

**Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Lars Dölken

**Effektivität von antiviralen Substanzen auf virale Infektionen
Inauguraldissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Philippa Langsch

aus Magdeburg

Würzburg, August 2022



Referent: Prof. Dr. Jochen Bodem

Koreferent/Koreferentin: Prof. Dr. Andrew Ullmann

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2023

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung	1
1.1	Respiratorisches Synzitial-Virus und Parainfluenzavirus	1
1.2	Masernvirus	2
1.3	Dengue-Virus	3
1.4	Chikungunya-Virus	4
1.5	Poliovirus.....	4
1.6	HIV-1.....	5
1.7	Herpes-simplex-Virus-1	5
1.8	Zytomegalievirus.....	6
1.9	Medikamentöse Therapie	7
1.10	Direkt-antivirale Medikamente	8
2.	Materialien und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Viren	12
2.1.2	Zelllinien.....	12
2.1.3	Sonden	12
2.1.4	Oligonukleotide	12
2.1.5	Medikamente	13
2.1.6	Kits	14
2.1.7	PCR Programme:.....	14
2.1.8	Laborgeräte.....	14
2.1.9	Reagenzien.....	15
2.1.10	Puffer	15
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	Verdünnungen	16
2.2.2	Zellkulturen	16
2.2.3	Toxizitätskontrolle.....	17
2.2.4	Inkubation der Viren mit zu testenden Substanzen	17
2.2.5	Messung der Infektiosität bei GFP- markierten Viren	18
2.2.6	Messung der Infektiosität bei HIV-1	18
2.2.7	RNA Gewinnung	19
2.2.8	PCR Ansätze.....	19
2.2.9	Labor eigene PCR Ansätze.....	19
2.2.10	PCR Effizienz	20
2.2.11	Zellpathogenitätskontrolle CHIKV und Poliovirus	20

3.	Ergebnisse	22
3.1	HIV-Polymerase-Inhibitoren und Elbasvir hemmen die Replikation von HSV-1	22
3.2	HIV-Polymerase-Inhibitoren und Velpatasvir hemmen die Replikation von mCMV.....	25
3.3	hCMV ist resistent gegen HIV-Polymerase-Inhibitoren und Velpatasvir.....	28
3.4	Masern-Infektionen werden nicht durch Substanzen beeinflusst.....	30
3.5	HCV-Protease-Inhibitoren hemmen die DENV-2-Replikation	31
3.6	CHIKV-Replikation wird nicht beeinflusst.....	34
3.7	Keine Wirkung der Substanzen auf Poliovirus-Infektionen.....	36
3.8	Grazoprevir hemmt Replikation von HIV-1	39
3.9	Substanzen zeigen keine Wirkung auf Infektionen mit RSV und Parainfluenzavirus-3.....	40
4.	Diskussion	44
4.1	TDF als mögliche Therapie für HSV-1-Infektionen	44
4.2	Hemmung von HSV-1 durch ABC, AZT und ELB	45
4.3	TDF, VEL und ABC senken Infektiosität von mCMV	46
4.4	Natürliche Resistenz von hCMV gegen TDF, VEL und ABC.....	47
4.5	Keine Wirkung auf Parainfluenza-3 und RSV-Infektionen	48
4.6	ELB und LDV als Therapiemöglichkeit bei Infektionen mit DENV-2	49
4.7	Daten für CHIKV weisen auf keine Wirksamkeit der Substanzen hin	51
4.8	Daten von Polio weisen auf keine Wirksamkeit der Substanzen hin	51
4.9	Kein Einfluss der Substanzen auf Masernvirus-Infektionen.....	52
4.10	Keine getestete Substanz zeigt bessere Wirkung gegen HIV-1 als Standardtherapie	52
5.	Zusammenfassung	54
6.	Literaturverzeichnis	55
Appendix		
I.	Abkürzungsverzeichnis	
II.	Abbildungsverzeichnis	
III.	Tabellenverzeichnis.....	
IV.	Danksagung.....	
V.	Lebenslauf.....	
VI.	Kongressteilnahme.....	

1. Einführung

Der Weg von der Entwicklung bis zur Zulassung neuer Virostatika ist bis heute mit hohen Kosten und einem großen Zeitaufwand verbunden ¹. Der größte Erfolg war die Einführung der direkt wirksamen antiviralen Substanzen gegen Infektionen mit humanem Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) ^{2,3}. Die Angriffspunkte der bereits existierenden Medikamente wurden für die Etablierung neuer direkt antiviralen Medikamente verwendet und haben neue Therapiemöglichkeiten für viele virale Infektionen ermöglicht.

1.1 Respiratorisches Synzitial-Virus und Parainfluenzavirus

An erster Stelle der tödlich infektiösen Erkrankungen stehen Infektionen des unteren Respirationstraktes ⁴. Der Großteil dieser Infektionen wird durch das Respiratorische Synzitial-Virus (RSV) verursacht ⁵⁻⁸, aber auch das Parainfluenzavirus spielt eine Rolle ^{7,8}. Vor allem Kleinkinder im Alter unter fünf Jahren sind von solchen Infektionen betroffen ^{6,7,9}. Laut Angaben des Robert Koch Instituts (RKI) kommen RSV-Atemwegserkrankungen mit einer Inzidenz von 48,5 Fällen und 5,6 schweren Fällen pro 1000 Kindern im ersten Lebensjahr vor ¹⁰. Im Alter von zwei Jahren wurde fast jedes Kind mindestens einmal mit RSV infiziert und Reinfektionen sind möglich ¹⁰. Die derzeitige Therapie von Infektionen mit RSV erweist sich als sehr schwierig. Bis heute gibt es keine zugelassene Impfung. Derzeitige Studien lassen jedoch auf die künftige Möglichkeit einer Impfung hoffen ^{11,12}. Nachdem die inhalative antivirale Therapie mit Ribavirin nicht mehr empfohlen wird ¹⁰, steht nur noch die passive Immunisierung mit dem Antikörper Pavilizumab als präventive Maßnahme bei Risikopatienten für RSV-Infektionen zur Verfügung ^{13,14}. Ansonsten wird die Infektion rein symptomatisch behandelt ^{10,13}. Das Parainfluenzavirus ist mit 8 % der dritthäufigste virale Erreger einer Pneumonie von Kindern unter fünf Jahren ¹⁵. Darüber hinaus ist der Virus mit 75 % der häufigste Erreger eines Krupp-Syndroms in dieser Altersklasse ¹⁶. Neue Studien haben gezeigt, dass das Parainfluenzavirus mit einer Häufigkeit von 0,2-11,5 % auch ein Verursacher von hospitalisierten Pneumonien im Erwachsenenalter ist ^{17,18}. Von den Serotypen Parainfluenzavirus 1-4 ist Parainfluenzavirus-3 der am häufigsten mit Hospitalisierungen assoziierte Subtyp ¹⁹. Auch Infektionen mit

Parainfluenzavirus können zurzeit nur symptomatisch behandelt werden ²⁰. Nur bei auftretenden Symptomen eines Krupp-Syndroms hat sich die Therapie mit Glucocorticoiden etabliert ^{21,22}.

Auch Versuche, eine Impfung gegen diese Viren zu entwickeln, waren bis heute nicht erfolgreich ²³⁻²⁵. Durch das Fehlen einer adäquaten antiviralen Therapie sind Infektionen mit diesen Erregern eine große Herausforderung für das Gesundheitssystem in Bezug auf die Kosten und die Therapie ^{26,27}.

1.2 Masernvirus

Eine weitere gefürchtete Viruserkrankung ist die Infektion mit dem Masernvirus. Im Frühstadium einer Infektion können Symptome wie Fieber, Husten und Konjunktivitis und im späteren Verlauf ein makulo-papulöses Exanthem beobachtet werden ²⁸. Komplikationen wie Gastroenteritiden, Blindheit und Encephalitis sind möglich ^{28,29}. Besonders gefürchtet ist die Komplikation der subakut sklerosierenden Panenzephalitis, die laut Fallzahlen des RKI bei 4-11 Fällen pro 100.000, für Kinder unter fünf Jahren sogar bei 30-60 Fällen pro 100.000 Masernerkrankungen liegt ^{29,30}. Das Masernvirus ist hoch infektiös und somit besteht ein hohes Ansteckungsrisiko ³¹. Um Infektionen und eine mögliche Persistenz des Virus vorzubeugen, besteht die präventive Maßnahme der Impfung ^{29,32}. Laut den Daten des RKI lagen die Impfquoten in Deutschland im Jahr 2018 für die erste Masernimpfung bei 97,9 %, für die zweite Impfung bei 93,1 % ²⁹. Die Impfung ist eine aktive Impfung und sollte erst ab dem 9. Lebensmonat verabreicht werden ²⁹. Ein effektiver Schutz von Neugeborenen ist somit nur durch den Herdenschutz der Bevölkerung gegeben. Europäische Impfprogramme zur Eradikation der Masern waren bis dato nicht erfolgreich und benötigen eine Impfquote von mindestens 95 % ³³. Eine antivirale Therapie bei Infektion gibt es nicht ^{28,29}. Durch das Fehlen einer antiviralen Therapie bei Infektion sind vor allem Säuglinge im Alter zwischen dem ersten bis 9. Lebensmonat besonders gefährdet, Spätkomplikationen zu entwickeln. Nur in Ausnahmefällen wie z.B. bei Exposition zu Erkrankten ist eine Impfung auch ab dem 6. Lebensmonat zu erwägen ³⁴. Daten zur klinischen Wirksamkeit einer so frühen Impfung sind jedoch nicht vorhanden ³⁴. Eine hohe Impfquote ist also nötig, um besonders junge Kinder vor einer Infektion zu schützen. Auch eine Infektion von Schwangeren birgt ein hohes Risiko für den Feten. Kongenitale Schäden wurden zwar nicht beobachtet ³⁵,

jedoch kann eine Infektion der Mutter zum frühzeitigen Abort oder niedrigem Geburtsgewicht führen^{35,36}.

Auch im Hinblick auf die Masernausbrüche in Massenunterkünften in Deutschland³⁷ durch zu geringe Impfquoten wäre eine antivirale Therapie ein wichtiger Schritt, um eine rasche Ausbreitung der Infektion und Folgeschäden bei Erkrankten zu vermeiden und um das Ziel der Eradikation zu erreichen.

1.3 Dengue-Virus

Seit der Entdeckung des Dengue-Virus (DENV) wurde ein starker Zuwachs an Infektionszahlen und betroffenen Gebieten verzeichnet^{38,39}. Gab es im Jahr 1970 neun betroffene Länder, so stuft die Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahr 2021 die Bevölkerung in 129 Ländern als für eine DENV-Infektion gefährdet ein^{38,40}. Obwohl der Virus vor allem in Afrika, Amerika, Süd-Ost-Asien und mediterranen Gebieten vorkommt wurde auch in Europa von ersten autochthonen Infektionsfällen berichtet^{41,42}. Die Inzidenz in Deutschland im Jahre 2019 lag bei 1,4:10.000 Einwohnern⁴³, was fast eine Verdopplung der Fallzahlen zum Vorjahr darstellt. Vor allem Personen zwischen 20-39 Jahren sind betroffen, was laut RKI an der höheren Reisefrequenz dieser Gruppe liegt⁴³. Die Fallzahlen in Deutschland sind stark abhängig vom Verlauf der Ausbrüche in betroffenen Ländern⁴³. Obwohl in Deutschland immer weniger ernste Verläufe des Dengue-Fieber beobachtet werden und es keine Sterbefälle gibt⁴³, kann die Krankheit sehr wohl in Einzelfällen und bei schlechter Gesundheitsversorgung einen solchen Verlauf nehmen³⁸. In neuen Studien wurden auch die Effekte von neonatalen Infektionen durch Arboviren, vor allem von DEN-, Zika- und Chikungunya-Viren (CHIKV) beschrieben⁴⁴. Bei Infektionen mit DENV stehen Frühgeburtlichkeit und ein niedriges Geburtsgewicht im Vordergrund^{45,46}. In Deutschland führten im Jahr 2019 allein 34 % der Infektionsfälle zu einer Hospitalisierung⁴³. Die Behandlung der Infektion beschränkt sich auf symptomatische Therapieansätze³⁸. Im Jahre 2015 wurde die erste Impfung unter dem Namen Dengvaxia gegen das DENV in wenigen Ländern zugelassen⁴⁷. Seit 2019 ist er auch in Europa für spezielle Fälle, nicht jedoch für Schwangere zugelassen^{48,49}. Weitere Impfstoffe befinden sich im Moment in der 3 Phase von klinischen Studien⁵⁰⁻⁵². Neueste Studien haben auch Inhibitoren der NS2B-NS3 Protease auf ihre Wirksamkeit gegen Flaviviren getestet⁵³⁻⁵⁵. Bis heute sind jedoch keine dieser Substanzen für den klinischen Gebrauch zugelassen.

1.4 Chikungunya-Virus

Die WHO berichtet von CHIKV-Infektionen in über 60 Ländern, darunter auch autochthone Infektionen in Italien und Frankreich ⁵⁶. Das Virus kann laut RKI „, große [und] z.T. über Jahre anhaltende Epidemien verursachen“ ⁵⁷. Die Krankheit verläuft selten tödlich, kann aber in Einzelfällen schwere Symptome verursachen ⁵⁸. 40 % der Patienten klagten über persistierende oder rezidivierende muskuloskelettale Symptome wie Arthritiden ⁵⁹. Bei CHIKV wurde ein vertikales Transmissionsrisiko von bis zu 48,2 % beschrieben ⁶⁰. Die Effekte auf Neugeborene können mild ausfallen, aber auch bis zu einer hospitalisierungspflichtigen Enzephalitis reichen ⁶¹. Die Fallzahlen von CHIKV in Deutschland sind seit Ende 2018 wieder steigend, sodass das RKI von 16 Infektionen bis Juli 2019 berichtet ⁶². Die Erkrankten infizieren sich in anderen Ländern, v.a. aber in Thailand ⁶². Die starke Dengue Fiebersaison dort sorgt für höhere Fallzahlen in Deutschland ⁶². Auch für CHIKV-Infektionen gibt es keine antiviralen Therapien ⁵⁶. Die Entwicklung einer aktiv sowie passiv Impfung war bis heute nicht erfolgreich ⁶³⁻⁶⁵. Zwei Impfstoffe befinden sich jedoch zur Zeit in klinischen Phase 2 Studien ⁶⁶⁻⁶⁸.

1.5 Poliovirus

Poliovirus ist ein Erreger, der durch hohe Impfquoten eradiziert werden könnte, da der Mensch der einzige bekannte Wirt des Virus ist ^{69,70}. Maximal in 4-8 % der Fälle treten Symptome wie mildes Fieber oder Gastrointestinale Schmerzen auf ⁷¹. In 0,1-4,5 % wird eine paralytische Symptomatik beobachtet, die als Poliomyelitis bekannt ist und unterschiedlich ausgeprägt sein kann ^{72,73}. Auch für Infektionen mit dem Poliovirus besteht keine antivirale Therapie ⁷⁰. Die Erkrankung ist durch globale Impfkampagnen weitgehend zurückgedrängt. Jedoch werden in den Ländern Pakistan und Afghanistan jährlich noch mehrere Poliofälle registriert ⁷⁴⁻⁷⁶. Nach Umstellung der Impfstrategie vom trivalenten auf den bivalenten Impfstoff, wurden erneut steigende Fallzahlen von Impfpoliiovirus Typ2 Infektionen verzeichnet ⁷⁷. Ein neuer monovalenter Impfstoff gegen das Typ 2 Poliovirus soll dies in Zukunft verhindern ⁷⁷. Die Fallzahlen der Erkrankungen wurden durch die Impfung zwar eingeschränkt ⁷⁸, dennoch ist es von Bedeutung, vor allem im Hinblick auf die Erreichung einer Eradikation, einen medikamentösen Therapieansatz zu finden.

1.6 HIV-1

Ohne Therapie führt eine Infektion mit HIV-1 zu schwerer Immunsuppression und damit verbundenen Komplikationen. Von UNAIDS veröffentlichte Daten besagen, dass es im Jahr 2020 37,7 Millionen Erkrankte und 1,5 Neuinfektionen an HIV-1 weltweit zu verzeichnen gab ⁷⁹. Durch die hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) hat sich die Prognose und auch das Übertragungsrisiko der Erkrankung gebessert ⁸⁰. Die Kosten dieser Therapie sind jedoch noch vergleichsweise hoch ⁸¹⁻⁸³, vor allem, da die Medikamente lebenslanglich eingenommen werden müssen und derzeit noch keine Ausheilung durch die antivirale Therapie erreicht wird ^{79,80}. Gleichzeitig wird die Behandlung durch Resistenzen des HIV gegen die herkömmlichen Therapiemöglichkeiten erschwert ^{84,85}. derzeitigen Laut Daten der UNAIDS waren im Jahr 2020 trotz der guten Therapiemöglichkeiten noch 680.000 Todesfälle durch HIV-1 assoziierte Erkrankungen zu verzeichnen ⁷⁹. Auch dies sind Gründe, bessere Therapiemöglichkeiten zu erforschen. Zudem gibt es weiterhin Patientengruppen, die keinen Zugang zu einer antiviralen Therapie haben ⁷⁹. Somit ist auch die Behandlung des akquirierten Immun-Defizienz Syndroms (AIDS) und allen Komplikationen einer unbehandelten HIV-1-Infektion von Bedeutung.

1.7 Herpes-simplex-Virus-1

Herpesinfektionen wie z.B. Infektionen mit Herpes-simplex-Virus-1 (HSV-1) und -2 (HSV-2) sowie mit humanen Zytomegalievirus (hCMV) treten in Patienten mit HIV-1 häufiger auf ⁸⁶⁻⁸⁸. Das symptomatische Auftreten dieser Viren wird vor allem mit der durch HIV-1 verursachten Suppression des Immunsystems in Zusammenhang gebracht. Ebenso bei Patienten, die wegen anderer Ursachen immunsupprimiert sind, wie z.B. nach Stammzell- oder Organtransplantation, kommen symptomatische Verläufe dieser Virusinfektionen häufiger vor ^{89,90}. HSV-Infektionen führen in Patienten nach allogener Stammzelltransplantation häufig zu Reinfektionen, die aber durch eine medikamentöse Prophylaxe reduziert werden können ⁹¹. Eine Medikamentöse Therapie mittel Aciclovir (ACV) ist möglich. Jedoch besteht eine höhere Resistenzrate gegen ACV bei immunsupprimierten Patienten ^{92,93}. Komplikationen wie ein Herpes-simplex vegetans mit ulzerierenden und nekrotisierenden Stellen vor allem an Schleimhäuten, sowie eine Mitbeteiligung des zentralen Nervensystem mit Folge einer Encephalitis werden bei

immunsupprimierten Patienten häufiger beobachtet ^{90,94,95}. Die Prävalenz für HSV-1-Infektionen in der allgemeinen Bevölkerung beträgt bis zu 90 % ⁹⁶⁻⁹⁹. Die Primärinfektion bleibt häufig klinisch inapparent. Ungefähr 40 % der Patienten neigen jedoch zu Rezidiven, die eine schwerere Symptomatik zeigen können ¹⁰⁰.

1.8 Zytomegalievirus

Infektionen mit hCMV sind mit einer Prävalenz von bis zu 30 % bei transplantierten Patienten (je nach Art des Transplantats) mit großen Risiken und hohen Kosten verbunden ¹⁰¹⁻¹⁰³. Bei CMV positiven Empfängern einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation ist eine präemptive Therapie mit Letemovir indiziert ¹⁰⁴. Weitere Substanzen wie z.B. Maribavir und Brincidofovir sind nicht für die Behandlung in Deutschland zugelassen ¹⁰⁵. Eine prophylaktische Therapie mit Ganciclovir (GCV) intravenös oder Valganciclovir oral wird von der „American Society for Transplantations“ für Patienten nach Nierentransplantation empfohlen ¹⁰⁶. Die prophylaktische Gabe von GCV birgt aber auch das Risiko der Resistenzbildung ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Laut Leitlinie wird im Falle einer Resistenz eine Minimierung der Dosis der immunsuppressiven Medikamente empfohlen, welche ein größeres Risiko für eine Abstoßungsreaktion mit sich bringt ¹⁰⁶. Eine optimale Therapie bei hCMV-Infektion gibt es nicht. Neue Versuche zur Etablierung eines Antikörpers sowie Hyperimmunglobulin-Gabe zur CMV-Therapie sind bereits erfolgt ¹¹⁰. Alternativ ist auch die Etablierung weiterer antivirale Medikamente in Betracht zu ziehen. Auch pränatale Infektionen von Feten durch vertikale Transmission sind im Kontext von hCMV-Infektionen zu nennen. Laut RKI ist das hCMV der häufigste Erreger einer pränatalen Infektion weltweit ^{111,112}. Infektionen seronegativer Mütter während der Schwangerschaft bergen ein großes Infektionsrisiko für den Feten ¹¹¹, da eine Infektion mit hCMV bei immunkompetenten Patienten meistens nur eine leichte Symptomatik verursacht und somit nicht erkannt wird ^{111,113}. Die Komplikationen einer pränatalen CMV-Infektion können sehr unterschiedlich sein und reichen von einem gesundheitlich unbeeinträchtigten Säugling über eine Mittelohrschwerhörigkeit bis zum Abort des Feten ¹¹⁴⁻¹¹⁶. Generell wird zur Therapie das Virostatikum GCV eingesetzt ¹¹¹. Bei Resistenz können Foscarnet (FOS) oder Cidofovir (CDV) (bei Mutation im UL-97 Gen) verwendet werden ^{105,111}. Die Medikamente FOS und CDV weisen eine hohe Nephrotoxizität und im Falle von GCV eine Myelotoxizität auf ^{105,111}. Für Schwangere und stillende Frauen

werden diese Medikamente nicht empfohlen¹¹¹. Auch für Kinder stellt der Einsatz dieser Medikamente ein „off-label-use“ dar¹¹¹. Alternative Therapieansätze mit Hyperimmunglobulinen sind für Patienten nach Organtransplantation zugelassen¹⁰⁵, bei schwangeren Frauen jedoch umstritten¹¹⁷⁻¹¹⁹. Trotz Therapie ist eine Heilung heutzutage nicht möglich, da das Virus lebenslang persistieren und reaktivieren kann¹²⁰. Daher ist eine Infektion, vor allem von Schwangeren, sehr schwierig zu therapieren und die Etablierung neuer Therapiemöglichkeiten von weltweiter Bedeutung.

1.9 Medikamentöse Therapie

Da Viren die Strukturen der Wirtszelle für ihre Replikation nutzen, ist eine selektive Bekämpfung der Viren ohne Schädigung körpereigener Zellen nicht immer möglich. Daher können viele Virostatika auch erhebliche Nebenwirkungen haben. Des Weiteren ist es bis heute nicht möglich bei Viren, die persistieren können, wie z.B. HIV-1^{121,122}, HSV-1¹²³ oder das hCMV¹²⁴⁻¹²⁶, eine Ausheilung des Organismus durch Medikamente zu erreichen. Die beste Alternative zu einer direkt antiviralen Therapie stellen die präventiven Impfungen dar¹²⁷. Da aktive Impfungen jedoch erst ab einem bestimmten Alter eingesetzt werden dürfen, sind vor allem Kinder, aber auch immunsupprimierte Patienten und Schwangere, bei denen aktive Impfungen kontraindiziert sind, eine Risikogruppe für virale Infektionen^{128,129}. Auch Virusstämme, die Resistenzen gegen die herkömmlichen Therapiemaßnahmen entwickelt haben, erhöhen den Druck, neue Behandlungsmöglichkeiten zu etablieren^{130,131}.

Eine möglichst effiziente Therapie sollte immer ohne großen Aufwand und mit möglichst geringen Kosten durchzuführen, die Einnahme der Substanz einfach und zeitlich beschränkt sein. Außerdem sind eine hohe Effektivität und geringe Nebenwirkungen wünschenswert. Etwaige Nebenwirkungen könnten die Adhärenz der Patienten verschlechtern, und einen Therapieabbruch zur Folge haben¹³². Um die Adhärenz der Patienten sicher zu stellen, muss im Vorfeld eine gute Aufklärung über Symptome und Folgen der Infektionen bei Therapieabbruch erfolgen¹³². Therapieabbrüche sowie eine Wiederaufnahme der Therapie nach vorherigem Aussetzen könnten auch eine erhöhte Resistenzbildung der Viren gegenüber den Medikamenten hervorrufen mit dem Risiko einer schlechteren Wirkung der Therapie^{133,134}.

1.10 Direkt-antivirale Medikamente

HIV-1: Direkt-antivirale Medikamente bedienen sich verschiedener Mechanismen und Zielstrukturen, um die virale Replikation zu hemmen. Besonders geeignet als Zielstruktur sind Virushüllproteine, da sie häufig virusspezifisch sind und schon frühzeitig durch Medikamente in den Replikationszyklus der Viren eingegriffen wird¹³⁵. Durch ein inhibierendes Agens, welches mit der Funktion der Hüllproteine interagiert, wird der Eintritt des Virus in die Wirtszelle verhindert¹³⁵. Diese Substanzen werden als „Entry-inhibitors“ bezeichnet und weiterhin in „Attachment-Inhibitoren“, und „Corezeptor-Inhibitoren“ eingeteilt¹³⁶. Der Eintrittsmechanismus von HIV-1 in CD4⁺ T-Zellen wird über die Virushüllproteine gp-120 und gp-41, sowie die humanen Corezeptoren CCR-5 und CXCR-4 gesteuert¹³⁷⁻¹⁴⁰. Maraviroc ist ein CCR-5 „Corezeptor-Inhibitor“ der klinisch eingesetzt wird¹⁴¹. Obwohl CCR-5 ein humanes Oberflächenprotein ist, überwiegen die Vorteile der Therapie und die Nebenwirkungen bleiben gering¹⁴². Enfuvirtid ist der einzige zugelassene Fusions-Inhibitor der an den gp-41 Rezeptor von HIV-1 bindet und somit eine Verschmelzung des Virus mit der Wirtszelle verhindert¹⁴³. Zur Zeit sind Fostemsavir und Ibalizumab als „Attachment-Inhibitor“ für Infektionen mit HIV-1 zugelassen^{144,145}. Fostemsavir bindet an das gp-120 Protein von HIV und verhindern die Bindung und somit den Eintritt des Virus in CD4⁺ T-Zellen¹⁴⁶. Ibalizumab bindet hingegen an den CD4 Rezeptor an T-Lymphozyten und inhibiert einen Eintritt des HIV-1^{147,148}.

Für Infektionen mit HIV-1 sind die ersten antiviralen Kombinationstherapien etabliert, um Resistenzen zu verhindern und die Effizienz der Therapie zu erhöhen¹⁴⁹. Ein verpflichtender Bestandteil der Kombinationstherapie ist der Einsatz von nukleosidischen und nicht-nukleosidischen Polymerase-Inhibitoren¹⁵⁰. Retroviren besitzen eine RNA-abhängigen DNA-Polymerase¹⁵¹. Gegen diese wurden Inhibitoren entwickelt. Nicht-nukleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) wie z.B. Efavirenz hemmen die Reverse Transkriptase allosterisch durch eine Konformationsänderung¹⁵². Nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) imitieren die Strukturen der Nukleoside Adenosin, Guanin, Cytosin und Thymidin. Tenofovir (TDF), Lamivudin (3TC), Zidovudin (AZT) und Abacavir (ABC) als Vertreter dieser Substanzklasse bewirken einen Kettenabbruch, da ihnen eine 3'-OH Gruppe fehlt, und werden als Kombinationstherapie bei HIV-1-Infektionen eingesetzt. Sie werden erst in den Zellen zu ihrer aktiven Form phosphoryliert¹⁵³⁻¹⁵⁶.

Besonders die Möglichkeit, Enzyme und deren aktiven Zentren sichtbar zu machen, hat zu weitreichenden Erfolgen geführt¹⁵⁷. Virale Enzyme sind gute Angriffspunkte für eine gezielte antivirale Therapie, da sie sich häufig von humanen Enzymen unterscheiden, ihre Konzentration in der Zelle meist begrenzt ist und sie daher leichter durch niedrige Dosen zu hemmen sind. Des Weiteren sind Enzymaktivitäten und somit die Wirkung der Medikamente gut messbar. Integrase-Inhibitoren wie z.B. Raltegravir stellen eine weitere Wirkstoffgruppe dar, die zur Therapie von HIV-1-Infektionen angewandt wird. Die Integrase ist ein Enzym, welches die virale DNA in die humane DNA einbaut und durch dessen Inhibierung keine infektiösen Viruspartikel mehr produziert werden können¹⁵⁸. Außerdem erzeugen alle Retroviren und RNA-Viren während ihrer Replikation ein Polyprotein, welches erst im späteren Verlauf des Replikationszyklus durch eine virale Protease in funktionelle Proteine gespalten wird¹⁵⁹. Die Protease ist somit eine gute Zielstruktur für eine direkte-antivirale Therapie. Protease-Inhibitoren für die Behandlung von Infektionen mit HIV-1 verhindern eine Spaltung des Gag-Pol-Polyproteins und haben zur Folge, dass nur noch nicht-infektiöse Viruspartikel freigesetzt werden^{160,161}.

Hepatitis-C-Virus: Antivirale Medikamente wie Simeprevir (SMV) und Grazoprevir (GRV) für einige Genotypen des Hepatitis-C-Virus (HCV) hemmen die NS3/4A-Serinprotease und verhindern dadurch ebenfalls eine Spaltung des Polyproteins¹⁶²⁻¹⁶⁵. Klinisch eingesetzte Medikamente, welche das NS5A-Protein von HCV hemmen, sind Ombitasvir, Daclatasvir (DCV), Ledipasvir (LDV), Elbasvir (ELB) und Velpatasvir (VEL)¹⁶⁶. NS5A ist ein phosphoryliertes nicht-struktur Protein, das keine enzymatische Funktion besitzt¹⁶⁷. Daher ist die genaue Wirkungsweise noch nicht vollständig geklärt¹⁶⁸. Ein wichtiger Effekt ist die Hemmung des HCV-Replikationszyklus durch die Inhibition des NS5A-Proteins^{167,169-171}. Der große Vorteil dieser Medikamente ist, dass sie schon in sehr geringen Konzentrationen eine Wirkung zeigen¹⁷²⁻¹⁷⁶. Um Resistenzbildung zu vermeiden, werden diese Stoffe für eine zuverlässige HCV-Therapie jedoch meistens in Kombinationspräparaten mit z.B. Sofosbuvir (SOF) verabreicht¹⁶⁶. SOF ist ein pangentypischer Inhibitor der RNA-abhängigen HCV RNA-Polymerase¹⁷⁷. Es wird als Uridin-Analogon während der Replikation eingebaut und führt zum Kettenabbruch¹⁷⁸. Dasabuvir (DSV) ist hingegen ein nicht-nukleosidischer Hemmer der RNA-abhängigen HCV RNA-Polymerase¹⁷⁹. Beide Medikamente werden auch als NS5B-Inhibitoren bezeichnet, da die RNA-abhängige RNA-Polymerase durch das NS5B-Gen codiert wird¹⁸⁰.

Herpes-Viren: Außerdem werden auch DNA-abhängige Polymerasen, wie bei den Medikamenten CDV und FOS als Zielstrukturen verwendet ^{181,182}. CDV ist ein Cytidin-Analogon, das zur Therapie GCV resistenter hCMV-Infektionen eingesetzt wird ¹⁶⁶. Wie auch andere DNA-Polymerase-Inhibitoren führt CDV zu einem Kettenabbruch und inhibiert dadurch den viralen Replikationszyklus ¹⁸¹. FOS ist ein Pyrophosphat Analogon ¹⁸². Es lagert sich kompetitiv an die Pyrophosphatbindestelle der Reversen Transkriptase von HIV-1 und der DNA-Polymerase von Herpes-Viren an und inhibiert diese ¹⁸². Weiterhin existieren „Prodrugs“ wie z.B. ACV, die erst von einem viruseigenen Enzym aktiviert werden und somit nebenwirkungsarm sind ¹⁸³. ACV ist ein Nucleosidanalogon und wird durch eine viruseigene Thymidin-Kinase in HSV-1 und Varizella-Zoster-Virus (VZV) phosphoryliert und führt zum Kettenabbruch ¹⁸⁴. Ähnlich funktioniert das Nucleosidanalogon GCV, das durch die Proteinkinase (UL-97) in hCMV phosphoryliert wird ¹⁸⁵. Auch das 2014 in Japan zugelassene Medikament Favipiravir (T-705) inhibiert die RNA-abhängige RNA-Polymerase von Influenza-Viren ¹⁸⁶. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht bekannt, es wurde aber über die Induktion von Kettenabbrüchen und letalen Hypermutationen durch die Substanz berichtet ¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Die Substanz ist zugelassen für pandemische Infektionen mit Influenza-Viren, zeigt aber auch Wirkung gegen einige andere RNA-Viren ¹⁸⁹⁻¹⁹⁴. T-705 ist ein Purin-Analogon, das in den Zellen zu seiner aktiven Form phosphoryliert und nur von der viralen RNA-Polymerase als Substrat erkannt wird ^{186,191,192,195}. Studien zur klinischen Anwendbarkeit werden zur Zeit durchgeführt ¹⁹⁶.

Doch selbst nach der Entdeckung oder Entwicklung solcher Substanzen ist es noch ein weiter Weg bis zur klinischen Zulassung. Eine einfachere Alternative ist die Testung bereits klinisch zugelassener Substanzen auf ihre Wirkung gegen andere Viren. Da die klinische Symptomatik meist mit der Höhe der Viruslast korreliert, kann durch medikamentöse Senkung der Viruslast *in vitro* auch auf eine Besserung der Symptome geschlossen werden ¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Daher wurden im Zuge dieser Arbeit die oben genannten Medikamente auf ihre Wirkung gegen die beschriebenen Viren getestet.

Tabelle 1: Klinische Therapie, Impfungen und Medikamenten gegen virale Infektionen

Virus	Direkt antivirale Therapie	Impfung	Ergebnisse
CHIKV	-	-	-
hCMV	GCV, CDV, FOS, Letermovir	-	-
mCMV	-	-	TDF, VEL, ABC
DENV	-	+ ¹	ELB, LDV
HIV-1	Corezeptor-Inhibitor, Integrase-Inhibitor, NNRTI, NRTI, Protease-Inhibitoren	-	GRV
HSV-1	ACV	-	TDF, ABC, AZT, ELB
Masernvirus	-	+	-
Parainfluenzavirus-3	-	-	-
Poliovirus	-	++	-
RSV	-	+ ²	-

¹ Impfung für DENV-Infektionen nur in bestimmten Fällen empfohlen ⁴⁸

² Pavilizumab nur für Risikopatienten empfohlen ^{10,13}

Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte einiger direkt wirkenden antiviralen Medikamente auf die im Text beschriebene Viren zu untersuchen. Insgesamt wurden 16 Substanzen auf Ihre Wirkung auf 10 Viren getestet. In die Versuchsreihe wurden NS3/4A Protease-, DNA- und RNA- Polymerase- Inhibitoren sowie die NS5A-Inhibitoren aufgenommen. Es ist anzunehmen, dass direkt antivirale Medikamente nicht nur für die bereits bekannten Anwendungen wirksam sind, sondern auch eine Wirkung auf andere virale Infektionen zeigen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Viren

egfp-kodierendes Masern (Wildtyp Virus; erhalten von Prof. Dr. J. Schneider-Schaulies²⁰⁰); DENV Serotyp-2 (DENV-2)²⁰¹; HIV-pNL4.3²⁰²; CHIKV²⁰³, Polio Virus (Impfstamm); *egfp*-kodierendes mCMV, *egfp*-kodierendes HSV-1 (erhalten mit Genehmigung von Lars Dölken, Leiter des Instituts für Virologie Würzburg); hCMV, RSV, Parainfluenza-3 (Patientenisolate; erhalten mit Genehmigung der Diagnostischen Abteilung des Instituts für Virologie Würzburg)

2.1.2 Zelllinien

BHK21- Hamster fibroblasten Zellen (ATCC CLL-10); NIH-3T3- Maus fibroblasten Zellen (ATCC CRL-1658); MRC-5- humane fibroblasten Zellen (ATCC CCL-171); HepG2- humane epitheliale Zellen (ATCC HB-8065); Vero-SLAM- Affen epitheliale Zellen (erhalten von Prof. Dr. J. Schneider-Schaulies); LLC-MK2- Affen epitheliale Zellen (ATC CCL-7); MT-4- humane lymphoblasten Zellen (erhalten von Prof. Dr. med. H.G. Kräusslich, Abteilung Virologie Heidelberg); TZM-bl- humane epithel Zellen, infiziert mit murinem leukämie Virus (erhalten von Prof. Dr. med. H.G. Kräusslich, Abteilung Virologie Heidelberg)

2.1.3 Sonden

Alle Sonden wurden über die Firma Roche bezogen.

Sonde 157	3'-ATGGTGGT-5'
Sonde 147	3'-GCCATCAA-5'
Sonde 140	3'-GGCAAAGA-5'
Sonde 111	3'-AGGCTGAG-5'

2.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide und Positivkontrollen wurden über die Firma Roche bezogen.

Genbank-Nummer: KY490088.1

hCMV codierender-Strang Primer; Sonde 157: 5'-GTTTGCCCACCAGTCGTC-3'

hCMV codogener-Strang Primer; Sonde 157: 3'-GGTGATGGGGGATTTTTCA-5'

hCMV Primer; Sonde 157. (Positivkontrolle): 5'-GGTGATGGGGGATTTTTCAGT
GTATTTGGTGACCATAATGGTGGTCTGACGACTGGTGGGCAAAC-3'

Amplicon 60 nt

hCMV codierender-Strang Primer; Sonde 140: 5'-TCCCTTCGACGAGCAGTC-3'

hCMV codogener-Strang Primer; Sonde 140: 3'-GCGGTTCTCGTTGTCGTA5'

hCMV; Sonde 140. (Positivkontrolle): 5'-GCGTTGTCGTTGTCGTACCGGCAAG
ACGGTGAGATCCAATAGCGACTGCTCGTTCGAAGGGA-3'

Amplicon 63nt

Genbank-Nummer: MH 781015

DENV codierender-Strang Primer; Sonde 111: 5'-CTGGTTTCATGCAGCGTCG-3'

DENV codogener-Strang Primer; Sonde 111: 3'-TTCAGAAATGGGTGCCAAC-5'

DENV; Sonde 111 (Positivkontrolle): 5'-TTCAGAAATGGGTGCCAACTTCAAGG
CTGAGAGGGTTATAGACCCCAGACGCTGCATGAAACCAG-3'

Amplicon 65nt

2.1.5 Medikamente

Foscarnet (FOS) und Ganciclovir (GCV) (L. Dölken)

Favipiravir (T-705) (TargetMol)

Alle weiteren Medikamente wurden von Herrn. Prof. Dr. med. Klinker zur Verfügung gestellt.

Reinsubstanzen: Cidofovir (CDV), Daclatasvir (DSV), Dasabuvir (DSV), Elbasvir
(ELB), Grazoprevir (GRV), Ledipasvir (LDV), Simeprevir (SMV),
Sofosbuvir (SOF)

Tabletten/ Kapseln: Abacavir (ABC) (Fixkombination mit Lamivudin; ViiV
Healthcare), Zidovudin (AZT) (ViiV Healthcare), Aciclovir (ACV),
Lamivudin (3TC) (GlaxoSmithKline), Tenofovir (TDF) (Gilead
Sciences)

2.1.6 Kits

High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Germany, Version 19, REF 1185887400); E.Z.N.A.[®] Viral RNA Kit (Omega, Germany, REF R6874-02), E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit (Omega, Germany, REF R6834-02); LightCycler[®] 480 RNA Master Hydrolysis Probes (Roche, Germany, Version 08, REF 04991885001); LightMix Modular RSV (Roche, Germany, REF 61-0110-96); LightMix Modular Parainfluenza (Roche, Germany, REF 53-0113-96); LightMix Modular Chikungunya (Roche, Germany, REF 50-0676-96), LightMix Modular Enterovirus (Roche, Germany, REF 64-0656-96)

2.1.7 PCR Programme:

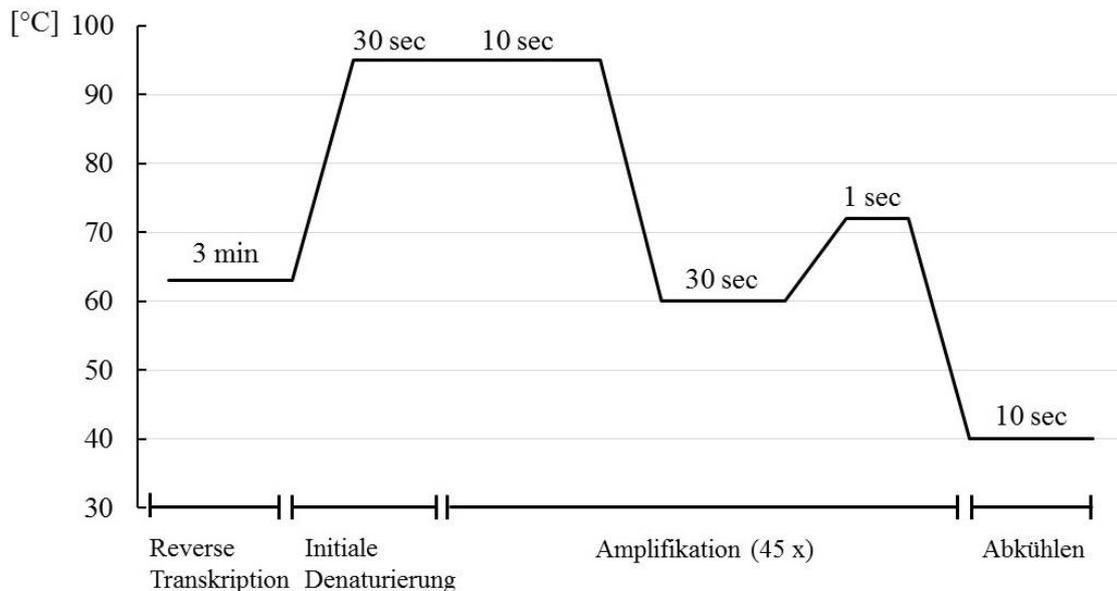


Abbildung 1: Einstellungen der genutzten PCR Programme. Die Einstellungen wurden aus dem „Protocol for use with LightCycler 480 Multiwell Plate 96, Version 08“ (Roche, Deutschland) übernommen.

2.1.8 Laborgeräte

LightCycler[®] II 480 (Roche, Germany), LightCycler[®] 96 (Roche, Germany), En Sight Multimode Plate Reader (Perkin Elmer[®], Germany), Spektrophometer Spectra Max[®] Plus 384 (Molecular Devices, Germany), NanoDrop2000 Spectrophometer (Thermo Scientific, Germany), für die Geräte wurde die vom Hersteller angegebenen Softwares verwendet.

2.1.9 Reagenzien

Alle Reagenzien wurden von den Firmen Sigma Aldrich und Aplicon bezogen.

ATV: 8,0 NaCl; 0,27g KCl; 1,15g Na₂ HPO₄; 0,1g MgSO₄ x 7H₂O; 1,125g Na₂-EDTA; 1,25g Trypsin → ad 1l destilliertes H₂O

MEM Minimum Essential Medium REF 31095-029 (Thermo Fischer Scientific); ergänzt mit 0,05 % Penicillin; 0,05 % Streptomycin; 5 % L-Glutamin; 10 % FKS (Komplementinaktiviert)

DMEM-Dulbecco's Modified Eagle Medium REF 41966-029 (Thermo Fischer Scientific); ergänzt mit 0,05 % Penicillin; 0,05 % Streptomycin; 5 % L-Glutamin; 10 % FKS (Komplementinaktiviert)

RPMI Media 1640 REF 21875-034 (Thermo Fischer Scientific); ergänzt mit 0,05 % Penicillin; 0,05 % Streptomycin; 5 % L-Glutamin; 10 % FKS (Komplementinaktiviert)

X-Gal Lösung: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid

MTS-Lösung (Promega): 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

MgCl₂ (Magnesiumchlorid)

K₃[Fe(CN)₆] Kaliumhexacyanoferrat(3)

K₄[Fe(CN)₆] Kaliumhexacyanoferrat(2)

2.1.10 Puffer

PBS: 137mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 1,4 mM KH₂PO₄; 1,5mM, CaCl₂; 1mM MgCl₂

2.2 Methoden

2.2.1 Verdünnungen

Alle Reinsubstanzen wurden zu Beginn auf eine Konzentration von 30 mM verdünnt. Als Verdünnungsmittel wurde, wie vom Hersteller angegeben, DMSO, für ABC H₂O verwendet. Danach wurden alle Substanzen in Volumina von 10 µl aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Medikamente in Tablettenform wurden zuerst zermörsert und anschließend ultrafiltriert um andere Bestandteile der Tabletten zu eliminieren.

2.2.2 Zellkulturen

Alle Zelllinien wurden aus den laboreigenen Beständen bezogen. Die Zellen wurden in einem Volumen von 1 ml bei -120 °C gelagert. Jeweils 1 ml frisch aufgetaute Zellen wurden pro 10 ml Zellkultur-Flasche verwendet und mit 9 ml Medium aufgefüllt. Nach 24 h Inkubationszeit (37 °C, 5 % CO₂) wurde die Viabilität der Zellen mikroskopisch geprüft und das Medium gewechselt. Alle Medien wurden vor Gebrauch 30 min in einem Wasserbad bei 25 °C erwärmt. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für BHK21, NIH-3T3, HepG2, MRC-5 und TZM-bl Zellen wurde DMEM Medium (2.1.9) verwendet. Für die Zelllinien Vero-SLAM und LLC-MK2 wurde MEM Medium (2.1.9), und für die einzige nicht adhärente Zelllinie MT-4 wurde RPMI Medium verwendet (2.1.9). Die Zellen wurden in Flaschen bei einer Zelldichte von ca. 80 % gehalten. Zum Ablösen der Zellen wurden 2 ml, bei 25 °C erwärmtes Trypsin verwendet. Die Adhärenz der Zellen wurde mikroskopisch überprüft. Zur Virusproduktion wurde 1/5 der Zellen in Kultur in eine neue Zellkultur-Flasche transferiert. Die Zellkultur-Flaschen wurden auf 10 ml bzw. 20 ml Volumen mit dem entsprechenden Medium aufgefüllt und das Virus hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Infektion der Zellen wurde mikroskopisch überprüft. Bei *egfp*-kodierenden Viren wie HSV-1, mCMV und Masernvirus wurde die Infektion durch die grün-fluoreszierenden Zellen in der Zellkultur-Flasche beurteilt. Bei Viren mit einem hohen Effekt auf die Zellviabilität wie Poliovirus und CHIKV wurde die Infektion durch die Verringerung der lebenden Zellen beurteilt. Bei anderen Viren wie HIV-1, DENV, RSV und Parainfluenzavirus-3 wurde die Infektion durch die morphologische Veränderung der Zellen, die unter dem Mikroskop sichtbar wurde, eingeschätzt. Bei einer Infektion von > 50 % der Zellen wurden die Zellen mit 2 ml erwärmten Trypsin gelöst. Nach 3-5 min Inkubationszeit

(37 °C, 5 % CO₂) mit 3 ml Medium aufgefüllt und resuspendiert. Zu den infizierten Zellen wurde ein neuer Anteil nicht-infizierter Zellen gegeben und das fehlende Volumen mit Medium aufgefüllt. Um Virusstock zu produzieren wurde der Überstand der infizierten Flaschen abgenommen, jeweils 500 µl pro Plastik-Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.3 Toxizitätskontrolle

Die Zytotoxizität der eingesetzten antiviralen Substanzen wurde mittels MTS-Test (Promega) ermittelt ²⁰⁴. Der Test wurde laut Angaben des Herstellers verwendet. Zu Beginn wurden für jede Zelllinie zwei 96-„well“-Platten (2 x 10³ Zellen / 100 µl Medium pro „well“) ausplattiert. Im Anschluss wurden alle Substanzen in Triplets hinzugegeben, in einer Konzentration von 30 µM und 10 µM. Als Vergleichswert wurde zusätzlich auf jede Platte eine DMSO- und H₂O-Kontrolle aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 96 h (36 °C, 5 % CO₂) wurden pro „well“ 5 µl der MTS-Lösung hinzugegeben. Die Absorption wurde bei 490 nm nach jeweils 1 h und 2 h spektrophotometrisch gemessen.

2.2.4 Inkubation der Viren mit zu testenden Substanzen

Für Infektionen mit HS-1-, mCM-, HI-1-, DEN-2-, CHIK-, Polio-, RS- und Parainfluenzavirus-3 wurden 48-„well“-Platten (2 x 10³ Zellen / 800 µl Medium pro „well“, für Poliovirus 4 x 10³ Zellen / 100 µl Medium pro „well“) ausplattiert und die Zellen über Nacht inkubiert (36 °C, 5 % CO₂). Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 100 µl aufgetautem Virusüberstand infiziert. Zusätzlich wurde in 100 µl Medium verdünnte Substanz in verschiedenen Konzentrationen (s.h. Ergebnisteil) in Triplets hinzugegeben. Es wurde auf jede Platte eine DMSO-Kontrolle, und auf die Platten mit ABC auch eine H₂O-Kontrolle aufgetragen. Die erfolgreiche Infektion der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Bei Infektionen mit HSV-1 und mCMV wurden adhärente Zellen auf einer 48-„well“-Platte (2 x 10³ Zellen / 900 µl Medium pro „well“) nach 96 h mit 100 µl zentrifugiertem (2000 rpm, 5 min) Überstand der ersten Platte infiziert. Die infizierten Zellen wurden für 96 h inkubiert (36 °C, 5 % CO₂).

Bei Infektionen mit Masernvirus wurde auf 96-„well“-Platten gearbeitet. Zu Beginn wurden 2 x 10³ Zellen / 90 µl Medium pro „well“ ausplattiert. Anschließend wurden die verdünnten Substanzen in einer Konzentration von 30 bzw. 10 µM in Triplets zu den

adhärenten Zellen hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Anzahl der infizierten Zellen durch die Zahl der grün-fluoreszierenden Zellen ermittelt.

Für Infektionen mit hCMV wurden 6-„well“-Platten (2×10^3 Zellen / 2 ml Medium pro „well“) ausplattiert. Von den adhärenten Zellen wurde das Medium wieder abgenommen und 1250 μ l aufgetauter Virusüberstand in die „wells“ durch langsames Eintropfen über den Rand dazugegeben. Die Substanzen wurden so verdünnt, dass sie in einem Volumen von 750 μ l hinzugegeben werden konnten. Nach 7 h wurde der Überstand abgenommen und neues Medium und die Substanzen in derselben Konzentration wie zuvor dazugegeben.

2.2.5 Messung der Infektiosität bei GFP- markierten Viren

Die Versuche mit Infektionen mit HSV-1 und mCMV wurden nach 96 h, die Versuche mit Infektionen mit Masernvirus nach 48 h ausgewertet. Die Zahl der infizierten Zellen wurde durch Fluoreszenzzählung mittels Ensight, Multimode Plate Reader (Perkin Elmer®) gemessen.

2.2.6 Messung der Infektiosität bei HIV-1

MT-4 Zellen wurden auf 48-„well“-Platten (2×10^3 Zellen / 90 μ l Medium pro „well“) ausgesät und 24 h inkubiert. Der Überstand der mit HIV-1 infizierten Platten wurde abgenommen und zentrifugiert (2000 rpm, 5 min). Jeweils 10 μ l des Überstands wurde pro „well“ auf adhärente TZM-bl Zellen auf einer 96-„well“-Platte (2×10^3 Zellen/ 90 μ l Medium pro „well“) hinzugegeben. Die Zellen wurden für 48 h inkubiert. Der Überstand in den „wells“ wurde auf Tüchern ausgeklopft, pro „well“ 100 μ l Methanolaceton hinzugefügt und nach 5 min abgeklopft. Die Zellen wurden drei Mal mit PBS-Puffer gewaschen und mittels X-Gal Färbung gefärbt²⁰⁵. Die Färbelösung wurde mit 83 % PBS Puffer, 0,04 % X-Gal; 0,02 % $MgCl_2$; und jeweils 0,05 % K_3 und K_4 angesetzt. Pro „well“ wurden 45 μ l der Färbelösung hinzugegeben. Nach 24 h wurden die blauen Zellen als Korrelat für die infizierten Zellen gezählt.

2.2.7 RNA Gewinnung

Für Parainfluenzavirus-3, RSV und DENV-2 wurden nach 96 h die Überstände abgenommen, zentrifugiert (2000 rpm, 5 min) und RNA gewonnen. Bei Infektionen mit Poliovirus wurden nach 24 h, bei Infektionen mit CHIKV nach 72 h die Überstände abgenommen. Für die RNA-Extraktion wurde das „High Pure Viral Nucleic Acid Kit“ laut Angaben des Herstellers verwendet. Nach dem zweiten Waschvorgang wurden die Proben zusätzlich 1 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Bei allen Versuchen wurden die Proben mit 50 µl eluiert. Die gewonnene RNA wurde bei - 80 °C aufbewahrt und für weitere Versuche auf Eis transportiert und gelagert.

Bei Infektionen mit hCMV wurde nach 120 h das Medium abgenommen und aus dem Zellrasen gesamte RNA mit dem „E.Z.N.A.® Viral RNA Kit und E.Z.N.A.® Total RNA Kit“ gewonnen. Das Kit wurde laut Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.8 PCR Ansätze

Zum Ansetzen des Reaktionsgemisches jeder PCR wurde das Kit „LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes Version 08“ verwendet. Das Kit wurde mit den Kits für die jeweiligen Viren (RSV, Parainfluenzavirus, CHIKV, Poliovirus) von TIB MOLBIOL erweitert. Die Ansätze wurden nach Angaben des Herstellers pipettiert. Als einzige Abweichung zum Protokoll wurden 5 µl RNA anstatt 2 µl zu 15 µl Ansatz hinzugegeben. Alle Proben wurden als Triplets auf die PCR-Platte hinzugegeben. Nach dem Auftragen der 5 µl Probe wurde der gesamte Ansatz von 20 µl resuspendiert. Danach wurde die Platte bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert. Die jeweiligen PCR-Programme wurden wie vom Hersteller angegeben verwendet. Gearbeitet wurde mit dem „Light Cycler® 480 II“ oder im Falle von RSV mit dem „Light Cycler® 96“. Ausgewertet wurden die Daten mit dem vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software „LightCycler® 480 SW“ und „Light Cycler® 96 SW 1.1“.

2.2.9 Labor eigene PCR Ansätze

Auch für eigen konstruierte PCR-Ansätze wurde das LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes zum Ansetzen des Reaktionsgemisches verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei „Universal ProbeLibrary Assay Design Center“ erstellt und von Sigma Aldrich bezogen. Die Oligonukleotide wurden nach Erhalt bei 2000 rpm zentrifugiert, in DNA-freiem Wasser auf 100 µM verdünnt bei einem Volumen von 2 µl,

in Plastik-Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei - 20 °C aufbewahrt. Die Oligonukleotide wurden in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 0,5 µM zum Reaktionsansatz zugegeben.

Die Positivkontrollen wurden bei 2000 rpm zentrifugiert, in DNA-freiem Wasser auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt und bei -20 °C aufbewahrt. Alle Ansätze der PCR-Proben wurden wie vom Hersteller angegeben angesetzt. Als einzige Abweichung vom Protokoll wurden pro Ansatz mit 15 µl Reaktionsgemisch und 5 µl RNA gearbeitet. Zur Quantifizierung der Genomsequenzen eines spät-exprimierenden Gens bei Infektionen mit hCMV wurde eine RTqPCR durchgeführt. Der RNA-Gehalt der einzelnen hCMV Proben wurde mit dem Gerät „NanoDrop200“ in ng/µl ermittelt und mit den PCR-Ergebnissen verrechnet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Genomkopien/ Gesamt-RNA.

2.2.10 PCR Effizienz

Um die Effizienz jeder PCR berechnen zu können wurden für jede Virusinfektion eine Standardreihe erstellt. Es wurden die in den Kits zur Verfügung gestellten Positivkontrollen mit einer Konzentration von 1×10^3 Kopien, oder die eigen erstellten Positivkontrollen auf 3×10^4 Kopien verdünnt verwendet. Jede Standardreihe wurde aus fünf Werten pro Konzentration erstellt. Für die Konzentrationen wurde eine 1:5 Verdünnung verwendet. Auf alle weiteren PCR-Platten wurde ein Standardwert in Triplets aufgetragen. Hierbei wurde entweder die Positivprobe aus den Kits unverdünnt verwendet oder die eigen konstruierte Kontrolle in einer Verdünnung von 6×10^3 Kopien. Die Effizienz für die Auswertung der weiteren PCR-Proben wurde von den Standardreihen übernommen.

2.2.11 Zellpathogenitätskontrolle CHIKV und Poliovirus

Bei Infektionen mit CHIKV und Poliovirus wurde der zytopathische Effekt des Virus mittels MTS-Tests bestimmt. Für Infektionen mit CHIKV wurden BHK21 Zellen, für Infektionen mit Poliovirus Vero-SLAM Zellen auf 96-„well“-Platten (2×10^3 Zellen/ 100 µl Medium pro „well“) ausplattiert und für 24 h inkubiert (36 °C, 5 % CO₂). Nach 24 h wurden 50 µl aufgetauter Virusüberstand und die Substanzen in einer Endkonzentration von 30 µM hinzugefügt. Die Überstände der infizierten Platten wurden abgenommen und zentrifugiert (2000 rpm, 5 min). Jeweils 10 µl des Überstands wurde

pro „well“ auf adhärente BHK21 Zellen bzw. Vero-SLAM Zellen auf einer 96-„well“-Platte (2×10^3 Zellen/ 90 μ l Medium pro „well“) hinzugegeben. Bei Infektionen mit CHIKV wurde nach 72 h, bei Infektionen mit Poliovirus nach 24 h die Zytotoxizität mittels MTS-Tests gemessen. Pro „well“ wurden 5 μ l MTS-Lösung hinzugegeben. Die Ergebnisse wurden bei 490 nm nach 1 h und 2 h spektrophotometrisch bestimmt. Bei weiteren Versuchen mit Poliovirus-Infektionen und den Substanzen DCV, DSV, SMV, GRV, ELB und LDV wurden nach 48 h die Überstände abgenommen, zentrifugiert und jeweils 10 μ l Überstand zu adhärenen Vero-SLAM Zellen auf einer 96-„well“-Platte (500 Zellen / 90 μ l Medium pro „well“) gegeben. Die Zytotoxizität wurde nach einer Inkubationszeit von 48 h mittels MTS-Tests wie beim ersten Versuch gemessen.

3. Ergebnisse

3.1 HIV-Polymerase-Inhibitoren und Elbasvir hemmen die Replikation von HSV-1

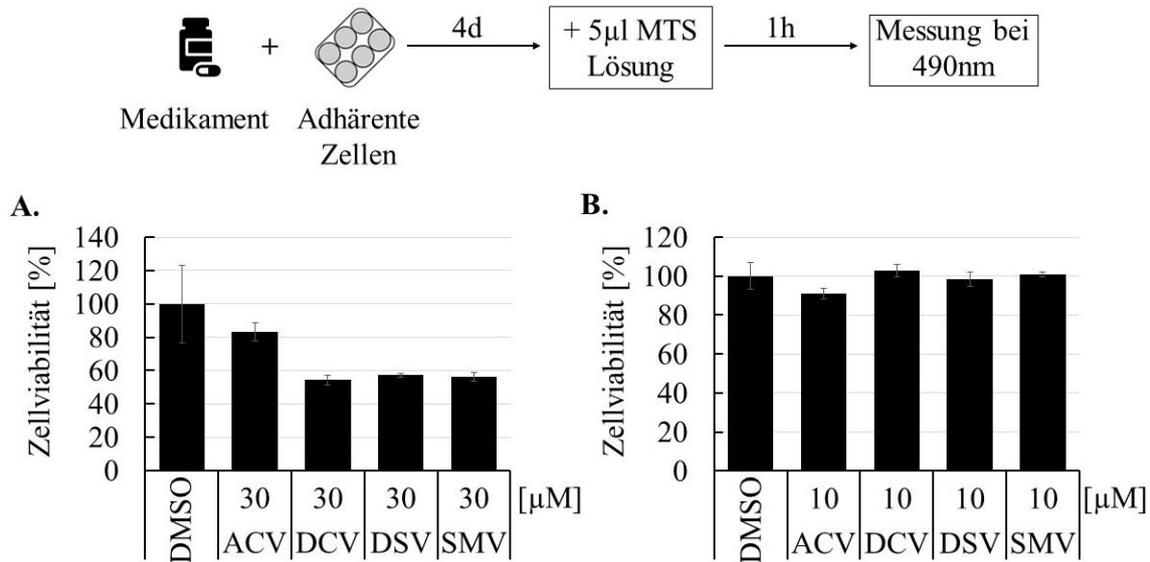


Abbildung 2: DCV, DSV und SMV haben einen zytopathischen Effekt. BHK21 Zellen wurden mit den Substanzen 4 d inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD_{490} nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO

Um die Zytotoxizität der eingesetzten antiviralen Substanzen zu ermitteln wurde ein MTS-Test durchgeführt. Zu Beginn wurden BHK21 Zellen in einer 96-„well“-Platte (2×10^3 Zellen / 100 µl Medium pro „well“) ausplattiert. Im Anschluss wurden alle Substanzen in Triplets mit einer finalen Konzentration von 30 µM oder 10 µM hinzugegeben. Als Vergleichswert wurde zusätzlich auf jede Platte eine DMSO und eine H₂O-Kontrolle in Triplets aufgetragen. Daraufhin wurden die Zellen 4 d lang inkubiert und anschließend pro „well“ 5 µl der MTS-Lösung hinzugegeben. Die Absorption wurde bei 490 nm nach jeweils 1 h und 2 h spektrophotometrisch bestimmt. Die Ergebnisse zeigen eine Zytotoxizität der Substanzen DCV, DSV und SMV bei einer Konzentration von 30 µM, jedoch nicht bei einer Konzentration von 10 µM (Abbildung 2). Bei allen anderen Substanzen wurde kein Effekt auf die Zellviabilität beobachtet. Daher wurden in den folgenden Versuchen die Substanzen in einer maximalen Konzentration von 30 µM DCV, DSV und SMV in Konzentrationen von 10 µM oder kleiner verwendet.

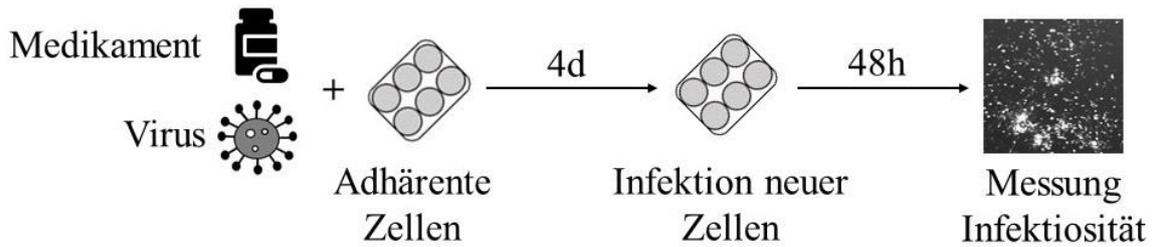


Abbildung 3: Schema der Analyse von *egfp*-kodierendem HSV-1 und mCMV. Zellen wurden mit den Substanzen und den jeweiligen Viren 4 d inkubiert. Anschließend wurden neue Zellen mit den zentrifugierten Überständen infiziert und 48 h inkubiert. Zuletzt wurden die grün fluoreszierenden Zellen mittels „Perkin Elmer Plate Reader Ensight“ gezählt.

Um die Wirkung der Substanzen auf Infektionen mit HSV-1 zu ermitteln wurde in den Versuchen mit *egfp*-codierendem HSV-1 gearbeitet (Abbildung 3). Für Infektionen mit HSV-1 wurden BHK21 Zellen in einer 48-„well“-Platte (2×10^3 Zellen / 800 μ l Medium pro „well“) ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die adhärennten Zellen mit aufgetautem Virusüberstand infiziert. Zusätzlich wurden die Substanzen in Triplets hinzugefügt und auf jede Platte eine DMSO-Kontrolle, auf die Platten mit ABC auch eine H₂O-Kontrolle, in Triplets aufgetragen. Die Infektion der Zellen wurde mikroskopisch durch die Expression von *egfp* kontrolliert (Abbildung 3). Nach 4 d wurden mit den zentrifugierten Überständen adhärennte BHK21 Zellen infiziert und nach weiteren 48 h die *egfp*-exprimierenden Zellen mittels „Perkin Elmer Plate Reader“ ausgezählt (Abbildung 3). Pro Substanz und Konzentration wurden drei Werte ermittelt. Die Substanzen GCV und FOS wurden nicht in die Versuchsreihe mit HSV-1 aufgenommen. Als Positivkontrolle wurde ACV verwendet. Die Replikation von HSV-1 wurde durch ACV bis zu einer Konzentration von 2 μ M mehr als 1 Größenordnung gehemmt und betrug auch bei einer Konzentration von 0,4 μ M noch 0,9 Größenordnungen (Abbildung 4). Für alle Substanzen bis auf DCV, DSV, SMV und ABC wurden die Konzentrationen von 10 bis 0,0036 μ M in einer 1:5 Verdünnungsreihe verwendet. Für die Substanzen DCV, DSV und SMV wurden die Ergebnisse für die Konzentrationen 10 und 2 μ M und bei ABC für die Konzentrationen 30, 10 und 2 μ M ermittelt (Abbildung 4). In den Versuchen wurde eine Senkung der Infektiosität durch TDF um maximal 0,5 Größenordnungen bei einer Konzentration von 10 μ M erreicht (Abbildung 4). Dies entspricht vorausgegangenem Daten²⁰⁶⁻²¹⁰ und zeigt, dass das System reproduzierbare Daten liefert. Des Weiteren wurde auch eine Wirkung von ABC auf HSV-1-Infektionen beobachtet (Abbildung 4). Es wurden weitere Versuche mit der Substanz ABC in den Konzentrationen 30, 10 und 2 μ M vorgenommen.

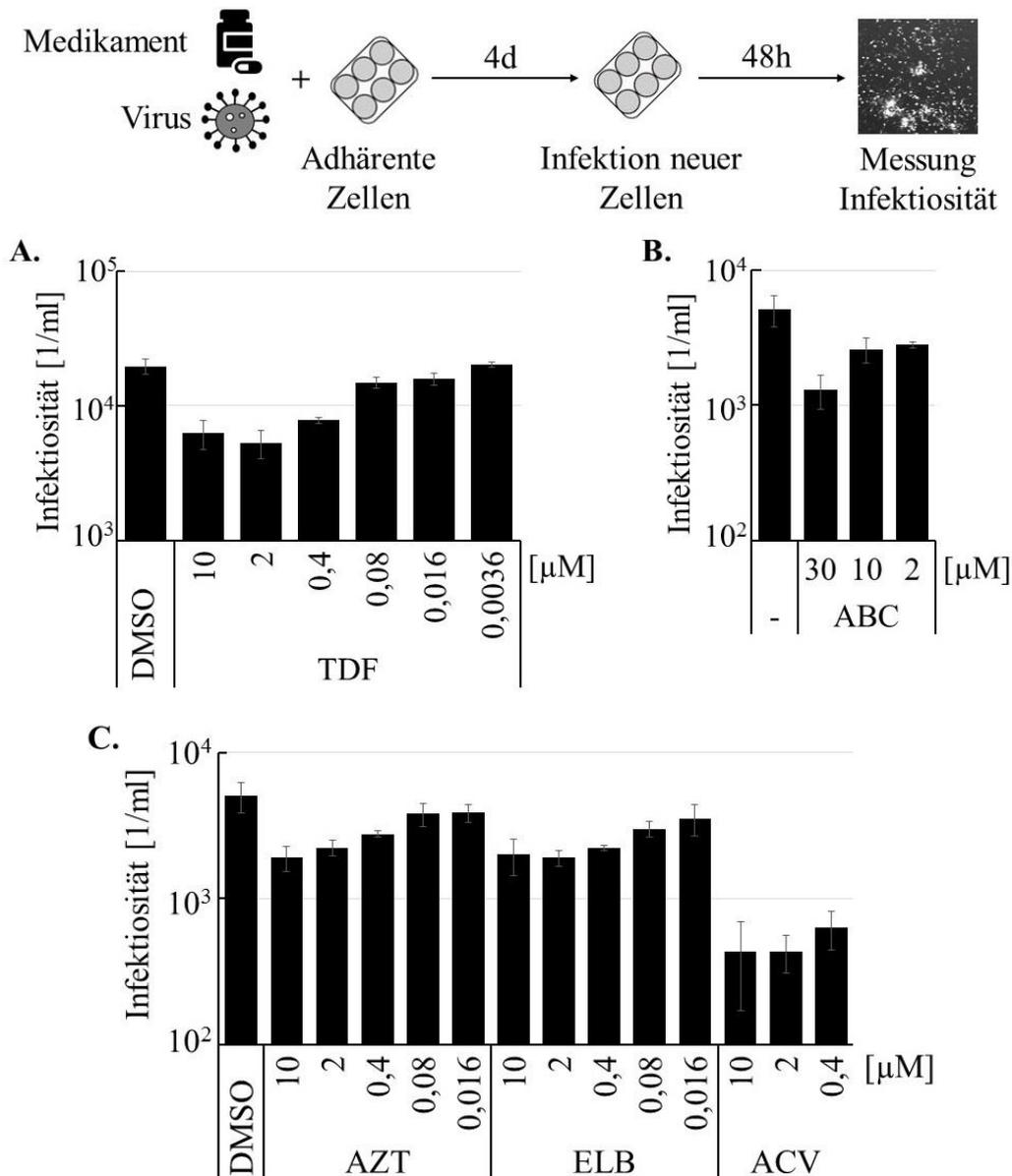


Abbildung 4: TDF (A.) sowie ABC (B.), AZT und ELB (C.) senken die HSV-1 Infektiosität. BHK21 Zellen wurden mit den Substanzen und HSV-1 4 d inkubiert. Mit den Viren im zentrifugierten Überstand wurden neue Zellen infiziert und nach 48 h Inkubationszeit die fluoreszierenden Zellen gezählt. Der Versuchsaufbau ist schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Negativkontrolle: DMSO (A., C.); H₂O (B.) Positivkontrolle (C.): ACV

Dabei wurde jeweils eine Senkung von ca. 0,6, 0,3 und 0,01 Größenordnungen beobachtet (Abbildung 4). ABC wurde in H₂O gelöst und als Kontrollwert H₂O in Triplets auf die Platte aufgetragen (Abbildung 4). Es wurde auch eine geringe Senkung der Infektiosität durch AZT und ELB bei Infektionen mit HSV-1 gezeigt. Die maximalen Differenzen zum Kontrollwert betragen für 10 μM in etwa 0,4 Größenordnungen (Abbildung 4).

3.2 HIV-Polymerase-Inhibitoren und Velpatasvir hemmen die Replikation von mCMV

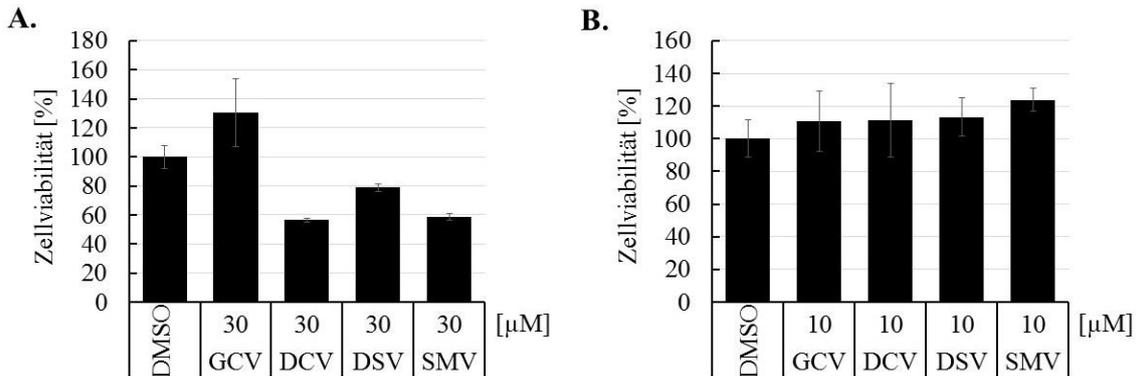
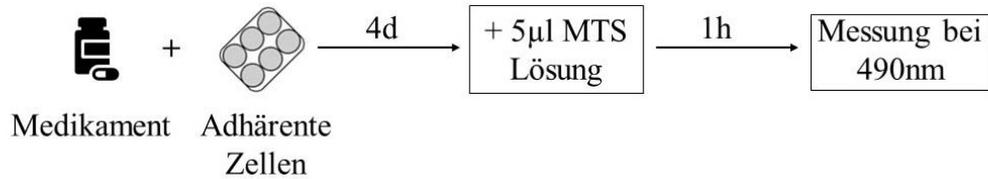


Abbildung 5: DCV, DSV und SMV haben einen zytopathischen Effekt auf NIH-3T3 Zellen. NIH-3T3 Zellen wurden mit den Substanzen 4 d inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO

Zur Ermittlung des Einflusses der eingesetzten antiviralen Substanzen auf die Zellviabilität wurde ein MTS-Test in Anwesenheit der Substanzen in Konzentrationen von 30 und 10 µM durchgeführt. Die Daten zeigten eine erhöhte Zytopathogenität der Substanzen DCV, DSV und SMV bei einer Konzentration von 30 µM, jedoch nicht bei einer Konzentration von 10 µM (Abbildung 5). Daher wurden in den folgenden Versuchen mit einer maximalen Konzentration von 30 µM und für DCV, DSV und SMV in Konzentrationen von 10 µM oder kleiner gearbeitet.

Um die Wirkungen der Substanzen auf Infektionen mit mCMV zu ermitteln wurde in den Versuchen mit *egfp*-codierendem mCMV gearbeitet (Abbildung 3). Für Infektionen mit mCMV wurden adhärenente NIH-3T3 Zellen auf einer 96-„well“-Platte (2×10^3 Zellen / 800 µl Medium pro „well“) mit aufgetautem Virusüberstand infiziert und die Substanzen in Triplets hinzugegeben. Zusätzlich wurde auf jede Platte eine DMSO-Kontrolle, und auf die Platten mit ABC auch eine H₂O-Kontrolle aufgetragen. Die Infektion der Zellen wurde mikroskopisch durch die Expression von *egfp* kontrolliert (Abbildung 3).

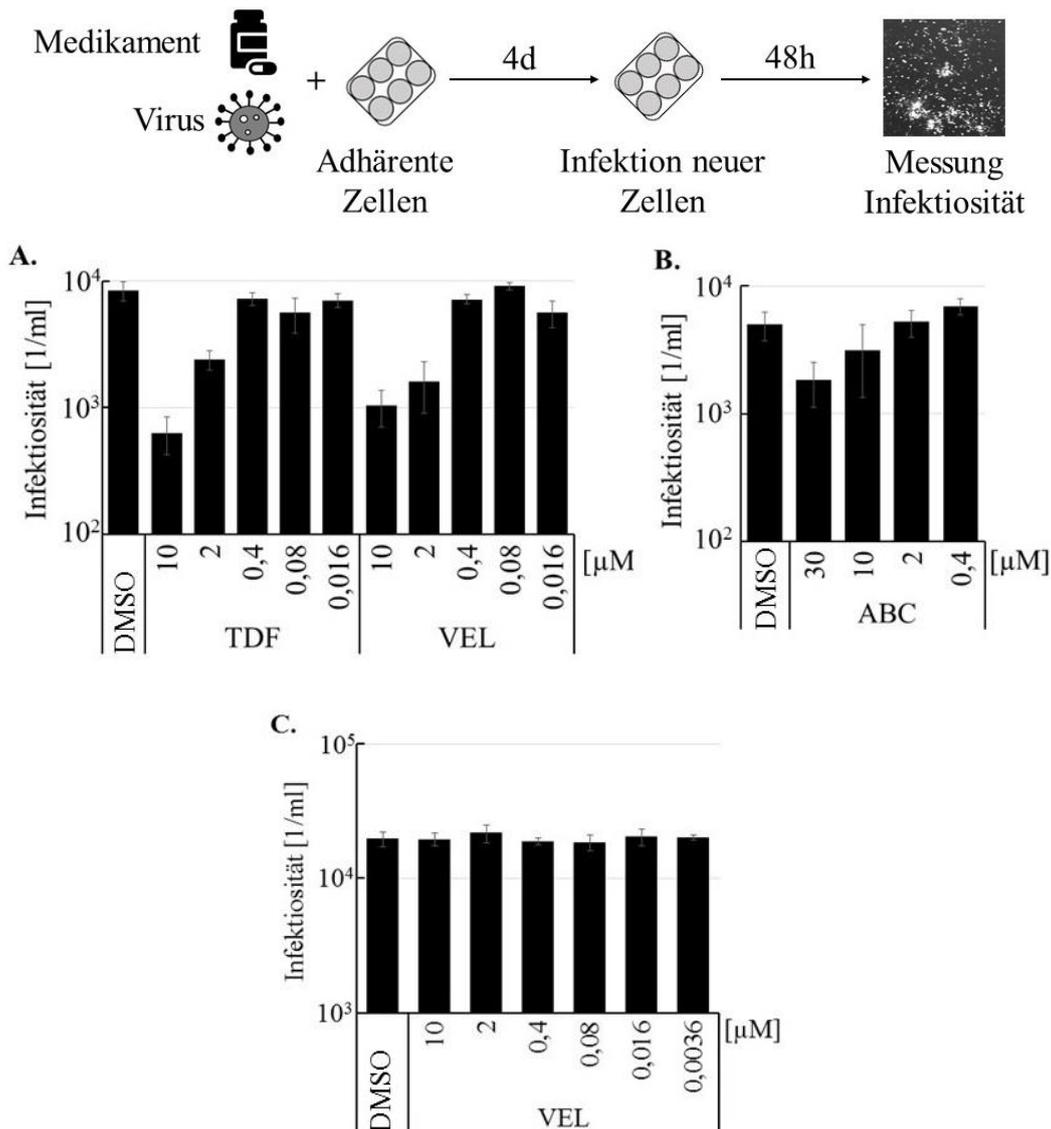


Abbildung 6: TDF und VEL (A.) sowie ABC (B.) senken die mCMV Infektiosität. NIH-3T3 Zellen (A., B.) und BHK21 Zellen (C.) wurden mit den Substanzen und mCMV (A., B.) bzw. HSV-1 (C.) 4 d inkubiert. Anschließend wurden neue Zellen mit den freigesetzten Viren im Überstand infiziert und 48 h inkubiert. Der Versuchsaufbau ist schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Negativkontrolle: DMSO

Nach 4 d wurden adhärenente NIH-3T3 Zellen mit 100 μl der zentrifugierten Überständen (2000 rpm, 5 min) infiziert und nach weiteren 48 h die *egfp*-exprimierenden Zellen mittels „Perkin Elmer Plate Reader“ ausgezählt (Abbildung 3). Als Positivkontrolle wurde GCV verwendet, welches in den Konzentrationen 10 und 2 μM zu einer Hemmung der Replikation von 1,7 und 0,6 Größenordnungen führte. Auch bei Infektionen mit mCMV wurde eine Wirkung von TDF und ABC beobachtet (Abbildung 6). Im Unterschied zu Infektionen mit HSV-1 hatten die Substanzen AZT und ELB keine Wirkung auf mCMV-Infektionen. Dafür wurde eine Hemmung durch VEL beobachtet, die bei Infektionen mit HSV-1 nicht gezeigt wurde (Abbildung 6).

TDF und VEL hemmen die Virusreplikation bis zu einer Konzentration von 2 μM . Die maximale Senkung der Infektiosität betrug bei 10 μM für TDF und für VEL ca. 1 Größenordnung (Abbildung 6). Ausgehend von 10 μM wurde für beide Substanzen mit einer 1:5 Verdünnung gearbeitet. Auch bei einer Konzentration von 2 μM wurde eine signifikante Hemmung von ca. 0,5 Größenordnungen im Falle von TDF und 0,7 Größenordnungen bei der Verwendung von VEL beobachtet (Abbildung 6).

Bei beiden Substanzen wurde ab einer Konzentration von 0,4 μM keine Hemmung der Infektiosität von mehr als 0,5 Größenordnungen beobachtet (Abbildung 6). ABC zeigte, wie schon bei Infektionen mit HSV-1, nur eine Senkung der Infektiosität von maximal 0,4 Größenordnungen bei einer Konzentration von 30 μM (Abbildung 6).

3.3 hCMV ist resistent gegen HIV-Polymerase-Inhibitoren und Velpatasvir

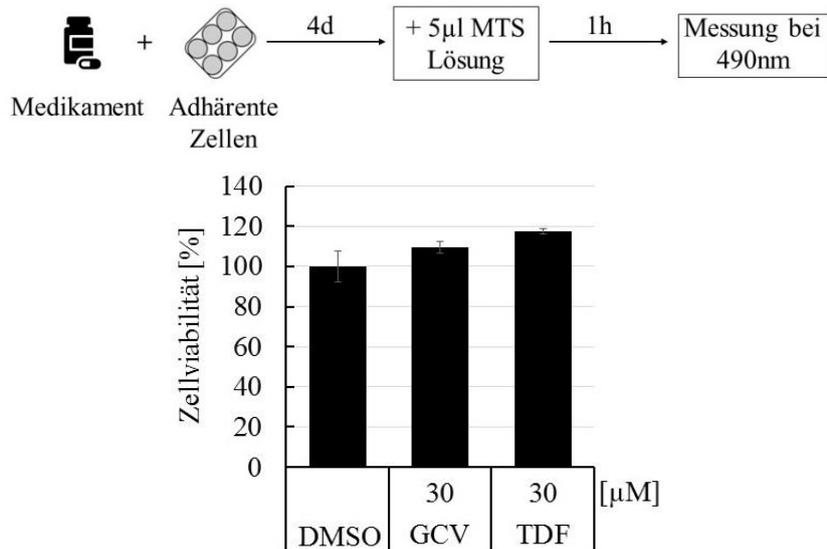


Abbildung 7 : TDF und GCV beeinflussen nicht die Zellviabilität von MRC-5 Zellen. MRC-5 Zellen wurden mit den Substanzen 4 d inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD490 nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO

Der Einfluss der Substanzen TDF und GCV auf die Zellviabilität von MRC-5 Zellen wurde mittels MTS-Tests in Gegenwart der Substanzen in den Konzentrationen 30 und 10 µM ermittelt. Keine der Substanzen zeigte einen Effekt auf die Zellviabilität von MRC-5 Zellen (Abbildung 7). Um die Wirkung der Substanzen VEL, TDF und ABC auf Infektionen mit hCMV zu messen, wurden MRC-5 Zellen in 6-„well“-Platten (2×10^3 Zellen /2 ml Medium pro „well“) ausplattiert. In vorherigen Versuchen war die Auswertung der Ergebnisse durch adhärenente Viren an der Zelloberfläche nicht möglich. Daher wurde in weiteren Versuchen von den adhärenenten Zellen das Medium wieder abgenommen und 1250 µl aufgetauter Virusüberstand in die „wells“ durch langsames Eintropfen über den Rand dazugegeben. Die Substanzen wurden so verdünnt, dass sie in einem Volumen von 750 µl als Doublets hinzugegeben werden konnten.

Damit das Ergebnis sich nur auf in den Zellen replizierte Viren bezieht, wurde nach 7 h der Überstand abgenommen und neues Medium sowie Substanzen in derselben Konzentration wie zuvor dazugegeben. Nach 5 d wurde das Medium abgenommen und aus dem Zellrasen Gesamt-RNA mit dem „E.Z.N.A.® Viral RNA Kit“ und „E.Z.N.A.® Total RNA Kit“ gewonnen. Zum Ansetzen des Reaktionsgemisches jeder PCR wurde das Kit „LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes“ verwendet.

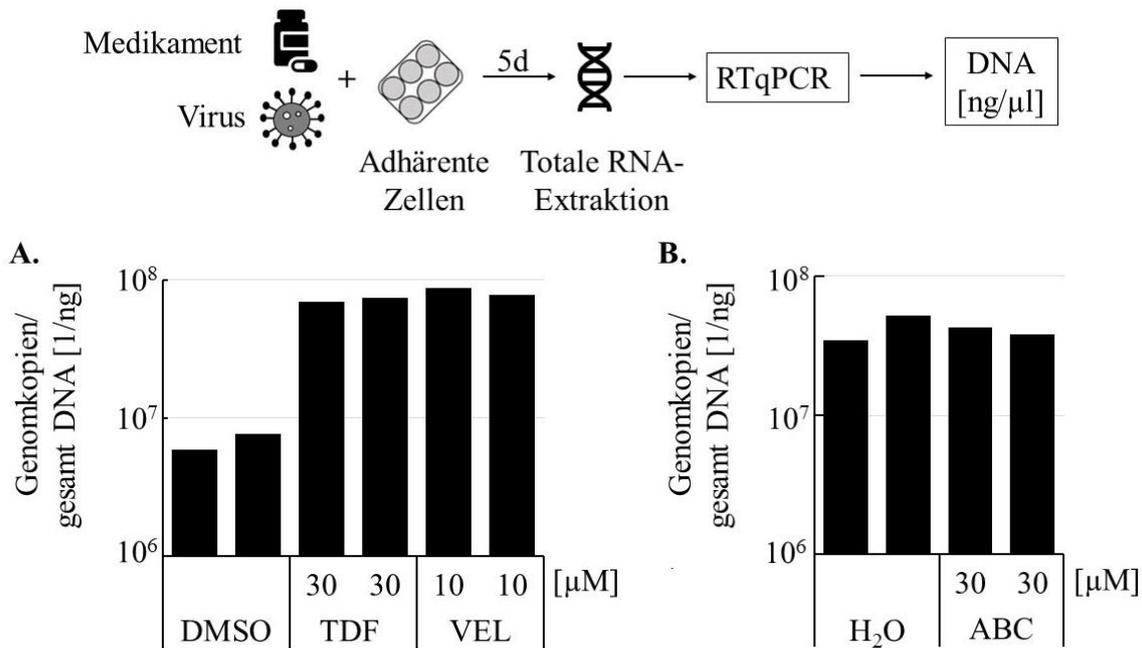


Abbildung 8: Weder TDF oder VEL (A.) noch ABC (B.) haben einen Effekt auf die hCMV Virusreplikation. MRC-5 Zellen wurden mit den Substanzen und hCMV 7 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 5 d Gesamt-RNA gewonnen. Daraus wurde eine RTqPCR für ein spät-exprimierendes Gen ausgeführt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Negativkontrolle: DMSO (A.), H₂O (B.)

Es wurde die Probe 157 und die hCMV codierenden-Strang Primer 157 und codogener-Strang Primer 157 genutzt. Die Oligonukleotide wurden in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 0,5 μM zum Reaktionsansatz dazugegeben. Es wurde pro Ansatz mit 15 μl Reaktionsgemisch und 5 μl RNA gearbeitet. Alle Proben wurden als Triplets auf die PCR-Platte hinzugegeben und bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert. Es wurde eine RTqPCR für ein spät-exprimierendes Gen durchgeführt. Der RNA-Gehalt der einzelnen Proben wurde mit dem Gerät „NanoDrop200“ in ng/μl ermittelt und die PCR-Ergebnisse damit normiert. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Genomkopien/ Gesamt-RNA (Abbildung 8). Um die Effizienz der PCR berechnen zu können wurde eine Standardreihe erstellt. Es wurden die eigen erstellten Positivkontrollen auf 3 × 10⁴ Kopien verdünnt verwendet. Die Standardreihe wurde aus fünf Werten pro Konzentration erstellt und fünf Mal durchgeführt. Für die Konzentrationen wurde eine 1:5 Verdünnung verwendet. Auf alle weiteren PCR-Platten wurde die eigen konstruierte Kontrolle in einer Verdünnung von 6 × 10³ Kopien als Standardwert in Triplets aufgetragen. Die errechnete Effizienz wurde für die Auswertung der weiteren PCR-Proben verwendet. In der Auswertung wurden die Werte aller Doublets gezeigt. Es wurde kein Effekt der Substanzen TDF, VEL und ABC auf die Genomkopienanzahl von hCMV-infizierten MRC-5 Zellen gesehen (Abbildung 8).

3.4 Masern-Infektionen werden nicht durch Substanzen beeinflusst

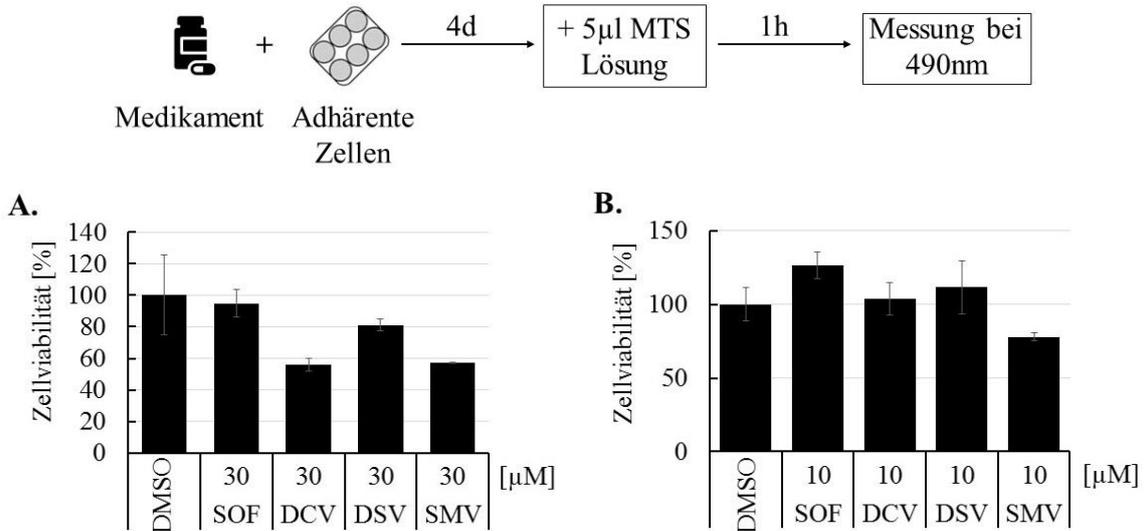


Abbildung 9: DCV, DSV und SMV haben einen zytopathischen Effekt auf Vero-SLAM Zellen. Vero-SLAM Zellen wurden mit den Substanzen 4 d inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO

Um den Einfluss der Substanzen auf die Zellviabilität zu messen wurde in Anwesenheit der Substanzen ein MTS-Test auf Vero-SLAM Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten einen Einfluss der Substanzen DCV, DSV und SMV bei einer Konzentration von 30 µM auf die Zellviabilität (Abbildung 9). Daher wurde in allen folgenden Versuchen mit Konzentrationen von 30 µM, für die Substanzen DCV, DSV und SMV mit einer Konzentration von 10 µM und kleiner gearbeitet.

Um die Wirkung der Substanzen auf Masernvirus-Infektionen zu ermitteln wurden adhärenente Vero-SLAM Zellen mit den Substanzen in einer Konzentration von 30 bzw. 10 µM und 50 µl aufgetautem Virusüberstand auf einer 96-„well“-Platte (2 x 10³ Zellen / 100 µl Medium pro „well“) inkubiert. Nach 48 h wurde die Anzahl der infizierten Zellen durch die Zahl der grün-fluoreszierenden Zellen ermittelt. Die Ergebnisse wiesen auf keinen Effekt einer der Substanzen hin.

3.5 HCV-Protease-Inhibitoren hemmen die DENV-2-Replikation

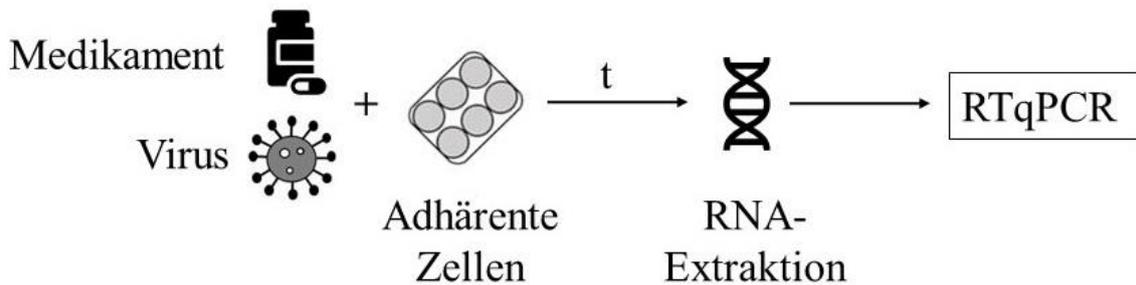


Abbildung 10: Schema der Analysen mit Dengue-2-, Chikungunya-, Polio-, Respiratorisches Synzitial- und Parainfluenzavirus-3. Die Zellen wurden mit den Substanzen und den jeweiligen Viren inkubiert. Anschließend wurde eine RTqPCR durchgeführt mit RNA aus den zentrifugierten Überständen.

Um den Einfluss der eingesetzten antiviralen Substanzen auf die Zellviabilität zu ermitteln wurde in Anwesenheit der Substanzen in den Konzentrationen 30 und 10 μM ein MTS-Test durchgeführt. Bei einer Konzentration von 30 μM wurde bei den Substanzen DCV, DSV und SMV ein zytopathischer Effekt erreicht (Abbildung 9). Daher wurden in allen folgenden Versuchen diese drei Substanzen in Konzentrationen von 10 μM oder kleiner verwendet. Um den Effekt der Substanzen auf Infektionen mit DENV-2 zu evaluieren wurden Vero-SLAM Zellen in 48-„well“-Platten (2×10^3 Zellen / 800 μl Medium pro „well“) ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Substanzen in einer Konzentration von 30 bzw. 10 μM in Triplets hinzugegeben und die Zellen mit aufgetautem Virusüberstand infiziert (Abbildung 10). Auf jede Platte wurde eine DMSO-Kontrolle, auf die Platten mit ABC auch eine H_2O -Kontrolle aufgetragen. Die Infektion der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Der Einfluss der Substanzen auf die Replikation von DENV-2 wurde mittels RTqPCR ermittelt. Nach 4 d wurden die Überstände abgenommen, zentrifugiert (2000 rpm, 5 min) und RNA gewonnen. Für die RNA-Extraktion wurde das „High Pure Viral Nucleic Acid Kit“ verwendet. Bei allen Versuchen wurden die Proben mit 50 μl eluiert und die gewonnene RNA bei -80°C aufbewahrt. Für die PCR wurde die Probe 111 und der Dengue codierender-Strang Primer sowie der Dengue codogener-Strang Primer benutzt. Zum Ansetzen des Reaktionsgemisches jeder PCR wurde das Kit „LightCycler[®] 480 RNA Master Hydrolysis Probes“ verwendet. Als einzige Abweichung zum Protokoll wurden 5 μl RNA anstatt 2 μl zu 15 μl Ansatz hinzugegeben. Alle Proben wurden als Triplets auf die PCR-Platte hinzugegeben und die Platte anschließend bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert.

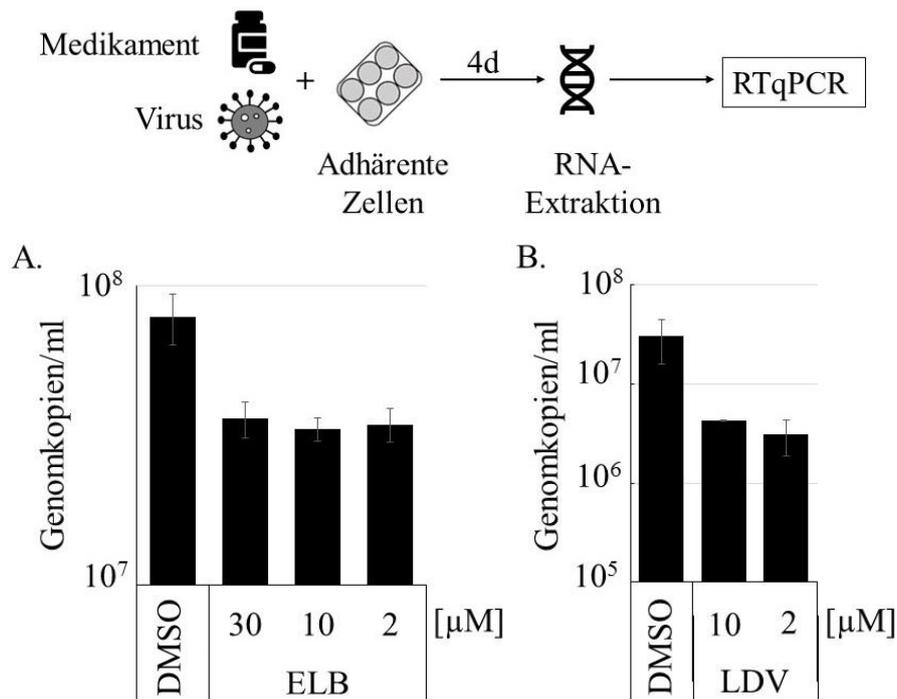


Abbildung 11: ELB und LDV senken die Anzahl der DENV-2 Genomkopien. Vero-SLAM Zellen wurden mit den Substanzen und DENV-2 inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus dem Überstand gewonnen und eine RTqPCR durchgeführt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Negativkontrolle: DMSO

Die jeweiligen PCR-Programme wurden wie vom Hersteller angegeben verwendet. Um die Effizienz jeder PCR berechnen zu können wurde eine Standardreihe erstellt. Es wurde die eigen erstellte Positivkontrolle auf 3×10^4 Kopien verdünnt verwendet. Jede Standardreihe wurde aus fünf Werten in einer 1:5 Verdünnung pro Konzentration erstellt und fünf Mal durchgeführt. Auf alle weiteren PCR-Platten wurde die eigen konstruierte Kontrolle in einer Verdünnung von 6×10^3 Kopien als Standartwert in Triplets aufgetragen. Die errechnete Effizienz wurde für die Auswertung der weiteren PCR-Proben verwendet. Der erste Versuch zeigte eine Reduktion der Anzahl der Genomkopien durch die Substanzen DCV, DSV, ELB, GRV, LDV und SMV. Bei einem Kontrollversuch mit den Substanzen DCV und DSV in den Konzentrationen 10, 2 und $0,4 \mu\text{M}$ wurde keine Wirkung der Substanzen nachgewiesen. Bei den Substanzen ELB, GRV, LDV und SMV wurde auch in weiteren Versuchen eine Senkung der Viruslast gezeigt. Jedoch wurde bei den Substanzen GRV und SMV kein konzentrationsabhängiger Effekt gesehen. In den Versuchen mit GRV und SMV wurde eine Senkung der Anzahl der Genomkopien, in der am höchsten eingesetzten Konzentration von 30 bzw. $10 \mu\text{M}$ beobachtet.

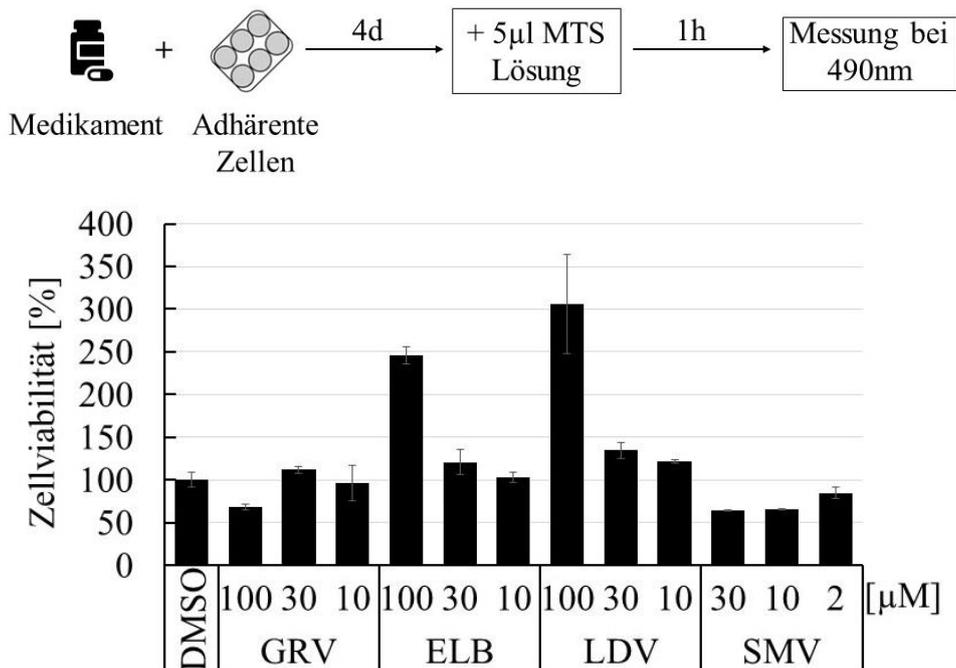


Abbildung 12: GRV und SMV beeinflussen die Zellviabilität von Vero-SLAM Zellen. Vero-SLAM Zellen wurden mit den Substanzen inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO

Bei den Substanzen LDV und ELB wurde die Viruslast bis zu einer Konzentration von jeweils 2 µM gehemmt. Für ELB betrug die Senkung der Anzahl der Genomkopien in den Konzentrationen 30, 10 und 2 µM ca. 0,6, 0,5 und 0,4 Größenordnungen (Abbildung 11). Bei LDV wurde die Viruslast in den Konzentrationen 10 µM um ungefähr 0,8 Größenordnungen bzw. 1 Größenordnung bei einer Konzentration von 2 µM gesenkt (Abbildung 11).

Im weiteren Verlauf wurde eine erweiterte Zytotoxizitätskontrolle mittels MTS-Tests mit den Substanzen ELB, GRV, LDV und SMV durchgeführt. Keine der Substanzen zeigte einen Effekt auf die Zellviabilität bei der an der höchsten eingesetzten Konzentration von 30 bzw. 10 µM. Bei den Substanzen ELB, GRV und LDV wurde der Versuch mit den Konzentrationen 100, 30 und 10 µM wiederholt (Abbildung 12). Bei SMV wurde in den Konzentrationen 30, 10 und 2 µM aufgetragen (Abbildung 12). Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen zytopathischen Effekt bei den Substanzen GRV und SMV in Konzentrationen von 100 bzw. 30 µM (Abbildung 12). Es wurde kein zytotoxischer Effekt bis zu einer Konzentration von 100 µM bei den Substanzen ELB und LDV gezeigt (Abbildung 12).

3.6 CHIKV-Replikation wird nicht beeinflusst

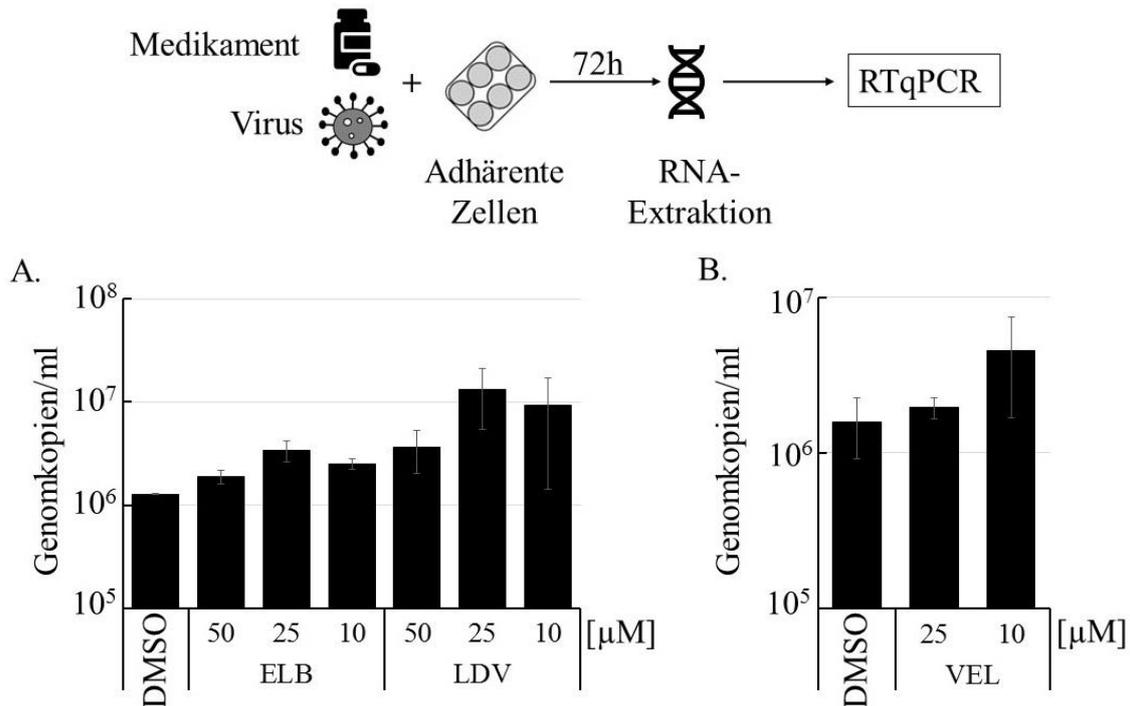


Abbildung 13: ELB und LDV (A.) sowie VEL (B.) senken nicht die Anzahl der CHIKV Genomkopien. BHK21 Zellen wurden mit den Substanzen und CHIKV inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus dem Überstand gewonnen und eine RTqPCR durchgeführt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Negativkontrolle: DMSO

Der Einfluss der Substanzen auf die Zellviabilität von BHK21 Zellen wurde mittels MTS-Tests in Gegenwart der Substanzen in Konzentrationen von 30 und 10 μM gemessen. Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Zytotoxizität der Substanzen DCV, DSV und SMV bei einer Konzentration von 30 μM (Abbildung 2). Daher wurde in allen weiteren Versuchen mit Konzentrationen von 30 μM , für die Substanzen DCV, DSV und SMV in Konzentrationen von 10 μM gearbeitet. Bei Infektionen mit CHIKV wurde der Effekt der Substanzen mittels MTS-Tests bestimmt. Es wurden zu adhärenen BHK21 Zellen in 96-„well“-Platten (2×10^3 Zellen / 100 μl Medium pro „well“) die Substanzen in Triplets in einer Endkonzentration von 30 bzw. 10 μM hinzugegeben und die Zellen mit 50 μl aufgetautem Virusüberstand infiziert. H_2O wurde als Referenzwert für ABC, DMSO als Referenzwert für alle anderen Substanzen verwendet. Nach 48 h wurden adhärenen BHK21 Zellen mit 10 μl der zentrifugierten Überstände infiziert.

Nach weiteren 72 h wurden pro „well“ 5 μl MTS-Lösung hinzugegeben. Die Zellviabilität wurde spektrophotometrisch bei 490 nm nach 1 und 2 h gemessen. Bei den Substanzen VEL, ELB und LDV wurde ein geringer positiver Effekt auf die Zellviabilität

gesehen. Im Anschluss wurde daher für diese drei Substanzen ein Kontrollversuch mittels RTqPCR durchgeführt. Zu adhärenen BHK21 Zellen auf einer 48-„well“-Platte (2×10^3 Zellen / 800 μ l Medium pro „well“) wurden die Substanzen VEL, ELB und LDV in Triplets und in Konzentrationen von 50, 25 und 10 μ M, sowie eine DMSO-Kontrolle aufgetragen und die Zellen mit 100 μ l aufgetautem Virusüberstand infiziert. Die Infektion der Zellen wurde mikroskopisch überprüft. Die Überstände wurden nach 72 h abgenommen und die RNA mittels „High Pure Viral Nucleic Acid Kit“ extrahiert (Abbildung 10). Die Proben wurden mit 50 μ l eluiert und die gewonnene RNA bei - 80 °C aufbewahrt.

Zum Ansetzen des Reaktionsgemisches der PCR wurde das Kit „LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes“ verwendet. Das Kit wurde mit dem „LightMix Modular Chikungunya“ von TIB MOLBIOL erweitert. Die Ansätze wurden nach Angaben des Herstellers pipettiert. Als einzige Abweichung zum Protokoll wurden 5 μ l RNA anstatt 2 μ l zu 15 μ l Ansatz hinzugegeben. Alle Proben wurden als Triplets auf die PCR-Platte hinzugegeben. Die jeweiligen PCR-Programme wurden wie vom Hersteller angegeben verwendet. Um die Effizienz der PCR errechnen zu können wurde eine Standardreihe mit fünf Werten und einer 1:5 Verdünnung der DMSO-Probe aufgetragen und fünf Mal durchgeführt. Daher wurden die Konzentrationen der Genomkopien relativ zum DMSO-Wert dargestellt. Die Ergebnisse der RTqPCR zeigen keinen Effekt der Substanzen auf die Virusreplikation (Abbildung 13).

3.7 Keine Wirkung der Substanzen auf Poliovirus-Infektionen

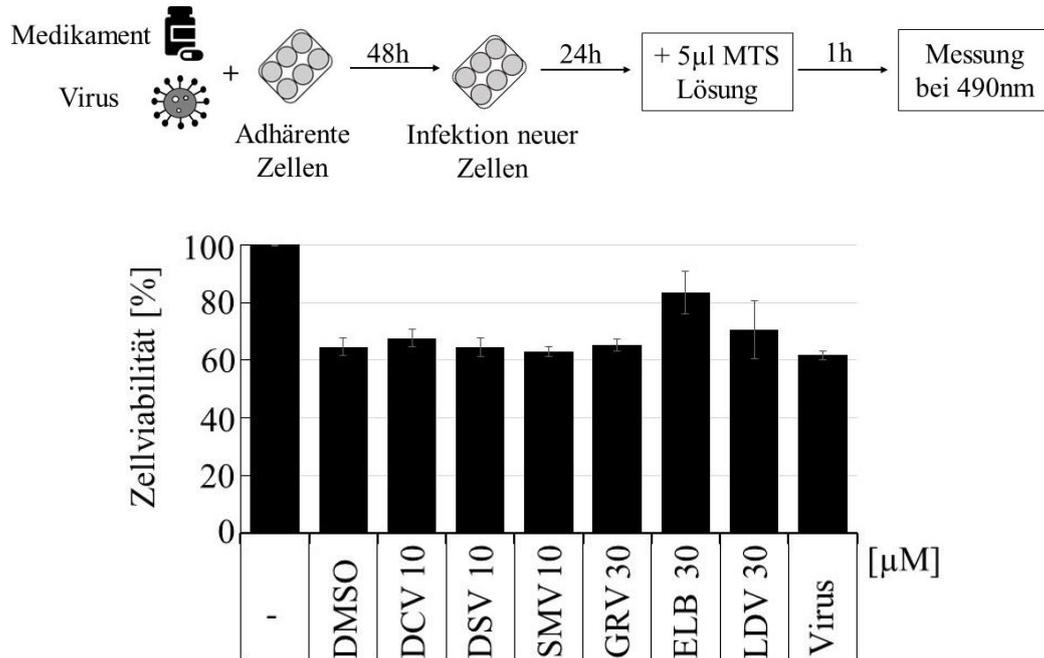


Abbildung 14: Kein Einfluss der Substanzen auf Infektiosität von Poliovirus. Vero-SLAM Zellen wurden mit den Substanzen und Poliovirus inkubiert. Nach 48 h wurden mit dem zentrifugierten Überstand neue Vero-SLAM Zellen infiziert, nach MTS-Lösung dazugegeben und die OD₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO

Um zu Beginn den Effekt der Substanzen auf die Zellviabilität von Vero-SLAM Zellen zu evaluieren wurde in Anwesenheit der Substanzen in den Konzentrationen 30 und 10 μM ein MTS-Test durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine Zytotoxizität der Substanzen DCV, DSV und SMV bei einer Konzentration von 30 μM (Abbildung 9). Daher wurde in allen weiteren Versuchen für diese drei Substanzen mit Konzentrationen von 10 μM oder kleiner gearbeitet.

Um die Wirkung der Substanzen auf Infektionen mit Poliovirus zu messen wurden zu adhärenen Vero-SLAM Zellen in 96-, „well“-Platten (2 x 10³ Zellen / 100 μl Medium pro „well“) alle Substanzen in Triplets in einer Konzentration von 30 bzw. 10 μM und Virusüberstand (Verdünnt 1:300) hinzugefügt. H₂O wurde als Negativkontrolle für die Substanz ABC, DMSO als Negativkontrolle für alle anderen Substanzen verwendet. Nach 24 h wurden 5 μl MTS-Lösung pro „well“ dazugegeben und die Zellviabilität spektrophotometrisch bei 490 nm nach 1 h und 2 h gemessen. Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Viabilität der Zellen im Vergleich zu DMSO bei den Substanzen ELB, LDV, 3TC und VEL.

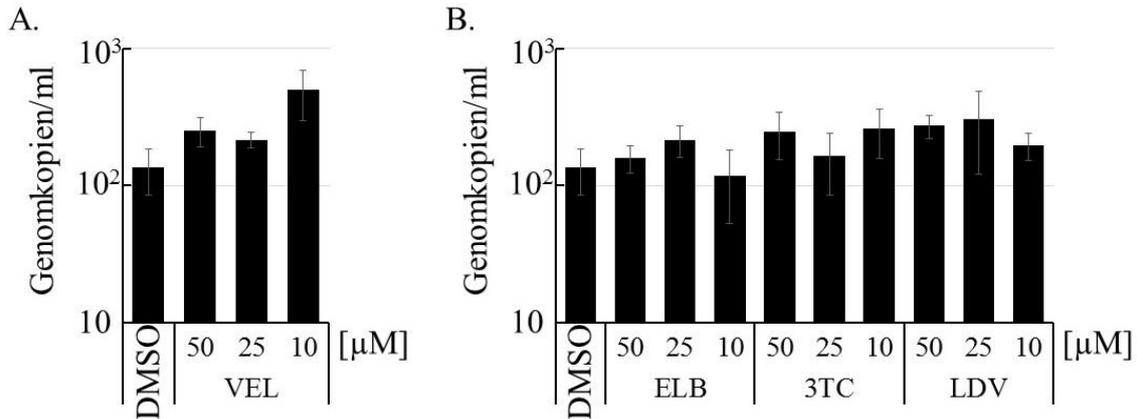
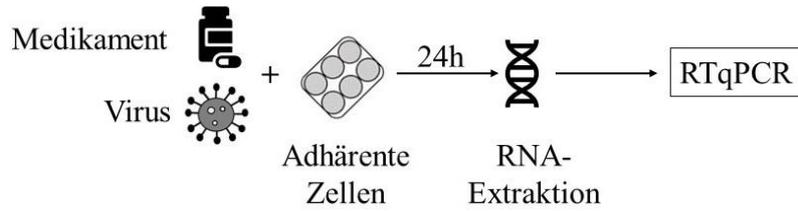


Abbildung 15: VEL (A.), ELB, 3TC und LDV (B.) senken nicht die Anzahl der Poliovirus Genomkopien. Vero-SLAM Zellen wurden mit den Substanzen und Poliovirus inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus dem Überstand gewonnen und eine RTqPCR durchgeführt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Negativkontrolle: DMSO

Um zu prüfen, ob die Substanzen, die in den Versuchen eine Wirkung gegen DENV-2-Infektionen aufwiesen, einen spezifischen Effekt haben, wurde zusätzlich ein weiterer Versuch mit diesen Substanzen bei Poliovirus-Infektionen durchgeführt. Dazu wurden die Substanzen DCV, DSV, SMV, GRV, ELB und LDV in Triplets in Konzentrationen von 30 bzw. 10 μM und Virusüberstand zu adhärenen Vero-SLAM Zellen in einer 96-„well“-Platte (500 Zellen / 100 μl Medium pro „well“) gegeben. Um auch eine Aussage zum Einfluss der Substanzen auf die Virusfreisetzung machen zu können, wurden nach einer Inkubationszeit von 48 h die Überstände abgenommen und mit 10 μl der zentrifugierten Überstände (2000 rpm, 5 min) adhärenen Vero-SLAM Zellen (500 Zellen / 90 μl Medium pro „well“) infiziert. Nach 24 h wurde ein MTS-Test durchgeführt. Die Werte zeigten keinen Einfluss der Substanzen auf Infektionen mit Poliovirus (Abbildung 15). Als Kontrollversuch wurde eine RTqPCR durchgeführt.

Dazu wurden die Substanzen ELB, LDV, 3TC und VEL in Triplets in Konzentrationen von 50, 25 und 10 μM und 100 μl aufgetauter Virusüberstand zu adhärenen Vero-SLAM Zellen auf eine 48-„well“-Platte (4 x 10³ Zellen / 800 μl Medium pro „well“) gegeben.

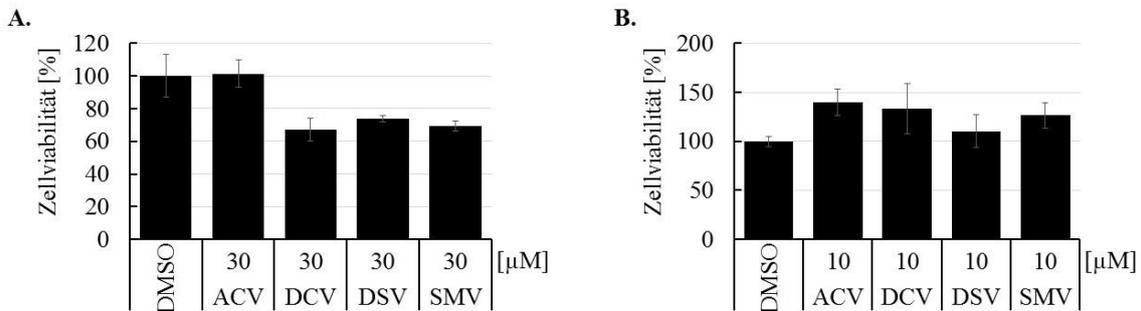
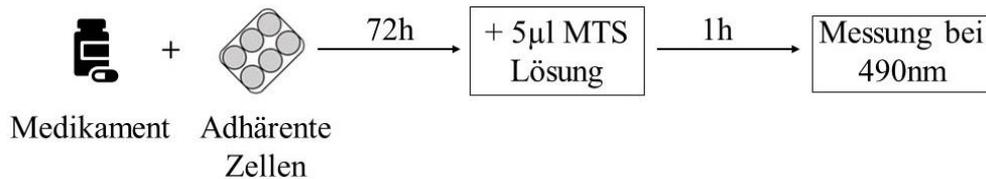


Abbildung 16: DCV, DSV und SMV haben einen zytopathischen Effekt auf MT-4 Zellen. MT-4 Zellen wurden mit den Substanzen inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD_{490} nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO

Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde aus den zentrifugierten Überständen (2000 rpm, 5 min) die RNA mittels „High Pure Viral Nucleic Acid Kit“ extrahiert. Bei allen Versuchen wurden die Proben mit 50 µl eluiert. Die gewonnene RNA wurde bei - 80 °C aufbewahrt. Zum Ansetzen des Reaktionsgemisches der PCR wurde das Kit „LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes“ verwendet. Das Kit wurde mit dem „LightMix Modular Enterovirus“ von TIB MOLBIOL erweitert. Als einzige Abweichung zum Protokoll wurden 5 µl RNA anstatt 2 µl zu 15 µl Ansatz hinzugegeben.

Alle Proben wurden als Triplets auf die PCR-Platte hinzugegeben. Die jeweiligen PCR-Programme wurden wie vom Hersteller angegeben verwendet (Abbildung 10). Um die Effizienz der PCR zu errechnen, wurde aus der DMSO-Probe eine Standardreihe mit fünf Werten in einer 1:5 Verdünnung aufgetragen und fünf Mal durchgeführt. Ausgewertet wurden die Konzentrationsangaben der Genomkopien prozentual zum DMSO-Wert. Die Ergebnisse zeigten keinen Einfluss der Substanzen auf die Virusreplikation (Abbildung 15), daher wurden die Ergebnisse nicht weiterverfolgt.

3.8 Grazoprevir hemmt Replikation von HIV-1

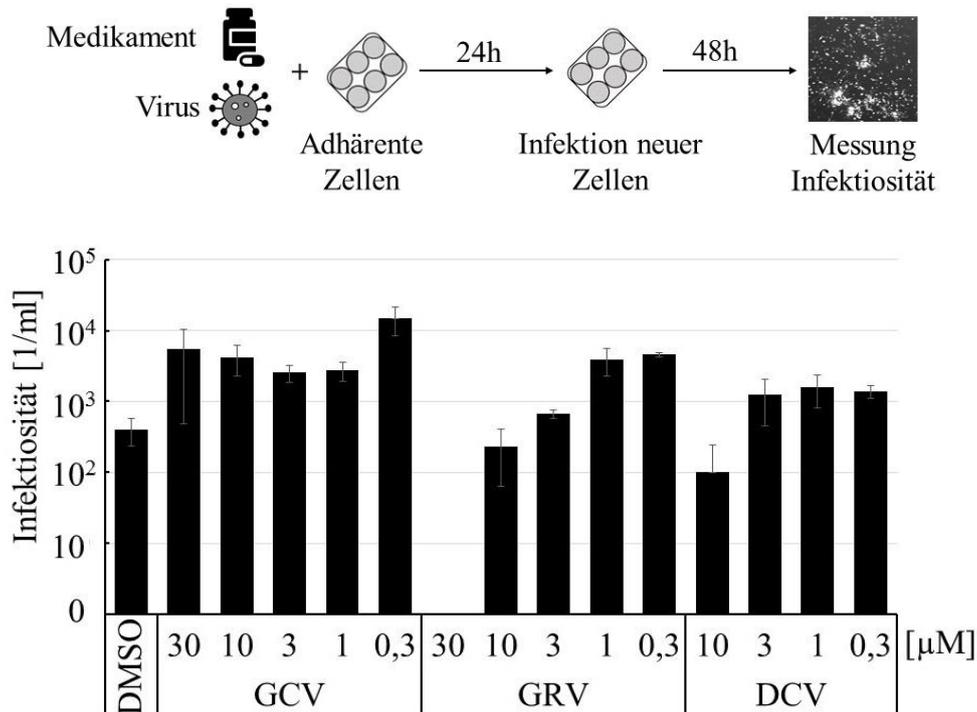


Abbildung 17: GRV senkt die Infektiosität von HIV-1. MT-4 Zellen wurden mit den Substanzen und dem Virus inkubiert. 24 h später wurden TZM-bl Zellen mit dem zentrifugierten Überstand infiziert. Eine X-Gal Färbung wurde durchgeführt und die blau gefärbten Zellen als Korrelat für die infizierten Zellen gezählt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von drei Werten. Negativkontrolle: DMSO

Um den Einfluss der Substanzen auf die Zellviabilität von MT-4 Zellen zu evaluieren wurde ein MTS-Test in Gegenwart der Substanzen in Konzentrationen von 30 und 10 μM durchgeführt. Die Ergebnisse wiesen auf eine erhöhte Zelltoxizität der Substanzen CDV, DCV und DSV bei einer Konzentration von 30 μM hin (Abbildung 16). Es wurde immer nur ein Vertreter von Substanzen mit gleichem Wirkmechanismus getestet. Um die Effekte der Substanzen CDV, GCV, GRV, DCV, DSV, VEL und T-705 auf die Virusreplikation von HIV-1 in MT-4 Zellen zu bestimmen, wurden die Substanzen in Konzentrationen von 30, 10, 3, 1 und 0,3 μM zu MT-4 Zellen auf einer 48-„well“-Platte (5 × 10³ Zellen / 900 μl Medium pro „well“) gegeben. Nach 24 h wurden adhärenzte TZM-bl Zellen auf einer 96-„well“-Platte (2 × 10³ Zellen / 90 μl Medium pro „well“) mit 10 μl des zentrifugierten (2000 rpm, 5 min) Überstandes infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde eine X-Gal-Färbung durchgeführt und die blauen Zellen als Korrelat für infizierte Zellen gezählt. Das Ergebnis wies lediglich auf eine Wirksamkeit von GRV bei einer Konzentration von 30 μM hin (Abbildung 17).

3.9 Substanzen zeigen keine Wirkung auf Infektionen mit RSV und Parainfluenzavirus-3

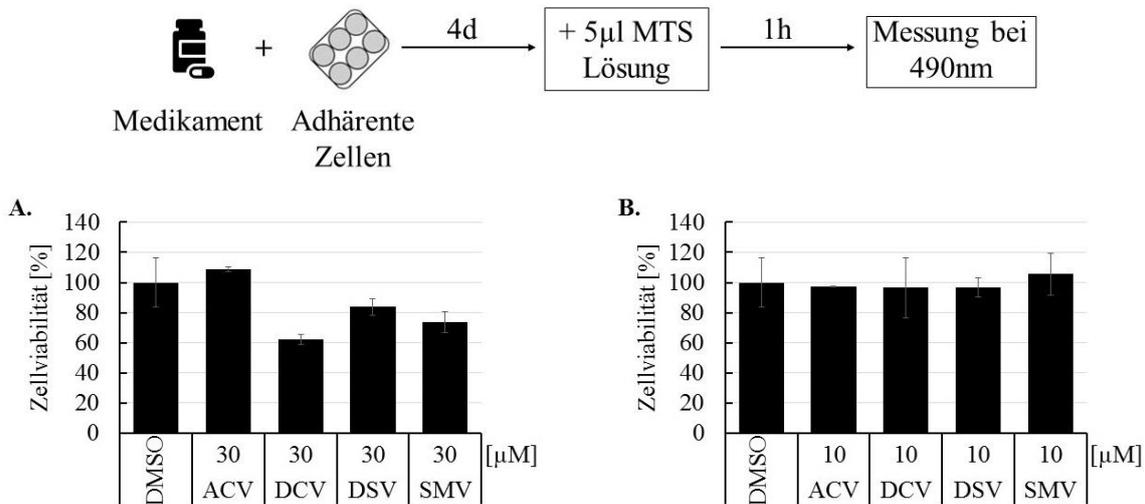


Abbildung 18: DCV, DSV und SMV haben einen zytopathischen Effekt auf HepG2 Zellen. HepG2 Zellen wurden mit den Substanzen inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO

Um zu Beginn den Effekt der Substanzen auf die Zellviabilität von HepG2 Zellen und LLC-MK2 Zellen zu messen wurde ein MTS-Test in Anwesenheit der Substanzen mit den Konzentrationen 30 und 10 µM durchgeführt. Die Ergebnisse wiesen auf eine erhöhte Zelltoxizität der Substanzen DCV, DSV und SMV bei einer Konzentration von 30 µM hin (Abbildung 18, Abbildung 19). Daher wurden diese Substanzen in allen weiteren Versuchen in einer Konzentration von 10 µM oder kleiner verwendet.

Damit die Wirkung der Substanzen auf Infektionen mit RSV und Parainfluenza-3 bestimmt werden konnte, wurden alle Substanzen in Triplets und einer Konzentration von 30 bzw. 10 µM zu adhären HepG2 Zellen bzw. LLC-MK2 Zellen in einer 48-, „well“-Platte (2 x 10³ Zellen / 800 µl Medium pro „well“) gegeben und mit 100 µl Virusüberstand infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 5 d wurde die RNA aus dem zentrifugierten Überstand (2000 rpm, 5 min) mittels „High Pure Viral Nucleic Acid Kit“ laut Angaben des Herstellers extrahiert (Abbildung 10). Bei allen Versuchen wurden die Proben mit 50 µl eluiert und die gewonnene RNA wurde bei - 80 °C aufbewahrt. Zum Ansetzen des Reaktionsgemisches jeder PCR wurde das Kit „LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes“ verwendet.

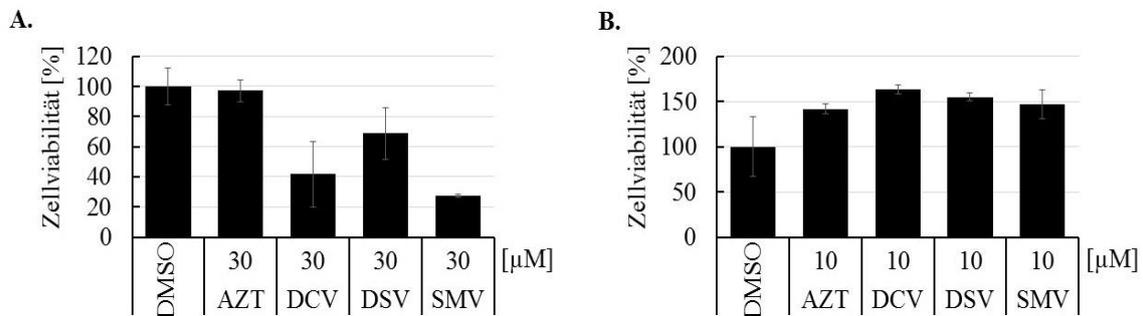
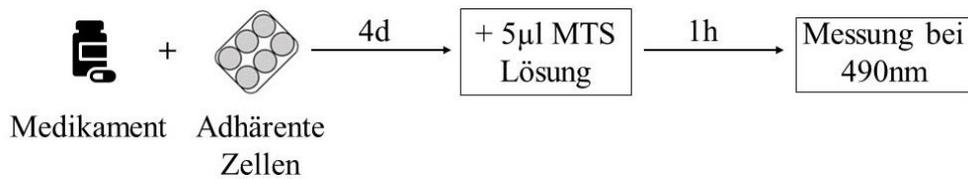


Abbildung 19: DCV, DSV und SMV haben einen zytopathischen Effekt auf LLC-MK2 Zellen. LLC-MK2 Zellen wurden mit den Substanzen inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO

Das Kit wurde mit dem „LightMix Modular RSV“ von TIB MOLBIOL und dem „LightMix Modular Parainfluenza“ von TIB MOLBIOL erweitert. Die Ansätze wurden nach Angaben des Herstellers pipettiert. Als einzige Abweichung zum Protokoll wurden 5 µl RNA anstatt 2 µl zu 15 µl Ansatz hinzugegeben.

Alle Proben wurden als Triplets auf die PCR-Platte hinzugegeben. Die jeweiligen PCR-Programme wurden wie vom Hersteller angegeben verwendet. Um die Effizienz jeder PCR berechnen zu können wurde eine Standardreihe erstellt. Es wurden die in den Kits zur Verfügung gestellten Positivkontrollen in einer Konzentration von 1×10^3 Kopien verwendet und mit 5 Werten in einer 1:5 Verdünnung gearbeitet. Jede Standardreihe wurde aus fünf Werten pro Konzentration erstellt. Auf alle weiteren PCR-Platten wurde ein Standardwert in Triplets aufgetragen. Hierbei wurde die Positivprobe aus den Kits unverdünnt verwendet. Die Effizienz für die Auswertung der weiteren PCR-Proben wurde von den Standardreihen übernommen. Die Ergebnisse wiesen auf keinen Einfluss der Substanzen auf die Replikationsrate von RSV oder Parainfluenza-3 hin.

Es wurde lediglich eine minimale Senkung der Replikationsrate bei den Substanzen DCV und DSV bei Infektionen mit RSV gesehen (Abbildung 20). Daraufhin wurde der Einfluss beider Substanzen in Kombination und in geringeren Konzentrationen auf die Zellviabilität kontrolliert.

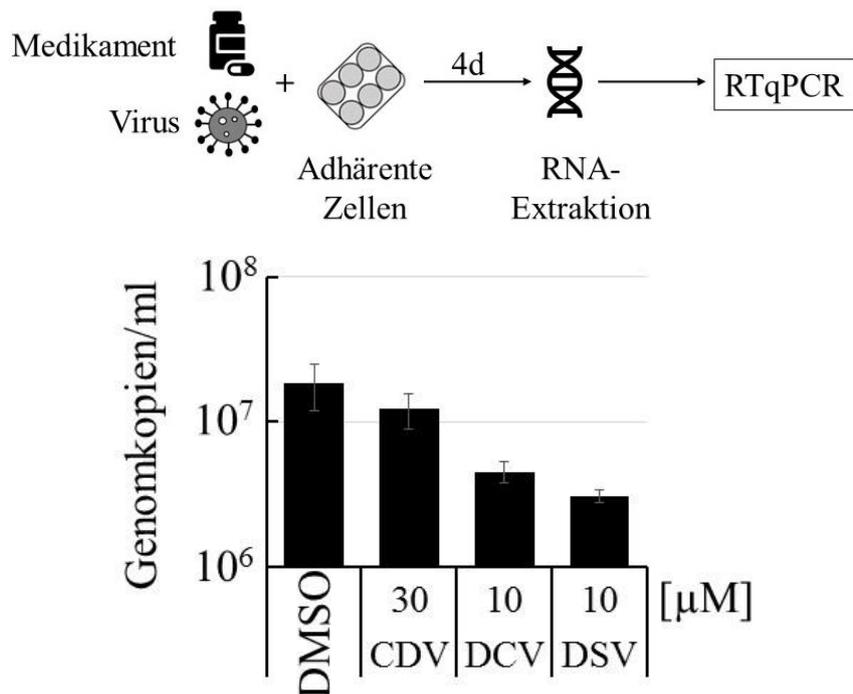


Abbildung 20: DCV und DSV senken die Anzahl der RSV Genomkopien. HepG2 Zellen wurden mit den Substanzen und RSV inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus dem Überstand gewonnen und eine RTqPCR durchgeführt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Negativkontrolle: DMSO

Dazu wurden beide Substanzen kombiniert in Konzentrationen von 2 und 0,1 μ M zu adhären HepG2 Zellen auf einer 96-„well“-Platte (1×10^3 Zellen / 100 μ l Medium pro „well“) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 d wurden 5 μ l MTS-Lösung pro „well“ hinzugegeben. Die Zellviabilität wurde spektrophotometrisch bei 490 nm nach 1 und 2 h bestimmt. Es konnte keine erhöhte Zytotoxizität beider Substanzen kombiniert beobachtet werden. Die Ergebnisse bei Infektionen mit Parainfluenza-3 zeigten eine minimale Senkung der Virusreplikation durch die Substanzen GCV, GRV und LDV. Da der Fehler von den Triplets der PCR-Ergebnisse bei jeweils einer Probe höher als 0,05 war, wurden jeweils nur zwei Proben in der Graphik dargestellt. Der Versuch wurde für diese Substanzen in den Konzentrationen 30 und 15 μ M wiederholt. Durch den Wiederholungsversuch konnte die Wirksamkeit der Substanzen nicht bestätigt werden (Abbildung 21). Da der Fehler eines Triplets der PCR-Ergebnisse für die Substanz LDV in der Konzentration 30 μ M höher als 0,05 war, wurden zwei Proben in der Graphik dargestellt. Der Fehlerbalken beider Proben bezieht sich auf den Standardfehler der PCR Triplets einer Probe.

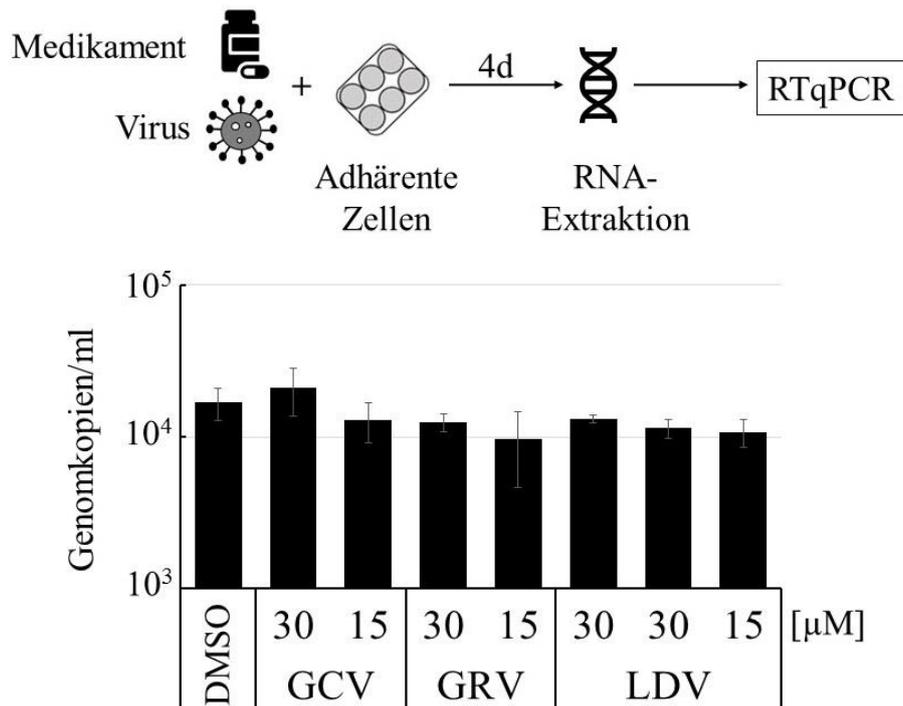


Abbildung 21: GCV, GRV und LDV senken nicht die Anzahl der Parainfluenzavirus-3 Genomkopien. LLC-MK2 Zellen wurden mit den Substanzen und Parainfluenzavirus-3 inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus dem Überstand gewonnen und eine RTqPCR durchgeführt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Negativkontrolle: DMSO

4. Diskussion

4.1 TDF als mögliche Therapie für HSV-1-Infektionen

Eine Hemmung von HSV-1 wurde durch die Substanzen TDF, AZT, ABC und ELB beobachtet (Abbildung 4). TDF zeigte bis zu einer Konzentration von 2 μM eine hemmende Wirkung auf HSV-1-Infektionen von ca. 0,6 Größenordnungen (Abbildung 4). Der Wert der mittleren Hemmkonzentration (IC_{50}) *in vitro* von TDF bei Infektionen mit HIV-1 liegen zwischen 0,4-8,5 μM ²¹¹. TDF als nukleotidischer und AZT sowie ABC als nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren werden gegen Infektionen mit HIV-1 eingesetzt^{156,212,213}. Alle drei Substanzen haben als entscheidenden Mechanismus einen Kettenabbruch zur Folge^{209,212,213}. Generell verfügen RNA- sowie DNA-Polymerasen über hoch konservierte Bereiche, die besonders in den Arealen des aktiven Zentrums liegen²¹⁴. Da TDF von einer zellulären Kinase phosphoryliert wird²¹¹ und auch HSV-1 über eine DNA-Polymerase verfügt²¹⁵, ist eine Hemmung dieser durch TDF denkbar. Die *in vivo* Wirksamkeit von TDF gegen HSV-2-Infektionen ist schon in verschiedenen Studien untersucht und publiziert worden^{207-210,216,217}, genauso wie eine inhibitorische Wirkung von TDF auf die DNA-Polymerase von Hepatitis-B-Viren (HBV)²¹⁸. Daher hat TDF im klinischen Alltag auch eine Zulassung für Patienten mit einer HBV-Infektion²¹⁹. TDF wird bei HIV-1-Patienten in einer Dosis von 123 mg / d (236 μM) eingesetzt²²⁰. Häufige Nebenwirkungen bei Einnahme sind gastrointestinale Beschwerden und eine Hypophosphatämie²²⁰. TDF ist im Gegensatz zu ACV kein Guanosinanalogen, sondern ein Adenosinanalogen. Sollte TDF auch in HSV-1 infizierten Zellen zu einem Kettenabbruch führen, so könnten beide Medikamente synergistisch wirken und die Therapiestrategie verbessern. Durch eine Kombinationstherapie könnten die Dosen beider Medikamente reduziert und somit auch Nebenwirkungen vermieden werden. Auch eine Therapie von HSV-1-Infektionen bei HIV-1-Patienten mit TDF wäre denkbar, und die Behandlung mit ACV einzusparen. Ebenfalls für Infektionen mit ACV-resistenten HSV-1 Stämmen wäre eine Therapie mit TDF denkbar. Die meisten Resistenzen von HSV-1 beruhen auf eine Mutation des UL-23 Gens²²¹, welches für die Thymidinkinase kodiert. Diese Thymidinkinase phosphoryliert ACV, sodass ACV v.a. in infizierten Zellen seine Wirkung zeigt²²². TDF wird jedoch durch zelleigene Enzyme phosphoryliert¹⁵⁶ und wäre somit trotz dieses Resistenz Mechanismus noch wirksam, sollte die Wirkung gegen HSV-1 auf demselben Mechanismus beruhen wie bei HIV. Eine Studie zur

Wirkung von TDF auf EBV-Infektionen lässt vermuten, dass TDF auch bei EBV-Infektionen als Adenosin-Analogon fungiert und zu einem Kettenabbruch führt²²³. Daher kann vermutet werden, dass TDF diese Wirkung auf alle Herpes-Viren zeigt.

4.2 Hemmung von HSV-1 durch ABC, AZT und ELB

In den Versuchen wurde eine relevante Hemmung von HSV-1 durch ABC bei einer Konzentration von 30 μM beobachtet (Abbildung 4). Auch in weiteren Publikationen wurde dieser Effekt beschrieben²²⁴. Der IC₅₀-Wert bei Infektionen mit HIV-1 für ABC liegt bei 0,26 ($\pm 0,18$) μM in vitro²¹². Die hohen Konzentrationen, die man für eine Therapie mit ABC einsetzen müsste, lägen also deutlich über dem IC₅₀-Wert. Weiterhin muss die Wirkung von ABC bei Infektionen mit HSV-1 bei 30 μM in Relation zur klinischen Anwendbarkeit gestellt werden. ABC wird in einer Konzentration von 600 mg / d (2,09 mM) bei Patienten eingesetzt²²⁵. Vereinzelt wurden auch Dosen von 1200 mg (4,19 mM) bis zu 1800 mg (6,28 mM) verabreicht, aber keine erhöhte Rate an Nebenwirkungen beobachtet²²⁵. Etwaige toxische Effekte von ABC bei Überdosierung sind nicht bekannt²²⁵. Die klinisch eingesetzten Konzentrationen liegen weit über den Werten, die in den Versuchen eine Wirkung auf HSV-1 Infektionen zeigten. Da keine erhöhte Nebenwirkungsrate bei höheren Dosen ermittelt wurde, könnte auch ABC als Therapie von HSV-1 Infektionen eine klinische Bedeutung erlangen. ABC ist wie ACV ein Nucleosidanalogon, welches jedoch durch zelleigene Enzyme phosphoryliert wird²¹². Wie schon im Falle von TDF könnte ABC bei HSV-1 Stämmen mit einer Mutation des UL-23 Gens und somit einer Resistenz gegenüber ACV als Therapeutikum erwogen werden. Wie schon in anderen Publikationen gezeigt, hat ABC eine Wirkung auf ACV resistente HSV-1 Stämme²²⁴. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Substanz einen sehr guten Anhaltspunkt für weitere Versuche bildet.

Auch AZT zeigte bei einer Konzentration von 10 μM eine schwache Reduktion der Infektiosität von HSV-1 von ca. 0,5 Größenordnungen (Abbildung 4). Auch in weiteren Publikationen wurde eine Wirkung von AZT gegen Infektionen mit HSV-1 beschrieben²²⁶. Die IC₅₀-Werte für HIV-1 liegen jedoch bei 0,015-6,7 μM ^{227,228}. Auch AZT wird in einer Dosis von 600 mg / d (2,2 mM) angewendet, jedoch sollte diese Dosis laut Hersteller auf zwei Dosen von je 300 mg (1,12 mM) verteilt werden²²⁹. Außer den bekannten Nebenwirkungen wurde von keiner erhöhten Toxizität bei Überdosierung berichtet²²⁹. Der IC₅₀-Wert liegt jedoch weit unter der eingesetzten Konzentration in den

Experimenten. AZT ist ein Analogon des Thymidins und wird von zelleigenen Enzymen phosphoryliert ¹⁵⁵. Vorausgesetzt es wirkt auch als solches in HSV-1 infizierten Zellen, könnte es, wie auch TDF, einen synergistischen Effekt zur Therapie mit ACV zeigen. Wie auch schon im Falle von TDF und ABC könnte es bei HSV-1 Infektionen mit einer Resistenz gegenüber ACV durch eine Mutation des UL-23 Gens eingesetzt werden. Die Substanz sollte für weitere Versuche in Betracht gezogen werden, da sie in modifizierter Form eine alternative Therapiemöglichkeit darstellen könnte.

Zusätzlich konnte ein inhibierender Effekt von ELB von ca. 0,4 Größenordnungen bei einer Konzentration von 10 µM gezeigt werden (Abbildung 4). ELB wird klinisch als Kombinationspräparat mit GRV in einer Dosis von 1 Tablette / d eingesetzt ^{166,230}. Eine Tablette enthält 50 mg (56,6 µM) ELB und 100 mg (130,39 µM) GRV ²³⁰. Es wurde keine erhöhte Toxizität von ELB bei einer Dosis von 200 mg / d (226,75 µM) über 10 d und einer einmaligen Dosis von 800 mg (907 µM) festgestellt ²³⁰. Versuche zur Kanzerogenität wurden nicht durchgeführt ²³⁰. Die EC50-Werte von ELB gegen Infektionen mit HCV betragen je nach HCV-Genotyp GT1a 0.004 (± 0.002) nM, GT1b 0.003 (± 0.001) nM, GT2a 0.003 (± 0.001) nM, GT3a 0.03 (± 0.01) nM und GT4a 0.003 (± 0.001) nM ¹⁷⁶. Die eingesetzte Konzentration liegt weit oberhalb der beschriebenen EC50-Werten. Auch wenn dies einen klinischen Gebrauch ausschließt, sollte die Substanz für weitere Versuche in Betracht gezogen werden, da sie in modifizierter Form als Therapeutikum gegen Infektionen mit HSV-1 eingesetzt werden könnte.

4.3 TDF, VEL und ABC senken Infektiosität von mCMV

Da die Herpes-Viren strukturverwandt sind ²³¹, wurde eine Wirkung der Medikamente, die eine Wirkung auf HSV-1-Infektionen zeigen, auch bei anderen Herpes-Viren vermutet. Im Falle von Infektionen mit mCMV und der Anwendung von TDF und ABC war dies auch der Fall (Abbildung 6). Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass hier tatsächlich von einer Hemmung der DNA-abhängigen Polymerase ausgegangen werden kann. Eine minimale Wirkung von AZT konnte nur in einem Versuch beobachtet werden. Da in den Folgeversuchen jedoch keine Hemmung zu sehen war, ist das Ergebnis als eher kritisch anzusehen. Außerdem ist eine zu niedrige Sensitivität der Methode nicht auszuschließen und die Ergebnisse eventuell in einem Tierversuch zu verifizieren.

Der inhibierende Effekt von TDF auf mCMV war vergleichbar mit dem Effekt auf Infektionen mit HSV-1 (Abbildung 4, Abbildung 6). Daher kann dieses Ergebnis, wie

schon bei HSV-1 erläutert, in Zukunft von Relevanz sein. Die Hemmung durch ABC war wie schon bei Infektionen mit HSV-1 so gering, dass von keiner hohen Relevanz ausgegangen wird (Abbildung 6).

Es wurde keine Senkung der Infektiosität bei mCMV-Infektionen mit ELB erreicht. Jedoch wurde eine starke hemmende Wirkung durch VEL beobachtet, die bei Infektionen mit HSV-1 nicht gesehen wurde (Abbildung 6). Die Wirkung von VEL war in den Versuchen vergleichbar stark, wie die von TDF (Abbildung 6). In den Versuchen wurde eine Wirkung von VEL bis zu einer Konzentration von 2 μM beobachtet (Abbildung 6). VEL inhibiert die HCV-Genotypen 1a-6e mit EC₅₀-Werten von 6-130 pM²³². Die EC₅₀-Werte liegen unterhalb der, in den Versuchen eingesetzten Konzentration von 2 μM . VEL ist ein Inhibitor des NS5A-Proteins²³² und als Kombinationspräparat mit SOF verfügbar²³³. Laut Herstellerangaben liegt die Dosierung bei einer Tablette / d mit einer Konzentration von 400 mg (755,5 μM) SOF und 100 mg (113,37 μM) VEL²³⁴. Bei Einzeldosen von 1200 mg (1.360,51 μM) wurden keine weiteren Nebenwirkungen beschrieben²³⁴. In Tierversuchen konnte keine Genotoxizität oder Kanzerogenität beobachtet werden²³⁴. Die Ergebnisse stellen im Vergleich mit den Ergebnissen zu Infektionen mit dem humanpathogenen CMV eine Möglichkeit dar, weitere Erfahrungen mit mCMV als Tiermodell für Infektionen mit hCMV zu sammeln.

4.4 Natürliche Resistenz von hCMV gegen TDF, VEL und ABC

Vor einer Verifizierung der Ergebnisse mittels Tiermodell wurde die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den humanpathogenen Erreger durch einen Versuch mit hCMV evaluiert. Die mittels RTqPCR ermittelten Daten wiesen auf keine Wirkung von TDF, VEL oder ABC auf Infektionen mit hCMV hin (Abbildung 8). Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine natürliche Resistenz von hCMV gegenüber den Substanzen TDF, ABC und VEL. Es existieren nur wenige Studien, die die Vergleichbarkeit von mCMV und hCMV untersuchen. Die Ergebnisse einer Studie wiesen auf den gleichen Mechanismus der Resistenzentwicklung gegen die Standardtherapie hin²³⁵. Andere Studien dagegen stellen gezielt die Unterschiede einzelner funktioneller Proteine in den Vordergrund^{236,237}. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich mCMV und hCMV in ihrer Hemmbarkeit durch die Substanzen TDF, VEL und ABC unterscheiden (Abbildung 6, Abbildung 8).

4.5 Keine Wirkung auf Parainfluenza-3 und RSV-Infektionen

Bei Infektionen mit Parainfluenzavirus-3 konnte eine geringe Senkung der Anzahl der Genomkopien durch die Substanzen GCV, GRV und LDV beobachtet werden, die jedoch weniger als eine Größenordnung ausmacht (Abbildung 21). Der Versuch wurde mit diesen drei Substanzen wiederholt. Die Hemmung fiel im Kontrollversuch deutlich geringer aus als im ersten Versuch (Abbildung 21). Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei einer Senkung der Anzahl der Genomkopien, die unterhalb einer Größenordnung liegt, um die Varianz der Methode handelt. Die klinische Anwendbarkeit muss jedoch weiter diskutiert werden, da zurzeit keine direkten antiviralen Therapien für Infektionen mit Parainfluenzaviren zur Verfügung stehen ²⁰.

Bei Infektionen mit RSV konnte keine Wirkung einer der angewendeten Substanzen beobachtet werden. Es wurde ein geringer Effekt von DCV und DSV auf die Virusreplikation gesehen (Abbildung 20). Jedoch sind beide Substanzen bei einer Konzentration von 30 μM zytotoxisch, mit einer Toxizität im Vergleich zu DMSO von 38 % für DCV und 16 % für DSV (Abbildung 18), sodass dieser Effekt durch eine gewisse Resttoxizität bei 10 μM ausgelöst sein kann. Da schon beim Parainfluenzavirus-3 eine hohe Varianz des Versuchsaufbaus gezeigt wurde, wurden für RSV die Werte nicht wiederholt. Es wird davon ausgegangen, dass erst eine Hemmung der Anzahl der Genomkopien von über einer Größenordnung und höher eine relevante antivirale Wirkung verdeutlicht. Dennoch sollten die Ergebnisse weiterverfolgt werden. Da weder für Infektionen mit Parainfluenzavirus, noch für RSV-Infektionen direkt-antivirale Medikamente zur Verfügung stehen ^{10,13,20}, könnten die Ergebnisse zu einer Etablierung solcher Medikamente weiterhelfen.

4.6 ELB und LDV als Therapiemöglichkeit bei Infektionen mit DENV-2

Bei Infektionen mit DENV-2 wurde in den Vorversuchen mit Konzentrationen von 30 bzw. 10 μM ein Effekt der Substanzen DCV, DSV, ELB, LDV, GRV und SMV gesehen (3.5, S.31). In weiterführenden Versuchen mit mehreren Konzentrationen konnte keine Wirkung der Substanzen DCV und DSV gezeigt werden (3.5, S.31). Eventuell könnte man mit einer Resttoxizität der Substanzen bei einer Konzentration von 10 μM im Vorversuch argumentieren.

Da GRV und SMV keinen konzentrations-abhängigen Effekt zeigten, sondern nur eine Hemmung der viralen RNA bei einer Konzentration von 30 bzw. 10 μM , wurde hier von einem zytotoxischen Effekt ausgegangen. Beide Substanzen zeigen in nächst höherer Konzentration von 100 bzw. 30 μM einen zytotoxischen Effekt (Abbildung 12). Daher ist bei der vermeintlichen antiviralen Wirkung in nächst niedrigerer Konzentration von einem zytotoxischen Effekt beider Substanzen auszugehen.

Bei den Substanzen LDV und ELB konnte kein zytotoxischer Effekt bei nächst höheren Konzentrationen gezeigt werden (Abbildung 12). Beide Substanzen hemmen bei HCV-Infektionen das NS5A-Protein^{174,176}. In Flaviviren wie dem DenV-2 wird dieses Protein nicht exprimiert, dafür aber ein NS5 Protein²³⁸. Weitere Studien zeigen, dass das NS5-Protein, extrahiert aus DenV-3 und das NS5A-Protein von HCV ein „zinc-binding motif“ aufweisen und mutmaßlich durch eine NS5A Kinase phosphoryliert werden^{239,240}. Daher werden beide Proteine als funktionell homolog bezeichnet²⁴⁰ und eine Hemmung durch dieselben Substanzen ist denkbar. Durch LDV wurde in den Versuchen eine Senkung der Genomkopienanzahl bis zu einer Konzentration von 2 μM um 1 Größenordnung erreicht (Abbildung 11). Die EC50-Werte für LDV für die HCV Genotypen 1a und 1b, liegen jedoch in dem Bereich von 0,004-0,031 nM¹⁷⁴. Damit liegen sie weit unter der, im Versuch eingesetzten Konzentration. LDV ist in einer Fixkombination mit SOF erhältlich¹⁶⁶. Die empfohlene Dosis beträgt 90 mg (101,23 μM) LDV und 400 mg (755,5 μM) SOF pro Tag, was einer Tablette entspricht²⁴¹. Bei einzelnen Überdosierungen von 120 mg (134,98 μM) über 10 d und einer Einzeldosis von 1200 mg (1349,83 μM) wurden keine schwereren Nebenwirkungen beobachtet²⁴¹. Eine direkte Anwendung der Substanz in der Klinik gegen Infektionen mit DENV-2 ist somit ausgeschlossen. Jedoch lassen die Werte darauf schließen, dass LDV in abgewandelter Form eine Therapiemöglichkeit für DENV-2-Infektionen darstellen kann.

Die höchste Senkung der Genomkopienanzahl von ca. 0,6 Größenordnungen durch ELB wurde bei einer Konzentration von 30 μM erreicht (Abbildung 11). Die EC₅₀-Werte von ELB gegen Infektionen mit HCV betragen je nach HCV-Genotyp GT1a 0.004 (\pm 0.002) nM, GT1b 0.003 (\pm 0.001) nM, GT2a 0.003 (\pm 0.001) nM, GT3a 0.03 (\pm 0.01) nM und GT4a 0.003 (\pm 0.001) nM ¹⁷⁶. Diese Werte liegen weit unter der im Versuch eingesetzten Konzentration. ELB wird bei Patienten mit einer HCV-Infektion in Kombination mit GRV verabreicht ¹⁶⁶. Die empfohlene Dosis beträgt eine Tablette pro Tag, wobei pro Tablette 50 mg ELB und 100 mg GRV enthalten sind ²³⁰. Es wurde keine erhöhte Toxizität von ELB bei einer Dosis von 200 mg / d (226,75 μM) über 10 d und einer einmaligen Dosis von 800 mg (907 μM) festgestellt ²³⁰. Versuche zur Kanzerogenität wurden nicht durchgeführt ²³⁰. Da für Infektionen mit DENV-2 zurzeit keine anderen direkt-antiviralen Therapien zugelassen sind ³⁸, kann die Substanz in modifizierter Form dennoch zur Etablierung einer Therapie führen.

Wegen der Strukturähnlichkeit des HCV und des DENV-2 wurden im Vorfeld von weiteren Arbeitsgruppen ähnliche Versuche durchgeführt. Dabei wurde eine Wirkung von SOF auf Infektionen mit DENV-2 und CHIKV gezeigt und publiziert ^{242,243}. Da SOF in dieser Versuchsreihe keinen Effekt auf Infektionen mit DENV-2 oder CHIKV zeigte, wurden die Ergebnisse für diese Substanz nachträglich auch für die anderen Viren nicht in diese Arbeit mit aufgenommen. Jedoch könnten diese Ergebnisse die klinische Relevanz für die Wirkung von LDV mit beeinflussen. Beide Medikamente sind im Moment als Kombinationspräparat auf dem Markt erhältlich ^{166,241}. Obwohl LDV in weitaus höheren Konzentrationen als in dem Präparat vorhanden eingesetzt werden müsste, könnte eine Therapie in Kombination mit SOF bei Infektionen mit DENV-2 zu besseren Erfolgen führen. ELB sowie LDV zeigten keine Wirkung auf Infektionen mit CHIKV oder Poliovirus (Abbildung 13, Abbildung 15), weshalb man bei beiden Substanzen von einem virus-spezifischen Effekt auf DENV-2-Infektionen ausgehen kann. Die Substanz T-705 bewirkte in den Versuchen eine Reduktion der Anzahl der Genomkopien von über einer Größenordnung, wenn sie in Konzentrationen von 200 μM oder höher eingesetzt wurde. Die Substanz zeigt jedoch eine Wirkung auf Infektionen von MDCK Zellen mit Influenza A, B und C mit IC₅₀-Werten von 0,082-3,05 μM ¹⁹⁵, was weit unterhalb der in diesem Versuch eingesetzten Menge liegt. Daher wurden die Ergebnisse nicht weiterverfolgt und nicht wiederholt.

4.7 Die Substanzen zeigen keine Wirksamkeit gegen CHIKV

Im Falle von CHIKV wurden die Effekte der Substanzen durch ihren Einfluss auf den zytotoxischen Effekt von CHIKV auf BHK21 Zellen mittels MTS-Tests gemessen. Bei den Substanzen VEL, ELB und LDV wurde ein geringer Effekt auf die Zellviabilität gezeigt (s.h. 3.6, S.34). Die Wirkung der Substanzen konnte durch einen Kontrollversuch mittels RTqPCR nicht bestätigt werden (Abbildung 13). Die Substanzen ELB und LDV wirken jedoch bei Infektionen mit DENV-2 (Abbildung 11). Da CHIKV ebenfalls ein (+)ss-RNA-Virus ist, kann bei diesen Substanzen von einem spezifischen Effekt auf Infektionen mit DENV-2 ausgegangen werden. Da SOF auch bei CHIKV Infektionen keine Wirkung zeigte, obwohl andere Publikationen eine Wirkung zeigte ²⁴³, ist die Aussagekraft der Ergebnisse als gering einzuschätzen. Auch die Substanz T-705 zeigte in Konzentrationen von 30 bzw. 10 µM keinen Effekt auf die Absorption. Anderweitig veröffentlichte Daten weisen jedoch auf eine Wirksamkeit gegen Infektionen mit CHIKV, Strains Ocean 899, LR2006-OPY1, Haly 2008 mit EC50-Werten von 0,3-9,4 µg/ml hin ¹⁹⁰. Des Weiteren kann vermutet werden, dass die, in den Versuchen verwendete Substanz nicht wirksam war.

4.8 Die Substanzen zeigen keine Wirksamkeit gegen Poliovirus

Auch im Falle von Poliovirus-Infektionen konnten keine Effekte der Substanzen beobachtet werden, obwohl eine Testung mit der Substanz SOF nochmals anzudenken wäre (Abbildung 15). Da das Poliovirus sowie DENV-2 ein (+) ss-RNA-Virus ist ²⁴⁴, kann von ähnlichen Mechanismen der Virusreplikation ausgegangen werden. Die Ergebnisse für die Substanzen ELB und LDV wurden mittels RTqPCR überprüft (Abbildung 10.). Da die Substanzen ELB und LDV in den Versuchen jedoch nur eine Wirkung auf DENV-2 und nicht auf Infektionen mit CHIKV oder Poliovirus gezeigt haben (Abbildung 11, Abbildung 13, Abbildung 15), kann von einem spezifischen Effekt für Infektionen mit DENV-2 ausgegangen werden. Die Substanz T-705 zeigte in Konzentrationen von 30 und 10 µM keinen Effekt auf die Absorption. Anderweitig veröffentlichte Daten weisen jedoch auf eine Wirksamkeit auf Infektionen mit Poliovirus mit einem IC50-Wert von 4,8 µg/ml hin ¹⁹⁵. Die Werte wurden mittels „Plaque-reducing essay“ auf Vero Zellen ermittelt ¹⁹⁵. Es muss davon ausgegangen werden, dass die verwendete Substanz T-705 nicht wirksam war.

4.9 Kein Einfluss der Substanzen auf Masernvirus-Infektionen

Die Ergebnisse bei Infektionen mit Masernvirus wiesen auf keine Wirksamkeit der Substanzen hin (3.4, S.30). Jedoch wurde in den Versuchen auch keine Wirkung der Substanz T-705 in den Konzentrationen 30 bis 0,4 μM bei Infektionen mit Masern beobachtet. In anderweitig veröffentlichten Quellen wird jedoch eine Wirkung von T-705 gegen Masern bis zu einer Konzentration von 13 μM beschrieben¹⁹³. Aufgrund dieser Daten ist die Validität der analysierten Ergebnisse kritisch zu betrachten. Eine mögliche Fehlerquelle könnten die unterschiedlich genutzten Methoden darstellen. Die Ergebnisse der beschriebenen Versuche wurden mittels Zählung der grün-fluoreszierenden Zellen ausgewertet. In der zitierten Quelle wurden die Synzytien Formationen gezählt¹⁹³. Weiterhin kann vermutet werden, dass die verwendete Substanz T-705 keine Wirksamkeit hatte, da auch die Ergebnisse auf Infektionen mit Poliovirus und CHIKV negativ ausfielen, obwohl anderweitig veröffentlichte Daten von einer Wirksamkeit der Substanz gegen Infektionen mit CHIKV, Poliovirus, DENV-2 und Masernvirus berichten^{190,193,195}.

4.10 Keine getestete Substanz zeigt bessere Wirkung gegen HIV-1 als die Standardtherapie

Die Versuche mit HIV-1 wurden nicht mit allen Substanzen durchgeführt. Es wurde immer nur ein Vertreter von Substanzen mit gleichem Wirkmechanismus getestet. Auch auf die Testung der meisten Herpesmedikamente wurde verzichtet. Da diese Medikamente schon sehr lange zur Verfügung stehen, wurden Versuche zur Wirkung dieser Substanzen auf HIV-1-Infektionen schon im Voraus durchgeführt²⁴⁵⁻²⁵⁰. Die moderate Senkung der Infektiosität bei Infektionen mit HIV-1 durch DCV bei einer Konzentration von 10 μM (Abbildung 17) könnte auf eine gewisse Resttoxizität zurückzuführen sein, vor allem, da kein konzentrations-abhängiger Effekt gesehen wurde. Denn obwohl DCV in Messungen zur Zytotoxizität bei einer Konzentration von 10 μM keine Toxizität zeigte, konnte eine hohe Zytotoxizität bei der eingesetzten Konzentration von 30 μM gezeigt werden (Abbildung 16). Auch GRV zeigte einen gewissen zytotoxischen Effekt bei einer Konzentration von 30 μM (Abbildung 16). Jedoch wurde im Versuch eine sehr starke Senkung der Infektiosität gesehen, die nicht unbedingt gänzlich durch einen zytotoxischen Effekt zu erklären ist (Abbildung 17). Die IC50-

Werte von GRV liegen bei Infektionen mit HCV aber zwischen 4 - 690 pM²³⁰ und somit weit unterhalb der in den Versuchen eingesetzten Konzentration. Da eine etablierte Standardtherapie für Infektionen mit HIV-1 zur Verfügung steht²⁵¹, ist eine klinische Anwendbarkeit der Ergebnisse fraglich. Daher wurden die Versuche nicht wiederholt. Dennoch sollten die Ergebnisse weiterverfolgt werden. Durch eine Modifikation der Substanz könnte eine Anwendung als alternative Therapiemöglichkeit möglich werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Versuche relevante Ergebnisse produzieren konnten. Sowohl die Funktionalität der Methoden als auch die Relevanz der Ergebnisse konnten mit dieser Arbeit gezeigt werden. Wider Erwarten wurden einige antivirale Wirkungen über deren Zulassung hinaus gezeigt. Selbst bei inhibitorischen Effekten von unter einer Größenordnung können die Ergebnisse für weiterführende Versuche hilfreich sein. Somit wurde mit dieser Arbeit ein Grundstein für die Etablierung neuer antiviraler Therapien gelegt.

5. Zusammenfassung

Der Weg von der Entwicklung bis zur Zulassung neuer Virostatika ist bis heute mit hohen Kosten und einem großen Zeitaufwand verbunden. Sollten jedoch bereits zugelassene antivirale Medikamente eine Wirkung auf andere virale Infektionen zeigen, könnte dieser Prozess stark verkürzt werden. Daher war es Ziel dieser Arbeit, den Effekt von zugelassenen Medikamenten, gegen HSV-1, mCMV, hCMV, RSV, Parainfluenzavirus-3, DENV-2, CHIKV, Poliovirus, Masernvirus und HIV-1 zu evaluieren. Getestet wurden die Polymeraseinhibitoren ACV, GCV, CDV, sowie das neuere Medikament T-705 und die reversen Transkriptase-Inhibitoren TDF, 3TC, AZT und ABC. Außerdem die Proteaseinhibitoren SMV, GRV, DCV, LDV, ELB, VEL, SOF und DSV.

TDF senkte in einer Konzentration von 10 μM die Infektiosität von HSV-1 und mCMV bis zu 1 Größenordnung. Auch ABC senkte die Infektiosität von HSV-1 und mCMV in einer Konzentration von 30 μM um 0,4 bzw. 0,6 Größenordnungen. AZT und ELB senkten die Infektiosität bei Infektionen mit HSV-1 in einer Konzentration von 30 μM um 0,4 Größenordnungen. VEL senkte die Infektiosität von mCMV bis zu einer Konzentration von 2 μM um 0,7 Größenordnungen. Durch die Substanzen ELB und LDV konnte die Replikation von DENV-2 bei einer Konzentration von 10 μM um 0,6 bzw. 0,8 Größenordnungen gesenkt werden. Die Substanzen zeigten jedoch keinen Effekt auf Infektionen mit CHIKV und Poliovirus, sodass für beide Substanzen ein virusspezifischer Effekt anzunehmen ist. Es wurde keine Wirkung der Substanzen gegen Infektionen mit Masernvirus, RSV oder Parainfluenzavirus-3 in den Versuchen beobachtet. Es wurde gezeigt, dass die verwendeten Methoden eine schnelle und effektive Möglichkeit darstellen, neue direkt-antivirale Medikamente zu etablieren. Zudem stellen die gefundenen Wirkstoffe eine gute Grundlage als Leitsubstanzen zur Entwicklung neuer Wirkstoffe dar. Weitere Versuche mit Kombinationen der wirksamen Substanzen sollten zur weiteren Therapiefindung durchgeführt werden. Damit hat die vorgelegte Arbeit eine hohe Relevanz für die weitere Forschung.

6. Literaturverzeichnis

- 1 DiMasi, J. A., Grabowski, H. G. & Hansen, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *Journal of health economics* **47**, 20-33, doi:10.1016/j.jhealeco.2016.01.012 (2016).
- 2 Field, H. J. & De Clercq, E. Antiviral drugs - a short history of their discovery and development. *Micorbiology Today* **31**, 58-61 (May 2004).
- 3 Palmisano, L. & Vella, S. A brief history of antiretroviral therapy of HIV infection: success and challenges. *Annali dell'Istituto superiore di sanita* **47**, 44-48, doi:10.4415/ann_11_01_10 (2011).
- 4 Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet. Infectious diseases* **17**, 1133-1161, doi:10.1016/s1473-3099(17)30396-1 (2017).
- 5 Nair, H. *et al.* Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)* **375**, 1545-1555, doi:10.1016/s0140-6736(10)60206-1 (2010).
- 6 Shi, T. *et al.* Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet (London, England)* **390**, 946-958, doi:10.1016/s0140-6736(17)30938-8 (2017).
- 7 Krishnan, A. *et al.* Epidemiology of viral acute lower respiratory infections in a community-based cohort of rural north Indian children. *Journal of global health* **9**, 010433, doi:10.7189/jogh.09.010433 (2019).
- 8 Wang, H. *et al.* Prevalence of respiratory viruses among children hospitalized from respiratory infections in Shenzhen, China. *Virology journal* **13**, 39, doi:10.1186/s12985-016-0493-7 (2016).
- 9 Weber, M. W., Mulholland, E. K. & Greenwood, B. M. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Tropical medicine & international health : TM & IH* **3**, 268-280, doi:10.1046/j.1365-3156.1998.00213.x (1998).
- 10 *RKI-Ratgeber: Respiratorische Synzytial-Virus-Infektionen (RSV)*, <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_RSV.html> (06.02.2018).
- 11 Mazur, N. I. *et al.* The respiratory syncytial virus vaccine landscape: lessons from the graveyard and promising candidates. *The Lancet. Infectious diseases* **18**, e295-e311, doi:10.1016/s1473-3099(18)30292-5 (2018).
- 12 Boyoglu-Barnum, S., Chirkova, T. & Anderson, L. J. Biology of Infection and Disease Pathogenesis to Guide RSV Vaccine Development. *Frontiers in immunology* **10**, 1675, doi:10.3389/fimmu.2019.01675 (2019).
- 13 J. Liesel/a, J. F. b. in *S2k-Leitlinie „Leitlinie zur Prophylaxe von schweren Erkrankungen durch Respiratory Syncytial Virus (RSV) bei Risikokindern“ Aktualisierung 2017/2018* (ed Federführend herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie) (30.10.2018).
- 14 Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMPact-RSV Study Group. *Pediatrics* **102**, 531-537 (1998).

- 15 Ruuskanen, O., Lahti, E., Jennings, L. C. & Murdoch, D. R. Viral pneumonia. *Lancet (London, England)* **377**, 1264-1275, doi:10.1016/s0140-6736(10)61459-6 (2011).
- 16 Knott, A. M., Long, C. E. & Hall, C. B. Parainfluenza viral infections in pediatric outpatients: seasonal patterns and clinical characteristics. *The Pediatric infectious disease journal* **13**, 269-273, doi:10.1097/00006454-199404000-00005 (1994).
- 17 Gilca, R. *et al.* Other respiratory viruses are important contributors to adult respiratory hospitalizations and mortality even during peak weeks of the influenza season. *Open forum infectious diseases* **1**, ofu086, doi:10.1093/ofid/ofu086 (2014).
- 18 Gaunt, E. R., Harvala, H., McIntyre, C., Templeton, K. E. & Simmonds, P. Disease burden of the most commonly detected respiratory viruses in hospitalized patients calculated using the disability adjusted life year (DALY) model. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **52**, 215-221, doi:10.1016/j.jcv.2011.07.017 (2011).
- 19 Russell, E., Yang, A., Tardrew, S. & Ison, M. G. Parainfluenza Virus in Hospitalized Adults: A 7-Year Retrospective Study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **68**, 298-305, doi:10.1093/cid/ciy451 (2019).
- 20 Branche, A. R. & Falsey, A. R. Parainfluenza Virus Infection. *Seminars in respiratory and critical care medicine* **37**, 538-554, doi:10.1055/s-0036-1584798 (2016).
- 21 Kairys, S. W., Olmstead, E. M. & O'Connor, G. T. Steroid treatment of laryngotracheitis: a meta-analysis of the evidence from randomized trials. *Pediatrics* **83**, 683-693 (1989).
- 22 Bjornson, C. L. *et al.* A randomized trial of a single dose of oral dexamethasone for mild croup. *The New England journal of medicine* **351**, 1306-1313, doi:10.1056/NEJMoa033534 (2004).
- 23 Russell, E. & Ison, M. G. Parainfluenza Virus in the Hospitalized Adult. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **65**, 1570-1576, doi:10.1093/cid/cix528 (2017).
- 24 Noor, A. & Krilov, L. R. Respiratory syncytial virus vaccine: where are we now and what comes next? *Expert opinion on biological therapy* **18**, 1247-1256, doi:10.1080/14712598.2018.1544239 (2018).
- 25 Rezaee, F., Linfield, D. T., Harford, T. J. & Piedimonte, G. Ongoing developments in RSV prophylaxis: a clinician's analysis. *Current opinion in virology* **24**, 70-78, doi:10.1016/j.coviro.2017.03.015 (2017).
- 26 Kramer, R., Duclos, A., Lina, B. & Casalegno, J. S. Cost and burden of RSV related hospitalisation from 2012 to 2017 in the first year of life in Lyon, France. *Vaccine* **36**, 6591-6593, doi:10.1016/j.vaccine.2018.09.029 (2018).
- 27 Ehlken, B. *et al.* Economic impact of community-acquired and nosocomial lower respiratory tract infections in young children in Germany. *European journal of pediatrics* **164**, 607-615, doi:10.1007/s00431-005-1705-0 (2005).
- 28 Strebel, P. M. & Orenstein, W. A. Measles. *The New England journal of medicine* **381**, 349-357, doi:10.1056/NEJMcp1905181 (2019).
- 29 *RKI-Ratgeber: Masern*, <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Masern.html> (23.07.2021).

- 30 Schönberger, K., Ludwig, M. S., Wildner, M. & Weissbrich, B. Epidemiology of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in Germany from 2003 to 2009: a risk estimation. *PloS one* **8**, e68909, doi:10.1371/journal.pone.0068909 (2013).
- 31 Guerra, F. M. *et al.* The basic reproduction number (R(0)) of measles: a systematic review. *The Lancet. Infectious diseases* **17**, e420-e428, doi:10.1016/s1473-3099(17)30307-9 (2017).
- 32 Di Pietrantonj, C., Rivetti, A., Marchione, P., Debalini, M. G. & Demicheli, V. Vaccines for measles, mumps, rubella, and varicella in children. *The Cochrane database of systematic reviews* **4**, Cd004407, doi:10.1002/14651858.CD004407.pub4 (2020).
- 33 Nationale Verifizierungskommission Masern/Röteln beim Robert Koch-Institut, <https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/NAVKO/NAVKO_node.html> (Stand: 16.07.2019).
- 34 Ständige Impfkommision: Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch-Institut. *Epid Bull* 2019. 313-364 (RKI, 2019).
- 35 Ogbuanu, I. U. *et al.* Maternal, fetal, and neonatal outcomes associated with measles during pregnancy: Namibia, 2009-2010. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **58**, 1086-1092, doi:10.1093/cid/ciu037 (2014).
- 36 Siegel, M. & Fuerst, H. T. Low birth weight and maternal virus diseases. A prospective study of rubella, measles, mumps, chickenpox, and hepatitis. *Jama* **197**, 680-684 (1966).
- 37 Werber, D., Hoffmann, A., Santibanez, S., Mankertz, A. & Sagebiel, D. Large measles outbreak introduced by asylum seekers and spread among the insufficiently vaccinated resident population, Berlin, October 2014 to August 2015. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **22**, doi:10.2807/1560-7917.es.2017.22.34.30599 (2017).
- 38 *Fact Sheets: Dengue and severe dengue*, <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>> (19.05.2021).
- 39 Roy, S. K. & Bhattacharjee, S. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. *Canadian journal of microbiology* **67**, 687-702, doi:10.1139/cjm-2020-0572 (2021).
- 40 Brady, O. J. *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS neglected tropical diseases* **6**, e1760, doi:10.1371/journal.pntd.0001760 (2012).
- 41 La Ruche, G. *et al.* First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **15**, 19676 (2010).
- 42 I Gjenero-Margan¹, B. A., D Krajcar², V Lesnikar², A Klobučar², I Pem-Novosell¹, S Kurečić-Filipović¹, S Komparak³, R Martić³, S Đuričić⁴, L Betica-Radić⁴, J Okmadžić⁵, T Vilibić-Čavlek¹, A Babić-Erceg¹, B Turković¹, T Avšić-Županc⁶, I Radić¹, M Ljubić⁷, K Šarac¹, N Benić², G Mlinarić-Galinović¹. Autochthonous dengue fever in Croatia, August–September 2010. *Eurosurveillance* **16** (2010).
- 43 Koch-Institut, R. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2019 Robert Koch-Institut, Berlin, 2020. Report No. 978-3-89606-297-0, (Robert Koch-Institut, Berlin, 2020).

- 44 Charlier, C., Beaudoin, M. C., Couderc, T., Lortholary, O. & Lecuit, M. Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects. *The Lancet. Child & adolescent health* **1**, 134-146, doi:10.1016/s2352-4642(17)30021-4 (2017).
- 45 Adam, I., Jumaa, A. M., Elbashir, H. M. & Karsany, M. S. Maternal and perinatal outcomes of dengue in PortSudan, Eastern Sudan. *Virology journal* **7**, 153, doi:10.1186/1743-422x-7-153 (2010).
- 46 Paixao, E. S., Teixeira, M. G., Costa, M. & Rodrigues, L. C. Dengue during pregnancy and adverse fetal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases* **16**, 857-865, doi:10.1016/s1473-3099(16)00088-8 (2016).
- 47 Khetarpal, N. & Khanna, I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. *Journal of immunology research* **2016**, 6803098, doi:10.1155/2016/6803098 (2016).
- 48 Thomas, S. J. & Yoon, I. K. A review of Dengvaxia(R): development to deployment. *Human vaccines & immunotherapeutics* **15**, 2295-2314, doi:10.1080/21645515.2019.1658503 (2019).
- 49 *Dengvaxia: EPAR- Product information*, <https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/dengvaxia-epar-product-information_en.pdf> (2018).
- 50 Institute, B. *Phase III Trial to Evaluate Efficacy and Safety of a Tetravalent Dengue Vaccine*, <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02406729>> (2019).
- 51 Wilder-Smith, A. Dengue vaccine development: status and future. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* **63**, 40-44, doi:10.1007/s00103-019-03060-3 (2020).
- 52 López-Medina, E. *et al.* Efficacy of a dengue vaccine candidate (TAK-003) in healthy children and adolescents two years after vaccination. *The Journal of infectious diseases*, doi:10.1093/infdis/jiaa761 (2020).
- 53 Nitsche, C. Strategies Towards Protease Inhibitors for Emerging Flaviviruses. *Advances in experimental medicine and biology* **1062**, 175-186, doi:10.1007/978-981-10-8727-1_13 (2018).
- 54 Hariono, M. *et al.* Thioguanine-based DENV-2 NS2B/NS3 protease inhibitors: Virtual screening, synthesis, biological evaluation and molecular modelling. *PloS one* **14**, e0210869, doi:10.1371/journal.pone.0210869 (2019).
- 55 Norshidah, H., Vignesh, R. & Lai, N. S. Updates on Dengue Vaccine and Antiviral: Where Are We Heading? *Molecules (Basel, Switzerland)* **26**, doi:10.3390/molecules26226768 (2021).
- 56 Organisation, W. H. *Chikungunya*, <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>> (2020).
- 57 *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2017: Chikungunyavirus-Erkrankung*, <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2017.pdf?__blob=publicationFile> (1.03.2018).
- 58 Bonifay, T. *et al.* Atypical and severe manifestations of chikungunya virus infection in French Guiana: A hospital-based study. *PloS one* **13**, e0207406, doi:10.1371/journal.pone.0207406 (2018).
- 59 Rodríguez-Morales, A. J., Cardona-Ospina, J. A., Fernanda Urbano-Garzón, S. & Sebastian Hurtado-Zapata, J. Prevalence of Post-Chikungunya Infection Chronic Inflammatory Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arthritis care & research* **68**, 1849-1858, doi:10.1002/acr.22900 (2016).

- 60 Torres, J. R. *et al.* Congenital and perinatal complications of chikungunya fever: a Latin American experience. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* **51**, 85-88, doi:10.1016/j.ijid.2016.09.009 (2016).
- 61 Maria, A., Vallamkonda, N., Shukla, A., Bhatt, A. & Sachdev, N. Encephalitic presentation of Neonatal Chikungunya: A Case Series. *Indian pediatrics* **55**, 671-674 (2018).
- 62 Institut, R. K. Hohe Denguefieber-Fallzahlen 2019 und Chikungunyafieber-Ausbruch in Thailand. *Epidemiologisches Bulletin* **27**, 250 (2019).
- 63 Powers, A. M. Vaccine and Therapeutic Options To Control Chikungunya Virus. *Clinical microbiology reviews* **31**, doi:10.1128/cmr.00104-16 (2018).
- 64 Kumar, R., Shrivastava, T., Samal, S., Ahmed, S. & Parray, H. A. Antibody-based therapeutic interventions: possible strategy to counter chikungunya viral infection. *Applied microbiology and biotechnology* **104**, 3209-3228, doi:10.1007/s00253-020-10437-x (2020).
- 65 Schrauf, S., Tschismarov, R., Tauber, E. & Ramsauer, K. Current Efforts in the Development of Vaccines for the Prevention of Zika and Chikungunya Virus Infections. *Frontiers in immunology* **11**, 592, doi:10.3389/fimmu.2020.00592 (2020).
- 66 Reisinger, E. C. *et al.* Immunogenicity, safety, and tolerability of the measles-vectored chikungunya virus vaccine MV-CHIK: a double-blind, randomised, placebo-controlled and active-controlled phase 2 trial. *Lancet (London, England)*, doi:10.1016/s0140-6736(18)32488-7 (2018).
- 67 (WRAIR), W. R. A. I. o. R. A Phase 2 Open-label Study to Assess the Safety and Immunogenicity of an Alum-Adjuvanted Chikungunya Virus-Like Particle Vaccine (PXVX0317) in Prior Recipients of Other Alphavirus Vaccines (WRAIR), <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03992872?cond=Chikungunya&draw=2&rank=2>> (2019).
- 68 Chen, G. L. *et al.* Effect of a Chikungunya Virus-Like Particle Vaccine on Safety and Tolerability Outcomes: A Randomized Clinical Trial. *Jama* **323**, 1369-1377, doi:10.1001/jama.2020.2477 (2020).
- 69 José R. Romero, J. F. M. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* 8th edn, Vol. 2 2073-2079 (Elsevier, 2015).
- 70 Koch-Institut, R. *Poliomyelitis RKI-Ratgeber*, <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Poliomyelitis.html#doc2374544bodyText12> (2021).
- 71 RKI. *Poliomyelitis RKI-Ratgeber*, <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Poliomyelitis.html> (2000).
- 72 Nathanson, N. & Martin, J. R. The epidemiology of poliomyelitis: enigmas surrounding its appearance, epidemicity, and disappearance. *American journal of epidemiology* **110**, 672-692, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a112848 (1979).
- 73 Horstmann, D. M. Poliomyelitis: severity and type of disease in different age groups. *Annals of the New York Academy of Sciences* **61**, 956-967, doi:10.1111/j.1749-6632.1955.tb42554.x (1955).
- 74 *Afghanistan Polio Eradication Initiative Annual Report, 2019*, <<https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2020/11/2019-Afghanistan-Annual-Report.pdf>> (2019).

- 75 *National emergency action plan for polio eradication 2020*,
<<https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2020/11/Pakistan-NEAP-2020.pdf>> (2020).
- 76 Lopalco, P. L. Wild and vaccine-derived poliovirus circulation, and implications for polio eradication. *Epidemiology and infection* **145**, 413-419, doi:10.1017/s0950268816002569 (2017).
- 77 Alleman, M. M. *et al.* Update on Vaccine-Derived Poliovirus Outbreaks - Worldwide, January 2020-June 2021. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* **70**, 1691-1699, doi:10.15585/mmwr.mm7049a1 (2021).
- 78 Bigouette, J. P. *et al.* Progress Toward Polio Eradication - Worldwide, January 2019-June 2021. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* **70**, 1129-1135, doi:10.15585/mmwr.mm7034a1 (2021).
- 79 estimates, U. e. *UNIADS fact sheet- world AIDS Day 2021*, <https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf> (
- 80 *RKI Ratgeber: HIV-Infektion/AIDS*, <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HIV_AIDS.html#doc2374480bodyText10> (22.11.2018).
- 81 Christensen, S., Wolf, E., Altevers, J. & Diaz-Cuervo, H. Comorbidities and costs in HIV patients: A retrospective claims database analysis in Germany. *PloS one* **14**, e0224279, doi:10.1371/journal.pone.0224279 (2019).
- 82 Krentz, H. B. & Gill, M. J. Increased costs of HIV care associated with aging in an HIV-infected population. *HIV medicine* **16**, 38-47, doi:10.1111/hiv.12176 (2015).
- 83 Matthias Stoll , C. K., Frank Bergmann, Johannes Bogner, Gerd Faetkenheuer, Carlos Fritzsche, Kirsten Hoepfer, Heinz-August Horst, Jan van Lunzen, Andreas Plettenberg, Stefan Reuter, Jürgen Rockstroh, Hans-Jürgen Stellbrink, [...], and the ClinSurv Study Group [view all]. Calculation of Direct Antiretroviral Treatment Costs and Potential Cost Savings by Using Generics in the German HIV ClinSurv Cohort.
- 84 Hamers, R. L., Rinke de Wit, T. F. & Holmes, C. B. HIV drug resistance in low-income and middle-income countries. *The lancet. HIV* **5**, e588-e596, doi:10.1016/s2352-3018(18)30173-5 (2018).
- 85 Rhee, S. Y. *et al.* HIV-1 transmitted drug resistance surveillance: shifting trends in study design and prevalence estimates. *Journal of the International AIDS Society* **23**, e25611, doi:10.1002/jia2.25611 (2020).
- 86 Munawwar, A., Gupta, S., Sharma, S. K. & Singh, S. Seroprevalence of HSV-1 and 2 in HIV-infected males with and without GUD: Study from a tertiary care setting of India. *Journal of laboratory physicians* **10**, 326-331, doi:10.4103/jlp.jlp_7_18 (2018).
- 87 Yunusa, T., Haruna, S. A. & Garba, H. Z. Seroprevalence of Herpes Simplex Virus among Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients in Resource-Limited Setting. *Journal of global infectious diseases* **11**, 107-111, doi:10.4103/jgid.jgid_168_18 (2019).
- 88 Fowotade, A., Okonko, I. O., Agbede, O. O. & Suleiman, S. T. High seropositivity of IgG and IgM antibodies against cytomegalovirus (CMV) among HIV-1 seropositive patients in Ilorin, Nigeria. *African health sciences* **15**, 1-9, doi:10.4314/ahs.v15i1.1 (2015).
- 89 Morfin, F. *et al.* HSV excretion after bone marrow transplantation: a 4-year survey. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan*

- American Society for Clinical Virology* **30**, 341-345,
doi:10.1016/j.jcv.2004.03.002 (2004).
- 90 Greenberg, M. S. *et al.* A comparative study of herpes simplex infections in renal transplant and leukemic patients. *The Journal of infectious diseases* **156**, 280-287 (1987).
- 91 Beyar-Katz, O. *et al.* Anti-herpesvirus prophylaxis, pre-emptive treatment or no treatment in adults undergoing allogeneic transplant for haematological disease: systematic review and meta-analysis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **26**, 189-198, doi:10.1016/j.cmi.2019.09.003 (2020).
- 92 Christophers, J. *et al.* Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **42**, 868-872, doi:10.1128/aac.42.4.868 (1998).
- 93 Englund, J. A. *et al.* Herpes simplex virus resistant to acyclovir. A study in a tertiary care center. *Annals of internal medicine* **112**, 416-422, doi:10.7326/0003-4819-76-3-112-6-416 (1990).
- 94 Cohen, S. G. & Greenberg, M. S. Chronic oral herpes simplex virus infection in immunocompromised patients. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* **59**, 465-471, doi:10.1016/0030-4220(85)90085-4 (1985).
- 95 Tan, I. L., McArthur, J. C., Venkatesan, A. & Nath, A. Atypical manifestations and poor outcome of herpes simplex encephalitis in the immunocompromised. *Neurology* **79**, 2125-2132, doi:10.1212/WNL.0b013e3182752ceb (2012).
- 96 Hellenbrand, W., Thierfelder, W., Müller-Pebody, B., Hamouda, O. & Breuer, T. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in former East and West Germany, 1997-1998. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **24**, 131-135, doi:10.1007/s10096-005-1286-x (2005).
- 97 Wutzler, P. *et al.* Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in selected German populations-relevance for the incidence of genital herpes. *Journal of medical virology* **61**, 201-207, doi:10.1002/(sici)1096-9071(200006)61:2<201::aid-jmv5>3.0.co;2-p (2000).
- 98 Buddingh, G. J., Schrum, D. I., Lanier, J. C. & Guidry, D. J. Studies of the natural history of herpes simplex infections. *Pediatrics* **11**, 595-610 (1953).
- 99 Chaabane, S., Harfouche, M., Chemaitelly, H., Schwarzer, G. & Abu-Raddad, L. J. Herpes simplex virus type 1 epidemiology in the Middle East and North Africa: systematic review, meta-analyses, and meta-regressions. *Scientific reports* **9**, 1136, doi:10.1038/s41598-018-37833-8 (2019).
- 100 Embil, J. A., Stephens, R. G. & Manuel, F. R. Prevalence of recurrent herpes labialis and aphthous ulcers among young adults on six continents. *Canadian Medical Association journal* **113**, 627-630 (1975).
- 101 Ruell, J. *et al.* Active CMV disease does not always correlate with viral load detection. *Bone marrow transplantation* **40**, 55-61, doi:10.1038/sj.bmt.1705671 (2007).
- 102 Avery, R. K. *et al.* Cytomegalovirus infections in lung and hematopoietic cell transplant recipients in the Organ Transplant Infection Prevention and Detection Study: A multi-year, multicenter prospective cohort study. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* **20**, e12877, doi:10.1111/tid.12877 (2018).
- 103 Chen, J. *et al.* Cost analysis of ganciclovir and foscarnet in recipients of allogeneic hematopoietic cell transplant with cytomegalovirus viremia.

- Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* **22**, e13233, doi:10.1111/tid.13233 (2020).
- 104 B.V., M. S. D. *Prevymis: EPAR- Product Information*,
<https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/prevymis-epar-product-information_en.pdf> (17.01.2018).
- 105 Uta Behrends (DGPI), A. B. G., Luisa Durán Graeff (DGI), Hermann Einsele (DGHO), Britta Eiz Vesper (DGTI), Helmut Fickenscher (externer Gutachter), Lutz Fischer (DTG), Christa Flechtenmacher (DGP, BDP), Barbara Gärtner (DVV), Andreas Groll (PEG), Joachim Hahn (DGHO), Klaus Hamprecht (GfV), Albert Heim (GfV), Britta Höcker (GPN), Ulrike Holtkamp (DLH), Manfred Hönig (DGKJ), Ernst Holler (DAGKBT), Jörg Kalff (DGCH), Johannes Korth (DGIM), Marie von Lilienfeld Toal (DGHO), Britta Maecker Kolhoff (GPOH), T. M. G., Detlef Michel (GfV), Susanne Modrow (GfV), Jürgen Rissland (GfV), Andreas Rosenwald (DGP, BDP), Andreas Sauerbrei (GfV), Barbara Schmidt (GfV; Koordinatorin), Corinna Schmitt (GfV), Paul Schnitzler (GfV), A. S. A., Martina Sester (DVV), Helmut Sitter (AWMF), Christoph Stamm (DGTHG), Christoph Steininger (externer Gutachter), Julia Tabatabai (DGPI), Burkhard Tönshoff (DTG), Jörg Janne Vehreschild (DGI), & Jürgen Wenzel (GfV), U. W. G., Oliver Witzke (DGfN). *Virusinfektionen bei Organ- und allogenen Stammzell-Transplantierten: Diagnostik, Prävention und Therapie* <https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/093-002l_S2k_Virusinfektionen-Organtransplantierte-alloge-Stammzell-Transplantierten-Diagnostik-Prävention-Therapie__2019-06.pdf> (2019).
- 106 Razonable, R. R. & Humar, A. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients-Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clinical transplantation* **33**, e13512, doi:10.1111/ctr.13512 (2019).
- 107 Iwasenko, J. M., Scott, G. M., Naing, Z., Glanville, A. R. & Rawlinson, W. D. Diversity of antiviral-resistant human cytomegalovirus in heart and lung transplant recipients. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* **13**, 145-153, doi:10.1111/j.1399-3062.2010.00584.x (2011).
- 108 Shmueli, E. *et al.* High rate of cytomegalovirus drug resistance among patients receiving preemptive antiviral treatment after haploidentical stem cell transplantation. *The Journal of infectious diseases* **209**, 557-561, doi:10.1093/infdis/jit475 (2014).
- 109 Boivin, G. *et al.* Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. *Antiviral therapy* **14**, 697-704 (2009).
- 110 Solidoro, P. *et al.* Effect of CMV-immunoglobulins (cytotect biotest) prophylaxis on CMV pneumonia after lung transplantation. *The new microbiologica* **34**, 33-36 (2011).
- 111 *RKI Ratgeber: Zytomegalievirus-Infektion*, <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Zytomegalievirus.html#doc4738494bodyText19> (20.01.2014).
- 112 Manicklal, S., Emery, V. C., Lazzarotto, T., Boppana, S. B. & Gupta, R. K. The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clinical microbiology reviews* **26**, 86-102, doi:10.1128/cmr.00062-12 (2013).

- 113 Pass, R. F. & Arav-Boger, R. Maternal and fetal cytomegalovirus infection: diagnosis, management, and prevention. *F1000Research* **7**, 255, doi:10.12688/f1000research.12517.1 (2018).
- 114 Pass, R. F., Fowler, K. B., Boppana, S. B., Britt, W. J. & Stagno, S. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **35**, 216-220, doi:10.1016/j.jcv.2005.09.015 (2006).
- 115 Dollard, S. C., Grosse, S. D. & Ross, D. S. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in medical virology* **17**, 355-363, doi:10.1002/rmv.544 (2007).
- 116 Kenneson, A. & Cannon, M. J. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Reviews in medical virology* **17**, 253-276, doi:10.1002/rmv.535 (2007).
- 117 Minsart, A. F. *et al.* Use of Cytomegalovirus-Specific Hyperimmunoglobulins in Pregnancy: A Retrospective Cohort. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC*, doi:10.1016/j.jogc.2018.03.013 (2018).
- 118 Nigro, G. Hyperimmune globulin in pregnancy for the prevention of congenital cytomegalovirus disease. *Expert review of anti-infective therapy* **15**, 977-986, doi:10.1080/14787210.2017.1398081 (2017).
- 119 Nigro, G. & Adler, S. P. High-dose CMV hyperimmune globulin (HIG) and maternal CMV DNAemia independently predict infant outcome in pregnant women with a primary cytomegalovirus (CMV) infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, doi:10.1093/cid/ciz1030 (2019).
- 120 Collins-McMillen, D., Buehler, J., Peppenelli, M. & Goodrum, F. Molecular Determinants and the Regulation of Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation. *Viruses* **10**, doi:10.3390/v10080444 (2018).
- 121 Chun, T. W. *et al.* Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**, 183-188, doi:10.1038/387183a0 (1997).
- 122 Chun, T. W. *et al.* In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nature medicine* **1**, 1284-1290, doi:10.1038/nm1295-1284 (1995).
- 123 Sedarati, F., Margolis, T. P. & Stevens, J. G. Latent infection can be established with drastically restricted transcription and replication of the HSV-1 genome. *Virology* **192**, 687-691, doi:10.1006/viro.1993.1089 (1993).
- 124 Kondo, K., Xu, J. & Mocarski, E. S. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 11137-11142, doi:10.1073/pnas.93.20.11137 (1996).
- 125 Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J. G., Borysiewicz, L. K. & Sinclair, J. H. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of general virology* **72 (Pt 9)**, 2059-2064, doi:10.1099/0022-1317-72-9-2059 (1991).
- 126 Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P. & Sinclair, J. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *The Journal of general virology* **77 (Pt 12)**, 3099-3102, doi:10.1099/0022-1317-77-12-3099 (1996).

- 127 Doherty, M., Buchy, P., Standaert, B., Giaquinto, C. & Prado-Cohrs, D. Vaccine impact: Benefits for human health. *Vaccine* **34**, 6707-6714, doi:10.1016/j.vaccine.2016.10.025 (2016).
- 128 Tim Niehues, C. B., Jane Hecht, Thomas Mertens, Miriam Wiese-Posselt, Fred Zepp. Impfen bei Immundefizienz. *Bundesgesundheitsblatt* **60**, 684, doi:DOI 10.1007/s00103-017-2555-4 (2017).
- 129 Impfen bei Immundefizienz : Anwendungshinweise zu den von der Ständigen Impfkommision empfohlenen Impfungen.(II) Impfen bei 1. Primären Immundefekterkrankungen und 2. HIV-Infektion. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* **61**, 1034-1051, doi:10.1007/s00103-018-2761-8 (2018).
- 130 Irwin, K. K., Renzette, N., Kowalik, T. F. & Jensen, J. D. Antiviral drug resistance as an adaptive process. *Virus evolution* **2**, vew014, doi:10.1093/ve/vew014 (2016).
- 131 Strasfeld, L. & Chou, S. Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications. *Infectious disease clinics of North America* **24**, 413-437, doi:10.1016/j.idc.2010.01.001 (2010).
- 132 Jin, J., Sklar, G. E., Min Sen Oh, V. & Chuen Li, S. Factors affecting therapeutic compliance: A review from the patient's perspective. *Therapeutics and clinical risk management* **4**, 269-286, doi:10.2147/tcrm.s1458 (2008).
- 133 Johannes Bogner, M. Adhärenz. *HIV&more* **2019** (2012).
- 134 Chesney, M. A., Morin, M. & Sherr, L. Adherence to HIV combination therapy. *Social science & medicine (1982)* **50**, 1599-1605, doi:10.1016/s0277-9536(99)00468-2 (2000).
- 135 Verma, J., Subbarao, N. & Rajala, M. S. Envelope proteins as antiviral drug target. *Journal of drug targeting* **28**, 1046-1052, doi:10.1080/1061186x.2020.1792916 (2020).
- 136 Kuritzkes, D. R. HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Current opinion in HIV and AIDS* **4**, 82-87, doi:10.1097/COH.0b013e328322402e (2009).
- 137 Levy, J. A. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiological reviews* **57**, 183-289, doi:10.1128/mr.57.1.183-289.1993 (1993).
- 138 Liu, R. *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367-377, doi:10.1016/s0092-8674(00)80110-5 (1996).
- 139 Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)* **272**, 872-877, doi:10.1126/science.272.5263.872 (1996).
- 140 Dragic, T. *et al.* HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673, doi:10.1038/381667a0 (1996).
- 141 Woollard, S. M. & Kanmogne, G. D. Maraviroc: a review of its use in HIV infection and beyond. *Drug design, development and therapy* **9**, 5447-5468, doi:10.2147/dddt.s90580 (2015).
- 142 Hardy, W. D. *et al.* Two-year safety and virologic efficacy of maraviroc in treatment-experienced patients with CCR5-tropic HIV-1 infection: 96-week combined analysis of MOTIVATE 1 and 2. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* **55**, 558-564, doi:10.1097/QAI.0b013e3181ee3d82 (2010).

- 143 Ding, X. *et al.* Enfuvirtide (T20)-Based Lipopeptide Is a Potent HIV-1 Cell Fusion Inhibitor: Implications for Viral Entry and Inhibition. *Journal of virology* **91**, doi:10.1128/jvi.00831-17 (2017).
- 144 Emu, B. *et al.* Phase 3 Study of Ibalizumab for Multidrug-Resistant HIV-1. *The New England journal of medicine* **379**, 645-654, doi:10.1056/NEJMoa1711460 (2018).
- 145 Anderson, S. J. *et al.* Patient-Reported Outcomes in the Phase III BRIGHT Trial of the HIV-1 Attachment Inhibitor Prodrug Fostemsavir in Heavily Treatment-Experienced Individuals. *The patient* **15**, 131-143, doi:10.1007/s40271-021-00534-y (2022).
- 146 Pancera, M. *et al.* Crystal structures of trimeric HIV envelope with entry inhibitors BMS-378806 and BMS-626529. *Nature chemical biology* **13**, 1115-1122, doi:10.1038/nchembio.2460 (2017).
- 147 Duan, L. W. *et al.* A non-canonical binding interface in the crystal structure of HIV-1 gp120 core in complex with CD4. *Scientific reports* **7**, 46733, doi:10.1038/srep46733 (2017).
- 148 Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Klasse, P. J. & Burkly, L. C. A monoclonal antibody to CD4 domain 2 blocks soluble CD4-induced conformational changes in the envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-1 infection of CD4+ cells. *Journal of virology* **66**, 4784-4793, doi:10.1128/jvi.66.8.4784-4793.1992 (1992).
- 149 Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. Delta Coordinating Committee. *Lancet (London, England)* **348**, 283-291, doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)05387-1 (1996).
- 150 Pau, A. K. & George, J. M. Antiretroviral therapy: current drugs. *Infectious disease clinics of North America* **28**, 371-402, doi:10.1016/j.idc.2014.06.001 (2014).
- 151 Temin H M, B. D. Temin H and Baltimore D. RNA-Directed DNA Synthesis and RNA Tumor Viruses. In *Advances in Virus Research*. *Advances in Virus Research* **17**, 129-186 (1988).
- 152 Venezia, C. F., Howard, K. J., Ignatov, M. E., Holladay, L. A. & Barkley, M. D. Effects of efavirenz binding on the subunit equilibria of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **45**, 2779-2789, doi:10.1021/bi051915z (2006).
- 153 Kewn, S., Veal, G. J., Hoggard, P. G., Barry, M. G. & Back, D. J. Lamivudine (3TC) phosphorylation and drug interactions in vitro. *Biochemical pharmacology* **54**, 589-595, doi:10.1016/s0006-2952(97)00189-5 (1997).
- 154 Faletto, M. B. *et al.* Unique intracellular activation of the potent anti-human immunodeficiency virus agent 1592U89. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **41**, 1099-1107, doi:10.1128/aac.41.5.1099 (1997).
- 155 Furman, P. A. *et al.* Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 8333-8337, doi:10.1073/pnas.83.21.8333 (1986).
- 156 Balzarini, J., Hao, Z., Herdewijn, P., Johns, D. G. & De Clercq, E. Intracellular metabolism and mechanism of anti-retrovirus action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 1499-1503, doi:10.1073/pnas.88.4.1499 (1991).

- 157 Menéndez-Arias, L. & Gago, F. Antiviral agents: structural basis of action and rational design. *Sub-cellular biochemistry* **68**, 599-630, doi:10.1007/978-94-007-6552-8_20 (2013).
- 158 Fujiwara, T. & Mizuuchi, K. Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate. *Cell* **54**, 497-504, doi:10.1016/0092-8674(88)90071-2 (1988).
- 159 Yost, S. A. & Marcotrigiano, J. Viral precursor polyproteins: keys of regulation from replication to maturation. *Current opinion in virology* **3**, 137-142, doi:10.1016/j.coviro.2013.03.009 (2013).
- 160 Fitzon, T. *et al.* Proline residues in the HIV-1 NH2-terminal capsid domain: structure determinants for proper core assembly and subsequent steps of early replication. *Virology* **268**, 294-307, doi:10.1006/viro.1999.0178 (2000).
- 161 von Schwedler, U. K. *et al.* Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly. *The EMBO journal* **17**, 1555-1568, doi:10.1093/emboj/17.6.1555 (1998).
- 162 Lin, T. I. *et al.* In vitro activity and preclinical profile of TMC435350, a potent hepatitis C virus protease inhibitor. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**, 1377-1385, doi:10.1128/aac.01058-08 (2009).
- 163 Harper, S. *et al.* Discovery of MK-5172, a Macrocyclic Hepatitis C Virus NS3/4a Protease Inhibitor. *ACS medicinal chemistry letters* **3**, 332-336, doi:10.1021/ml300017p (2012).
- 164 Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J. & Jacobsen, H. Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *Journal of virology* **67**, 3835-3844, doi:10.1128/jvi.67.7.3835-3844.1993 (1993).
- 165 Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J. & Jacobsen, H. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *Journal of virology* **68**, 5045-5055, doi:10.1128/jvi.68.8.5045-5055.1994 (1994).
- 166 Christoph Sarrazin, T. Z., Thomas Berg, Ulf Peter Neumann, Peter Schirmacher, Hartmut Schmidt, Ulrich Spengler, Jörg Timm, Heiner Wedemeyer, Stefan Wirth, Stefan Zeuzem. S3-Leitlinie „Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus (HCV) -Infektion“. *Zeitschrift für Gastroenterologie* **56**, 756–838, doi:10.1055/a-0599-1320 (2018).
- 167 Macdonald, A. & Harris, M. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *The Journal of general virology* **85**, 2485-2502, doi:10.1099/vir.0.80204-0 (2004).
- 168 Yupeng He, K. A. S., and Seng-Lai Tan. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. (Horizon Bioscience, 2006).
- 169 Belda, O. & Targett-Adams, P. Small molecule inhibitors of the hepatitis C virus-encoded NS5A protein. *Virus research* **170**, 1-14, doi:10.1016/j.virusres.2012.09.007 (2012).
- 170 Shirota, Y. *et al.* Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *The Journal of biological chemistry* **277**, 11149-11155, doi:10.1074/jbc.M111392200 (2002).
- 171 Scheel, T. K. *et al.* Analysis of functional differences between hepatitis C virus NS5A of genotypes 1-7 in infectious cell culture systems. *PLoS pathogens* **8**, e1002696, doi:10.1371/journal.ppat.1002696 (2012).

- 172 Gao, M. *et al.* Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* **465**, 96-100, doi:10.1038/nature08960 (2010).
- 173 Badri, P. S., Shuster, D. L., Dutta, S. & Menon, R. M. Clinical Pharmacokinetics of Ombitasvir. *Clinical pharmacokinetics* **56**, 1103-1113, doi:10.1007/s40262-017-0518-4 (2017).
- 174 Link, J. O. *et al.* Discovery of ledipasvir (GS-5885): a potent, once-daily oral NS5A inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection. *Journal of medicinal chemistry* **57**, 2033-2046, doi:10.1021/jm401499g (2014).
- 175 Cheng, G., Yu, M., Peng, B., Lee, Y.-J., Trejo-Martin, A., Gong, R., Link, J. O. . 1191 GS-5816, a second generation HCV NS5A inhibitor with potent antiviral activity, broad genotypic coverage and a high resistance barrier. *Journal of hepatology* **58**, doi:10.1016/s0168-8278(13)61192-7 (2013).
- 176 Coburn, C. A. *et al.* Discovery of MK-8742: an HCV NS5A inhibitor with broad genotype activity. *ChemMedChem* **8**, 1930-1940, doi:10.1002/cmdc.201300343 (2013).
- 177 Noell, B. C., Besur, S. V. & deLemos, A. S. Changing the face of hepatitis C management - the design and development of sofosbuvir. *Drug design, development and therapy* **9**, 2367-2374, doi:10.2147/dddt.s65255 (2015).
- 178 UC, G. S. I. *Epclusa, INN-sofosbuvir/velpatasvir*, <https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/epclusa-epar-product-information_de.pdf> (28.07.2016).
- 179 Ltd, A. *Exviera: EPAR - Produkt Information*, <https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2016/20160125133904/anx_133904_de.pdf> (12.02.2015).
- 180 Kanamori, H., Yuhashi, K., Ohnishi, S., Koike, K. & Kodama, T. RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus binds to its coding region RNA stem-loop structure, 5BSL3.2, and its negative strand. *The Journal of general virology* **91**, 1207-1212, doi:10.1099/vir.0.016907-0 (2010).
- 181 Xiong, X., Smith, J. L. & Chen, M. S. Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **41**, 594-599, doi:10.1128/aac.41.3.594 (1997).
- 182 Crumpacker, C. S. Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *The American journal of medicine* **92**, 3s-7s, doi:10.1073/pnas.2002392117 (1992).
- 183 Fyfe, J. A., Keller, P. M., Furman, P. A., Miller, R. L. & Elion, G. B. Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *The Journal of biological chemistry* **253**, 8721-8727 (1978).
- 184 Elion, G. B. The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **12 Suppl B**, 9-17, doi:10.1093/jac/12.suppl_b.9 (1983).
- 185 Littler, E., Stuart, A. D. & Chee, M. S. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* **358**, 160-162, doi:10.1038/358160a0 (1992).
- 186 Furuta, Y. *et al.* Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**, 981-986, doi:10.1128/aac.49.3.981-986.2005 (2005).

- 187 Baranovich, T. *et al.* T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro. *Journal of virology* **87**, 3741-3751, doi:10.1128/jvi.02346-12 (2013).
- 188 Wang, Y. *et al.* The mechanism of action of T-705 as a unique delayed chain terminator on influenza viral polymerase transcription. *Biophysical chemistry* **277**, 106652, doi:10.1016/j.bpc.2021.106652 (2021).
- 189 Delang, L., Abdelnabi, R. & Neyts, J. Favipiravir as a potential countermeasure against neglected and emerging RNA viruses. *Antiviral research* **153**, 85-94, doi:10.1016/j.antiviral.2018.03.003 (2018).
- 190 Delang, L. *et al.* Mutations in the chikungunya virus non-structural proteins cause resistance to favipiravir (T-705), a broad-spectrum antiviral. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **69**, 2770-2784, doi:10.1093/jac/dku209 (2014).
- 191 Furuta, Y. *et al.* Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral research* **100**, 446-454, doi:10.1016/j.antiviral.2013.09.015 (2013).
- 192 Furuta, Y., Komeno, T. & Nakamura, T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* **93**, 449-463, doi:10.2183/pjab.93.027 (2017).
- 193 Jochmans, D. *et al.* Antiviral Activity of Favipiravir (T-705) against a Broad Range of Paramyxoviruses In Vitro and against Human Metapneumovirus in Hamsters. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **60**, 4620-4629, doi:10.1128/aac.00709-16 (2016).
- 194 Oestereich, L. *et al.* Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model. *Antiviral research* **105**, 17-21, doi:10.1016/j.antiviral.2014.02.014 (2014).
- 195 Furuta, Y. *et al.* In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**, 977-981 (2002).
- 196 Hayden, F. G. & Shindo, N. Influenza virus polymerase inhibitors in clinical development. *Current opinion in infectious diseases* **32**, 176-186, doi:10.1097/qco.0000000000000532 (2019).
- 197 Uusitupa, E., Waris, M. & Heikkinen, T. Association of Viral Load With Disease Severity in Outpatient Children With Respiratory Syncytial Virus Infection. *The Journal of infectious diseases* **222**, 298-304, doi:10.1093/infdis/jiaa076 (2020).
- 198 Nijman, J. *et al.* Urine viral load and correlation with disease severity in infants with congenital or postnatal cytomegalovirus infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **54**, 121-124, doi:10.1016/j.jcv.2012.02.017 (2012).
- 199 Kelley, C. F., Barbour, J. D. & Hecht, F. M. The relation between symptoms, viral load, and viral load set point in primary HIV infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* **45**, 445-448, doi:10.1097/QAI.0b013e318074ef6e (2007).
- 200 Duprex, W. P., McQuaid, S., Hangartner, L., Billeter, M. A. & Rima, B. K. Observation of measles virus cell-to-cell spread in astrocytoma cells by using a green fluorescent protein-expressing recombinant virus. *Journal of virology* **73**, 9568-9575 (1999).
- 201 Shin, D., Richards, S. L., Alto, B. W., Bettinardi, D. J. & Smartt, C. T. Genome sequence analysis of dengue virus 1 isolated in Key West, Florida. *PloS one* **8**, e74582, doi:10.1371/journal.pone.0074582 (2013).

- 202 Lawrence, P. *et al.* Construction and tropism characterisation of recombinant
viruses exhibiting HIV-1 env gene from seminal strains. *Virology* **386**, 373-379,
doi:10.1016/j.virol.2009.01.028 (2009).
- 203 Kowalzik, S. *et al.* Characterisation of a chikungunya virus from a German
patient returning from Mauritius and development of a serological test. *Medical
microbiology and immunology* **197**, 381-386, doi:10.1007/s00430-008-0090-5
(2008).
- 204 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:
application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological
methods* **65**, 55-63 (1983).
- 205 Jacobs, G. B. *et al.* Construction of a high titer infectious HIV-1 subtype C
proviral clone from South Africa. *Viruses* **4**, 1830-1843, doi:10.3390/v4091830
(2012).
- 206 Abdool Karim, Q. *et al.* Effectiveness and safety of tenofovir gel, an
antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women.
Science (New York, N.Y.) **329**, 1168-1174, doi:10.1126/science.1193748 (2010).
- 207 Abdool Karim, S. S. *et al.* Tenofovir Gel for the Prevention of Herpes Simplex
Virus Type 2 Infection. *The New England journal of medicine* **373**, 530-539,
doi:10.1056/NEJMoa1410649 (2015).
- 208 Celum, C. *et al.* Daily oral tenofovir and emtricitabine-tenofovir preexposure
prophylaxis reduces herpes simplex virus type 2 acquisition among heterosexual
HIV-1-uninfected men and women: a subgroup analysis of a randomized trial.
Annals of internal medicine **161**, 11-19, doi:10.7326/m13-2471 (2014).
- 209 De Clercq, E. *et al.* Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of
purine and pyrimidines. *Antiviral research* **8**, 261-272, doi:10.1016/s0166-
3542(87)80004-9 (1987).
- 210 De Clercq, E. *et al.* A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent.
Nature **323**, 464-467, doi:10.1038/323464a0 (1986).
- 211 Pham, P. A. & Gallant, J. E. Tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of
HIV infection. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **2**, 459-469,
doi:10.1517/17425255.2.3.459 (2006).
- 212 Daluge, S. M. *et al.* 1592U89, a novel carbocyclic nucleoside analog with
potent, selective anti-human immunodeficiency virus activity. *Antimicrobial
agents and chemotherapy* **41**, 1082-1093 (1997).
- 213 Mitsuya, H. *et al.* 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent
that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus
type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proceedings of the National
Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 7096-7100,
doi:10.1073/pnas.82.20.7096 (1985).
- 214 Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D. & Argos, P. An attempt to unify the
structure of polymerases. *Protein engineering* **3**, 461-467,
doi:10.1093/protein/3.6.461 (1990).
- 215 Powell, K. L. & Purifoy, D. J. Nonstructural proteins of herpes simplex virus. I.
Purification of the induced DNA polymerase. *Journal of virology* **24**, 618-626,
doi:10.1128/jvi.24.2.618-626.1977 (1977).
- 216 Andrei, G. *et al.* Topical tenofovir, a microbicide effective against HIV, inhibits
herpes simplex virus-2 replication. *Cell host & microbe* **10**, 379-389,
doi:10.1016/j.chom.2011.08.015 (2011).

- 217 Marcus, J. L. *et al.* Daily oral emtricitabine/tenofovir preexposure prophylaxis and herpes simplex virus type 2 among men who have sex with men. *PLoS one* **9**, e91513, doi:10.1371/journal.pone.0091513 (2014).
- 218 Pol, S. & Lampertico, P. First-line treatment of chronic hepatitis B with entecavir or tenofovir in 'real-life' settings: from clinical trials to clinical practice. *Journal of viral hepatitis* **19**, 377-386, doi:10.1111/j.1365-2893.2012.01602.x (2012).
- 219 Lok, A. S. *et al.* Antiviral therapy for chronic hepatitis B viral infection in adults: A systematic review and meta-analysis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **63**, 284-306, doi:10.1002/hep.28280 (2016).
- 220 Sciences, G. *Viread- EPAR Product Information*, <https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/viread-epar-product-information_en.pdf> (20.11.2019).
- 221 Piret, J. & Boivin, G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 459-472, doi:10.1128/aac.00615-10 (2011).
- 222 Knipe, D. M. & Howley, P. M. *Fields Virology*. 6th edn, Vol. 1 341 (Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
- 223 Drosu, N. C., Edelman, E. R. & Housman, D. E. Tenofovir prodrugs potently inhibit Epstein-Barr virus lytic DNA replication by targeting the viral DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**, 12368-12374, doi:10.1073/pnas.2002392117 (2020).
- 224 Balzarini, J., Haller-Meier, F., De Clercq, E. & Meier, C. Antiviral activity of cycloaligenyl prodrugs of acyclovir, carbovir and abacavir. *Antiviral chemistry & chemotherapy* **12**, 301-306, doi:10.1177/095632020101200505 (2001).
- 225 Agency, E. M. *Ziagen: EPAR-Product Information*, <https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ziagen-epar-product-information_de.pdf> (12.12.2009).
- 226 Nahid Samiei, R. *et al.* In vitro effect of some nucleoside reverse transcriptase inhibitors against HSV-1 replication. *European review for medical and pharmacological sciences* **24**, 1454-1459, doi:10.26355/eurrev_202002_20204 (2020).
- 227 Royer, R. E., Mills, R. G., Young, S. A. & Vander Jagt, D. L. Comparison of the antiviral activities of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) and gossylic iminolactone (GIL) against clinical isolates of HIV-1. *Pharmacological research* **31**, 49-52, doi:10.1016/1043-6618(95)80047-6 (1995).
- 228 Rosenblum, L. L. *et al.* Differential susceptibility of retroviruses to nucleoside analogues. *Antiviral chemistry & chemotherapy* **12**, 91-97, doi:10.1177/095632020101200202 (2001).
- 229 Agency, E. M. *Lamivudin/Zidovudin TEVA: EPAR -Product Information*, <https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/lamivudine/zidovudine-teva-epar-product-information_en.pdf> (15.03.2011).
- 230 B.V., M. S. D. *Zepatier : EPAR - Product Information*, <https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2018/20180615141454/anx_141454_de.pdf> (28.07.2016).
- 231 Roizman, B. & Baines, J. The diversity and unity of Herpesviridae. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* **14**, 63-79, doi:10.1016/0147-9571(91)90122-t (1991).

- 232 Guofeng Cheng, Y. T., Mei Yu, Yu-Jen Lee, Ruoyu Gong, Alejandra Trejo-Martin, Betty Peng, Margaret Robinson, Rudolf Beran, Caroline Bush, Katie Chan, Michelle Nash, Angela Worth, Huiling Yang, Jason Perry, James Taylor, Chris Yang, Matthew Paulson, William Delaney IV, John O. Link Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA, USA. GS-5816, a Second-Generation HCV NS5A Inhibitor With Potent Antiviral Activity, Broad Genotypic Coverage, and a High Resistance Barrier. *Journal of hepatology* **58** (2013).
- 233 Christoph Sarrazin, T. Z., Thomas Berg, Ulf Peter Neumann, Peter Schirmacher, Hartmut Schmidt, Ulrich Spengler, Jörg Timm, Heiner Wedemeyer, Stefan Wirth, Stefan Zeuzem. S3-Leitlinie „Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus (HCV) -Infektion“. *Zeitschrift für Gastroenterologie* **56**, 756-838 (2004).
- 234 Sciences, G. *Epclusa: EPAR-Product Information*, <https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/epclusa-epar-product-information_en.pdf> (28.07.2016).
- 235 Scott, G. M., Ng, H. L., Morton, C. J., Parker, M. W. & Rawlinson, W. D. Murine cytomegalovirus resistant to antivirals has genetic correlates with human cytomegalovirus. *The Journal of general virology* **86**, 2141-2151, doi:10.1099/vir.0.80910-0 (2005).
- 236 Wagner, M. *et al.* Comparison between human cytomegalovirus pUL97 and murine cytomegalovirus (MCMV) pM97 expressed by MCMV and vaccinia virus: pM97 does not confer ganciclovir sensitivity. *Journal of virology* **74**, 10729-10736 (2000).
- 237 Maul, G. G. & Negorev, D. Differences between mouse and human cytomegalovirus interactions with their respective hosts at immediate early times of the replication cycle. *Medical microbiology and immunology* **197**, 241-249, doi:10.1007/s00430-008-0078-1 (2008).
- 238 Murray, C. L., Jones, C. T. & Rice, C. M. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nature reviews. Microbiology* **6**, 699-708, doi:10.1038/nrmicro1928 (2008).
- 239 Yap, T. L. *et al.* Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *Journal of virology* **81**, 4753-4765, doi:10.1128/jvi.02283-06 (2007).
- 240 Reed, K. E., Gorbalenya, A. E. & Rice, C. M. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *Journal of virology* **72**, 6199-6206, doi:10.1128/jvi.72.7.6199-6206.1998 (1998).
- 241 Sciences, G. *Harvoni : EPAR - Product Information*, <https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/harvoni-epar-product-information_de.pdf> (4.12.2014).
- 242 Xu, H. T. *et al.* Evaluation of Sofosbuvir (beta-D-2'-deoxy-2'-alpha-fluoro-2'-beta-C-methyluridine) as an inhibitor of Dengue virus replication(). *Scientific reports* **7**, 6345, doi:10.1038/s41598-017-06612-2 (2017).
- 243 Ferreira, A. C. *et al.* Beyond Members of the Flaviviridae Family, Sofosbuvir Also Inhibits Chikungunya Virus Replication. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **63**, doi:10.1128/aac.01389-18 (2019).
- 244 Phakaratsakul, S., Sirihongthong, T., Boonarkart, C., Suptawiwat, O. & Auewarakul, P. Genome polarity of RNA viruses reflects the different evolutionary pressures shaping codon usage. *Archives of virology* **163**, 2883-2888, doi:10.1007/s00705-018-3930-7 (2018).

- 245 Lisco, A. *et al.* Acyclovir is activated into a HIV-1 reverse transcriptase inhibitor in herpesvirus-infected human tissues. *Cell host & microbe* **4**, 260-270, doi:10.1016/j.chom.2008.07.008 (2008).
- 246 McMahon, M. A. *et al.* The antiherpetic drug acyclovir inhibits HIV replication and selects the V75I reverse transcriptase multidrug resistance mutation. *The Journal of biological chemistry* **283**, 31289-31293, doi:10.1074/jbc.C800188200 (2008).
- 247 Vanpouille, C. *et al.* Exploiting the anti-HIV-1 activity of acyclovir: suppression of primary and drug-resistant HIV isolates and potentiation of the activity by ribavirin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**, 2604-2611, doi:10.1128/aac.05986-11 (2012).
- 248 Delory, T. *et al.* Foscarnet, zidovudine and dolutegravir combination efficacy and tolerability for late stage HIV salvage therapy: A case-series experience. *Journal of medical virology* **88**, 1204-1210, doi:10.1002/jmv.24442 (2016).
- 249 Garvey, L., Thomson, E. C. & Taylor, G. P. Progressive multifocal leukoencephalopathy: prolonged survival in patients treated with protease inhibitors and cidofovir: a case series. *AIDS (London, England)* **20**, 791-793, doi:10.1097/01.aids.0000216390.83351.87 (2006).
- 250 Roberts, M. T., Carmichael, A. & Lever, A. M. Prolonged survival in AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy following anti-retroviral therapy and cidofovir. *International journal of antimicrobial agents* **21**, 347-349 (2003).
- 251 De Clercq, E. Anti-HIV drugs. *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van Belgie* **69**, 81-104 (2007).

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

ABC-	Abacavir	eGFP-	„enhanced green fluorescent protein“
ACV-	Aciclovir		
AIDS-	akquiriertes Immun- Defizienz-Syndrom	ELB-	Elbasvir
		FKS-	„fetal calf serum“
ATV-	Trypsin	FOS-	Foscarnet
AZT-	Zidovudin	Gag-pol- -	Gruppenspezifisches- Protein
bzw.-	beziehungsweise		Antigen-Polymerase Vorläuferprotein
CaCl ₂ -	Kalziumchlorid	GCV-	Ganciclovir
CCR-5-	CC-Motiv-Chemokin- Rezeptor 5	GFP-	„green fluorescent protein“
CD ⁴⁺ -	„cluster of differentiation 4 positive“	gp-	Glycoprotein
CDV-	Cidofovir	GRV-	Grazoprevir
CHIKV-	Chikungunyavirus	HAART-	hochaktive antiretrovirale Therapie
CO ₂ -	Kohlenstoffdioxid	HBV-	Hepatitis-B-Virus
CXCR-4-	CXC-Motiv- Chemokinrezeptor 4	hCMV-	humanes Zytomegalievirus
DCV-	Daclatasvir	HCV-	Hepatitis-C-Virus
DENV-	Denguevirus	HIV-1-	humanes Immundefizienz-Virus
DENV-2-	Denguevirus Serogruppe-2	H ₂ O-	Wasser (Hydrogenoxid)
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium	HSV-	Herpes-Simplex-Virus
DMSO-	Dimethylsulfoxid	IC-50-	mittlere inhibitorische Konzentration
DNA-	„desoxyribonucleinacid“	K ₃ [Fe(CN) ₆]-	Kaliumhexacyano- ferrat(3)
DSV-	Dasabuvir	K ₄ [Fe(CN) ₆]-	Kaliumhexacyano- ferrat(2)
EC50-	mittlere effektive Konzentration		

KCl-	Kaliumchlorid	PCR-	„polymerase chain reaction“
KH ₂ PO ₄ -	Kaliumhydrogenphosphat	RKI-	Robert-Koch-Institut
LDV-	Ledipasvir	RNA-	„ribonucleicacid“
mCMV-	maus Zytomegalievirus	rpm-	„rounds per minute“
MEM-	Minimum Essential Medium	RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
MgCl ₂ -	Magnesiumchlorid	RSV-	Respiratorisches Synzytial-Virus
MgSO ₄ -	Magnesiumsulfat	RTqPCR-	„realtime polymerase chain reaction“
MTS-	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-tetrazoliumbromid	SLAM-	„signaling lymphocyte activation molecule“
NaCl-	Natriumchlorid	SMV-	Simeprevir
Na ₂ -EDTA-	Ethylendiamintetraacetat Natriumkomplexiert	SOF-	Sofosbuvir
Na ₂ HPO ₄ -	Dinatriumhydrogenphosphat	(+)ss-RNA-	„single-stranded ribonucleicacid with positive orientation“
NNRTI-	nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren	T-705-	Favipiravir
NRTI-	nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren	TDF-	Tenofovir
nt-	Nucleotide	T-Zellen-	Thymus Lymphozyten
NS3/4A-	„non-structural 3/4A Serinprotease“	UL-97-Gen-	„unique long-97“ Gen
NS5A-	„non-structural 5A protein“	UNAIDS-	„Joint United Nations Programme on HIV/AIDS“
NS5B-	„non-structural 5B Protein“	USA-	„United States of America“
OD-	optische Dichte	VEL-	Velpatasvir
PBS-	„phosphate buffered saline“	VZV-	Varizella-Zoster-Virus
		WHO-	„World Health Organisation“

X-Gal-	5-Brom-4-chlor-3- indoxyl- β -D- galactosid
3TC-	Lamivudin

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einstellungen der genutzten PCR Programme. Die Einstellungen wurden aus dem „Protocol for use with LightCycler 480 Multiwell Plate 96, Version 08“ (Roche, Deutschland) übernommen.	14
Abbildung 2: DCV, DSV und SMV haben einen zytopathischen Effekt. BHK21 Zellen wurden mit den Substanzen 4 d inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD ₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO	22
Abbildung 3: Schema der Analyse von egfp-kodierendem HSV-1 und mCMV. Zellen wurden mit den Substanzen und den jeweiligen Viren 4 d inkubiert. Anschließend wurden neue Zellen mit den zentrifugierten Überständen infiziert und 2 Tage inkubiert. Zuletzt wurden die grün fluoreszierenden Zellen mittels „Perkin Elmer Plate Reader Ensight“ gezählt.....	23
Abbildung 4: TDF (A.) sowie ABC (B.), AZT und ELB (C.) senken die HSV-1 Infektiosität. BHK21 Zellen wurden mit den Substanzen und HSV-1 4 d inkubiert. Mit den Viren im zentrifugierten Überstand wurden neue Zellen infiziert und nach 48 h Inkubationszeit die fluoreszierenden Zellen gezählt. Der Versuchsaufbau ist schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Negativkontrolle: DMSO (A., C.); H ₂ O (B.) Positivkontrolle (C.): ACV	24
Abbildung 5: DCV, DSV und SMV haben einen zytopathischen Effekt auf NIH-3T3 Zellen. NIH-3T3 Zellen wurden mit den Substanzen 4 d inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD ₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO	25
Abbildung 6: TDF und VEL (A.) sowie ABC (B.) senken die mCMV Infektiosität. NIH-3T3 Zellen (A., B.) und BHK21 Zellen (C.) wurden mit den Substanzen und mCMV (A., B.) bzw. HSV-1 (C.) 4 d inkubiert. Anschließend wurden neue Zellen mit den freigesetzten Viren im Überstand infiziert und 48 h inkubiert. Der Versuchsaufbau ist schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Negativkontrolle: DMSO	26
Abbildung 7 : TDF und GCV beeinflussen nicht die Zellviabilität von MRC-5 Zellen. MRC-5 Zellen wurden mit den Substanzen 4 d inkubiert. Anschließend wurde die MTS-	

Lösung dazugegeben und die OD₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO 28

Abbildung 8: Weder TDF oder VEL (A.) noch ABC (B.) haben einen Effekt auf die hCMV Virusreplikation. MRC-5 Zellen wurden mit den Substanzen und hCMV 7 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 5 d Gesamt-RNA gewonnen. Daraus wurde eine RTqPCR für ein spät-exprimierendes Gen ausgeführt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Negativkontrolle: DMSO (A.), H₂O (B.) 29

Abbildung 9: DCV, DSV und SMV haben einen zytopathischen Effekt auf Vero-SLAM Zellen. Vero-SLAM Zellen wurden mit den Substanzen 4 d inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO..... 30

Abbildung 10: Schema der Analysen mit Dengue-2-, Chikungunya-, Polio-, Respiratorisches Synzitial- und Parainfluenzavirus-3. Die Zellen wurden mit den Substanzen und den jeweiligen Viren inkubiert. Anschließend wurde eine RTqPCR durchgeführt mit RNA aus den zentrifugierten Überständen..... 31

Abbildung 11: ELB und LDV senken die Anzahl der DENV-2 Genomkopien. Vero-SLAM Zellen wurden mit den Substanzen und DENV-2 inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus dem Überstand gewonnen und eine RTqPCR durchgeführt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Negativkontrolle: DMSO 32

Abbildung 12: GRV und SMV beeinflussen die Zellviabilität von Vero-SLAM Zellen. Vero-SLAM Zellen wurden mit den Substanzen inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO 33

Abbildung 13: ELB und LDV (A.) sowie VEL (B.) senken nicht die Anzahl der CHIKV Genomkopien. BHK21 Zellen wurden mit den Substanzen und CHIKV inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus dem Überstand gewonnen und eine RTqPCR durchgeführt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Negativkontrolle: DMSO..... 34

Abbildung 14: Kein Einfluss der Substanzen auf Infektiosität von Poliovirus. Vero-SLAM Zellen wurden mit den Substanzen und Poliovirus inkubiert. Nach 48 h wurden mit dem zentrifugierten Überstand neue Vero-SLAM Zellen infiziert, nach MTS-Lösung dazugegeben und die OD₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO 36

Abbildung 15: VEL (A.), ELB, 3TC und LDV (B.) senken nicht die Anzahl der Poliovirus Genomkopien. Vero-SLAM Zellen wurden mit den Substanzen und Poliovirus inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus dem Überstand gewonnen und eine RTqPCR durchgeführt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Negativkontrolle: DMSO..... 37

Abbildung 16: DCV, DSV und SMV haben einen zytopathischen Effekt auf MT-4 Zellen. MT-4 Zellen wurden mit den Substanzen inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO 38

Abbildung 17: GRV senkt die Infektiosität von HIV-1. MT-4 Zellen wurden mit den Substanzen und dem Virus inkubiert. 24 h später wurden TZM-bl Zellen mit dem zentrifugierten Überstand infiziert. Eine X-Gal Färbung wurde durchgeführt und die blau gefärbten Zellen als Korrelat für die infizierten Zellen gezählt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von drei Werten. Negativkontrolle: DMSO 39

Abbildung 18: DCV, DSV und SMV haben einen zytopathischen Effekt auf HepG2 Zellen. HepG2 Zellen wurden mit den Substanzen inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO 40

Abbildung 19: DCV, DSV und SMV haben einen zytopathischen Effekt auf LLC-MK2 Zellen. LLC-MK2 Zellen wurden mit den Substanzen inkubiert. Anschließend wurde die MTS-Lösung dazugegeben und die OD₄₉₀ nach 1 h bestimmt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Balken geben die relative Zellviabilität und die Fehlerbalken den Standardfehler an. Referenzwert: DMSO 41

Abbildung 20: DCV und DSV senken die Anzahl der RSV Genomkopien. HepG2 Zellen wurden mit den Substanzen und RSV inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus dem Überstand gewonnen und eine RTqPCR durchgeführt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.
Negativkontrolle: DMSO 42

Abbildung 21: GCV, GRV und LDV senken nicht die Anzahl der Parainfluenzavirus-3 Genomkopien. LLC-MK2 Zellen wurden mit den Substanzen und Parainfluenzavirus-3 inkubiert. Anschließend wurde die RNA aus dem Überstand gewonnen und eine RTqPCR durchgeführt. Der Versuchsaufbau wird schematisch über dem Diagramm gezeigt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.
Negativkontrolle: DMSO 43

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Therapie, Impfungen und Medikamenten gegen virale Infektionen	11
---	-----------

IV. Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt PD. Dr. rer. nat. J. Bodem, der als Doktorvater meine Arbeit unterstütz und sie somit möglich gemacht hat. Vor allem aber auch für seine intensive Betreuung und sein Vertrauen in mich während des gesamten Arbeitsprozesses. Des Weiteren möchte ich Herrn Abgeordneten Prof. Dr. med. A. Ullmann, Leiter der Infektiologie Würzburg, für seine Unterstützung als Zweitbetreuer danken. Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. med. L. Dölken, Leiter des Instituts für Virologie und Immunbiologie Würzburg, sowie seinen Mitarbeitern für die Unterstützung während der Laborarbeit. Mein besonderer Dank gilt K. Wifling für ihre Hilfe und Geduld im Labor.

Für die Bereitstellung der Viren danke ich herzlich Prof. Dr. J. Schneider-Schaulies, sowie Dr. B. Weißbricht aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg. Weiterhin möchte ich mich ausdrücklich für die Zurverfügungstellung der Medikamente bei Herrn Prof. Dr. med. H. Klinker bedanken, durch welche diese Arbeit möglich wurde.

V. Lebenslauf

VI. Kongressteilnahme

29th Annual Meeting of the Society for Virology

Postervorstellung: „Effectivness of off-label used antiviral substances“

Autoren: P. Langsch, K. Wifling, and J. Bodem