resorption in den Nierentubuli und beschleunigt daher die Ausscheidung (179). Ein saurer Urin bewirkt das Gegenteil, was demzufolge zu hohen Plasmaspiegeln führt. Diskutiert wird darüber hinaus, ob auch die Leberfunktion einen signifikanten Einfluss auf die Höhe des RBV-Plasmaspiegel hat (170). Dies gilt deswegen als wahrscheinlich, da RBV teilweise durch die Leber metabolisiert wird.

Therapeutic Drug Monitoring in der HCV-Therapie

Ein Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) besteht aus der regelmäßigen Messung

eines Medikamentenserumspiegels und dient als Instrument zur Kontrolle und Anpassung der Dosierung. Bislang ist TDM in der HCV-Therapie im Klinikalltag nicht etabliert, scheint aber auch bei komplikationslos zu behandelnden Patienten sinnvoll zu sein. Noch höher zu bewerten, eigentlich unumgänglich, ist TDM bei schwierig zu therapierenden Patienten, wie solche mit eingeschränkter Nierenfunktion, fortgeschrittener Lebererkrankung oder HIV-Koinfektion. Insgesamt lässt sich durch die Kenntnis des RBV-Spiegels eine viel feinere Abstimmung der Therapie auf die Bedürfnisse des Patienten erreichen. Zum einen kann man eine Überdosierung mit nachfolgendem Therapieabbruch verhindern, zum anderen eine zu starke Dosisreduktion, die den Therapieerfolg verschlechtert, vermeiden. Was bislang fehlt, sind validierte Werte und Leitlinien bezüglich der optimalen RBV-Plasmakonzentrationen, mit der man einen möglichst großen Therapieerfolg mit möglichst wenigen Nebenwirkungen erzielen kann. Ebenso fehlen Daten bezüglich einer therapeutisch minimal notwendigen Serumkonzentration und einer oberen Sicherheitsgrenze.

Von Arase et al. wurde zu diesem Thema (99) der Zusammenhang von Ribavirinspiegel, SVR und Hämoglobinkonzentration bei 68 Patienten mit Genotyp 1b-Infektion in Therapiewoche acht untersucht. Dabei kam man zu dem Ergebnis, dass der geeignetste Spiegel zwischen 3000 und 3500 ng/ml liegt. Darüber stiegen die Abbruchraten rapide an, darunter ging zu Lasten des SVR ($p = 0.033$). Maeda et al. bezeichnen den Spiegel von 3500 ng/ml als „toxische Grenze“ und empfehlen einen RBV-Plasmaspiegel von 2500 – 3500 ng/ml (170). Tsubota et al. (180) kamen zu dem Ergebnis, dass für einen SVR ein RBV-Mindestspiegel von 3000 ng/ml Voraussetzung ist, während in einer anderen Untersuchung von Breilh et al. (181) 1000 ng/ml als Untergrenze für virologisches Ansprechen bezeichnen. Hier wurden pro Tag 800 – 1200 mg Ribavirin gegeben, ein mittlerer steady state Plasmaspiegel von 1800 ng/ml gemessen und auch hier als unabhängiger Prädiktor für den Therapieerfolg bezeichnet. Eigene Ergebnisse (siehe dazu RBV-Spiegel in den ersten sechs Therapiewochen) weisen eher auf einen niedrigeren notwendigen RBV-Spiegel hin, um ein SVR zu erreichen.

Ein weiterer Faktor, der für die Einführung eines TDM spricht ist der ökonomische Aspekt. Die Gesamtkosten einer in Deutschland durchgeführten Kombinationstherapie mit Ribavirin und pegyliertem Interferon über 48 Wochen betragen etwa 23.500 Euro (182). Man könnte TDM also auch mit dem Ziel einsetzen, eine Therapie möglichst effektiv zu gestalten, indem man frühzeitig eine Dosisanpassung entsprechend des Plasmaspiegels vornimmt. Dies würde eine erhebliche Kosteneinsparung bewirken.

Insgesamt gesehen könnte die Kombinationstherapie der chronischen HCV-Infektion durch ein routinemäßiges TDM wesentlich effektiver, sicherer und kostengünstiger gestaltet werden und somit dessen Einführung wichtiges Zukunftsziel.

4.3 Ribavirinplasmaspiegelverlauf in den ersten sechs Therapiewochen

In der aktuellen Literatur wird eine Steady-state-Einstellung nach vier Wochen beschrieben (87), (74). Arase et al. (173) sprechen von einem steigenden RBV-Plasmaspiegel über acht Wochen mit einer anschließenden Plateaubildung. Anhand eigener Ergebnisse wurde deutlich, dass sich der RBV-Spiegel nach vier Therapiewochen meist noch relativ stark ändert (siehe Tabellen 14-16). So lag der Mittelwert des Ribavirinspiegels bei den Männern in Therapiewoche vier bei 1429,1 ng/ml, in Woche sechs bei 1571,2 ng/ml und im weiteren Verlauf bei 1892,5 ng/ml. Bei den Frauen entwickelte sich der Mittelwert von 1754,0 ng/ml in Woche vier, über 1584,0 ng/ml in Woche sechs, hin zu einem Mittelwert von 2245,4 ng/ml über den Therapieverlauf ab Woche sieben. Doch im Gegensatz dazu fielen auch Probanden auf, die in Therapiewoche sechs noch Spiegel unter 1000 ng/ml aufwiesen. Auf deren weitere Entwicklung wird unten genauer eingegangen.

Mit dem Ziel einer zukünftigen Therapieoptimierung wäre es wünschenswert, den RBV-Plasmaspiegel gleich zu Therapiebeginn auf ein höheres Niveau einzustellen. Dies könnte man beispielsweise dadurch realisieren, zu Therapiebeginn höhere RBV-Dosen im Sinne einer Loading Dose zu geben, oder vor der üblichen Kombinationstherapie eine RBV-Mono-Vorphase durchzuführen.

Ein weiteres Problem, das sich anhand der Messergebnisse zeigte, war eine bereits vorbeschriebene, große interindividuelle Variabilität der RBV-Plasmaspiegel. So gab es neben den ganz niedrigen Spiegel auch Probanden (z. B. Proband 124) die trotz normaler Nierenfunktion sehr hohe Spiegel aufbauten. Hier wäre ein, wie bereits oben beschriebenes, TDM mit engmaschigen Plasmaspiegelkontrollen z. B. in den Therapiewochen 2, 4, 8, 12 und 18 zur Anpassung der optimalen RBV-Dosis wünschenswert. Ebenso könnte hier die erwähnte Dosierung unter Berücksichtigung der Nierenfunktion der Patienten einen hilfreichen Beitrag leisten.

Besonders niedrige Spiegel im weiteren Verlauf:

Da davon ausgegangen wird, dass eine RBV-Mindestserumkonzentration notwendig ist, um ein virales Ansprechen zu erreichen (170), (180) sahen wir uns gesondert den Verlauf der in Woche sechs auffallend niedrigen Spiegel an. Als niedrig bezeichneten wir einen mittleren Plasmaspiegel von unter 1000 ng/ml. Die Höhe der für einen Therapieerfolg notwendigen RBV-Spiegel wird kontrovers diskutiert, doch der tiefste in diesem Zusammenhang genannte Spiegel liegt bei 1000 ng/ml (181). Wodurch genau diese geringen Plasmaspiegel zustande kamen, ist nicht geklärt. Es gibt verschiedene mögliche Einflussfaktoren, wie die Nieren- und die Leberfunktion, die allerdings bei unseren Patienten nicht auffällig eingeschränkt waren (BMI der Patienten sind im Ergebnisteil angeführt). Die Tagesdosis richtete sich mit Ausnahme von Proband 124, bei welchem eine Dosisanpassung vorgenommen werden musste, nach den aktuellen Leitlinien.

Im Therapieverlauf zeigten sich zwei Entwicklungen: bei den Probanden 22, 57 und 66 blieben die Ribavirinspiegel über den gesamten Therapieverlauf auf einem Niveau von unter 1000 ng/ml, bzw. nur knapp über 1000 ng/ml. Trotzdem konnte die Therapie bei diesen drei Probanden mit SVR abgeschlossen werden.

Bei den Probanden 2, 77, 94, 104, 124, 130, 146 und 148 stiegen die Spiegel später als innerhalb der erwarteten vier Wochen noch an, und entwickelten ein mittleres Niveau von über 1000 ng/ml. Nur drei von den acht Patienten waren Therapieresponder.

Für eine zukünftige Therapieoptimierung wäre nun in weiteren Studien die notwendige RBV-Mindestserumkonzentration zu evaluieren. Nach unseren Ergebnissen ist es jedenfalls nicht ausgeschlossen, trotz mittleren Spiegeln von unter 1000 ng/ml einen SVR zu erreichen, doch sind die Erfolgsraten bei Plasmakonzentration im unteren Bereich offensichtlich wesentlich geringer. Allerdings scheinen die von Maeda et al. (170) und Tsubota et al. (180) geforderten Mindestkonzentration von rund 3000 ng/ml sehr hoch zu liegen, und wenn man sich die mittleren Spiegel unseres Gesamtkollektivs von knapp 2000 ng/ml ansieht, sind diese mit der RBV-Tagesdosis nach aktuellen Leitlinien kaum zu erreichen.

4.3.1 Geschlechtsabhängigkeit der RBV-Plasmakonzentration

Bei der Dosierung von Ribavirin wird keine Unterscheidung zwischen Männern und Frauen gemacht. Betrachtet man die Ribavirinspiegel der ersten sechs Therapiewochen getrennt nach dem Geschlecht der Patienten, fallen zunächst keine großen Unterschiede auf. Allerdings scheint sich in der weiteren Entwicklung nach Therapiewoche sechs, eine zentrale Tendenz einzustellen, dass Frauen mit derselben Tagesdosis durchweg höhere Plasmaspiegel entwickeln. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Dosis/kg durchschnittlich bei den (meist) leichteren Frauen höher liegt als bei den Männern. Da der Unterschied des Plasmaspiegels aber insgesamt für den ganzen Therapieverlauf nur bei rund 300 ng/ml liegt, ist es wahrscheinlich, dass das Geschlecht die Höhe nicht wesentlich beeinflusst. Einschränkend wirkt auf die Untersuchung allerdings, dass die Fallzahlen der Frauen geringer sind als die der Männer. Resümierend kann man nach unseren Ergebnissen die in der Klinik etablierte Methode bestätigen, dass es ausreichend ist, bei der RBV-Dosierung das Geschlecht der Patienten nicht mit einzubeziehen.

4.3.2 Interferon alfa-2a/alfa-2b

Die Überlegung bestand darin, ob die Wahl des Interferons einen Einfluss auf den Ribavirinplasmaspiegel hat. Hintergrund ist, dass beide modernen Peginterferone in Wirkung, Nebenwirkungen, Indikation und Kontraindikation nicht wesentlich differieren (6), (83), (183). Bei Betrachtung der RBV-Spiegel in der Therapieanfangsphase, schienen jene in Verbindung mit einer Interferon alfa-2b

Komedikation schneller anzusteigen. Auch im weiteren Therapieverlauf setzte sich diese Tendenz fort. Patienten, die Interferon alfa-2b erhielten, wiesen rund 200 ng/ml höhere RBV-Spiegel auf. Ob die etwas höheren Ribavirinplasmaspiegel des einen Kollektivs signifikant sind und zu höheren Ansprechraten führen, bleibt Subjekt zukünftiger Untersuchungen.

4.4 Ribavirinplasmaspiegel-Tageskinetiken

Bei den Tageskinetiken kann der genaue Verlauf des RBV-Plasmaspiegels im Verhältnis zum Einnahmeintervall betrachtet werden. Dargestellt sind die Stunden nach erstmaliger Einnahme von RBV (Pbn 48), Tageskinetiken vor Erreichen des steady state (Pbn 57, Pbn 104) und im steady state (Pbn 85, Pbn 65).

Die Ergebnisse der Zeit bis zum Erreichen der maximalen Serumkonzentration (T_{max}) von RBV reichen von zweieinhalb Stunden bei einem naiven Patienten (Pbn. 48), über zwei bis drei Stunden vor Erreichen des steady state (Pbn. 57 und 104), bis hin zu ein bis zweieinhalb Stunden im steady state (Pbn. 85 und 65). Der vorgeschriebene Wert für T_{max} nach Einzeldosis lag bei eineinhalb Stunden (87), (74), somit zeigte sich unser Wert leicht nach hinten verschoben. Einschränkend ist allerdings die Tatsache zu sehen, dass bei der Kinetik nach Einzeldosis ein drei Stunden Wert fehlt, sodass sich die T_{max} hier im Bereich von zweieinhalb bis vier Stunden befindet. Bezüglich der maximalen Serumkonzentration (C_{max}) wurden nach Einzeldosis 586 ng/ml und nach Mehrfachdosis im Mittel 1952 ng/ml gemessen, was ebenso wie der mittlere Plasmaspiegel nach Einzeldosis von 371 ng/ml und nach Mehrfachdosis von 1601,5 ng/ml, etwas unter den vorgeschriebenen Werten liegt. In der Tendenz aber, bestätigen die erhobenen Ergebnisse die Eigenschaften, die RBV in vorangehenden pharmakokinetischen Untersuchungen zugeschrieben wurden. Nach der Einnahme erfolgen eine schnelle Verteilungsphase und darauf eine lange Eliminationsphase. Des Weiteren unterscheidet sich der RBV-Spiegel nach Einzeldosis sehr stark von dem nach Mehrfachdosis, da RBV nach mehrmaliger Gabe akkumuliert, und der mittlere Plasmaspiegel und auch C_{max} nach wiederholter Einnahme ein Vielfaches der Einzeldosis betragen. Einen negativen Einfluss auf den Therapieerfolg scheint die

Tatsache zu haben, dass es relativ lange (siehe Ergebnisse der Tageskinetiken und Plasmaspiegelverläufe in den ersten sechs Therapiewochen) dauert, bis für einen Virusabfall ausreichend hohe Spiegel entstehen. In den ersten Therapiewochen sind die Talspiegel, der mittlere RBV-Plasmaspiegel und der minimale Plasmaspiegel besonders niedrig. Dies spricht wiederum für die oben beschriebene Einführung einer RBV-Mono-Vorphase oder einer RBV-Loading-Dose.

Für ein eventuelles zukünftiges routinemäßiges TDM wäre eine weitere Schlussfolgerung aus den Tageskinetiken interessant: aufgrund der hohen intraindividuellen Variabilität lassen sich zu unterschiedlichen Tageszeiten abgenommene RBV-Plasmaspiegel schlecht vergleichen, daher ist stets darauf zu achten, die Spiegelmessung als Talspiegelbestimmung am Ende eines Dosierungsintervalls durchzuführen.

4.5 Ribavirintherapie bei terminaler Nierensinsuffizienz

Für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz gibt es bislang kein etabliertes Therapieregime in der Kombinationstherapie mit RBV und Peginterferon. Vielmehr wird eine GFR von unter 50 ml/min häufig als absolute (74), (67), oder relative (6), (83) Kontraindikation angesehen.

Unser Patient (Proband 55) wies eine GFR (MDRD) von 5 ml/min/1,73qm auf und benötigte eine Nierenersatztherapie. Durch die geringe Vorerfahrung einer HCV-Kombinationstherapie bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz wusste man nicht, ob diese hier überhaupt durchführbar sein würde, wie lange sie dauern sollte, welche Tagesdosis am geeignetsten sein würde und auch nicht, welcher RBV-Plasmaspiegel im Verhältnis zur Dosis entstehen würden. Neuere Studien weisen jedoch grundsätzlich auf eine starke, negative Korrelation zwischen Nierenfunktion und Ribavirinspiegel hin (s. o.), (170), (178), (177). Daraus resultiert eine erhöhte Toxizität dieser Therapie bei niereninsuffizienten Patienten. Das vorwiegend renal eliminierte RBV akkumuliert in wesentlich stärkerem Maße. Darüber hinaus bereiten sinkende Hb-Werte bei terminaler Niereninsuffizienz größere Schwierigkeiten, da renale und ribavirininduzierte Anämie einen additiven Effekt ausüben. Bei unserem Patienten wurde eine Therapiedauer über 48 Wochen (Genotyp 1b) und

eine geringe Eingangsdosis von 400 mg/die gewählt. Trotz dieser niedrigen Dosis entwickelte der Patient bereits in der ersten Therapiewoche RBV-Plasmaspiegel von über 1000 ng/ml, was den reziproken Zusammenhang von geringer GFR und hohen Spiegel bestätigt. Es schien angebracht, RBV aufgrund der schlechten Steuerbarkeit (lange Eliminationshalbwertszeit und fehlende Dialysierbarkeit) eher vorsichtig zu dosieren, daher wurde in Therapiewoche zwei eine Dosisanpassung auf nunmehr 200 mg/die vorgenommen.

Als limitierender Faktor stellte sich im Therapieverlauf erwartungsgemäß der Hb-Wert heraus. Dieser fiel zwar nicht sehr stark und schnell ab, doch lag er nach zwei Monaten unter 10 mg/dl. Im Hinblick auf einen Therapieerfolg schien es nicht sinnvoll, die Tagesdosis von 200 mg/d noch weiter zu reduzieren, da die RBV-Plasmaspiegel des niereninsuffizienten Patienten bereits leicht unter denen des Vergleichskollektivs lagen. Durch eine Verabreichung von Erythrozytenkonzentraten und Erythropoetin ließ sich die Anämie deutlich abmildern. Insgesamt wurde die Therapie gut vertragen, andere gravierende Nebenwirkungen traten nicht auf. Der Therapieverlauf war zunächst erfolgreich. Die Transaminasen normalisierten sich und die Viruslast war ab der 20. Therapiewoche negativ. Leider kam es zwei Monate nach Therapieende zu einem Relapse mit erneut messbarer HCV-RNA. Hier ist zu diskutieren, ob eventuell die verspätete virale Antwort einen Einfluss gehabt haben könnte. Abhilfe könnte ebenso wie bei den anderen Patienten ein höherer RBV-Plasmaspiegel zu Beginn der Therapie schaffen, sofern dieser toleriert wird. Neben einer höheren Dosierung wäre eine Verlängerung des Therapieregimes eine weitere Möglichkeit, den Therapieerfolg positiv zu beeinflussen.

Zusammenfassend kann man aus dem individuellen Heilversuch bei terminaler Niereninsuffizienz das Fazit ziehen, dass eine Therapie generell möglich ist. Besonders wichtig sind allerdings eine gute Überwachung der RBV-Spiegel und der sonstigen Blutwerte, was nur durch eine enge Anbindung der Patienten an eine Ambulanz geschehen kann. Noch zu evaluieren bleiben Leitlinien für eine solche Therapie, mit Festlegung der optimalen RBV Tagesdosis in Abstimmung mit der Nierenfunktion und eine geeignete Therapielänge.

5 Zusammenfassung

Bei der vorliegenden Dissertation wurden in der Einleitung epidemiologische Daten und die Standardtherapie der HCV-Infektion dargestellt, sowie Informationen über das Medikament RBV und die HPLC zusammengefasst.

Im methodischen Teil wurde eine HPLC-Methode zur Bestimmung des RBV-Plasmaspiegels beschrieben. Es handelt sich um eine Umkehrphasenchromatographie (RP-HPLC), welche mit einer Festphasenextraktionsmethode (SPE) zur Probenvorbereitung gekoppelt wurde. Die Datenerhebung zur RBV-Plasmaspiegelmessung erfolgte über einen Zeitraum von zwei Jahren. Bei einem Kollektiv von 155 gut charakterisierten, konsekutiven Patienten wurden insgesamt 627 Spiegel bestimmt.

Im Ergebnisteil wurden die Messwerte mittels deskriptiver Statistik dargestellt. Bei der Entwicklung der mittleren RBV-Konzentrationen im Therapieverlauf, zeigten sich auch nach Einstellung eines steady state in Woche vier noch relativ starke Änderungen. So betrug der mittlere RBV-Spiegel der Männer in Therapiewoche vier 1429,1 ng/ml, in Woche sechs 1571,2 ng/ml und im weiteren Verlauf 1892,5 ng/ml. Frauen wiesen durchweg um rund 300 ng/ml höhere Spiegel auf. Bei drei Patienten wurden trotz leitliniengerechter RBV-Dosierung keine Plasmaspiegel über 1000 ng/ml erreicht. Sie schlossen die Therapie trotzdem mit SVR ab. Bei acht Patienten stiegen die Spiegel später als erwartet noch an. Nur drei von ihnen waren Therapieresponder. Bei der Gegenüberstellung von INF-alfa 2a und 2b zeigte sich eine Tendenz, dass Patienten welche INF-alfa 2a erhielten ca. 200 ng/ml niedrigere RBV-Spiegel entwickeln. RBV-Plasmaspiegel-Tageskinetiken wurden zu Therapiebeginn, vor Erreichen des steady state und im steady state erstellt. Hier betrug der mittlere Plasmaspiegel nach Einzeldosis 371 ng/ml und nach Mehrfachdosierung 1601,5 ng/ml. Der T_{max} war im Vergleich zu den vorbeschriebenen pharmakokinetischen Angaben leicht nach hinten verschoben und lag bei 2-4h; C_{max} lag mit 586 ng/ml im Mittel nach Einzeldosis und 1601,5 ng/ml nach Mehrfachdosis etwas unter dem vorbeschriebenen Wert. Bei einem Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz wurde im Rahmen eines individuellen Heilversuchs unter engmaschiger Überwachung die HCV-

Kombinationstherapie im 48-Wochen-Regime durchgeführt. Dies erwies sich mit einer geringen Anfangsdosis von 400mg/d und dann Dosisreduktion auf 200mg/d, sowie Erythropoetin- sowie EK-Gaben als möglich. Der reziproke Zusammenhang zwischen RBV-Plasmaspiegel und der GFR bestätigte sich, indem der Patient trotz der geringen Dosis annähernd die Spiegel des Vergleichskollektivs hatte. Nach Therapieende kam es zu einem Relapse, das heißt zu der erneuten Messbarkeit einer Viruslast. Insgesamt fiel bei den durchgeführten Messungen auf, dass sich in den ersten Therapiewochen sehr niedrige C_{min} , Talspiegel und mittlere RBV-Plasmakonzentrationen zeigten und RBV erst spät akkumulierte. Außerdem auffällig waren eine hohe intra- und interindividuelle Variabilität der Spiegel.

Im Diskussionsteil wurde die Entwicklung der HPLC-Methode erläutert und die Qualitätssicherung analysiert. Dabei erwies sie sich als hinsichtlich Retention, Selektivität und System gut optimierte und validierte Messmethode, die zuverlässig genaue qualitative und quantitative Ergebnisse liefert und sich als Standardmethode für den Klinikalltag eignet. Anschließend wurde der wichtige Stellenwert des RBV-Plasmaspiegels für Therapiesicherheit- und Effizienz in der HCV-Behandlung herausgearbeitet. Vor allem die initialen Plasmaspiegel besitzen eine hohe prädiktive Bedeutung sowohl für ein frühes, als auch für ein dauerhaftes, virologisches Ansprechen, als auch für die Entstehung einer RBV-assoziierten Anämie. Sodann wurde zu den erhobenen Messergebnissen Stellung genommen, und daraus resultierende Schlussfolgerungen bezüglich einer Optimierung der Hep-C-Therapie kommentiert. Diese sind konkret zusammengefasst: Einführung einer RBV-Loading-Dose oder RBV-Mono-Vorphase, Dosierung unter Berücksichtigung der Nierenfunktion, Durchführung der Therapie bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz unter Versuch einer längeren Therapiedauer und ebenso höheren Anfangsdosen, Einführung eines TDM in die HCV-Therapie mit Evaluation des therapeutischen Bereichs (Zielkonzentration unter Berücksichtigung der Toxizitätsgrenze und der nötigen RBV-Mindestkonzentration für einen SVR), sowie Entnahme des Blutes am Ende eines Dosierungsintervalls von 12h.

6 Anhang

Tabellen mit Daten der Validierung

03.11.2004 **Messung: RBV06.12.04-250µlCalib.rnet Säule: Reprosil-PUR C18-AQ 250x2mm ID No.300604/20701**

100% Recovery anhand 3 unterschiedlicher Konzentrationen

Der Ansatz der Gebrauchslösungen ist äquivalent zu etwalgigen Probenansätzen gelöst wird hier mit 600µl LM d.h. die RBV-Menge muss als 2-fache Menge einpip. werden.

Konz. ng/ml	100% RECOVERY						Nach Aufarbeitung								
	210nm			230nm			210nm			230nm			% Recovery	HEIGHT	% Recovery
	AREA	HEIGHT	AREA	HEIGHT	AREA	HEIGHT	AREA	HEIGHT	AREA	HEIGHT	AREA	HEIGHT			
100	60535	2837	21178	996	52114	2459	25060	1033	25060	1033	25060	1033	*Quelle 1		
100µl Lsg.l	61389	2933	20987	1011	49716	2403	25294	1038	25294	1038	25294	1038	*Quelle 2		
ad 600µl LM	62179	2985	20923	1023	52828	2985	22231	1148	22231	1148	22231	1148	*Quelle 3		
MW	61368	2918	21029	1010	51553	2616	24195	1073	24195	1073	24195	1073	82		
1000	578078	26652	200991	9318	477560	23307	174940	8387	174940	8387	174940	8387	*Quelle 1		
50µl Lsg.l	577617	27172	201775	9480	467707	23264	172160	8387	172160	8387	172160	8387	*Quelle 2		
ad 600µl LM	580022	27732	202216	9682	499630	29307	173091	10360	173091	10360	173091	10360	*Quelle 3		
MW	578572	27185	201661	9493	481832	25293	173397	9045	173397	9045	173397	9045	86		
6000	3409737	191759	1192662	67130	2945096	133896	1068220	47605	1068220	47605	1068220	47605	*Quelle 1		
300µl Lsg.l	3402269	193841	1191446	67972	2811703	133884	1003080	47605	1003080	47605	1003080	47605	*Quelle 2		
ad 600µl LM	3411744	195811	1193548	68583	2928371	170208	1046330	59739	1046330	59739	1046330	59739	*Quelle 3		
MW	3407917	193804	1192552	67895	2895087	145896	1038877	87	1038877	87	1038877	87	76		
*Quelle 1	Calib.-Proben v.28.10.04	Analysenzeit:	03.11.2004	MW	7.19	SD	81	MW	81	SD	81	5.17			
*Quelle 2	Calib.-Proben v.28.10.04	Analysenzeit:	03.11.2004	11:13:29	bis11:18:08										
*Quelle 3	Calib.-Proben v.28.10.04	Analysenzeit:	03.11.2004	10:34:36	bis10:34:48										
	Calib.-Proben v.28.10.04	Analysenzeit:	03.11.2004	17:27:14	bis19:26:58										

ERGEBNIS Die Recovery bei 210nm liegt bei 82%
Die Recovery bei 230nm liegt bei 81%

Die Wiederfindung von Ribavirin nach PBA-Säulenextraktion liegt bei 81,6%

- RBV = Ribavirin
- ID = Innendurchmesser
- LM = Lösungsmittel
- einpip = einpipettiert
- Konz = Konzentration
- MW = Mittelwert
- SD = Standardabweichung
- PBA = Phenyl-Boronsäure
- Lsg = Lösung
- Calib = Kalibration

Abb. 40: recovery

Erläuterung zu den Datenquellen		100	3000	6000	ng/ml	Standzeit des gel. Eluats
Cyclen	Messtag	Ansatz vom:				
1	03.11.2004	28.10.2004	031104RBV-Calib-Kontrollen001 bis 006	3328	6332	6 Tage bei -20°C
2	06.12.2004	28.10.2004	061204RBV-Stability001 bis 006	3281	6498	39 Tage bei -20°C
3	06.12.2004	28.10.2004	061204RBV-Stability001 bis 006	3201	6220	
4	07.12.2004	07.12.2004	071204RBV-Stability-Ref.0Std.01 bis 009	2869	5849	0Std.Raumtemp.
5	08.12.2004	07.12.2004	081204RBV-Stability-Ref.24Std.001 bis 009	2971	6252	24 Std. Raumtemp.
6	09.12.2004	07.12.2004	091204RBV-Stability-Ref.48Std002 bis 009	3204	6252	48 Std. Raumtemp
7	13.12.2004	13.12.2004	131204RBV-Stability-Ref.0Std.002 bis 012	2972	6210	0Std.Raumtemp.
8	14.12.2004	13.12.2004	141204RBV-Stability-Ref.24Std.078 bis 088	2915	5876	24 Std. Raumtemp.
9	16.12.2004	13.12.2004	151204RBV-LOQ-wdh118 bis128	2944	5912	60 Std. Raumtemp.
		28.10.2004	151204RBV-Calib-Kontrollen130 bis 136	3156	6614	48 Tage bei -20°C
			MW	3084.1	6201.5	
			SD	167.1	257.0	
			R.E. %	-2.8	-3.4	
			V.C. %	5.4	4.1	VC-MW = 5.6%

ERGEBNIS Der VC liegt im Mittel bei 5.6%

RBV = Ribavirin

ID = Innendurchmesser

Calib = Kalibration

gel = gelöstes

LOQ = limit of quantification

R.E.% = Richtigkeit

V.C.% = Präzision

Ref. = Referenz

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

VC = Variationskoeffizient

Abb. 41: interday-stability

14.12.2004 **RBV-Intraday-Stability**

Messung: RBV06.12.04-250µlCalib.met Säule: Reprisil-PUR C18-AQ 250x2mm ID No.300604/20701

Konz. ng/ml	230nm	Daten aus der Patienten-Stability-Messung					
		Aus Ansatz A	3000	Aus Ansatz A	6000	Aus Ansatz A	Aus Ansatz A
	107			3219		6807	Aus Ansatz A
	90			3033		6468	
	109			2998		7073	
	99	Aus Ansatz B		2971	Aus Ansatz B	5847	Aus Ansatz B
	102			3073		6252	
	104			3061		5657	
	115	Aus Ansatz C		3057	Aus Ansatz C	6780	Aus Ansatz C
	103			3510		7158	
	116			3644		6418	
	102	Ref.0Std.07.12		2813	Ref.0Std.07.12	5395	Ref.0Std.07.12
	93			2869		5849	
	99			2856		5325	
MW	105.00		MW	3174.00		6495.56	
SD	8.03		SD	240.97		517.21	
R.E.%	-5.00		R.E.%	-5.80		-8.26	
V.C.%	7.65		V.C.%	7.59		7.96	
							VC-MW = 7.73

ERGEBNIS

Der VC liegt im Mittel bei 7.73%

RBV = Ribavirin

ID = Innendurchmesser

MW = Mittelwert

SD =
Standardabweichung

V.C.% = Präzision

R.E.% = Richtigkeit

Ref. = Referenz

VC =
Variationskoeffizient

Abb. 42: intraday-stability

Methoden-	Stability	Messung: RBV28.10.04-250µlCalib.met	Säule: Reprisil-PUR C18-AQ 250x2mm ID No.300604/20701
------------------	------------------	-------------------------------------	---

Jeder Konzentration wird 3-fach angesetzt mit einem Serum (BSA)-Einsatzvolumen von 0.25ml und später jeweils 50µl inj. und vermessen.
 Die Ansätze setzen sich wie folgt zusammen:

Konz. 100	Konz. 3000	Konz. 6000	ng/ml	ISTD	Lösen	Inj.
50µl Lsg. II	75µl Lsg. I	150µl Lsg. I		20µl	300µl LM	50µl
250µl BSA	250µl BSA	250µl BSA				

Ansätzen Vermessen PBA-Verbr.

Ansatz I	Trockenes Eluat 30Tage bei -20°C lagern	11.11.2004	13.12.2004	9
Ansatz II a	Gelöstes Eluat 7Tage bei -20°C lagern	06.12.2004	13.12.2004	9
Ansatz II b	Gelöstes Eluat 7Tg./ -20°C 3x tauen	06.12.2004 08.12.2004 09.12.2004	13.12.2004	9
Ansatz (III)	Gel. Eluat 0-24-48Std. RT	07.12.2004	07.12.2004 ***	
***=Referenzproben v.07.12.04 d. Pat.-Stability		24Std. 48Std.	08.12.2004 09.12.2004	
Referenzansatz		13.12.2004	13.12.2004	9
				36

RBV = Ribavirin
 ID =
 Innendurchmesser
 Lsg = Lösung
 BSA = bovine serum albumin
 ISTD = IS = interner Standard
 Inj. =
 Injektionsvolumen
 PBA = Phenyl-Boronsäure

Abb. 43: stability

Patienten- HEIGHT-Intgr.	Stability		Calibration: RBV06.12.04-250µlCalib.met				Säule: Rösil-PUR C18-AQ 250x2mm ID No.300604/20701			
	230 nm	100	230 nm	3000	230 nm	230 nm	230 nm	6000	230 nm	230 nm
Konz.:µmol/L	Gemessen	HEIGHT 230nm	AREA ISTD	Gemessen	HEIGHT 230nm	AREA ISTD	Gemessen	HEIGHT 230nm	AREA ISTD	AREA ISTD
Ansatz A	107	1112	55985	3219	30457	57145	6118	66642	65915	
30 Tage -20°C	90	996	58753	3033	29583	58996	5811	71183	74132	
Mi. 08.11.04	109	1224	60565	2998	29148	58170	6509	70567	65622	
MW	102	1111	58434	3083	29729	58070	6146	69464	68555	
SD	10	114	2307	119	667	880	350	2463	4822	
C.V.%	10.236	10.265	3.947	3.853	2.242	1.515	5.692	3.546	7.042	
R.E. %	-2.000			-2.778			-2.433			
Ansatz B	98	1245	68022	3307	32156	58738	5647	50657	54280	
7 Tage -20°C	77	1097	76624	3027	28941	57738	5919	56189	57442	
3x freeze/thawed	73	1045	73175	3525	32073	54969	5945	57503	58532	
MW Mi. 01.12.04	83	1129	72607	3286	31057	57148	5837	54783	56752	
SD	13	104	4329	250	1833	1952	165	3633	2205	
C.V.%	16.245	9.191	5.962	7.596	5.901	3.416	2.828	6.632	3.892	
R.E. %	17.333			-9.544			2.717			
Ansatz C	94	1259	71570	2482	28185	68498	6084	71341	70966	
7 Tage 4°C	79	1151	75472	2834	31667	67449	5762	71362	74942	
Mi. 01.12.04	95	1364	76615	3070	35848	70514	5209	64987	75476	
MW	89	1258	74552	2795	31900	68820	5685	69230	73792	
SD	9	107	2645	296	3837	1558	443	3675	2464	
C.V.%	10.033	8.466	3.548	10.586	12.028	2.263	7.785	5.308	3.340	
R.E. %	10.667			6.822			5.250			
Ansatz D	98	966	52697	2918	25885	53567	5783	52827	55275	
24Std/Raumtemp.	93	948	54289	3099	27670	53925	5931	53518	54600	
Di. 07.12.04	86	895	54911	2893	26627	55562	5303	47958	54715	
MW	92	936	53966	2970	26727	54351	5672	51434	54862	
SD	6	37	1142	112	897	1064	328	3030	360	
C.V.%	6.528	3.942	2.116	3.785	3.355	1.957	5.788	5.892	0.657	
R.E. %	7.667			1.000			5.461			

RBV = Ribavirin, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, C.V.% = Präzision, R.E.% = Richtigkeit

Abb. 44: stability

Inkubationsansatz	98	1108	60491	3102	29087	56630	6234	65301	63304
60min bei 56°C	95	1033	57997	3088	30526	59713	6468	67695	63349
Mi. 15.12.04	90	968	56977	3129	32273	62293	6528	70261	65146
MW	94	1036	58488	3106	30629	59545	6410	67752	63933
SD	4	70	1808	21	1595	2835	155	2480	1051
C.V.%	4.284	6.760	3.091	0.671	5.209	4.761	2.423	3.661	1.643
R.E. %	-3.285			0.566			-1.859		

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

C.V.% = Präzision

R.E.% = Richtigkeit

Abb. 45: Fortsetzung stability

23.12.2004

LOD

Theoretische Annahme

Auf Grund der LLQ-Probenansätze und deren chromatographischen Läufe, kann angenommen werden, dass das LOD bei 0.042ng absolut-Signal liegt.

Erläuterung:

RBV-Lsg. III 0.005mg/100ml
entspr. 5000ng/100.000µl

100000.000 5000.000000
50 x x=2.5ng

2.5ng/300µl LM und hiervon 50µl inj entspr. einer absoluten Aufgabemenge auf die Säule von:

300 2.5
50 x x=0.42ng abs.Signal, dies entspr.dem Signal der LLQ von 10ng/ml bei

einem Ansatzvol.von 0.250ml Serum. Von hier ausgehend kann angenommen werden, dass ein Signal mit dem 10tel der Größe des LLQ (Faktor 10) gerade noch detektiert werden kann.

Schlussfolgerung

ERGEBNIS Faktor 10 gleich einer Signalgröße von 0.042ng entspr.fiktiv einem Wert von 1ng/ml

ERGEBNIS

Der LOD für RBV liegt bei 0.042ng absolut Signal

RBV = Ribavirin

Lsg. = Lösung

LOD = limit of detection

LLQ = lower limit of quantification

LM = Lösungsmittel

Abb. 46: limit of detection

13.12.2004		Ribavirin-LLQ				HPLC3				Messung: RBV06.12.04-250µlCalib.met				Säule: Reprosil-PUR C18-AQ 250x2mm ID No.300604/20701				
Konz. ng/ml	1		3		5		10		Gemessen	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm
	Gemessen	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	Gemessen	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm										
	8.2	214	60577	13.3	273	62393	7.4	211	62058	222	60574							
	9.8	239	63129	11.6	249	60931	5.5	183	59510	264	60000							
	8.6	222	61689	11.6	237	58099	3.3	161	59376	243	57950							
MW	8.867			12.167			5.400											
SD	0.833			0.981			2.052											
C.V.%	9.39087			8.06709			37.99682											
R.E. %	-786.66667			-305.55556			-8.00000											
Konz. ng/ml	20		30		50													
	Gemessen	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	Gemessen	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm	HEIGHT 230nm
	23.4	392	64173	30.2	413	57785	47.7	652	64978									
	19.6	332	61455	29.8	435	61311	57.7	666	56972									
	21.5	358	62630	32.9	447	58761	50.2	604	57806									
MW	21.500			30.967			51.867											
SD	1.900			1.686			5.204											
C.V.%	8.83721			5.44527			10.03374											
R.E. %	-7.50000			-3.22222			-3.73333											
ERGEBNIS	Das LLQ liegt bei 10ng/ml entsprechend 0.21µmol/L. Trotz mehrfacher Bemühung den Bereich auf unter 10ng/ml zu drücken konnte keine Verbesserung zum derzeitigen Stand erreicht werden.																	
Bemerkung	Die Kalibration wurde gewichtet. Linear 1/Response (Siehe auch Folie der Kalibration vom 06.12.04)																	
ERGEBNIS	Das LLQ für RBV liegt bei 10ng/ml (0.21µmol/l) Das ULQ für RBV liegt bei 18000ng/ml (73.8µmol/l)																	

RBV = Ribavirin

ID = Innendurchmesser

LLQ = lower limit of quantification

ULQ = upper limit of quantification

Konz. = Konzentration

MW = Mittelwert

SD = Standardabweichung

ISTD = IS = interner Standard

C.V.% = Präzision

R. E. % = Richtigkeit

Abb. 47 lower and upper limit of quantification

Tabelle mit Daten des Patientengesamtkollektivs

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
1	45	05.08.1978	10.02.2005	13,00	800	913	4	0	1	61	13,1	1	15,3	39	45
1	125	05.08.1978	17.03.2005	12,00	800	1076	9	0	1	61	13,1	1	14,6	27	38
1	150	05.08.1978	31.03.2005	10,00	800	1408	11	0	1	61	13,1	1	13,9	21	23
1	193	05.08.1978	20.04.2005	11,50	800	1340	14	0	1	61	13,1	1	14,4		20
1	208	05.08.1978	11.05.2005	11,00	800	1077	17	0	1	61	13,1	1	14,1		19
1	311	05.08.1978	01.07.2005	8,50	800	1278	24	0	1	61	13,1	1	13,2	24	21
1	372	05.08.1978	19.08.2005	13,00	800	872	31	0	1	61	13,1	1			
1	423	05.08.1978	06.10.2005	12,00	800	1192	38	0	1	61	13,1	1	14,3	21	19
2	62	07.05.1954	01.03.2005	2,50	1000	1307	1	0	1	71	14,1	1	15,9	50	76
2	157	07.05.1954	05.04.2005	3,00	1000	1757	6	0	1	70	14,3	1	14,6	35	48,1
2	184	07.05.1954	19.04.2005	3,00	1000	1951	8	0	1	69	14,5	1	13,1	28,3	35
2	215	07.05.1954	17.05.2005	2,00	1000	2242	12	0	1	68	14,7	1	12,8	24,5	28,8
2	267	07.05.1954	14.06.2005	1,50	1000	2040	16	0	1	68	14,7	1	11,9	23,7	28
2	351	19.04.1954	09.08.2005	2,50	1000	2277	24	0	1	68	14,7	1	12,4	24	21,8
2	411	07.05.1954	04.10.2005	3,50	1000	2074	32	0	1	67,3	14,9	1	11,8		18,9
2	477	07.05.1954	29.11.2005	2,50	1000	2832	40	0	1	68	14,7	1	12,2	20,6	12,2
2	100	07.05.1954	15.03.2005	13,00	1000	668	3	0	1	71	14,1	1	13,9	41,9	68,5
2	110	07.05.1954	22.03.2005	2,00	1000	1541	4	0	1	70	14,3	1	14,4	37,6	56,5
2	87	07.05.1954	08.03.2005	1,50	1000	921	2	0	1	71	14,1	1	15,0	61	87,6
2	88	07.05.1954	08.03.2005	3,00	1000	833	2	0	1	71	14,1	1	15,0		
2	86	07.05.1954	08.03.2005		1000	604	2	0	1	71	14,1	1	15,0		

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
3	457	05.09.1973	11.11.2005	1,50	800	1642	4	0	2	58	13,8	3		66	133
3	556	05.09.1973	17.02.2006	13,00	800	1490	17	0	2	56,5	14,1	3		43,3	48,2
3	582	05.09.1973	24.03.2006	13,50	800	2030	22	0	2	56	14,3	3	11,4	33,7	38,8
4	213	17.04.1958	11.05.2005	9,00	1000	739	2	1	2	66,5	15,0	3	9,2		81
4	262	17.04.1958	08.06.2005	8,00	1000	1198	6	1	2	64	15,6	3	10,9		
4	373	17.04.1958	19.08.2005	2,00	1000	1734	16	1	2	62	16,1	3	10,4	98	63
4	394	17.04.1958	14.09.2005	1,50	1000	1278	20	1	2	61	16,4	3	10,6	102	65
4	483	17.04.1958	25.11.2005	1,50	800	2108	29	1	2	62	12,9	3	9,5	122	64
4	513	17.04.1958	05.01.2006	3,00	800	2177	35	1	2	60	13,3	3	10,3	104	49
4	628	17.04.1958	09.06.2006	2,50	800	1709	55	1	2	55	14,5	3	10,5	100	50
4	425	17.04.1958	12.10.2005	1,50	800	1526	24	1	2	62	12,9	3	11,2		
5	161	24.06.1955	06.04.2005	3,50	1000	2932	4	0	2	64	15,6	1	12,5	34,1	40,8
5	250	24.06.1955	07.06.2005	2,00	1000	2524	8	0	2	62	16,1	1	11,7	36,5	40,3
5	304	24.06.1955	06.07.2005	2,00	1000	2433	12	0	2	62	16,1	1	11,8	26,8	22,8
5	485	24.06.1955	12.12.2005	2,00	1000	2266	41	0	2	60	16,7	1	11,7	42,3	25,1
5	549	24.06.1955	06.02.2006	2,00	1000	3257	48	0	2	62,5	16,0	1	11,6	35,4	25,6
6	44	08.07.1955	07.02.2005	2,50	1000	1705	20	0	1	66	15,2	1	12,7	25	16
6	69	08.07.1955	23.02.2005	15,50	1000	1519	23	0	1	66	15,2	1	13,1	23	12
6	308	08.07.1955	05.07.2005	3,00	1000	1718	42	0	1	66	15,2	1	12,4	25	15
7	624	02.06.1958	12.06.2006	3,00	1000	2216	13	0	1	63	15,9	3	15,6	55,6	95,9
8	574	19.11.1978	14.03.2006	2,00	1000	2607	2	0	1	66	15,2	3	12,0	47,5	74,2

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
8	584	19.11.1978	28.03.2006	12,50	1000	1988	4	0	1	65,5	15,3	3	11,2	31,7	35,8
8	612	19.11.1978	23.05.2006	1,50	1000	3243	12	0	1	64,7	15,5	3	11,7	28,5	20,8
9	374	04.01.1979	29.08.2005	1,00	1000	1541	3	0	1	73,5	13,7	1	14,4		
9	392	04.01.1979	13.09.2005	1,00	1000	1492	4	0	1	73	13,7	1	14,1	30	34
9	429	04.01.1979	17.10.1979		1000	1020	9	0	1	67	15,0	1	13,6	33	47
9	465	04.01.1979	07.11.2005	6,50	1000	1277	12	0	1	72	13,9	1			
9	540	04.01.1979	30.01.2006	9,50	1000	1321	24	0	1	73,8	13,6	1	14,1	30	42
10	615	08.05.1974	23.05.2006	2,50	1200	2008	2	0	1	101,2	11,9	1	15,2		
10	625	08.05.1974	13.06.2006	2,50	1200	2007	5	0	1	100,5	11,9	1	14,3	26	26
10	635	08.05.1974	11.07.2006	3,00	1200	2024	8	0	1	100	12,0	1	13,7	26	34
10	660	08.05.1974	08.08.2006	1,50	1200	1790	12	0	1	100	12,0	1	14,2	26	31
11	616	26.05.1961	23.05.2006	3,00	1000	2389	8	0	1	75	13,3	3	14,3	25,2	17,5
11	643	26.05.1961	18.07.2006	13,00	1000	2307	16	0	1	71,6	14,0	3	13,0	21,3	9,8
12	256	20.06.1975	06.06.2005	1,50	1000	1708	4	0	1	69	14,5	2	14,2	30	23
12	292	20.06.1975	27.06.2005	2,00	1000	2062	7	0	1	66	15,1	2	13,5		16
12	310	20.06.1975	04.07.2005	1,50	1000	1135	8	0	1	68,7	14,6	2	13,6	27	16
12	347	20.06.1975	01.08.2005	1,50	1000	1513	12	0	1	67	14,9	2	12,8	27	16
12	388	20.06.1975	29.08.2005	1,00	1000	1902	16	0	1	67	14,9	2	13,4	27	21
12	407	20.06.1975	26.09.2005	1,00	1000	1682	20	0	1	67	14,9	2	13,5	28	16
12	449	20.06.1975	24.10.2005	1,50	1000	2038	24	0	1	68	14,7	2	13,5	33	17
13	589	23.11.1975	04.04.2006	2,50	1000	2464	2	0	1	65,9	15,2	1	13,9	20,2	22,2

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
13	626	23.11.1975	13.06.2006	2,50	1000	3360	12	0	1	64,5	15,5	1	10,9	17,3	16,1
14	505	25.01.1962	19.12.2005	3,50	1000	1954	21	0	1	67	14,9	1	15,1	41	41
14	525	25.01.1962	19.01.2006	3,00	1000	2678	25	0	1	67	14,9	1	14,9		27
14	569	25.01.1962	03.03.2006	2,00	1000	3079	27	0	1	68	14,7	1	13,4	34	28
15	417	16.11.1969	05.10.2005	1,50	800	1600	9	0	2	85	9,4	1			
15	497	16.11.1969	19.12.2005	1,00	800	1715	19	0	2	82,5	9,7	1	10,7	30,9	36
16	251	29.03.1975	08.06.2005	2,00	1200	2237	21	0	2	75	16,0	1	11,5	25	17
16	325	29.03.1975	13.07.2005	2,50	1200	2284	26	0	2	67,5	17,8	1	12,2	22	14
16	444	29.03.1975	18.10.2005	1,50	1200	1919	38	0	2	68	17,6	1	12,6	27	30
16	518	29.03.1975	11.01.2006	2,00	1200	1372	50	0	2	72,5	16,6	1		24	17
17	384	21.10.1947	06.09.2005	3,00	800	2393	2	0	2	82	9,8	1	13,0		
17	397	21.10.1947	20.09.2005	3,00	1000	2981	4	0	2	81	12,3	1	11,2	26	24
17	434	21.10.1947	18.10.2005	2,50	1000	3517	8	0	2	77	13,0	1			
17	467	21.10.1947	15.11.2005	3,00	1000	4029	12	0	2	74	13,5	1			
17	476	21.10.1947	28.11.2005	4,00	1000	4219	14	0	2	73	13,7	1	9,3	30,6	29,2
17	598	21.10.1947	02.05.2006	1,50	800	3193	35	0	2	72,5	11,0	1	9,9	21	19
17	649	21.10.1947	25.07.2006	1,00	800	3674	48	0	2	69	11,6	1	9,3	26	23
18	66	22.09.1976	02.03.2005	10,00	1000	1393	16	0	1	66	15,1	1	12,9	24	21
18	199	22.09.1976	02.05.2005	22,00	1000	1191	25	0	1	66	15,1	1	12,5	22	20
18	295	22.09.1976	29.06.2005	1,00	1000	1727	33	0	1	64	15,6	1	12,2		21
19	634	31.05.1963	27.06.2006	8,00	1000	1531	5	0	1	63,5	15,7	1	15,3	25,7	31,6

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
19	651	31.05.1963	26.07.2006	9,50	1000	2028	9	0	1	63,5	15,7	1	14,6	26,2	25,5
19	666	31.05.1963	14.08.2006	11,00	1000	2053	12	0	1	61	16,4	1	14,5	26,3	24,5
20	10	14.02.1979	14.12.2004		1000	2184	16	0	1	66	15,2	3	13,6	65,7	71,3
21	239	24.10.1980	01.06.2005	9,00	800	1602	4	0	2	48	16,7	3	10,5	26	22
21	326	24.10.1980	13.07.2005	8,50	800	1663	10	0	2	48	16,7	3	10,8	25	23
21	355	24.10.1980	10.08.2005	8,00	800	2094	14	0	2	49	16,3	3	10,5	19	16
21	454	24.10.1980	02.11.2005	9,00	800	2010	24	0	2	51,5	15,5	3	10,2	22	21
21	539	24.10.1980	25.01.2006	7,50	800	2544	36	0	2	53,5	14,9	3	10,7	25	20
22	46	28.01.1963	08.02.2005	2,00	1000	938	4	0	1	65	15,4	3	14,5		38
22	90	28.01.1963	08.03.2005	1,00	1000	1032	8	0	1	67	14,9	3	14,5	28	36
22	240	28.01.1963	31.05.2005	16,00	1000	561	20	0	1	65	15,4	3	14,4	25	12
23	619	25.09.1972	29.05.2006	2,00	1200	1825	10	0	1	89,5	13,4	1	14,3	33,3	40,4
23	640	25.09.1972	10.07.2006	2,00	1200	1244	16	0	1	84	14,3	1	14,3	38,1	47,1
24	427	03.02.1965	10.10.2005	24,00	800	818	2	0	2	53	15,1	1	14,6	33	28
24	446	03.02.1965	17.10.2005	11,50	800	1177	3	0	2	53	15,1	1	14,2	29	16
24	450	03.02.1965	24.10.2005	10,00	800	1418	4	0	2	53	15,1	1	12,9	23	15
24	474	03.02.1965	21.11.2005	10,00	800	2046	8	0	2	50	16,0	1	12,2		15
24	482	03.02.2005	28.11.2005	24,00	800	2032	9	0	2	50	16,0	1	12,1	20	13
24	538	03.02.1965	26.01.2006	10,00	800		17	0	2	47,5	16,8	1	10,7	19	12
25	368	04.10.1965	23.08.2005	16,30	1200	1222	2	0	1	95	12,6	1	15,4		
25	377	04.10.1965	30.08.2005	17,00	1200	1460	5	0	1	92,8	12,9	1	13,3	25	12

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
25	403	04.10.1965	27.09.2005	17,00	1200	1590	8	0	1	91,1	13,2	1	12,2	25	9
25	452	04.10.1965	31.10.2005	3,30	1200	1667	12	0	1	90	13,3	1	13,2	21	8
25	479	04.10.1965	29.11.2005	15,00	1200	1399	17	0	1	88	13,6	1	14,2	26	16
25	524	04.10.1965	17.01.2006	16,00	1200	1630	24	0	1	97,2	12,3	1	13,4	23	11
25	592	04.10.1965	11.04.2006	12,00	1200	1799	36	0	1	98	12,2	1	13,3	20	12
25	636	04.10.1965	04.07.2006	16,50	1200	1184	48	0	1	97,5	12,3	1	12,8	20	10
26	285	07.12.1972	28.06.2005	2,25	1000	2135	4	0	1	71	14,1	2	11,9	29,5	23
26	343	07.12.1972	02.08.2005	2,00	1000	1530	8	0	1	71	14,1	2	12,8	25	15,3
26	369	07.12.1972	23.08.2005	1,30	1000	2189	12	0	1	68	14,7	2	11,0	26,3	20,9
26	399	07.12.1972	20.09.2005	2,50	1000	1849	16	0	1	67,5	14,8	2	13,4	25,4	19,5
27	43	29.11.1983	07.02.2005	2,00	800	892	2	0	2	58	13,8	1	13,7	46	59
27	71	29.11.1983	23.02.2005	1,50	800	1167	4	0	2	58	13,8	1	13,0	45	66
27	212	29.11.1983	10.05.2005	5,00	800	1155	15	0	2	58	13,8	1	12,0	51	60
27	252	29.11.1983	07.06.2005	3,00	800	1656	19	0	2	57	14,0	1	12,5	39	45
27	424	29.11.1983	30.09.2005	11,00	800	974	35	0	2	57	14,0	1	13,6	40	26
28	385	05.04.1965	05.09.2005		1000	919	2	0	1	76	14,0	3	15,8	20	17
29	514	05.07.1976	05.01.2006	11,00	1200	1391	3	0	1	89	13,5	1	14,4		78
29	550	05.07.1976	07.02.2006	10,50	1200	2294	8	0	1	87	13,8	1	13,2	29	43
30	15	25.07.1965	10.01.2005	4,00	800	2841	24	0	1	66	12,1	3	11,1	40,4	42,6
31	263	18.11.1944	06.06.2005	14,00	800	733	42	0	1	79	10,1	1			
32	9	11.09.1963	14.12.2004		1000	1849	12	0	1	67	15,0	1	13,6	25,7	23,3

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
33	551	07.07.1981	13.02.2006	9,00	1200	1413	4	0	1	80	15,0	4	15,4	25,9	31,5
33	610	07.07.1981	22.05.2006	4,00	1200	2811	18	0	1	80	15,0	4	12,4	22,7	22
33	659	07.07.1981	07.08.2006	4,00	1200	2496	28	0	1	80	15,0	4	12,2	22,3	26,1
34	20	03.10.1953	25.01.2005	13,00	1000	1177	3	0	1	62	16,1	1	13,9	137	236
34	36	03.10.1953	08.02.2005	1,50	1000	2444	5	0	1	60	16,7	1	10,3	113	151,2
34	55	03.10.1953	22.02.2005	1,50	1000	1598	7	0	1	61	16,4	1	10,5	97,2	121
34	217	03.10.1953	17.05.2005	2,50	1000	2594	13	0	1	59	17,0	1	9,8	83,2	85,9
34	268	03.10.1953	14.06.2005	12,00	1000	2452	22	0	1	58	17,2	1	9,0	72,6	78,8
34	350	03.10.1953	09.08.2005	7,50	1000	2228	30	0	1	59	17,0	1	9,3	60,7	56,1
34	458	03.10.1953	14.11.2005	14,00	1000	2143	45	0	1	57	17,5	1	9,8	69,5	77,3
34	491	03.10.1953	13.12.2005	13,00	1000	1897	59,8	0	1	59,8	16,7	1	9,7	75,9	98,2
34	115	03.10.1953	22.03.2005	11,50	1000	1586	11	0	1	60	16,7	1	11,1	89,5	106,2
34	116	03.10.1953	22.03.2005	0,50	1000	1773	11	0	1	60	16,7	1	11,1		
34	117	03.10.1953	22.03.2005	1,50	1000	2112	11	0	1	60	16,7	1	11,1		
35	648	08.04.1950	24.07.2006	4,00	1000	2787	13	0	1	55	18,0	1	10,4	34,5	24,8
36	607	30.01.1934	18.05.2006	16,00	600	2705	4	0	2	58	10,3	2	10,9	49	34
37	235	30.09.1976	31.05.2005	2,00	800	1061	2	0	1	83	9,6	3	15,5	51,1	109,1
37	286	30.09.1976	28.06.2005	2,50	800	1570	12	0	1	81	9,9	3	14,3	53	91,6
37	352	30.09.1976	09.08.2005	1,50	800	1493	12	0	1	83	9,6	3	14,4	38,9	68,7
38	335	25.08.1970	26.07.2005	2,50	600	1691	16	0	2	64	9,4	3	9,4	15,9	9
39	13	24.02.1954	21.12.2004	2,50	600	1643	24	0	1	60	10,0	3	10,4		

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
40	471	07.01.1964	22.11.2005	13,30	1000	1158	2	0	1	78	12,8	1			
40	508	07.01.1964	03.01.2006	1,50	1000	2930	8	0	1	77	13,0	1	12,2	26	31
40	543	07.01.1964	31.01.2006	11,50	1000	2391	12	0	1	77,7	12,9	1	12,5	21	20
40	572	07.01.1964	14.03.2006	2,00	1000	3039	18	0	1	75	13,3	1	12,4	22	22
40	595	07.01.1964	25.04.2006	3,00	1000	2899	24	0	1	73	13,7	1	11,9	22	17
40	642	07.01.1964	18.07.2006	2,00	1000	3374	36	0	1	73,1	13,7	1	10,9	24	23
41	70	13.07.1944	21.02.2005	3,50	800	2666	20	0	2	50	16,0	1	9,7	64	66
41	123	13.07.1944	16.03.2005	3,00	400	1998	24	0	2	48,5	8,2	1	10,3	62	62
41	201	13.07.1944	03.05.2005	4,00	400	2716	27	0	2	45	8,9	1	10,9	33	39
41	259	13.07.1944	07.06.2005	4,50	400	2435	31	0	2	45	8,9	1	12,6	39	37
41	272	13.07.1944	13.06.2005	2,00	400	2326	32	0	2	45	8,9	1	11,0	37	33
41	280	13.07.1944	20.06.2005	2,50	400	3210	33	0	2	45	8,9	1	10,0		31
41	291	13.07.1944	27.06.2005	0,50	400	3652	34	0	2	45	8,9	1	9,0		
41	313	13.07.1944	04.07.2005	3,00	400	2110	35	0	2	45	8,9	1	9,0	38	39
41	337	13.07.1944	25.07.2005	3,00	400	2771	38	0	2	45	8,9	1	9,2		
41	348	13.07.1944	01.08.2005	2,50	400	2254	39	0	2	43	9,3	1	9,9		29
41	353	13.07.1944	08.08.2005	3,00	400	3300	40	0	2	43	9,3	1	10,1	38	33
41	386	13.07.1944	01.09.2005	8,50	400	3322	43	0	2	43	9,3	1	8,8	35	28
41	391	13.07.1944	06.09.2005	2,50	600	4110	44	0	2	43	14,0	1	9,7		29
41	395	13.07.1944	12.09.2005	3,00	600	2915	45	0	2	44	13,6	1	9,8	35	26
41	406	13.07.1944	26.09.2005	2,50	600	2837	47	0	2	44	13,6	1	9,7	35	29

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
41	428	13.07.1944	10.10.2005	3,00	600	3393	49	0	2	42	14,3	1	9,7	36	30
41	481	13.07.1944	29.11.2005	2,00	600	2808	56	0	2	42	14,3	1	9,4	32	27
41	516	13.07.1944	10.01.2006	3,00	600	2547	61	0	2	42	14,3	1	9,9	33	27
41	537	13.07.1944	24.01.2006	2,50	600	3532	63	0	2	42	14,3	1	9,5	30	25
42	4	12.11.1965	23.11.2004		1200	2381	6	0	1	84	14,3	1	12,6	13,7	31
42	33	12.11.1965	08.02.2005	3,00	1200	2205	13	0	1	81	14,8	1	13,1	21,2	45
42	164	12.11.1965	06.04.2005	3,50	1200	1746	25	0	1	79	15,2	1	12,6	15,7	35,2
42	288	12.11.1965	29.06.2005	2,50	1200	2256	37	0	1	77	15,6	1	12,8	20,6	40
43	590	09.11.1955	31.03.2006	15,50	1000	2621	11	0	1	66,5	15,0	4	12,3	41	43
44	238	15.12.1964	02.06.2005	12,50	400	1507	24	0	1	81	4,9	1	14,7	43	49
44	330	15.12.1964	19.07.2005	12,50	400	2813	31	0	1	81	4,9	1	13,5	42	56
45	92	27.08.1982	04.03.2005	4,00	1000	3439	5	0	2	60	16,7	3	9,9	31	24
46	503	28.10.1958	20.12.2005	4,00	1000	851	3	0	1	81,3	12,3	1	15,6	25,9	19,9
46	557	28.10.1958	22.02.2006	2,50	1000	1348	12	0	1	74,3	13,5	1	15,9	34,3	30,5
46	656	28.10.1958	02.08.2006	1,50	1000	1408	34	0	1	71	14,1	1	16,1	32,8	24,5
46	529	28.10.1958	24.01.2006	2,00	1000	1106	76,6	0	1	76,6	13,1	1	16,3	45,4	49,2
47	172	14.04.1975	13.04.2005	3,50	800	1678	11	1	1	58	13,8	1	11,7	95	82
47	220	14.04.1975	13.05.2005	12,00	800	1637	16	1	1	58	13,8	1	11,9		64
47	264	14.04.1975	06.06.2005	13,50	800	1532	19	1	1	56	14,3	1	12,5	56	65
47	75	14.04.1975	28.02.1975	2,00	800	1574	5	1	1	58	13,8	1			
48	341	21.07.1965	01.08.2005	15,00	1200	1854	10	0	1	85	14,1	1	14,6	40,7	28,3

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
48	375	21.07.1965	29.08.2005	13,50	1000	2393	12	0	1	83,8	12,0	1	14,0	42,2	29,8
48	472	21.07.1965	22.11.2005	14,30	1200	2260	26	0	1	81	14,8	1	13,2	37,3	27,3
48	521	21.07.1965	17.01.2006	14,00	1200	2395	34	0	1	79,8	15,0	1	13,7	28,9	22,5
48	281	21.07.1965	10.06.2005	5,00	1000	778	3	0	1	85	11,8	1			
48	243	21.07.1965	06.06.2005		0		2	0	1	88	0,0	1	16,1	46,7	63,6
48	247	21.07.1965	06.06.2005	12,00	400	172	2	0	1	88	4,5	1	16,1		
48	244	21.07.1965	06.06.2005	2,00	400	531	2	0	1	88	4,5	1	16,1		
48	245	21.07.1965	06.06.2005	4,00	400	586	2	0	1	88	4,5	1	16,1		
48	246	21.07.1965	06.06.2005	8,00	400	194	2	0	1	88	4,5	1	16,1		
48	282	21.07.1965	27.06.2005	14,00	1000	1463	4	0	1	85	11,8	1	15,2	43,6	45,7
48	296	21.07.1965	04.07.2005	15,00	1200	1766	6	0	1	84	14,3	1	14,8	38,3	41,3
49	94	02.02.1958	07.03.2005	1,00	800	1798	20	0	2	52	15,4	1	11,3	36	25
49	257	02.02.1958	06.06.2005	10,50	800	1904	24	0	2	52	15,4	1	12,0	40	34
49	306	02.02.1958	06.07.2005	0,50	800	2217	28	0	2	53	15,1	1	12,0	44	23
49	53	02.02.1958	15.02.2005	2,00	800	1521	17	0	2	51	15,7	1	12,6	71	52
50	493	21.01.1965	14.12.2005	13,00	1200	1157	4	0	1	102,7	11,7	3	16,3	104,4	189,9
50	520	21.01.1965	16.01.2006	2,00	1200	2016	8	0	1	103,5	11,6	3	13,8	103,1	156,1
50	554	21.01.1965	15.02.2006	11,50	1200	2149	13	0	1	105	11,4	3	13,1	121,7	176,5
50	575	21.01.1965	15.03.2006	1,00	1200	2752	17	0	1	103,1	11,6	3	12,8	125,8	170,7
50	602	21.01.1965	10.05.2006	12,00	1200	2542	24	0	1	102,5	11,7	3	13,0	124,6	168,1
51	637	03.06.1966	28.06.2006	14,00	1000	1331	4	0	2	67	14,9	3	13,5	46,5	92,1

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
52	229	13.09.1978	24.05.2005	1,00	800	1235	12	0	1	66	12,1	3	12,7	30,1	44,2
53	132	11.06.1952	21.03.2005	8,00	1200	2032	4	0	2	67	18,0	1	11,8	35,3	34,9
53	360	11.06.1952	17.08.2005	3,00	1200	2790	24	0	2			1	10,5	27,6	21,7
53	460	11.06.1952	09.11.2005	3,00	1200	2415	38	0	2	62	19,4	1	11,3	23,1	18,5
54	645	07.10.1969	18.07.2006	13,00	1000	1659	4	0	2	62	16,1	1	11,5	24,8	28
54	665	07.10.1969	14.08.2006	15,00	800	1823	8	0	2	62	12,9	1	12,4	23,5	19,2
55	667	30.07.1949	17.07.2006		200	648	2	0	1			1			
55	668	30.07.1949	17.07.2006		200	424	2	0	1			1			
55	669	30.07.1949	19.07.2006		200	824	2	0	1			1			
55	670	30.07.1949	19.07.2006		200	568	2	0	1			1			
55	671	30.07.1949	21.07.2006		200	1016	3	0	1			1			
55	672	30.07.1949	21.07.2006		200	580	3	0	1			1			
55	673	30.07.1949	24.07.2006		200	1037	3	0	1			1			
55	674	30.07.1949	24.07.2006		200	696	3	0	1			1			
55	675	30.07.1949	26.07.2006		200	1014	4	0	1			1			
55	676	30.07.1949	26.07.2006		200	747	4	0	1			1			
55	677	30.07.1949	28.07.2006		200	1531	4	0	1	87	2,3	1	11,9	44,8	56,8
56	104	29.09.1961	15.03.2005	1,00	800	1473	4	0	2	55	14,5	2	11,9	41,3	35,1
56	142	29.09.1961	12.04.2005	3,00	800	1277	8	0	2	55	14,5	2	11,4	31,1	24,2
57	63	03.04.1972	01.03.2005	1,50	1000	699	1	0	1	76	13,2	1	16,6	31,1	37,4
57	101	03.04.1972	15.03.2005	2,00	1000	1122	3	0	1	78	12,8	1	15,2	38,4	56,5

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
57	107	03.04.1972	22.03.2005	1,50	1000	1069	4	0	1	79	12,7	1	13,8	36,6	48,6
57	158	03.04.1972	05.04.2005	2,00	1000	1185	6	0	1	78	12,8	1	13,5	31,2	35,8
57	180	03.04.1972	19.04.2005	2,00	1000	1475	8	0	1	78	12,8	1	12,8	38,6	51,5
57	218	03.04.1972	17.05.2005	5,00	1000	1062	12	0	1	79	12,7	1	12,9	31	46,9
57	269	03.04.1972	14.06.2005	4,00	1000	1231	16	0	1	79	12,7	1	12,7		48,3
57	418	03.04.1972	11.10.2005	2,50	1000	1219	33	0	1	72,8	13,7	1	13,6	26,4	31,5
57	542	03.04.1972	31.01.2006	1,50	1000	942	48	0	1	74,5	13,4	1	13,3	23,5	28
57	79	03.04.1972	08.03.2005	1,00	1000	752	2	0	1	79	12,7	1	15,6	23,9	48,4
57	80	03.04.1972	08.03.2005	2,00	1000	955	2	0	1	79	12,7	1	15,6		
57	81	03.04.1972	08.03.2005	3,00	1000	995	2	0	1	79	12,7	1	15,6		
57	78	03.04.1972	08.03.2005		1000	792	2	0	1	79	12,7	1	15,6		
58	664	23.01.1979	11.08.2006	3,00	800	905	4	0	1	74	10,8	3	15,6	21,4	22,3
59	127	24.04.1959	14.03.2005	1,50	1200	2215	26	0	1	82	14,6	4	13,3	45	53
60	422	14.03.1971	04.10.2005	3,00	1200	1882	4	0	1	94	12,8	1	13,8	52	74
60	426	14.03.1971	11.10.2005	2,50	1200	1847	5	0	1	94	12,8	1	13,2	63	81
60	445	14.03.1971	18.10.2005	3,50	1200	2112	6	0	1	94	12,8	1	14,1	59	91
60	517	14.03.1971	10.01.2006	2,00	1200	2218	18	0	1	94	12,8	1	12,6		107
61	609	01.03.1975	22.05.2006	1,50	1000	1934	13	0	1	74	13,5	1	13,0	224,9	360,4
62	5	27.09.1961	23.11.2004	1,50	1200	3052	24	0	1	111	10,8	1	12,1	72,7	116,1
62	40	27.09.1961	15.02.2005	9,50	1200	2038	36	0	1	113	10,6	1	11,6	76	108,4
62	204	27.09.1961	09.05.2005	2,00	1200	2682	39	0	1	111	10,8	1	11,9	78	123,1

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
63	106	14.02.1977	15.03.2005	2,00	1200	2289	16	0	1	86	14,0	1	11,7	40,6	50,5
63	342	14.02.1977	02.08.2005	14,50	600	909	36	0	1	83	7,2	1	15,5	20,8	32,9
64	367	23.11.1954	23.08.2005	4,00	1200	1864	2	0	1	84	14,3	1	12,8		
64	381	23.11.1954	06.09.2005	11,30	1200	2120	4	0	1	82	14,6	1			
64	414	23.11.1954	04.10.2005	12,00	1200	2439	8	0	1	79,8	15,0	1			
64	489	23.11.1954	13.12.2005	12,50	1200	2811	18	0	1	78,6	15,3	1	10,2	40	44
64	530	23.11.1954	24.01.2006	15,00	1200	2596	24	0	1	79,2	15,2	1	10,7	34,6	36,4
64	591	23.11.1954	10.04.2006	2,50	1200	2700	35	0	1	79	15,2	1	11,0	32,4	41,6
64	641	23.11.1954	10.07.2006	1,00	1200	2991	48	0	1	78	15,4	1	10,4	27,6	24,9
65	26	13.05.1948	01.02.2005	3,00	1200	1709	26	0	2	72	16,7	1	12,3	33	31,2
65	133	13.05.1948	29.03.2005	2,00	1200	1517	34	0	2	73	16,4	1	12,3	38,5	39,1
65	248	13.05.1948	07.06.2005	3,00	1200	2253	44	0	2	72	16,7	1	12,2	35,9	39
65	175	13.05.1948	26.04.2005	14,00	1200	1599	38	0	2	73	16,4	1	12,5	41,5	36,6
65	176	13.05.1948	26.04.2005	0,50	1200	1855	38	0	2	73	16,4	1	12,5		
65	177	13.05.1948	26.04.2005	1,00	1200	2258	38	0	2	73	16,4	1	12,5		
65	178	13.05.1948	26.04.2005	2,00	1200	2078	38	0	2	73	16,4	1	12,5		
66	181	24.09.1977	19.04.2005	1,50	1200	474	4	0	1	105	11,4	1	17,5	78,9	131,3
66	188	24.09.1977	03.05.2005	10,00	1200	694	6	0	1	104	11,5	1	17,6	40,5	34
66	233	24.09.1977	31.05.2005	10,50	1200	841	10	0	1	103	11,7	1	17,2	34,6	46,2
66	283	24.09.1977	28.06.2005	9,50	1200	777	14	0	1	101	11,9	1	17,2	29,8	26,8
66	333	24.09.1977	26.07.2005	9,50	1200	646	18	0	1	102	11,8	1	15,8	40,2	31,2

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
66	398	24.09.1977	20.09.2005	10,50	1200	904	26	0	1	101,5	11,8	1	17,1	45,5	24
66	478	24.09.1977	29.11.2005	2,50	1200	1027	36	0	1	100	12,0	1	15,7	35,9	43,6
66	507	24.09.1977	03.01.2006	11,00	1200	491	42	0	1	99,5	12,1	1	16,2	63,2	109,3
67	510	05.10.1957	02.01.2006	15,50	1200	2048	17	0	2	101	11,9	1	13,8	32	41
67	564	05.10.1957	27.02.2006	14,50	1200	2616	25	0	2	101	11,9	1	12,7	49	44
68	6	12.01.1967	29.11.2004		1000	2920	9	0	2	50	20,0	1	9,5	28,3	34,6
68	31	12.01.1967	07.02.2005	2,00	600	1009	13	0	2	51	11,8	1	10,1	36,9	52,3
68	152	12.01.1967	04.04.2005	3,00	600	1591	24	0	2	50	12,0	1	10,0	27,4	30,3
68	349	12.01.1967	08.08.2005	1,50	600	2034	44	0	2	49	12,2	1	9,3	25,8	26,7
69	586	30.12.1977	29.03.2006	12,00	800	920	2	0	1	61	13,1	1	13,8	40	65
70	419	20.05.1978	04.10.2005	2,50	1000	2050	2	0	2	62	16,1	1	12,6	34	102
70	447	20.05.1978	18.10.2005	12,00	1000	1580	4	0	2	61	16,4	1	11,3	37	97
70	470	20.02.1978	14.11.2005	10,50	1000	2090	8	0	2	61	16,4	1	11,4	74	244
70	506	20.05.1978	20.12.2005	13,00	1000	1819	13	0	2	64	15,6	1	12,9	32	134
70	563	20.05.1978	28.02.2006	11,50	1000	1756	22	0	2	58,5	17,1	1	10,4	38	108
70	652	20.05.1978	26.07.2006		1000	1559	44	0	2	58,5	17,1	1	11,6	27	52
71	547	03.07.1952	27.01.2006	2,00	1000	3691	18	0	2	65	15,4	1	10,5	126	102
72	627	22.03.1984	13.06.2006	10,50	1000	1427	6	0	1	74,3	13,5	3	15,9	35,5	49,6
73	221	05.07.1982	17.05.2005	3,50	1200	1764	6	0	1	74	16,2	1	15,0	55	74
73	290	05.07.1982	28.06.2005	13,00	1200	1826	12	0	1	74	16,2	1	13,9	21	22
73	338	05.07.1982	26.07.2005	11,50	1200	1648	16	0	1	74	16,2	1			

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
73	515	05.07.1982	10.01.2006	11,00	1200	1609	39	0	1	76	15,8	1	14,6	27	39
74	61	28.06.1957	01.03.2005	1,00	1200	1588	8	0	1	86	14,0	2	11,9	23,7	21,8
74	183	28.06.1957	19.04.2005	1,50	1200	2104	16	0	1	86	14,0	2	11,2	28,9	26,8
74	108	28.06.1957	22.03.2005	10,00	1200	1605	12	0	1	86	14,0	2	11,8	24,9	24,5
74	109	28.06.1957	22.03.2005	0,50	1200	1697	12	0	1	86	14,0	2	11,8		
75	561	30.07.1968	27.02.2006	1,50	1000	2254	12	0	2	66,8	15,0	1	8,6	57	49,9
75	576	30.07.1968	20.03.2006	3,50	1000	2087	14	0	2	65,8	15,2	1	8,2	53,3	35,3
76	155	28.03.1958	05.04.2005	2,00	1200	895	3	0	2	90	13,3	1	14,6	28,6	41,2
76	143	28.03.1958	12.04.2005	2,50	1200	1992	4	0	2	89	13,5	1	14,3	23,3	19
76	174	28.03.1958	26.04.2005	1,00	1200	2054	6	0	2	88	13,6	1	12,7	30,3	25,4
76	228	28.03.1958	24.05.2005	1,50	1200	2217	10	0	2	87	13,8	1	10,9	30,9	24,8
76	278	28.03.1958	21.06.2005	1,50	1200	2551	14	0	2	85	14,1	1	10,4	26,6	17
76	318	28.03.1958	19.07.2005	1,50	1200	2537	18	0	2	84	14,3	1	10,4	31,2	19,4
76	462	28.03.1958	08.11.2005	2,50	1200	3615	34	0	2	80	15,0	1	10,4	24,9	13,8
77	191	11.02.1962	20.04.2005	11,50	1200	748	4	0	1	80	15,0	1	15,4	55	74
77	195	11.02.1962	26.04.2005	1,50	1200	1137	5	0	1	78	15,4	1	14,3		56
77	200	11.02.1962	02.05.2005	11,50	1200	1054	6	0	1	78	15,4	1	13,6	73	92
77	241	11.02.1962	31.05.2005	1,00	1200	1440	10	0	1	78	15,4	1	12,3	48	60
77	316	11.02.1962	04.07.2005	1,00	1200	1211	15	0	1	77	15,6	1	12,7	39	53
77	420	11.02.1962	05.10.2005	2,50	1200	1449	28	0	1	77	15,6	1	12,2		83
78	499	09.08.1984	20.12.2005	1,00	800	1471	7	0	2	55	14,5	3	11,2	19	9,6

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
78	533	09.08.1984	24.01.2006	9,00	800	1746	12	0	2	54,8	14,6	3	11,4	22,2	12,8
79	206	13.08.1984	11.05.2005	13,50	600	1497	24	0	2	63	9,5	1	10,0	168,7	176,7
79	378	13.08.1984	30.08.2005	13,00	600	1606	40	0	2	63,2	9,5	1	9,5	114,5	121,9
79	440	13.08.1984	25.10.2005	12,00	600	1357	48	0	2	63,2	9,5	1	9,5	157,3	140,3
79	498	13.08.1984	20.12.2005	11,00	600	1769	56	0	2	62,1	9,7	1	10,1	141,6	132,2
79	552	13.08.1984	14.02.2006	11,00	600	2067	64	0	2	62,8	9,6	1	9,3	168,4	157,4
80	249	24.06.1950	07.06.2005	2,50	1000	3102	2	0	2	75	13,3	1	9,8	59,5	125,1
80	301	24.06.1950	05.07.2005	2,50	600	1744	6	0	2	75	8,0	1	10,1	78,4	131,9
80	356	24.06.1950	16.08.2005	2,50	600	2488	12	0	2	75	8,0	1	10,0	76,8	125,2
80	463	24.06.1950	08.11.2005	3,00	600	2395	25	0	2	74	8,1	1	9,8	130,7	262,6
80	492	24.06.1950	14.12.2005	4,50	600	2303	30	0	2	72,2	8,3	1	10,3	146,4	316,3
80	555	24.06.1950	15.02.2006	5,50	800	2655	38	0	2	72,3	8,3	1	10,3	174,2	318,7
81	223	23.10.1952	23.05.2005	10,50	1200	1476	12	0	1	82	14,6	1	13,0	47,7	29,1
81	362	23.10.1952	17.08.2005	11,00	1200	1388	24	0	1	79	15,2	1	12,1	32,2	13
81	451	23.10.1952	26.10.2005	11,00	1200	1463	24	0	1	76,5	15,7	1	12,1	32,8	11,6
81	473	23.10.1952	23.11.2005	10,00	1200	1688	40	0	1	75	16,0	1	11,9	28,7	10,7
82	662	15.06.1979	04.08.2006	1,50	800	1236		0	1	59	13,6	3	16,2	25	38
83	42	13.06.1981	15.02.2005	1,50	1000	1652	4	0	1	70	14,3	2	14,0	27,6	32,8
83	118	13.06.1981	22.03.2005	1,50	1000	2205	8	0	1	65	15,4	2	13,7	26,3	35
83	182	13.06.1981	19.04.2005	2,00	1000	2003	12	0	1	67	15,0	2	14,2	37,3	52
83	300	13.06.1981	05.07.2005	2,50	1000	2155	24	0	1	64	15,6	2	13,6	30,8	41,9

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
84	47	05.07.1936	08.02.2005		600	2484	8	0	2	76	1,9	1	10,6	48	134
84	72	05.07.1936	01.03.2005	2,00	600	3514	12	0	2	74	8,1	1	10,1	61	59
84	194	05.07.1936	26.04.2005	2,00	600	2531	20	0	2	74	8,1	1	10,8	48	44
84	210	05.07.1936	10.05.2005	3,00	600	3418	22	0	2	75	8,0	1	10,4	50	47
84	222	05.07.1936	17.05.2005	14,00	600	3144	23	0	2	73	8,2	1	10,0	47	39
84	270	05.07.1936	14.06.2005	1,50	600	649	27	0	2	73	8,2	1	11,1	62	51
84	307	05.07.1936	06.07.2005	12,00	600	212	30	0	2	73	8,2	1	12,6	83	73
84	455	05.07.1936	02.11.2005	13,50	1000	859	47	0	2	72	8,3	1	13,7	145	366
85	3	14.12.1943	23.11.2004	1,50	600	1586	18	0	1	74	8,1	1	12,2	27,9	27,8
85	105	14.12.1943	15.03.2005	2,00	600	1630	34	0	1	80	7,5	1	12,9	26,3	27,6
85	298	14.12.1943	05.07.2005	13,00	600	1417	50	0	1	77	7,8	1	12,5	30,1	35,6
85	111	14.12.1943	22.03.2005	12,00	600	941	36	0	1	78	7,7	1			
85	112	14.12.1943	22.03.2005	0,50	600	1051	36	0	1	78	7,7	1			
85	113	14.12.1943	22.03.2005	1,50	600	1382	36	0	1	78	7,7	1			
85	114	14.12.1943	22.03.2005	2,50	600	1646	36	0	1	78	7,7	1			
86	76	21.04.1960	23.02.2005		1200	1575	4	0	1	115	10,4	2	14,3	27,3	26
86	162	21.04.1960	06.04.2005	3,50	1200	2141	10	0	1	114	10,5	2	12,8	31	29
87	16	03.03.1973	11.01.2005	3,00	1000	4589	42	0	2	52	19,2	1	10,8	16,4	6,6
88	230	20.04.1970	24.05.2005	1,50	1000	2652	8	0	1	74	13,5	3	15,0		
88	277	20.04.1970	21.06.2005	1,50	1000	3190	12	0	1	72	13,9	3	15,5	38	28,6
88	332	20.04.1970	25.07.2005	2,00	1000	2694	18	0	1	73	13,7	3	14,9	33,3	32,2

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
88	382	20.04.1970	06.09.2005	2,00	1000	3299	24	0	1	75	13,3	3	13,6	33,4	25,2
89	571	12.01.1970	13.03.2006	3,50	1000	1649	22	0	1	79	12,7	1	13,3	28,6	54,9
90	2	07.08.1974	23.11.2004	2,00	1200	1877	22	0	1	101	11,9	1	11,8	28,4	26,9
90	14	07.08.1974	21.12.2004	2,00	1200	2256	26	0	1	99	8,1	1	12,6	32,6	33,5
91	73	15.08.1974	01.03.2005	19,00	1200	601	15	0	1	97	12,4	3	17,0	66	115
92	21	16.11.1969	25.01.2005	2,00	800	962	8	0	1	85	9,4	3	14,5	29,7	33,3
92	58	16.11.1969	22.02.2005	3,00	800	1174	12	0	1	84	9,5	3	14,0	28,9	26,7
92	153	16.11.1969	05.04.2005	2,00	800	1422	18	0	1	83	9,6	3	14,9	24,2	20,1
93	562	13.03.1983	01.03.2006	12,00	1000	1876	4	0	1	72	13,9	1	12,9	23,6	18,6
94	54	21.05.1964	17.02.2005	3,00	800	220	1	1	1	82	9,8	2	12,8		49
94	67	21.05.1964	23.02.2005	3,50	800	758	2	1	1	82	9,8	2			
94	74	21.05.1964	02.03.2005	14,50	800	577	3	1	1	80	10,0	2	10,8	64	72
94	95	21.05.1964	07.03.2005	15,50	800	684	4	1	1	80	10,0	2	11,0	52	65
94	126	21.05.1964	15.03.2005	16,00	1200	758	5	1	1	80	15,0	2	10,7	57	69
94	171	21.05.1964	12.04.2005	10,50	1200	1102	9	1	1	78	15,4	2	10,5	60	63
94	209	21.05.1964	10.05.2005	9,50	1200	941	13	1	1	76,5	15,7	2	10,1	89	91
94	253	21.05.1964	07.06.2005	12,00	1200	1174	17	1	1	75	16,0	2	10,9	51	53
94	317	21.05.1964	06.07.2005	11,50	1200	770	21	1	1	78,5	15,3	2	9,4	49	42
94	345	21.05.1964	02.08.2005	12,50	1200	870	25	1	1	76,5	15,7	2	9,7	48	36
94	390	21.05.1964	30.08.2005	11,50	1200	1476	29	1	1	76,5	15,7	2	8,8	36	28
94	405	21.05.1964	27.09.2005	11,00	1200	1355	33	1	1	74	16,2	2	7,4	38	28

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
94	448	21.05.1964	24.10.2005	1,50	600	1099	37	1	1	75	8,0	2	9,1	47	30
94	526	21.05.1964	17.01.2006	12,50	600	1193	48	1	1	75	8,0	2	12,3	45	52
95	617	31.12.1955	24.05.2006	12,50	800	1768	4	0	2	64,8	12,3	2	12,3	38,1	33,4
95	629	31.12.1955	20.06.2006	11,00	800	2349	8	0	2	63,4	12,6	2	10,9	35,4	26,2
96	361	09.07.1973	17.08.2005	1,00	1000	1757	4	0	1	79	12,7	2	12,4	29,5	39,6
96	435	09.07.1973	18.10.2005	0,50	1000	1699	13	0	1	75,6	13,2	2	11,2	19,7	20,4
96	512	09.07.1973	11.10.2006	2,00	1000	2168	24	0	1	75,5	13,2	2	11,7	21,2	27
97	93	25.08.1973	03.03.2005	10,00	1000	1654	6	0	1	87	11,5	3	15,4	34	58
97	121	25.08.1973	10.03.2005	10,50	1000	1212	7	0	1	87	11,5	3	15,1	32	44
97	166	25.08.1973	05.04.2005	12,00	1000	1072	11	0	1	85	11,8	3	16,6	28	37
97	211	25.08.1973	10.05.2005	26,50	1000	634	16	0	1	85	11,8	3	16,3	28	31
97	260	25.08.1973	08.06.2005	0,50	1000	2402	20	0	1	84	11,9	3	16,3	36	57
97	68	25.08.1973	17.02.2005	12,00	1000	1008	4	0	1	89	11,2	3	15,8	29	57
98	480	14.01.1954	30.11.2005	3,50	1000	984	4	0	1	85	11,8	2	15,5	50,4	61,1
99	8	11.10.1957	07.12.2004	10,50	1200	733	2	0	1	113	10,6	1	14,1	33,4	35,5
99	17	11.10.1957	11.01.2005	3,50	1200	1268	6	0	1	111	10,8	1	13,9	42,9	55,8
99	50	11.10.1957	21.02.2005	12,00	1200	1193	12	0	1	106	11,3	1	14,2	69,5	70,7
99	131	11.10.1957	21.03.2005	14,00	1200	1039	16	0	1	106	11,3	1	13,9	56,4	62,5
99	224	11.10.1957	23.05.2005	12,50	1200	1455	24	0	1	106	11,3	1	14,0	40,3	52,4
99	359	11.10.1957	17.08.2005	14,00	1200	1473	36	0	1			1	14,5	37,3	46,3
100	22	17.06.1969	25.01.2005	2,50	1000	1829	2	0	1	68	14,7	1	13,8	51,9	70,3

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
100	28	17.06.1969	01.02.2005	2,00	1000	2082	3	0	1	68	14,7	1	12,2	49,4	66,3
100	35	17.06.1969	08.02.2005	3,00	1000	1783	4	0	1	67	15,0	1	11,9	45,3	59,8
100	56	17.06.1969	22.02.2005	3,00	1000	1944	6	0	1	67	15,0	1	11,5	44,8	51,1
100	160	17.06.1969	06.04.2005	3,00	1000	1869	12	0	1	65	15,4	1	12,7	75,9	89,4
100	196	17.06.1969	03.05.2005	2,00	1000	2136	16	0	1	65	15,4	1	12,0		87
100	287	17.06.1969	28.06.2005	1,50	1000	2141	24	0	1	63	15,9	1	12,3	89,3	98,3
100	334	17.06.1969	26.07.2005	2,50	1000	1803	28	0	1	66	15,2	1	12,5	87,3	95,8
101	535	02.12.1981	24.01.2006	24,00	1200	933	1	0	2	74	16,2	1	14,5	66	84
101	545	02.12.1981	31.01.2006	11,50	1200	1332	2	0	2	74	16,2	1	12,2	54	70
102	275	02.11.1972	21.06.2005	2,50	1200	2658	4	0	1	93	12,9	3	12,5	104,8	63,9
102	320	02.11.1972	19.07.2005	2,50	1200	2108	8	0	1	90	13,3	3	11,4	81,2	32,1
102	357	02.11.1972	16.08.2005	14,00	1200	3607	12	0	1	89	13,5	3	11,7	110,4	45,8
102	393	02.11.1972	13.09.2005	2,50	1200	3031	16	0	1	84,5	14,2	3	11,5	79,2	27,5
103	32	21.04.1966	08.02.2005	1,00	1200	1964	3	0	1	103	11,7	3	12,4	78,6	153,3
103	89	21.04.1966	15.03.2005	12,00	1200	2088	8	0	1	103	11,7	3	12,3	97,6	183,2
103	169	21.04.1966	13.04.2005	12,00	1200	2095	12	0	1	100	12,0	3	12,1	51,4	93,3
103	231	21.04.1966	25.05.2005	14,00	1200	2237	19	0	1	101	11,9	3	11,8	30,7	48,6
104	227	13.02.1975	24.05.2005	10,00	1200	840	12	0	1	82	14,6	3	13,1	51,9	73,8
104	273	13.02.1975	21.06.2005	1,00	1200	1292	16	0	1	81	14,8	3	12,7	48,6	105,1
104	135	13.02.1975	29.03.2005	1,00	1200	1442	3	0	1	86	14,0	3	13,4		
104	136	13.02.1975	29.03.2005	2,00	1200	1793	3	0	1	86	14,0	3	13,4		

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
104	137	13.02.1975	29.03.2005	3,00	1200	1594	3	0	1	86	14,0	3	13,4		
104	134	13.02.1975	29.03.2005	10,00	1200	852	3	0	1	86	14,0	3	13,4		
105	226	12.02.1977	24.05.2005	1,00	1000	1645	12	0	2	69	14,5	3	12,7	15,3	14,8
105	274	12.02.1977	21.06.2005	1,00	1000	1778	16	0	2	69	14,5	3	12,4	17,1	13,5
105	358	12.02.1977	16.08.2005	1,50	1000	3044	24	0	2	70	14,3	3	13,0	27,4	26,6
105	139	12.02.1977	29.03.2005	1,00	1000	2104	4	0	2	70	14,3	3	13,4		
105	140	12.02.1977	29.03.2005	2,00	1000	1864	4	0	2	70	14,3	3	13,4		
105	141	12.02.1977	29.03.2005	3,00	1000	1678	4	0	2	70	14,3	3	13,4		
105	138	12.02.1977	29.03.2005	10,00	1000	1454	4	0	2	70	14,3	3	13,4	24,4	26,1
106	523	03.07.1975	17.01.2006	2,50	1000	1754	13	0	1	80,7	12,4	1	14,0	22,5	18,1
106	570	03.07.1975	13.03.2006	3,50	1000	1690	21	0	1	79,2	12,6	1	13,9	21	17,8
106	605	03.07.1975	16.05.2006	1,50	1000	1660	30	0	1	80	12,5	1	14,0	24,5	17,6
107	608	28.11.1967	17.05.2006	2,00	1000	3538	14	0	1	63	15,9	1	12,2	27	23
107	631	28.11.1967	20.06.2006	1,50	1000	2265	19	0	1	64	15,6	1	12,8	27,5	25,2
107	654	28.11.1967	31.07.2006	1,50	1000	1739	24	0	1	63	15,9	1	11,9	25	22,6
108	464	10.09.1961	08.11.2005	14,00	1000	1822	3	0	1	77	13,0	1	11,9	42,1	59,9
108	484	10.09.1961	05.12.2005	13,50	1000	2557	6	0	1	73	13,7	1	11,3	31,1	30
108	522	10.09.1961	17.01.2006		1000	2536	12	0	1	77,4	12,9	1	11,4	30,7	27
108	579	10.09.1961	03.04.2006	2,00	600	2964	24	0	1	67,1	8,9	1	11,1	26,8	21,3
108	632	10.09.1961	26.06.2006	12,00	600	1646	36	0	1	76,5	7,8	1	12,5	33,2	36
109	214	31.10.1952	12.05.2005	2,50	1200	1929	34	0	1	90	13,3	1	15,4	63	98

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
109	254	31.10.1952	09.06.2005	2,00	1200	2292	38	0	1	91	13,2	1	15,8	71	142
109	324	31.10.1952	11.07.2005	16,00	1200	1631	42	0	1	91	13,2	1	16,1	63	103
109	354	31.10.1952	05.08.2005	4,00	1200	2471	46	0	1	90	13,3	1	16,0	52	87
110	409	13.07.1974	04.10.2005	3,00	1200	1448	2	0	1	87,2	13,8	1	14,5		
110	431	13.07.1974	18.10.2005	2,50	1200	2238	4	0	1	86	14,0	1			
110	468	13.07.1974	15.11.2005	1,50	1200	2917	8	0	1	82,8	14,5	1	11,3	19	27
110	488	13.07.1974	13.12.2005	1,00	1200	3103	12	0	1	80	15,0	1	12,0	24	27
110	532	13.07.1974	24.01.2006	2,50	1200	3720	18	0	1	78,8	15,2	1	12,0	18	23
110	565	13.07.1974	07.03.2006	1,50	1200	3197	24	0	1	76	15,8	1	11,4	16	23
110	620	13.07.1974	30.05.2006	2,50	1200	3592	36	0	1	73,6	16,3	1	12,2	17	17
111	52	20.06.1933	17.02.2005	2,00	1000	1819	26	0	1	66	15,2	1	10,9	52	46
111	124	20.06.1933	17.03.2005	2,00	1000	1623	30	0	1	65	15,4	1	11,6		43
111	312	20.06.1933	01.07.2005	2,50	1000	2086	45	0	1	65	15,4	1	11,3	53	41
112	163	04.04.1977	06.04.2005	14,00	1200	194	48	0	1	90	13,3	1	14,8	19,6	15,1
113	309	04.05.1978	04.07.2005	2,00	800	2204	12	0	2	53,5	15,0	3	12,4	21	16
113	197	04.05.1978	02.05.2005	3,50	800	1564	4	0	2	51,5	15,5	3	12,8		
113	261	04.05.1978	06.06.2005	1,00	800	1680	8	0	2	53,5	15,0	3	12,4	22	17
113	346	04.05.1978	01.08.2005	3,00	800	3148	16	0	2	52	15,4	3	12,9	29	20
113	387	04.05.1978	25.08.2005	6,00	800	2002	20	0	2	52	15,4	3	11,9	41	29
114	96	19.09.1960	09.03.2005	3,50	600	27	1	1	1	75	8,0	1	17,5	55	78
114	331	19.09.1960	20.07.2005	2,00	600	1362	19	1	1	72	8,3	1	11,6	41	23

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
115	588	22.11.1982	04.04.2006	2,50	800	1195	12	1	2	60	13,3	3	11,8	31,7	33,3
115	658	22.11.1982	07.08.2006	3,00	800	1180	30	1	2			3	10,9	31,9	29,2
115	623	22.11.1982	12.06.2006	3,00	800	1607	48	1	2	57,3	14,0	3	11,2	26,7	20,1
116	198	28.05.1980	02.05.2005	1,50	800	1800	4	0	1	76,5	10,5	3	14,0	26	34
116	237	28.05.1980	31.05.2005	1,50	1000	1728	8	0	1	76,5	13,1	3	13,4		26
116	315	28.05.1980	06.07.2005	3,00	1000	1805	13	0	1	76,5	13,1	3	15,4	31	39
116	344	28.05.1980	04.08.2005	2,50	1000	1001	17	0	1	74	13,5	3	15,7	25	24
117	536	01.10.1979	24.01.2006	12,50	1000	1192	2	0	2	67	14,9	3	14,7	24	22
117	546	01.10.1979	31.01.2006	11,50	1000	1579	3	0	2	65	15,4	3	13,2	35	45
118	51	28.10.1953	21.02.2005	15,50	1000	1927	34	0	2	63	15,9	1	9,7	35,2	39,7
118	179	28.10.1953	19.04.2005	16,50	1000	2084	42	0	2	61	16,4	1	9,5	34,1	34
118	265	28.10.1953	14.06.2005	18,00	1000	2306	50	0	2	60	16,7	1	9,2	45	55,1
119	91	26.11.1962	04.03.2005	3,00	1000	2021	3	0	1	67	14,9	2	10,9	41	35
119	122	26.11.1962	11.03.2005	5,50	1000	2132	4	0	1	66	15,2	2	11,5		45
119	170	26.11.1962	08.04.2005	3,00	1000	1749	8	0	1	66	15,2	2	11,4		68
120	29	20.11.1971	01.02.2005	2,00	800	1639	7	0	1	60	13,3	3	11,7	26,5	26,2
120	97	20.11.1971	14.03.2005	2,00	800	1621	12	0	1	60	13,3	3	10,8	26	23,1
120	242	20.11.1971	06.06.2005	10,50	1200	1558	24	0	1	61	19,8	3	11,2	49,9	48,5
121	30	30.11.1975	01.02.2005	2,00	1200	2041	2	0	1	86	14,0	1	14,2	28,7	24
121	64	30.11.1975	01.03.2005	1,50	800	1484	6	0	1	87	9,2	1	12,5	27,1	21,1
121	302	30.11.1975	05.07.2005	1,50	1200	2711	24	0	1	84	14,3	1	11,3	36,4	30,3

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
121	401	30.11.1975	20.09.2005	3,00	1200	2412	36	0	1	85,7	14,0	1	12,3	22,9	16,9
121	408	30.11.1975	04.10.2005	1,50	1200	2251	48	0	1	74,9	16,0	1	12,4	22,8	15,5
121	147	30.11.1975	12.04.2005	11,50	1200	1477	12	0	1	84	14,3	1	12,2	28	27,8
121	148	30.11.1975	12.04.2005	1,00	1200	1784	12	0	1	84	14,3	1	12,2		
122	37	02.09.1979	09.02.2005	15,50	1000	1115	15	0	1	84	12,0	3	12,4	35,4	34,6
123	678	12.05.1980	22.08.2006	2,00	800	958	4	0	1	78,5	10,2	3	13,7	27,7	39,5
124	443	02.09.1979	14.10.2005	12,00	200	911	4	0	2	58	3,4	1	14,9	25	28
124	459	02.09.1979	04.11.2005	12,00	200	966	7	0	2	60	3,3	1	12,9		27
124	486	02.09.1979	02.12.2005	1,50	200	2277	11	0	2	56	3,6	1	13,6	34	20
125	500	10.08.1982	20.12.2005	2,50	1200	2410	1	0	1	96,6	12,4	1	17,4		
125	511	10.08.1982	10.01.2006	16,00	1200	1206	4	0	1	93,9	12,8	1	17,3	36	47
125	578	10.08.1982	21.03.2006	3,00	1200	2439	15	0	1	90	13,3	1	15,4	39	59
125	613	10.08.1982	23.05.2006	1,00	1200	2641	24	0	1	89,3	13,4	1	15,9	39	66
125	679	10.08.1982	22.08.2006	1,50	1200	1818	36	0	1	90	13,3	1	15,7	37	62
126	596	14.11.1964	28.04.2006	2,00	1000	2134	4	0	2	68,5	14,6	1	14,7	26,1	21,8
126	633	14.11.1964	23.06.2006	2,50	1000	2116	8	0	2	65	15,4	1	13,3	18,2	12,9
126	663	14.11.1964	11.08.2006	12,00	1000	1720	12	0	2	65	15,4	1	13,2	12,9	32,2
127	192	23.03.1979	19.04.2005	5,50	1000	2067	55	0	1	71	14,1	1	12,9	47	50
127	364	23.03.1979	15.08.2005	10,00	1000	1743	68	0	1	68	14,7	1	13,0	65	99
127	421	23.03.1979	30.09.2005	17,50	1000	1526	74	0	1	68	14,7	1	11,4		47
128	436	17.10.1980	24.10.2005	2,00	800	1232	5	0	2	65	12,3	3	12,7	39,9	51

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
128	475	17.10.1980	28.11.2005	2,50	800	1875	9	0	2	64	12,5	3	12,6	30,5	34,5
129	412	01.08.1961	04.10.2005	1,00	1200	1978	2	0	1	98	12,2	1			
129	433	01.08.1961	18.10.2005	1,50	1200	2124	4	0	1	97,5	12,3	1			
129	466	01.08.1961	15.11.2005	1,00	1200	2832	8	0	1	97,6	12,3	1	11,5	39	49
129	487	01.08.1961	13.12.2005		1200	2536	12	0	1	98	12,2	1	11,4	36	42
129	531	01.08.1961	24.01.2006	2,00	1200	3121	18	0	1	95,9	12,5	1	11,0	24	22
129	567	01.08.1961	07.03.2006	1,50	1200	3112	24	0	1	93,7	12,8	1	10,9	26	23
129	587	01.08.1961	04.04.2006		1200	1382	27	0	1	92,5	13,0	1	12,4	25	30
130	258	28.06.1962	07.06.2005	3,00	1000	903	1	1	1	75	13,3	1	15,1	119	294
130	271	28.06.1962	14.06.2005	8,50	1000	599	2	1	1	75	13,3	1	13,7	120	306
130	294	28.06.1962	28.06.2005	1,00	1000	884	4	1	1	75	13,3	1	13,6	74	172
130	340	28.06.1962	26.07.2005	1,00	1000	1216	8	1	1	71	14,1	1	13,6	42	74
130	370	28.06.1962	22.08.2005	0,50	1000	1395	12	1	1	68,5	14,6	1	13,3	37	56
130	404	28.06.1962	19.09.2005	0,50	1000	1585	16	1	1	68,5	14,6	1	12,5	51	61
130	441	28.06.1962	17.10.2005	1,00	1000	1344	20	1	1	70,5	14,2	1	12,2	35	45
130	494	28.06.1962	12.12.2005	1,00	1000	1317	28	1	1	70,5	14,2	1	12,8	32	43
130	519	28.06.1962	11.01.2006	1,00	1000	1838	32	1	1	70,5	14,2	1	11,8	29	23
130	568	28.06.1962	03.03.2006	0,50	1000	1659	40	1	1	72	13,9	1	12,2	36	40
130	597	28.06.1962	21.04.2006	1,00	1000	1453	47	1	1	72	13,9	1	12,1	30	30
131	456	29.09.1966	02.11.2005	16,30	200	1352	2	0	2	65	3,1	3	12,1	21	19
132	23	27.03.1968	25.01.2005	3,00	1000	1488	14	0	1	78	12,8	1	12,2	35,3	43,9

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
132	57	27.03.1968	22.02.2005	3,00	1000	1617	18	0	1	78	12,8	1	12,2	42,5	49,6
133	653	10.12.1965	31.07.2006	1,50	800	817	4	0	1	87,9	9,1	2	13,5	26,4	27,8
134	1	02.02.1978	15.11.2004	1,00	1000	949	3	0	2	64	15,6	1	14,6	45,3	45,9
134	7	02.02.1978	06.12.2004	1,50	1000	1286	6	0	2	64	15,6	1	12,9	50,1	39
134	59	02.02.1978	22.02.2005	1,50	1000	1303	18	0	2	65	15,4	1	12,4	84	63
135	219	25.07.1957	18.05.2005	12,50	1000	1272	5	0	1	78	12,8	1	11,6	36,5	56,8
135	232	25.07.1957	31.05.2005	1,50	1000	2437	5	0	1	77	13,0	1	10,2	37,9	41,4
135	303	25.07.1957	11.07.2005	1,00	1000	2042	11	0	1	76	13,2	1	11,1	45,3	45,3
135	376	25.07.1957	30.08.2005	2,00	1000	2233	19	0	1	76,6	13,1	1	10,5	33	28,3
135	416	25.07.1957	05.10.2005	1,00	1000	2611	24	0	1	76,5	13,1	1	10,8	33,2	29,8
135	534	25.07.1957	25.01.2006	1,00	1000	2663	40	0	1	79,9	12,5	1	10,7	42	46,6
135	577	25.07.1957	20.03.2006		1000	2363	48	0	1	76	13,2	1	11,2	29,9	25,2
136	225	27.09.1968	24.05.2005	2,00	800	1294	4	0	1	63	12,7	3	13,2	28,4	29,4
137	581	21.08.1957	24.03.2006	2,00	1000	2910	12	0	2	58,7	17,0	1	11,9	22,2	28,4
138	34	01.06.1967	08.02.2005	2,00	1000	1650	24	0	1	77	13,0	2	14,5	22,4	33,4
139	12	19.10.1965	21.12.2004	3,00	1000	1652	47	0	1	72	13,9	1	12,4	24,3	25,2
140	187	04.08.1976	25.04.2005	2,50	1200	2635	25	0	1	79	15,2	1	11,9	32,7	24,7
140	415	04.08.1976	05.10.2005	2,00	1200	2884	48	0	1	75	16,0	1	11,3	29,9	19,1
141	129	18.07.1952	18.03.2005		1000	686	3	0	2	69	14,5	1	14,1	48,9	71,9
141	120	18.07.1952	23.03.2005	2,50	1000	1479	4	0	2	68	14,7	1	13,3	60,6	73,5
141	156	18.07.1952	05.04.2005	3,00	1000	1836	6	0	2	69	14,5	1	11,0	43,1	50

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
142	11	08.02.1952	14.12.2004	2,50	1000	2399	42	0	1	83	12,0	1	13,4	48,1	41,3
143	618	22.01.1957	26.05.2006	2,00	1000	1971	4	1	1	80	12,5	1	13,8	29,4	45,4
143	639	22.01.1957	07.07.2006	0,50	1000	1987	9	1	1	81	12,3	1	12,3	25,4	26,8
144	159	09.08.1972	05.04.2005	14,00	1000	669	3	0	1	74	13,5	1	14,0	44,8	55,6
144	144	09.08.1972	12.04.2005	3,00	1000	1484	4	0	1	73	13,7	1	12,2	38,9	50,1
144	173	09.08.1972	26.04.2005	16,00	1000	1322	6	0	1	71	14,1	1	10,5	36,4	40,8
144	236	09.08.1972	31.05.2005	14,50	1000	1371	12	0	1	72	13,9	1	11,1	34,3	37
144	276	09.08.1972	21.06.2005	2,50	1000	1868	14	0	1	69	14,5	1	11,4	34,9	39,3
144	321	09.08.1972	19.07.2005	3,00	1000	1522	18	0	1	71	14,1	1	11,6	40	49,2
144	400	09.08.1972	20.09.2005	3,00	1000	1397	26	0	1	73,2	13,7	1	11,0	38,8	53,3
145	544	29.06.1966	31.01.2006	1,00	1200	2576	18	0	2	75	16,0	1	11,2	26	16
145	585	29.06.1966	29.03.2006	12,50	1200	2605	26	0	2	75	16,0	1	10,9	22	15
145	661	29.06.1966	10.08.2006	10,50	1200	2251	45	0	2	72,5	16,6	1	10,8	18	11
146	65	15.04.1952	01.03.2005	16,00	400	0	1	0	2	86	4,7	1	14,9	54,6	42
146	102	15.04.1952	15.03.2005	2,00	1200	748	3	0	2	86	14,0	1	14,0	60	41,4
146	119	15.04.1952	22.03.2005	0,50	1200	872	4	0	2	85	14,1	1	14,4	53,4	50
146	154	15.04.1952	05.04.2005	14,50	1200	1386	6	0	2	86	14,0	1	13,4	43	36,5
146	189	15.04.1952	03.05.2005	12,00	1200	1855	10	0	2	86	14,0	1	12,1	41,3	36
146	234	15.04.1952	31.05.2005	13,00	1200	2283	14	0	2	84	14,3	1	11,2	40,3	33,7
146	284	15.04.1952	28.06.2005	14,50	1200	2008	18	0	2	83	12,0	1	11,0	37,3	32,8
146	439	15.04.1952	25.10.2005	14,00	1200	1696	34	0	2	78,3	15,3	1	11,1	34,3	26,2

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
146	501	15.04.1952	20.12.2005	15,00	1200	1582	42	0	2	78	15,4	1	11,1	33	22,9
146	553	15.04.1952	14.02.2006	13,00	1200	1782	50	0	2	78,3	15,3	1	10,8	36,1	26
146	83	15.04.1952	08.03.2005	1,00	1200	119	2	0	2	87	13,8	1	15,3	57,5	44
146	84	15.04.1952	08.03.2005	2,00	1200	237	2	0	2	87	13,8	1	15,3		
146	85	15.04.1952	08.03.2005	3,00	1200	351	2	0	2	87	13,8	1	15,3		
146	82	15.04.1952	08.03.2005		1200		2	0	2	87	13,8	1	15,3		
147	305	22.02.1980	12.07.2005	2,00	1000	1863	2	0	1	78	12,8	1	14,3		
147	319	22.02.1980	19.07.2005	1,00	1000	1395	3	0	1	77	13,0	1	13,6	28	45
147	366	22.02.1980	23.08.2005	1,50	1000	2432	8	0	1	78	12,8	1	12,4	21	22
147	402	22.02.1980	20.09.2005	1,00	1000	2051	12	0	1	78,5	12,7	1	11,9	21	15
147	430	22.02.1980	18.10.2005	2,00	1000	2074	16	0	1	78	12,8	1	12,3	24	22
147	490	22.02.1980	13.12.2005	16,00	1000	1941	24	0	1	76	13,2	1	12,8	21	20
147	559	22.02.1980	28.02.2006	0,50	1000	1703	35	0	1	76,5	13,1	1	12,4	27	27
147	611	22.02.1980	23.05.2006	1,00	1000	2459	48	0	1	77,8	12,9	1	12,6	19	19
148	255	28.01.1963	06.06.2005	11,00	1000	58	4	1	1	64	15,6	1	13,2	49	41
148	279	28.01.1968	20.06.2005	10,50	1000	435	6	1	1	64	15,6	1	10,9	91	50
148	289	28.01.1963	27.06.2005	13,50	1000	693	7	1	1	64	15,6	1	9,4		57
148	323	28.01.1968	13.07.2005	15,50	1000	426	9	1	1	64	15,6	1	10,8		
148	327	28.01.1968	15.07.2005	15,50	1000	540	10	1	1	64	15,6	1	10,6		54
148	329	28.01.1968	18.07.2005	12,00	800	707	10	1	1	64	12,5	1	11,6		53
148	339	28.01.1968	25.07.2005	1,50	800	1304	11	1	1	64	12,5	1	11,4		47

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
148	363	28.01.1968	17.08.2005	3,50	800	2126	14	1	1	64	12,5	1	11,2	47	35
148	389	28.01.1968	01.09.2005	10,30	800	2229	16	1	1	62,5	12,8	1	11,2		
148	469	28.01.1968	22.11.2005	10,30	800	5480	27	1	1	62,5	12,8	1			
148	548	28.01.1968	30.01.2006	12,50	800	2546	35	1	1	64	12,5	1	13,2	34	27
148	604	28.01.1968	08.05.2006	13,00	800	519	49	1	1	67	11,9	1	14,2	44	67
149	41	10.02.1954	15.02.2005	1,50	1000	1906	6	0	1	65	15,4	1	11,2	23,2	19,2
149	99	10.02.1954	15.03.2005	2,00	1000	2241	10	0	1	66	15,2	1	11,2	20,9	13,6
149	299	10.02.1954	05.07.2005	1,50	1000	2335	26	0	1	63	15,9	1	11,2	20,4	12,7
149	379	10.02.1954	30.08.2005	3,50	1000	3312	34	0	1	63,3	15,8	1	11,5	21,6	17
149	438	10.02.1954	25.10.2005	2,50	1000	2183	42	0	1	68	14,7	1	12,7	21,9	19
149	502	10.02.1954	20.12.2005	3,50	1000	1788	50	0	1	68,5	14,6	1	12,8	22,7	19,1
149	205	10.02.1954	10.05.2005	2,00	1000	2380	18	0	1	61	16,4	1	11,8	21,9	16,1
149	145	10.02.1954	12.04.2005	13,00	1000	1820	14	0	1	62	16,1	1	11,4	20,8	13,3
149	146	10.02.1954	12.04.2005	1,00	1000	2170	14	0	1	62	16,1	1	11,4		
150	24	08.06.1964	25.01.2005	12,50	1200	482	2	0	2	62	19,4	1	15,6	87,2	99,6
150	297	08.06.1954	05.07.2005	2,00	1200	2325	26	0	2	69	17,4	1	11,1	29,2	15,3
150	216	08.06.1954	17.05.2005	1,50	1200	2062	29	0	2	71	16,9	1	11,7	32,9	12,2
150	380	08.06.1954	30.08.2005	2,50	1200	2981	35	0	2	67,9	17,7	1	10,7	25,6	12,7
150	432	08.06.1954	18.10.2005	2,00	1200	2603	42	0	2	65	18,5	1	10,7	25,3	11,5
151	566	09.02.1956	07.03.2006	2,00	800	3425	13	0	2	60	13,3	3	12,4	23	16,1
151	541	09.02.1956	31.01.2006	1,50	800	2539	15	0	2	61,2	13,1	3	13,2	22,6	18,4

Laufende Nummer	Probennummer	Geburtsdatum	Abnahmedatum	Intervall zur Einnahme	Dosis in mg/d	RBV in ng/ml	Therapie woche	HIV-Status neg=0	Geschlecht	Gewicht in (kg)	Dosis/kg Körpergewicht	HCV-Genotyp	Hb in (mg/dl)	AST (U/l)	ALT (U/l)
151	630	09.02.1956	20.06.2006	2,50	800	3486	29	0	2	57,7	13,9	3	11,2	23,2	14
152	383	04.02.1965	06.09.2005	2,50	1000	2928	3	0	1	84	11,9	3	12,5	29,9	40,6
152	410	04.02.1965	04.10.2005	2,00	1000	2433	8	0	1	81	12,3	3	12,6	27,8	34,1
152	527	04.02.1965	23.01.2006	13,00	1000	2450	24	0	1	79,5	12,6	3	11,7	25,5	25,2
153	207	23.02.1959	11.05.2005	3,00	1000	1951	39	0	1	72	13,9	1	13,3	110,1	106,3
153	322	23.02.1959	13.07.2005	2,50	1000	1604	48	0	1	70	14,3	1	13,8	220,4	194,9
154	560	26.02.1971	27.02.2006	3,00	1000	1367	4	0	1	85,3	11,7	3	14,2	32,3	21,6
154	583	26.02.1971	28.03.2006	4,00	1000	1848	8	0	1	85,1	11,8	3	12,5	28,6	18
154	594	26.02.1971	25.04.2006	2,00	1000	2657	12	0	1	86	11,6	3	11,4	30,6	19
154	614	26.02.1971	23.05.2006	2,00	1000	2610	16	0	1	83,2	12,0	3	11,5	27,1	19
154	644	26.02.1971	18.07.2006	2,00	1000	2555	24	0	1	81	12,3	3	10,5	32,4	18,9
155	573	14.08.1967	14.03.2006	2,00	1000	2475	4	0	1	74,5	13,4	1	14,0	27,9	34
155	638	14.08.1967	03.07.2006	2,50	1000	2303	12	0	1	71,1	14,1	1	13,7	22,6	19,6
155	601	14.08.1967	10.05.2006	2,00	1000	2769	13	0	1	71,4	14,0	1	14,2	24,1	22,7

Literaturverzeichnis

1. **al., Poynard T. et.** Viral hepatitis C. *Lancet*. 2003, 362:2095-2100.
2. **WHO.** Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board. *J. Viral Hepatol.* 1999, 6(1):35-47.
3. **Perz JF, Alter MJ.** The coming wave of HCV-related liver disease: Dilemmas and challenges. *J Hepatol.* 2006, 44:441-443.
4. **WHO.** State of the art of new vaccine and development. 2006.
5. **Armstrong GL, Alter MJ, McQuillan GK, Margolis HS.** The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology.* 2000, 31:777-82.
6. **Jay H. Hoofnagle, M.D., Leonard. Seeff, M.D.** Peginterferon and Ribavirin for Chronic Hepatitis C. *N Engl J Med* . 2006, 355; 2444-51.
7. **Häussinger D, Niederau C.** *Hepatitis C.* Berlin/Wien : Blackwell Wissenschaftsverlag, 2001.
8. **Schreier E, Höhne M.** Hepatitis C - Epidemiologie und Prävention. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz.* 2001, 44:554-561.
9. **Stark K, Bienzle U, Vonk R et al.** History of syringe-sharing in prison and risk of Hepatitis B virus, Hepatitis C virus, and Human immunodeficiency virus infection among injecting drug user in Berlin. *Int J Epidemiol.* 1997, 26:1359-1366.
10. **Weber B, Rabenau H, Berger A et al.** Seroprevalence of HCV, HAV, HDV, HCMV and HIV in high risk groups/Frankfurt a. M. *Zentralbl. Bakteriol.* 1995, 282:102-112.
11. **Paul-Ehrlich-Institut.**
12. **JH, Hoofnagle.** Hepatitis C: The clinical spectrum of the disease. *Hepatology.* 1997, 26(Suppl 1):15-20.
13. **Neumann AU, Lam Np, Dahari H, et al.** Hepatitis C viral dynamic in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science.* 1988, 282:103-7.
14. **Herbert Hof, Rüdiger Dörries.** *Medizinische Mikrobiologie.* s.l. : Thieme Verlag, 2002.

15. **Lauer GM, Walker BD.** Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001, 345,41-52.
16. **Lindenbach BD, Rice C.** Unraveling hepatitis C virus replication from genome to function. . *Nature.* 2005, 436;933-8.
17. dc2.uni-bielefeld.de. [Online]
18. **Simmonds P, Bukh J, Combet C et al.** Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* . 2005, 42:962-73.
19. euHCVdb.fr. [Online] 2004.
20. **Ross RS, Viazov S, Renzing-Köhler K, Roggendorf M.** Changes in the epidemiology of hepatitis C infection in Germany: shift in the predominance of hepatitis C subtypes. *J Med Virol.* 2000, 60(2):122-5.
21. **Berg T, Hopf U, Stark K et al.** 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.
22. **Ross RS, Viazov S, Renzinger-Köhler K et al.** Changes in the epidemiology of Hepatitis C infection in German: shift in the predominance of Hepatitis C subtypes. *J Med Virol.* 2000, 60:122-125.
23. **Berg T, Hopf U, Stark K, 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(3):484-91.
24. **Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al.** Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2002, 347:975-82.
25. **Maier, Klaus-Peter.** *Akute und chronische Hepatitis C, Epidemiologie - Diagnostik - Therapie.* s.l. : Thieme-Verlag, 2002. S. 67 - 70.
26. **WHO.** Fact sheet N°164. 2000.
27. **Rehermann B, Nascimbeni M.** Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* . 2005, 5:215-29.
28. **Bowen DG, Walker CM.** Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature.* 2005, 436:946-52.
29. **Wiese M, Berr F, Lafrenz M et al.** Low frequency of cirrhosis in a Hepatitis C single-source outbreak in Germany: a 20 year multicenter study. *Hepatology.* 2000, 32:91-96.

30. **JH, Hoofnagle.** Course and outcome of Hepatitis C. *Hepatology*. 2002, 36:Suppl 1:S21-29.
31. **Thomas DL, Seeff LB.** Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis*. 2005, 9:383-98.
32. **Fattovich G, Stoffolini T, Zagni I, Donato F.** Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004, 127:Suppl 1:35-50.
33. **NW, Leung.** Management of viral Hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002, 17(Suppl):146-154.
34. **Herold, Gerd.** *Innere Medizin*. 2004. 474-475.
35. **Eckart Schreier, Doris Radun, Hannelore Neuhauser, Klaus Stark.** *Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 15*. s.l. : Robert-Koch-Institut, 2003.
36. **Feld JJ, Hoofnagle JH.** Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*. 2005, 436:967-72.
37. **GC, Sen.** Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol*. 2001, 55:255-81.
38. **H., Tilg.** New insights into the mechanisms of interferon alfa: an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. *Gastroenterology*. 1997, 112:1017-21.
39. **Myers RP, Regimbeau C, Thevenot T et al.** Interferon for interferon naive patients with chronic hepatitis C. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002, 2:CD000370.
40. **Brok J, Gluud LL, Gluud C.** Ribavirin for monotherapy for chronic hepatitis C infection: a Cochrane Hepato-Biliary Group systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Gastroenterol*. 2006, 101:842-7.
41. **McHutchinson JG, Gordon SC, Schiff ER, et al.** Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med*. 1998, 339:1485-92.
42. **Poynard T, Marcellin P, Lee SS, et al.** Randomised trial of interferon alfa2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alfa2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet*. 1998, 352:1426-32.
43. **Reiser, Schmiegel.** Fortschritt durch Kombinationstherapie mit Interferon alpha und Ribavirin. *Deutsches Ärzteblatt*. 96, 1999, Bd. 4, A-195.
44. **Statement, National Institutes of Health Consensus Development Conference.** Management of Hepatitis C. *Hepatology*. 2002, 36:Suppl 1:3-20.

45. **C, EASL International Consensus Conference on hepatitis.** Consensus statement. *J Hepatol*. 1999, 31(Suppl.):3-8 (Übersicht).
46. **statement, National Institutes of Health consensus development conference.** Management of hepatitis C. *Hepatology*. 2002, 36(Suppl.):3-15 (Übersicht).
47. **Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB.** American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Gastroenterology*. 2004, 39:1147-71(Erratum,Hepatology 40:269).
48. **Dienstag JL, McHutchinson JG.** Gastroenterological Association technical review on the management of hepatitis C. *Gastroenterology*. 2006, 130:231-64.
49. **S., Zeuzem.** Standard Treatment of Acute and Chronic Hepatitis C. *Z Gastroenterol*. 2004, 42:714-719.
50. **DE, Kleiner.** The liver biopsy in chronic hepatitis C: a view from the other side of the microscope. *Semin Liver Dis*. 2005, 25:52-64.
51. **Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al.** Histologic grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 1995, 22:696-699.
52. **Bedossa P, Poynard T.** An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1996, 24:289-93.
53. **DL, Thomas.** Hepatitis C and human immunodeficiency virus infection. *Hepatology*. 2002, 36:Suppl 1:201-209.
54. **McHutchinson JG, Manns M, Patel K et al.** Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2002, 123:1061-9.
55. **GL, Davis.** Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology*. 2002, 36:Suppl 1:S145-S151.
56. **Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR et al.** Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002, 347:975-982 (Ib).
57. **Wong JB, Davis GL, McHutchinson JG et al.** Clinical implications of testing viral response during ribavirin and peginterferon alfa-2b treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002, 36(Suppl.):281A(III).
58. **Berg T, Sarrazin C, Herrmann E et al.** Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology*. 2003, 37:600-609 (III).

59. **McHutchinson JG, Gordon SC, Schiff ER et al.** Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med.* 1998, 339:1485-1492 (1b).
60. **Dalgard O, Bjoro K, Hellum KB, et al.** Treatment with pegylated interferon and ribavirin in HCV infection with genotype 2 or 3 for 14 weeks: a pilot study. *Hepatology.* 2004, 40:1260-5.
61. **Mangia A, Santoro R, Minerva N, et al.** Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med.* 2005, 352:2609-17.
62. **von Wagner M, Huber M, Berg T, et al.** Peginterferon-alpha-2a (40KD) and ribavirin for 16 or 24 weeks in patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2005, 129:522-7.
63. **Zeuzem S, Buti M, Ferenci P, et al.** Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotype 1 and low pretreatment viremia. *J Hepatol.* 2006, 44:97-103.
64. **Keating G, Curran M.** Peginterferon-alpha-2a (40kD) plus ribavirin: a review of its use in the management of chronic hepatitis C. *Drugs.* 2003, 63:701-730.
65. **Scott LJ, Perry CM.** Interferon-alpha-2b plus ribavirin: a review of its use in the management of chronic hepatitis C. *Drugs.* 2002, 62:507-556.
66. **Graham CS, Baden LR, Yu E, et al.** Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2001, 33:562-9.
67. **Michael P. Manns, Heiner Wedemeyer.** *Handbuch der Hepatitis C: Diagnostik, Verlauf, Therapie.* Bremen : UNI-MED Science, 2003. Seiten 82 - 84.
68. **Anderson KB, Guest JL, Rimland D et al.** Hepatitis C virus coinfection increases mortality in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era: data from the HIV Atlanta VA Cohort Study. *Clin Infect Dis.* 2004, 39:1507-13.
69. **Torriani FJ, Rodriguez-Torres M, Rockstroh JK et al.** Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2004, 351:438-50.
70. **Carrat F, Bani-Sadr F, Pol S et al.** Pegylated interferon alfa-2b vs standard interferon alfa-2b, plus ribavirin, for chronic hepatitis C in HIV-infect. *JAMA.* 2004, 292:2839-48.

71. **Mauss S, Rockstroh J.K.** HCV/HIV-coinfection-is there a state of the art after APRICOT an RIBAVIC? *Journal fo Antimicrobial Chemotherapy*. 2005, 56:615-618.
72. **Rockstroh JK, Vogel M.** Therapy of hepatitis C in HIV-coinfection. *Eur J Med Res*. 2004, 9(6):304-8.
73. **Laguno M, Murillas J, Blanco JL et al.** Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of HIV/HCV co-infected patients. *AIDS*. 2004, 18:F27-34.
74. **Ribavirin, Fachinformation Wirkstoff, Roche und Essex Pharma.** *Rote Liste*. 2006.
75. **Bruchfeld A, Lindahl K, Schvarcz R, Stahle L.** Dosage of ribavirin in patients with hepatitis C should be based on renal function: a population pharmacokinetic analysis. *Ther Drug Monit*. 2002, 24:701-708.
76. **Dumortier J., Ducos E., Scoazec J.-Y., Chevallier P., Boillot O., Gagnieu M.-C.** Plasma ribavirin concentrations during treatment of recurrent hepatitis C with peginterferon alfa-2b and ribavirin combination after liver transplantation. *Journal of Viral Hepatitis*. 2006, 13:538-43.
77. **Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NY.** Ribavirin. *data on file*. NJ : s.n., 1998.
78. **Kramer TH, Gaar GG, Ray CG, Minnich L, Copeland JG, Connor JD.** Hemodialysis clearance of intravenously administered ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990, 34:489-490.
79. **Poynard T, McHutchinson J, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J.** Is an "a la carte" combination interferon alfa 2b plus ribavirin regimen possible for the first line treatment in patients with chronic hepatitis C?The ALGO-VIRC Project Group. *Hepatology*. 2000, 31(1):211-218.
80. **Manns MP, McHutchinson JG, Gordon SC, et al.** Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001, 358:958-65.
81. **Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, et al.** Peginterferon alfa-2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*. 2004, 140:346-55.
82. **Musselmann DL, Lawson DH, Gumnick JF, Manatunga AK, Penna S, Goodkin RS et al.** Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa. *N Eng J Med*. 2001, 344(13):961-966.

83. **Karow Thomas, Lang-Roth Ruth.** *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 2006. S. 828.
84. **Lo Re, J.R. Kostman.** Anemia during treatment of hepatitis C in HIV-infected patients. *AIDS Read.* 2004, 14(10):555-7,562,565-71.
85. **N., Brau.** Epoetin alfa treatment for acute anemia during interferon plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2004, 11(3):191-7.
86. **Conjeevaram HS, Fried MV, Jeffers LJ et al.** Peginterferon and ribavirin treatment in African American and Caucasian American patients with hepatitis C genotype 1. *Gastroenterology.* 2006, 131:470-7.
87. **P., Glue.** The clinical pharmacology of ribavirin. *Semin Liver Dis.* 1999, 19Suppl1:17-24.
88. **Vogt MW, Hartshorn KL, Furmann PA, et al.** Ribavirin antagonizes the effect of azidothymidine on HIV replication. *Science.* 1987, 235:1376-1379.
89. **Hoggard PG, Barry MG, Khoo SH, Back DJ.** Drug interactions with d4T phosphorylation in vitro. *Br J Clin Pharmacol.* 1996, 42:278.
90. **Baba M, Pauwels R, Balzarini J, Herdewijn P, De Clerq E, Desmyter J.** Ribavirin antagonized inhibitory effects of pyrimidine 2',3'-dideoxynucleosides but enhances inhibitory effects of purine... *Antimicrob Agents Chemother.* 1987, 31:1613-1617.
91. **Balzarini J, Herdewijn P, Clercq E.** Potentiating effect of ribavirin on the anti-retrovirus activity of 3'-azido-2,6-diaminopurine-2',3'-dideoxyriboside in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 1989, 11:161-171.
92. **Hartman NR, Ahluwalia GS, Cooney DA, et al.** Inhibitors of IMP dehydrogenase stimulate the phosphorylation of the antihuman immunodeficiency virus nucleosides 2'-3'-dideoxyadenosine and 2'-3'-dideoxyinosine. *Mol Pharmacol.* 1991, 40:118-124.
93. **Khakoo S, Glue P, Grellier L, et al.** Ribavirin and interferon alpha-2b in chronic hepatitis C: assessment of possible pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions. *Br J Clin Pharmacol.* 1998, 46:563-570.
94. Europäische Arzneimittel Agentur (EMA). <http://www.emea.europa.eu/>. [Online] 2007.
95. **Wikipedia, freie Enzyklopädie.** *Ribavirin.* 2007.
96. **PW, Atkins.** Physical Chemistry. *Oxford University Press.* 1998, ed 6. Oxford.

97. **Morrison RT, Royd RN.** Organic Chemistry. *Organic Chemistry, Prentice-Hall.* 1992, ed 6. New York.
98. **Cotton FA, Wilkinson G, Gauss PL.** *Basic inorganic chemistry, Chichester, Wiley.* 1995.
99. **Yasuji Arase, Kenji Ikeda, Akihito Tsubota, Fumitaka Suzuki, Yoshiyuki Suzuki, Satoshi Saitoh et al.** Significance of Serum Ribavirin Concentration in Combination Therapy of Interferon and Ribavirin for Chronic Hepatitis C. *Intervirolgy.* 2005, 48:138-144.
100. **Dixit NM, Layden-Almer JE, Layden TJ, Perelson AS.** Modelling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. *Nature.* 2004, 432:922-4.
101. **Lau JY, Tam RC, Liang TJ, Hong Z.** Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology.* 2002, 35:1002-9.
102. **Maag D, Castro C, Hong Z, Cameron CE.** Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J Biol Chem.* 2001, 276:46094-8.
103. **Crotty S, Maag D, Arnold JJ, et al.** The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med.* 2001, 7:255.
104. **Herbert Hof, Rüdiger Dörries.** *Medizinische Mikrobiologie.* Stuttgart : Thieme-Verlag, 2002. ISBN 3-13-125312-6.
105. **Laskin OL, Longstreth JA, Hart CC, et al.** Ribavirin disposition in high-risk patients for acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Pharmacol Ther.* 1987, 41:546-555.
106. **Paroni R, Del Puppo M, Borghi C, Sirtori CR, Galli Kienle M.** Pharmacokinetics of ribavirin and urinary excretion of the major metabolite 1,2,4-triazole-3-carboxamide in normal volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol .* 1989, 27:302-307.
107. **Preston S, Drusano GL, Glue P, et al.** Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ribavirin using stable isotope methodology in normal volunteers. *ICAAC Abstracts.* 1998.
108. *Labor Limbach.* Heidelberg : s.n.
109. **Patil SD, Glue P, Unadkat JD.** Intestinal absorption of ribavirin is mediated by the Na⁺-nucleosid purine (N1) transporter. *Pharm res.* 1998, 15:950-952.

110. **Ferrara EA, Oishi JS, Wannemacher RW Jr, Stephen EL.** Plasma disappearance, urine excretion, and tissue distribution of ribavirin in rats and rhesus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother.* 1981, 19:1042-1049.
111. **Jarvis SM, Thorn JA, Glue P.** Ribavirin uptake by human erythrocytes and the involvement of nitrobenzylthioinosine-sensitive (es)-nucleoside transporters. *Br J Pharmacol.* 1998, 123:1587-1592.
112. **Zimmermann TP, Deepprose RD.** Metabolism of 5-amino-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide and related five-membered heterocycles to 5'-triphosphates in human blood and L5178Y cells. *Biochem Pharmacol.* 1978, 27:709-716.
113. **Page T, Connor JD.** The metabolism of ribavirin in erythrocytes and nucleated cells. *Int J Biochem.* 1990, 22:379-383.
114. **Miller JP, Kigwana LJ, Streeter DG, Robins RK, Simon LN, Roboz J.** The relationship between the metabolism of ribavirin and its proposed mechanism of action. *Ann N Y Acad Sci.* 1977, 284:211-229.
115. **Connor E, Morrison S, Lane J, Oleske J, Sonke RL, Connor J.** Safety, tolerance, and pharmacokinetics of systemic ribavirin in children with human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993, 37:532-539.
116. **Lertora JJ, Rege AB, Lacour JT, et al.** Pharmacokinetics and long-term tolerance to ribavirin in asymptomatic patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Pharmacol Ther.* 1991, 50:442-449.
117. **Catlin DH, Smith RA, Samuels AI, Smith RA, Kirkpatrick W et al.** 14C-ribavirin distribution and pharmacokinetic studies in rats, baboons and man. *New York Academic Press.* 1980, 83-98.
118. **Yoichi Inoue, Masato Homma, Yasushi Matsuzaki, Minoru Shibata, Takuya Matsumura, Takayoshi Ito, Keiji Mitamura, Naomi Tanaka, Yukinao Kohda.** Liquid Chromatography Assay for Routine Monitoring of Cellular Ribavirin Levels in Blood. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48:3813-3816.
119. **De Franceschi L., Fattovich G., Turrini F., Ayi K., Brugnara C., Manzato F., Noventa F., Stanzial A. M., Solero P., Corcher R.** Hemolytic anemia induced by ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: role of membrane oxidative damage. *Hepatology.* 2000, 31:997-1004.

120. **Shulman NR, Smith RA, Knight V, Smith JAD, et al.** Assessment of hematological effects of ribavirin in humans; in *Clinical Applications of Ribavirin*. *New York Academic Press*. 1984, 79-92.
121. **Willis RC, Carson DA, Seegmiller JE.** Adenosin kinase initiates the major route of ribavirin activation in a cultured human cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978, 75:3042-3044.
122. **Lindsay, Sandie.** *Einführung in die HPLC. Analytische Chemie*. s.l. : Vieweg Lehrbuch.
123. **Meyer, Veronika R.** *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. St. Gallen, Schweiz : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004, 9. Auflage. ISBN 3-527-30726-5.
124. **www.umweltlabor.de/Labor/hplc.htm.** *Informationen über die HPLC*.
125. **Unger, K. K.** *Handbuch der HPLC, Leitfaden für Anfänger und Praktiker*. Darmstadt : GIT VERLAG, 1989. ISBN 3-921956-84-6.
126. **SNYDER, L. R.** *Principles of Adsorption Chromatography*. New York : Marcel Dekker, 1968.
127. **C. Laurent, H. A. H. Billiet und L. de Galan.** *Chromatographia*. 1983, 17:253.
128. **Kawasaki, T. J.** *Chromatogr.* 1991, 544; 147.
129. **Buchmeister, M. R.** *J. Chromatogr.* 2001, 918; 233.
130. **Meyer, Selbst erstellte Zeichnung nach Vorbild von Abb. 2.9 von Veronika R.** *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie*. Seite 23. s.l. : WILEY-VCH, 2004, 9. Auflage. 9.
131. **S. Larrat, F. Stanke-Labesque, A. Plages, J.-P. Zarski, G. Bessard, C. Souvignet.** Ribavirin Quantification in Combination Treatment of Chronic Hepatitis C. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003, 47:124-129.
132. **Homma Masato, Anura L Jayewardene, Tokyo University of Pharmacy & Life Science.** High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Ribavirin in Whole Blood To Assess Disposition in Erythrocytes. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. Volume 43, 1999, Bde. p. 2716-2719, Nummer 11.
133. **Institut, Robert Koch.** Aktuelle Epidemiologie der Hepatitis-C. *RKI Epidemiologisches Bulletin*. 17.11.2006, 46.

134. **Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J.** Basislehrbuch Innere Medizin. *Niere*, S. 895. München : Elsevier, 2004.
135. Robert-Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin*. 2006.
136. *Epidemiologie und therapeutische Maßnahmen bei dualer HCV/HIV-Koinfektion*. **K., Rockstroh J.** Bonn : S. 105-108.
137. **al, S.-S. Kim et.** pages 174 - 179. *J. Chromatography*. 2007, B 852.
138. **Robbins, B. L., B. H. Waibel, and A. Fridland.** Quantitation of intracellular zidovudine phosphates by use of combined cartridge-radioimmuno-assay methodology. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996, Bde. p 2651-2654, 40.
139. **Laskin O. L., Longstrath J. A., Hart C.C., Scavuzzo D., Kalman C. M., Connor J. D., Roberts R. B.** *Clin. Pharmacol. Ther.* 1987, 41; 546-555.
140. **Lertora J. J. L., Rege A. B., Lacour J. T., Ferencz N., Gerorge W. J., Vandyke R. B., Agrawal K. C., Hyslop N. E.** *Clin. Pharmacol. Ther.* 1991, 50; 442-449.
141. **Austin R. K., Trefts P. E., Hintz M., Connor J. D., Kagnoff M. F.** Sensitive radioimmunoassay for the broad-spectrum antiviral agent ribavirin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983, 24:696-701.
142. **Breadmore M. C., Theurillat R., Thormann W.** Determination of ribavirin in human serum and plasma by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2004, 25; 1615-1622.
143. **Shihabi Z. K., Oles K. S.** *J. Chromatogr.* 1996, 683:119-123.
144. **Thormann W., Minger A., Molteni S., Caslavaska J., Gebauer P. J.** *Chromatogr.* 1992, 593:275-288.
145. **Granich G. G., Krogstad D. J., Connor J. D., Desrochers K. L., Sherwood C.** High-performance liquid chromatography assay for ribavirin and comparison of the HPLC assay with radioimmunoassay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989, 33;311-315.
146. **Laffeuillade A., Hittinger G., Chadapaud S.** Increased mitochondrial toxicity with ribavirin in HIV/HCV coinfection. *Lancet*. 2001, 357; 280-281.
147. **Homma M., Jayewardene A. L., Gambertoglio J., Aweeka F.** High-performance liquid chromatographic determination of ribavirin in whole blood to assess disposition in erythrocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43:2716-2719.

148. **Smith R. H., Gilbert B. E.** Quantification of ribavirin in biological fluids and tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1987, 414:202-210.
149. **Paroni R., Sirtori C. R., Borghi C., Kienle M. G.** High-performance liquid chromatographic determination of ribavirin in serum and urine and of its urinary metabolite 1,2,4-triazole-3-carboxamide. *J. Chromatogr.* 1987, 420:189-196.
150. **Svensson J. O., Bruchfeld A., Schvarcz R., Stahle L.** Determination of ribavirin in serum using highly selective solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Ther. Drug Monit.* 2000, 22:215-218.
151. **Preston S. L., Drusano G. L., Glue P., Nash J., Gupta S. K., McNamara P.** Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ribavirin in healthy volunteers as determined by stable-isotope methodology. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43:2451-2456.
152. **Shou W. Z., Bu H. Z., Addison T., Jiang X., Naidong W. J.** *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 29:83-94.
153. **Lin C.-C., Yeh L.-T., Lau J. Y. N.** *J. Chromatogr.* 2002, 779:241-248.
154. **Roboz J., Suzuki R.** Determination of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole) in blood and urine by chemical ionisation-mass fragmentography. *J. Chromatogr.* 1978, 160:169-179.
155. **M., Jemal.** *Biomed. Chromatogr.* 2000, 14:422.
156. **Wilson Z. Shou, Hai-Zhi Bu, Addison T., Xiangyu Jiang, Naidong Weng.** Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for the determination of ribavirin in human plasma and serum. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 29:83-94.
157. **Smith RHA, Gilbert BE.** Quantification of ribavirin in biological fluids and tissues by high performance liquid chromatography. *Chromatogr. B.* 1987, 414:201-210.
158. **Stoll MS, Hounsell EF.** Selective purification of reduced oligosaccharides using phenylboronic acid bond elut column: potential application in HPLC, mass spectrometry, reductive amination procedures and antigenic/serum analysis. *Biomed. Chromatogr.* . 1988, 2:249-253.
159. **Seaver C., Sadek P.** *LC GC.* 1994, 7:631.
160. **Engelhardt H., Asshauer J., Ullner H.** *Practice of High Performance Liquid Chromatography.* Berlin : Springer, 1986. S. 65-108.

161. **E., Katz.** *Quantitative Analysis Using Chromatographic Techniques*. Chichester : Wiley, 1987. S. 31-98.
162. **S., Lindsay.** *High Performance Liquid Chromatography, ACOL Series*. Chichester : Wiley, 1992. S. 229-250.
163. **L., Huber.** *LC GC*. 1998, 11:96.
164. **Shah V. P., Midha K. K., Dighe S., McGilveray I. J., Skelly J. P., Yacobi A., Layloff T., Viswanathan C. T., Cook C. E., McDowall R. D. et al.** Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* . 1991, 16:249-255.
165. **Shah V. P., Midha K. K., Findlay J. W., Hill H. M., Hulse J. D. McGilveray I. J., McKay G., Miller K. J., Patnaik R. N., Powell M. L., Tonelli A., Viswanathan C. T., Yacobi A.** Bionanalytical method validation - a revisit with a decade of progress. *Pharm. Res.* 2000, 17:1551-1557.
166. **al., C. - T. Huang et.** *J. Chromatogr.* 1998, 716: 251-255.
167. **al., A. I. Veldkamp et.** *J. Chromatogr.* 1999, 727: 151-157.
168. **Dolan, J. W.** *LC GC Int.* 1993, 6:411.
169. **Kirschbaum, J. J. J.** *J. Pharm. Biomed. Anal.* . 1989, 7:411.
170. **Maeda Y, Kiribayashi Y, Moriya T, et al.** Dosage Adjustment of Ribavirin based on Renal Function in Japanese Patients with Chronic Hepatitis C. *Ther Drug Monit.* 2004, 11:84-7.
171. **Lindahl K, Schvarcz R, Bruchfeld A, Stahle L.** Evidence that plasma concentration rather than dose per kilogram body weight predicts ribavirin-induced anaemia. *J Viral Hepat.* 2004, 11:84-87.
172. **Rendon AL, Nunez M, Romero M et al.** Early Monitoring of Ribavirin Plasma Concentrations May Predict Anemia and Early Virological Response in HIV/Hepatitis C Virus-Coninfected Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005, 39:401-5.
173. **al., Arase et.** Significance of Serum Ribavirin Concentration in Combination Therapy of Interferon and Ribavirin for Chronic Hepatitis C. *Intervirolgy.* 2005, 48:142.
174. **Zeuzem S, Herrmann E, Lee Jh et al.** Viral kinetic in patients with chronic hepatitis C treated with standard or peginterferon alpha-2a. *Gastroenterology.* 2001, 120:1438-1447.

175. **Zeuzem S, Lee JH, Franke A et al.** Quantification of the initial decline of serum hepatitis C virus RNA and response to interferon alfa. *Hepatology*. 1998, 27:1149-1156.
176. **Larrat S, Stanke-Labesque F, Plages A, Zarski JP, Bessard G, Souvignet C.** Ribavirin quantification in combination treatment of chronic hepatitis C. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003, 47:124-129.
177. **Jen JF, Glue P, Gupta S, Zambas D, Hajian G.** Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Ther Drug Monit*. 2000, 22:555-565.
178. **Bruchfeld A., Lindahl K., Schvarcz R., Stahle L.** Dosage of ribavirin in patients with hepatitis C should be based on renal function: a population pharmacokinetic analysis. *Ther Drug Monit*. 2002, 24:701-708.
179. **Goodman, Gilman.** *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York : McGraw-Hill, 1996. ed 9..
180. **Tsubota A., Suzuki A. N. et al.** Viral dynamics and pharmacokinetics in combined interferon alfa-2b and ribavirin therapy for patients infected with hepatitis C virus genotype 1b and high pretreatment viral load. *Intervirology*. 2002, 45:33-42.
181. **Breilh D, Neau D, Djabarouti S et al.** Plasma Target Concentration of Ribavirin in HCV/HIV Co-infected Patients. *12th CROI, Boston, 22.-25.02.* 2005, Abstract 928.
182. **Siebert U., Sroczynski G.** Antivirale Therapie bei Patienten mit chronischer Hepatitis C in Deutschland. Medizinische und ökonomische Evaluation der initialen Kombinationstherapie mit Interferon und Ribavirin. *Health Technology Assessment im Auftrag der Deutschen Agentur für Health Technology Assessment beim DIMDI*. 2003, http://www.dimdi.de/de/hta/veroeffentlichungen/hta_berichte.html.
183. **Pharma, Roche und Essex.** Peginterferon Fachinformation. *Rote Liste*. 2006.
184. Bundesministerium für Bildung und Forschung. [Online] 2007.
185. **Armstrong, Alter, McQuillan GM et al.** The past incidence of Hepatitis C Virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology* . 2000, 31, Pages 777-782.
186. **Wasley A, Alter MJ.** Epidemiology of Hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis*. 2000, 20:1-16.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Alexandra Böckenhoff, geb. Kubisch

Geburtstag- und Ort: 14.05.1978, Würzburg

Familienstand: verheiratet mit Moritz Böckenhoff, seit 06.09.2008, ein Kind: Wilhelm Bernhard Maria Böckenhoff, geboren am 20.12.2009

Hochschulausbildung

Seit 09/08	Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Caritas-Krankenhaus Bad Mergentheim
06/08	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04 – 07 / 07	Dritter Abschnitt des Praktischen Jahres, Fachgebiet Chirurgie an der Missionsärztlichen Klinik Würzburg
12 / 06 – 04 / 07	Zweiter Abschnitt des Praktischen Jahres, Fachgebiet Innere Medizin an der Missionsärztlichen Klinik Würzburg
08 – 12 / 06	Erster Abschnitt des Praktischen Jahres, Fachgebiet Gynäkologie und Geburtshilfe an der Universitätsfrauenklinik
2003 – 2006	Klinisches Studium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002 – 2006	Mitarbeiter in der Infektionsambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg
2001	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
1997 – 2000	Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Berufsausbildung

1998 – 2000

Ausbildung zur Arzthelferin

Schulbildung

1997

Allgemeine Hochschulreife,
Röntgengymnasium Würzburg

1984 – 1997

Freie Waldorfschule Würzburg

Alexandra Böckenhoff

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Hartwig Klinker für die Themenstellung, Betreuung und die jahrelange gute Zusammenarbeit, sowie dem Team des Leberlabors der Uniklinik Würzburg, insbesondere Frau Diana Schirmer.

Eine wichtige Rolle während der Zeit der Entstehung dieser Promotion, hat auch stets Sophie Rasche gespielt, welche sich betont klinischen Auswertungen der erhobenen Daten gewidmet hat. Es war stets eine inspirierende, gute und freundschaftliche Zusammenarbeit. Danke dafür.

Ein herzliches Dankeschön auch an meinen lieben Freund Dr. med. Markus Letsch für das Korrekturlesen, sowie meinen Bruder Dipl. Ing. Andreas Kubisch für die Hilfe bei der Erstellung von Zeichnungen, sowie seine Unterstützung bei computerbezogenen Fragen.