

Aus dem Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jörg Timm

**Einsatz und Weiterentwicklung molekulargenetischer
diagnostischer Verfahren sowie deren Bedeutung für den
Krankheitsverlauf und Therapieerfolg von HIV-1 und SARS-CoV-2
Infektionen**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Virologie
des Fachbereichs Medizin der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Nadine Lübke
2022

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	2
2	Abkürzungsverzeichnis	3
3	Zusammenfassung	5
4	Einleitung	7
4.1	Evolution von Virusvarianten	7
4.2	Humanes Immundefizienz Virus-1 (HIV-1)	7
4.2.1	Infektion, klinische Symptomatik und Krankheitsverlauf	9
4.2.2	Antiretrovirale Therapie (ART)	9
4.2.3	HIV-Resistenztestung	12
4.3	Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)	14
4.3.1	Variants of Concern (VOCs)	14
4.3.2	Surveillance von Immun-Escape Varianten	15
4.3.3	Infektion, Klinische Symptomatik und Krankheitsverlauf der SARS-CoV-2 Infektion	15
4.3.4	Antivirale Therapie	16
5	Ziele der vorgelegten Arbeiten	18
6	Eigene Untersuchungen und Ergebnisse	19
6.1	Weiterentwicklung von genotypischen und phänotypischen Resistenzanalysen für HIV-1	19
6.1.1	Analyse der Baseline Resistenz von HIV-1 non-B Subtypen gegenüber dem Integrase Inhibitor Raltegravir	19
6.1.2	Entwicklung eines phänotypischen Resistenztests für HIV-1 Integrase Inhibitoren	22
6.1.3	Untersuchung der HIV-1 Resistenzinformation der archivierten Proviren im Vergleich zur viralen RNA	24
6.2	Evolution von Virusvarianten im Kontext von Medikamentenresistenz und Immunescape	27
6.2.1	Evolution resistenter HIV-1 Virusvarianten unter Selektionsdruck durch Integrase Inhibitoren	27
6.2.2	Therapieversagen einer Dolutegravir-haltigen Erstlinientherapie unter Selektion von resistenten Virusvarianten	31
6.2.3	Evolution von SARS-CoV-2 Escape Varianten unter Selektionsdruck durch monoklonale Antikörper	34
7	Literaturverzeichnis	41
8	Lebenslauf	51
9	Danksagung	54
10	Eigene Veröffentlichungen	56
11	Erklärungen und eidesstattliche Versicherung	57
12	Zugrunde liegende Originalarbeiten	58

2 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ART	antiretrovirale Therapie
BIC	Bictegravir
BMI	body mass index
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
CRF	zirkulierende rekombinante Form (circulating recombinant form)
Ct	cycle-threshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRV	Darunavir
DRV/r	Ritonavir geboostertes Darunavir
DTG	Dolutegravir
EI	Entry Inhibitor
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (European Medicines Agency)
EVG	Elvitegravir
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FDC	Festdosiskombination
FTC	Emtricitabin
GRID	Gay Related Immunodeficiency Syndrome
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ID	Identifikationsnummer
INI	Integrase Inhibitor
INSTI	Integrase Strangtransfer Inhibitor
IRIS	Inflammatorisches Immunrekonstitutionssyndrom
LOD	level of detection
mAB	monoklonale Antikörper
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
ml	Milliliter
MSM	Männer, die Sexualverkehr mit Männern haben
NGS	Next-Generation Sequencing
NNRTI	nicht-nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
NRTI	nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDNA	provirale DNA
PI	Protease Inhibitor
RAL	Raltegravir
RESINA	primary drug RESistance in treatment NAive HIV-infected patients
RNA	Ribonukleinsäure
RPV	Rilpivirine
RT	Reverse Transcription
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
TDF	Tenofovir Disoproxil Fumarat
US	United States
VOC	variants of concern
VOI	variants of interest

vRNA	virale RNA
WGS	whole genome sequencing
WHO	Weltgesundheitsorganisation

3 Zusammenfassung

Die molekulare Diagnostik von HIV-1 und SARS-CoV-2 ist mittlerweile zentrale Grundlage für die Einschätzung des Krankheitsverlauf und des Therapieerfolgs bei Infektionen. Aufgrund der stetigen Veränderung dieser Viren mit der Verbreitung von neuen Varianten und der Zulassung von neuen antiviralen Wirkstoffen müssen auch molekulargenetische diagnostische Verfahren kontinuierlich weiterentwickelt werden, indem sie belastbare Entscheidungshilfen für individualisierte Therapieentscheidungen beitragen.

Die Zulassung von neuen antiretroviralen Substanzen und Substanzklassen zur Therapie der HIV-Infektion erfordert einerseits die Weiterentwicklung der phänotypischen und genotypischen Resistenzanalysen zur Abdeckung aller Therapieziele in HIV-1 und andererseits ein besseres Verständnis von der klinischen Bedeutung von Resistenzen oder Kreuzresistenzen vor Beginn einer Therapie („Baseline“-Resistenz), um ein mögliches vorzeitiges Therapieversagen zu verhindern. Die in dieser kumulativen Arbeit präsentierten Daten zur Entwicklung der genotypischen und phänotypischen Resistenzanalysen für Integrase Inhibitoren, sowie die Untersuchungen zur Baseline-Resistenz in Abhängigkeit vom HIV-1 Subtyp und zu Kreuzresistenzen für unterschiedlichen Integrase-Inhibitoren haben grundlegend zu dem aktuellen Wissen über Resistenzen in der Integrase-Region beigetragen. Mit der Zunahme und Verbesserung der antiretroviralen Substanzen in Bezug auf Nebenwirkungsprofile und die Tablettenlast besteht ein wachsendes Interesse an Therapieumstellungen. Auch vor einer geplanten Umstellung unter einer effektiven Therapie (Viruslast <50 Kopien/ml) sollte idealerweise eine Resistenzanalyse erfolgen, damit das Risiko eines Therapieversagens nach Umstellung aufgrund von Resistenzen minimiert wird. Als Alternative zur standardmäßigen Resistenztestung der viralen Plasma RNA (vRNA) kann bei geringer Viruslast die Resistenztestung anhand der proviralen DNA (pDNA) durchgeführt werden. Dabei wird nicht die freie virale Plasma RNA, sondern die zelluläre provirale DNA isoliert und analysiert. In einer Vergleichsanalyse konnte gezeigt werden, dass die Genotypisierung der pDNA möglich ist und zudem wichtige Resistenzinformationen liefert. Die Mehrheit der Resistenzmutationen wurden in beiden Kompartimenten detektiert und nur wenige Mutationen waren ausschließlich in der vRNA oder der pDNA nachweisbar. Auch wenn die Aussagekraft der proviralen Resistenzanalyse Limitationen hat, bietet sie eine Alternative, wenn Resistenzanalysen der vRNA aufgrund zu niedriger Viruslasten erfolglos sind. Die hier gezeigten Daten haben grundlegend zum Verständnis, aber auch zum Einsatz der proviralen Resistenzanalyse in der Routinediagnostik beigetragen.

Nicht nur die Sensitivität der Nachweismethoden, sondern auch die Sequenziermethoden selbst haben sich weiterentwickelt und somit neue Möglichkeiten für die Analyse von Viruspopulationen geliefert. Während noch vor wenigen Jahren die klassische Sanger Sequenzierung standardmäßig angewandt wurde, wird heute bei der Analyse von resistenten Virusvarianten bzw. von Immun-„Escape“ Varianten vorwiegend das sogenannte Next-Generation-Sequencing (NGS) durchgeführt. Diese Hochdurchsatz-Technologie ermöglicht, je nach Methode, sowohl Ganzgenomanalysen als auch eine Quantifizierung von resistenten Virusvarianten oder Escape-Varianten innerhalb einer Viruspopulation. Durch longitudinale Resistenzanalysen unter versagender antiretroviraler Therapie und Einsatz von NGS zur Quantifizierung von resistenten Virusvarianten, konnten in den präsentierten Arbeiten nicht nur die charakteristischen Resistenzprofile von den Integrase-Inhibitoren Raltegravir und Dolutegravir identifiziert, sondern auch die Evolution der resistenten Virusvarianten charakterisiert werden.

Auch im Rahmen der SARS-CoV-2 Pandemie hat sich NGS für die Ganzgenom-Sequenzierung zu *Surveillance* der SARS-CoV-2 Varianten etabliert. Da sich einzelne Virusvarianten, die sogenannten *Variants of Concern* (VOCs) der Schutzwirkung der Impfung entziehen können, und auch spezifische Personengruppen mit einem Risiko von schweren COVID-19 Verläufen keinen ausreichenden Impfschutz aufbauen können, werden zur Behandlung einer SARS-CoV-2 Infektion auch antivirale Therapien eingesetzt. Dabei haben sich monoklonale Antikörper (mAb) als effektive Behandlungsmöglichkeit herausgestellt. In den hier präsentierten Arbeiten zur Evolution von SARS-CoV-2 Varianten unter Selektionsdruck durch mAbs konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von COVID-19 mit einer mAb-Monotherapie bei immunsupprimierten Personen in einem erheblichen Anteil zu einer Selektion von Immun-„Escape“-Varianten führte. Dabei wurden nicht nur die spezifischen Mutationsprofile verschiedener mAb identifiziert, sondern durch longitudinale Analysen auch die differentielle Entwicklung von Escape-Mutationen in Abhängigkeit von der SARS-CoV-2 Variante charakterisiert.

Die in dieser Arbeit zusammengefassten Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Entwicklung und Weiterentwicklung von molekulargenetischen diagnostischen Verfahren für HIV-1 und SARS-CoV-2 Infektionen erheblich zum Verständnis der Krankheitsverläufe, aber auch zu Verbesserung der Therapieerfolge beigetragen hat.

4 Einleitung

4.1 Evolution von Virusvarianten

Die Vertreter der verschiedenen Virusfamilien unterscheiden sich in ihrer Replikationsstrategie und damit auch in der Mutationsrate und Evolution unter verschiedenen Replikationsbedingungen. Im Gegensatz zu DNA-Viren verwenden RNA-Viren in der Regel bei der Replikation ihres Genoms eine virale RNA-abhängigen RNA-Polymerasen (RdRp). Diese RdRp haben keine Korrekturleseaktivität und sind daher nicht in der Lage, Fehler während der Replikation zu korrigieren, was zu höheren Mutationsraten führt. Bei den meisten RNA-Viren findet man deshalb mit einer Frequenz von 10^{-6} bis 10^{-4} Substitutionen pro Nukleotidposition deutlich mehr „falsch eingebaute“ Nukleotide als bei DNA-Viren mit einer Mutationsrate von 10^{-8} bis 10^{-6} Substitutionen pro Nukleotidposition pro Vermehrungszyklus [1]. Tatsächlich sind daher in einer Infektion nicht alle Viren genetisch identisch, sondern es handelt sich um eine Population sehr nahe verwandter Viren. Diese Viruspopulation innerhalb desselben Wirtes wird als sogenannte Quasispezies bezeichnet [2]. Die Diversität und Komplexität der Quasispezies und die Selektion verschiedener Virusvarianten wird durch die Reaktion des Immunsystems, aber auch z.B. durch den Selektionsdruck antiviraler Medikamente beeinflusst.

4.2 Humanes Immundefizienz Virus-1 (HIV-1)

Im Jahr 1981 meldeten die United States Centers for Disease Control and Prevention (US CDC) das scheinbar plötzliche Auftreten einer tödlichen Infektionskrankheit unter homosexuellen Männern und Drogenkonsumenten. Diese neue Krankheit verursachte eine Schwächung des Immunsystems der Patienten, die z.B. zu Kaposi-Sarkomen, opportunistischen Infektionen wie *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonien oder auch Lymphomen und schließlich zum Tod führte. Da die Krankheit zunächst hauptsächlich bei männlichen Homosexuellen festgestellt wurde, nannte man sie zunächst "Gay Related Immunodeficiency Syndrome" (GRID). Im Jahr 1983 isolierten Luc Montagnier und andere Mitarbeiter des „Institut Pasteur“ in Frankreich ein Retrovirus aus dem Lymphknoten eines Lymphompatienten, welches später als Humanes Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) identifiziert wurde [3-6].

Das HI-Virus ist ein Lentivirus aus der Familie der Retroviridae. Ihre Infektion ist charakterisiert durch einen chronischen Verlauf mit persistierender Virämie und langer Latenzzeit bis zum Auftreten von klinischen Symptomen. Die ca. 100nm großen Viruspartikel sind von einer Lipoproteinhülle umgeben, in die Glykoproteinkomplexe eingebettet sind. Der Glykoproteinkomplex aus gp120 und gp41 spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung an Zellen, die den CD4 Rezeptor tragen, unter Beteiligung der zellulären Korezeptoren CXCR4 und CCR5. Nach Bindung an eine Zelle und Membranfusion wird das virale Nukleokapsid mit dem RNA-Genom aufgenommen. Es kodiert für insgesamt 9 Gene, darunter sind die Strukturgene *pol*, *env* und *gag*, sowie regulatorische Gene. Auf dem *pol*-Gen sind die viralen Enzyme kodiert: die reverse Transkriptase, die Protease und die Integrase. In der Wirtszelle muss das virale RNA-Genom zunächst durch die reverse Transkriptase in provirale DNA umgeschrieben werden, die dann durch das Enzym Integrase in das Genom der Wirtszelle integriert wird. Diese Integration der proviralen DNA ist irreversibel und führt daher zu einer chronischen Infektion. Nach der Transkription wird die virale RNA im Zytoplasma translatiert und das virale Genom, sowie die viralen Proteine werden über ein *Assembly* zusammengefügt woraufhin das *Budding*, die Knospung der Viruspartikel durch die Plasmamembran der Zelle, erfolgen kann. Nach der Abknospung der noch unreifen Virionen müssen zum Teil Vorläuferproteine zunächst noch durch die virale Protease in funktionell aktive

Proteine gespalten werden. Durch diesen Prozess der Maturation (Reifung) entstehen schließlich neue infektiöse Viruspartikel (Abbildung 1) [7].

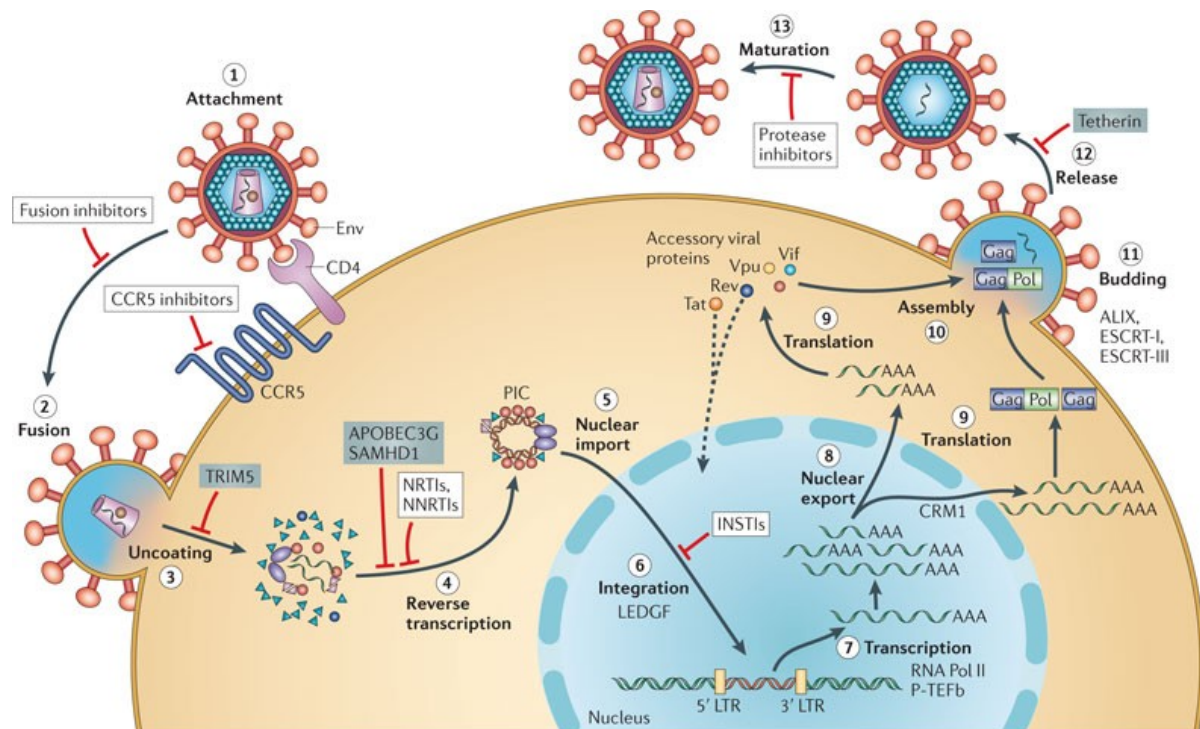


Abbildung 1: Replikationszyklus von HIV und Angriffspunkte antiretroviraler Medikamente.

Bindung an den CD4-Rezeptor und den Co-Rezeptor (1), Fusion des Virus mit der Zellmembran (2), Freisetzung des Virus-Kapsids ins Zytoplasma (3), Reverse Transkription der einzelsträngigen RNA in doppelsträngige provirale DNA (4), Prozessierung des Provirus im Präintegrationskomplex (PIC) durch die virale Integrase und Transport in den Zellkern (5), Integration ins Wirts-Genom (6), Transkription des Provirus (7), Export ins Cytoplasma (8), Translation (9): mRNA entweder als Matrize für die Translation oder als RNA-Virus-Genom für neue Virus-Partikel, Assemblierung von viralen und zellulären Proteinen (10), Freisetzung der Viruspartikel durch Knospung (11,12), Reifung der Virus-Partikel durch Spaltung der Vorläufer-Polypeptide durch die virale Protease (13); [7].

Copyright: Die Verwendung des Bildmaterials aus dieser Veröffentlichung erfolgt mit Genehmigung des Verlags Springer Nature BV. Lizenz ID: 1292737-1.

Es werden zwei Typen von HIV unterschieden, HIV-1 und HIV-2, wobei HIV-2 vor allem in Westafrika vorkommt und weltweit eine wesentlich geringere Rolle als HIV-1 spielt. HIV-1 wird wiederum in verschiedene Gruppen eingeteilt, von denen Viren der Gruppe M für die überwiegende Zahl der Infektionen weltweit verantwortlich ist. Viren der Gruppe M werden weiter in die Subtypen A bis K unterteilt, wobei die Verteilung regional sehr unterschiedlich ist. In Europa und Amerika ist der B-Subtyp vorherrschend, wohingegen in Afrika dieser Subtyp selten ist und dafür die Subtypen A und C vorherrschen, sowie rekombinante Viren mit Anteilen aus verschiedenen Subtypen [8]. Die Subtypen der Gruppe M werden für viele Fragestellungen auch vereinfacht in B und non-B Subtypen klassifiziert. Die verschiedenen Subtypen unterscheiden sich u. a. hinsichtlich Diagnostik, des klinischen Verlaufs und der Resistenzentwicklung [9, 10]. Heute sind, dank der immens erfolgreichen weltweiten Forschungsaktivitäten der vergangenen 35 Jahre, die Replikation und die Pathogenese der HIV-Infektion in weiten Teilen untersucht und beschrieben. Durch Kenntnis der molekularbiologischen Mechanismen wurde die Entwicklung einer effektiven antiretroviralen Kombinationstherapie (ART) ermöglicht.

4.2.1 Infektion, klinische Symptomatik und Krankheitsverlauf

HIV wird durch Blut und andere infektiöse Körperflüssigkeiten übertragen, vor allem durch Sperma, Vaginalsekrete und den Flüssigkeitsfilm auf der Darmschleimhaut. Der häufigste Übertragungsweg ist ungeschützter sexueller Kontakt [11]. Eine unbehandelte HIV-Infektion verläuft in der Regel in mehreren Stadien. Die Stadien der HIV-Infektion sind die akute Infektion (auch als Primärinfektion bezeichnet), die Latenzzeit oder auch chronische oder asymptomatische Infektion genannt und das Stadium AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). Die akute Infektion dauert mehrere Wochen und kann Symptome wie Fieber, Lymphknotenschwellung, Halsentzündungen, Hautausschlag, Muskelschmerzen, Unwohlsein sowie Wunden in Mund und Speiseröhre hervorrufen. Das Virus infiziert und zerstört die CD4⁺ T-Zellen (T-Helferzellen) des Immunsystems, sodass es bei einer unbehandelten HIV-Infektion zu einem kontinuierlichen Verlust der T-Helferzellen und somit zu einer Schwächung des Immunsystems kommt. In der Phase der akuten HIV-Infektion ist die Konzentration infektiöser Partikel im Blut sehr hoch, was das Risiko einer HIV-Übertragung stark erhöht. Das Latenzstadium ist mit wenigen oder keinen Symptomen verbunden und kann individuell in Abhängigkeit von viralen und Wirtsfaktoren zwischen zwei Wochen und zwanzig Jahren oder länger dauern. AIDS, das Endstadium der HIV-Infektion, ist definiert durch niedrige CD4⁺ T-Zellzahlen (weniger als 200 pro μ l Blut) und dadurch bedingte opportunistische Infektionen, Krebs und andere lebensbedrohliche Erkrankungen [12]. Durch die Behandlung einer HIV-Infektion mit einer antiretroviralen Therapie kann dieser Verlauf einer HIV-Infektion jedoch verzögert bzw. gestoppt werden.

4.2.2 Antiretrovirale Therapie (ART)

Durch die zunehmende Kenntnis der molekularbiologischen Mechanismen von HIV wurde die Entwicklung einer effektiven antiretroviralen Kombinationstherapie ermöglicht. Durch diese kann die Virusreplikation inzwischen bei fast allen Patienten nahezu vollständig unterdrückt und damit ein Fortschreiten der klinischen HIV-Erkrankung verhindert werden. Eine charakteristische Eigenschaft von HIV-1 ist der Prozess der reversen Transkription. Daher wurde zunächst eine Strategie zur Entwicklung von Medikamenten angewandt, die auf die Blockierung dieses Prozesses abzielte, und das erste HIV-1-Therapeutikum, Zidovudin (ZDV), ein nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor (NRTI), wurde 1987 entwickelt [13]. Es folgte die sukzessive Entwicklung von nicht-nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs), Protease Inhibitoren (PIs), Entry Inhibitoren (EIs) und Integrase-Strangtransfer-Inhibitoren (INSTIs) oder kurz Integrase Inhibitoren (INIs), welche jeweils unterschiedliche Prozesse im Replikationszyklus von HIV blockieren (Abbildung 1). In jüngerer Zeit wurden kontinuierliche Fortschritte in der Entwicklung von neuen HIV-Medikamenten mit einer Verbesserung der antiretroviralen Aktivität und der Nebenwirkungsprofile, sowie einer reduzierten Tablettenbelastung erzielt. Bei den aktuellen Empfehlungen zur antiretroviralen Kombinationstherapie spielen die Integrase Inhibitoren eine entscheidende Rolle.

4.2.2.1 Integrase Strangtransfer Inhibitoren (INSTI)

Die virale Integrase ist ein essenzielles Enzym für die HIV-Virusreplikation, indem es über einen 3'-Strangtransfer die Integration der proviralen DNA ins Wirtsgenom induziert [14, 15]. Die Integrase Strangtransfer Inhibitoren binden das aktive Zentrum der Integrase und blockieren damit diesen Schritt im Replikationszyklus und verhindern somit die Virusvermehrung.

Mit der Zulassung des Integrase Inhibitors Raltegravir (RAL) für eine zweimal tägliche Einnahme im Jahr 2007 war eine neue Substanzklasse zur antiretroviralen Therapie verfügbar, welche anfangs vor allem vorbehandelten HIV-Infizierten mit multiresistenten Viren eine neue Therapieoption lieferte. Eine einmal täglich zu verabreichende Formulierung wurde erst 2017 zugelassen [16]. Elvitegravir (EVG) war der zweite INSTI, der 2012 von der FDA zugelassen wurde, jedoch nur in einem einmal täglich einzunehmenden Festdosiskombinations-Tablettenregime (Fixed Dose Combination, FDC) in Kombination mit Cobicistat, Emtricitabin und Tenofoviralfenamid [17]. Beide INSTIs zeichnen sich durch eine sehr gute Verträglichkeit und eine starke antivirale Aktivität verbunden mit einem raschen Abfall der Viruslast unter Therapie aus. Dennoch haben beide Substanzen eine relativ kurze Halbwertszeit, sodass es bei unregelmäßiger Einnahme schnell zu unzureichenden Plasmaspiegeln der antiretroviralen Substanzen kommt und so eine komplette Virussuppression nicht mehr aufrechterhalten werden kann [18, 19]. Dies kann dazu führen, dass unter den replizierenden Viren resistente Virusvarianten selektiert werden, was dann schnell zu einem Viruslastanstieg und somit zu einem Therapieversagen führt. Diese Substanzen haben eine vergleichsweise niedrige Resistenzbarriere und ihr Therapieerfolg ist daher von einer antiretroviral voll aktiven Begleittherapie und von einer regelmäßigen Einnahme abhängig.

Die weitere Entwicklung neuer Integrase Strangtransfer Inhibitoren zielte daher auf eine längere Halbwertszeit der Substanzen hin, um so die Resistenzbarriere zu erhöhen und damit das Risiko für ein vorzeitiges Therapieversagen zu minimieren. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Entwicklung neuer INSTIs war, dass die neuen Substanzen möglichst ein verändertes Resistenzprofil in der Integrase-Genregion haben und somit möglichst eine geringe Kreuzresistenz zu Raltegravir und Elvitegravir aufweisen. Das würde nach einem Therapieversagen mit einer INSTI-haltigen Kombinationstherapie noch eine Folgetherapie mit neuen Integrase Inhibitoren ermöglichen. Mit der Entwicklung von Dolutegravir (DTG) und Bictegravir (BIC) ist dies gelungen. Während das Dolutegravir bereits 2013 von der EMA (European Medicines Agency) zugelassen wurde, erhielt Bictegravir als Bestandteil eines FDC-Regimes (Bictarvy) erst 2018 eine Zulassung [20, 21]. Beides sind INSTIs der zweiten Generation, welche durch eine stärkere antiretrovirale Aktivität mit einer vergleichsweise hohen Resistenzbarriere und gleichzeitig einer geringen Kreuzresistenz mit den INSTIs der ersten Generation charakterisiert sind [22, 23]. Nach den Empfehlungen der Deutsch-Österreichischen Leitlinien können sie sowohl bei der Erstlinientherapie als auch bei der Therapie von bereits vorbehandelten HIV-Infizierten eingesetzt werden [24, 25]. Der jüngste INSTI ist das Cabotegravir, welches 2020 von der EMA zur Behandlung von HIV-1 positiven Erwachsenen zugelassen wurde. Cabotegravir ist die erste antiretrovirale Substanz, die nicht nur als Filmtablette, sondern auch als langwirksames (*long-acting*) Produkt formuliert ist und intramuskulär in Kombination mit Rilpivirin, einem NNRTI, als langwirksame Injektionssuspension verabreicht wird [26]. Im Gegensatz zu Dolutegravir und Bictegravir wird die Behandlung mit Cabotegravir ausschließlich bei HIV-1-infizierten Erwachsene angewendet, die auf einem stabilen antiretroviralen Regime virologisch supprimiert sind (HIV-1-RNA < 50 Kopien/ml) ohne gegenwärtige oder historisch dokumentierte Resistenzen gegenüber der NNRTI- oder INSTI-Klasse und ohne virologisches Versagen gegenüber INSTIs in der Vergangenheit [27]. Demnach kann Cabotegravir nur zur Aufrechterhaltung eines stabilen antiretroviralen Regimes eingesetzt werden.

4.2.2.2 HIV-Resistenz

HIV-Arzneimittelresistenz entsteht, durch die Selektion von Virusvariante mit einer verminderten Wirksamkeit der antiretroviralen Therapie. Mit ART kann eine HIV-Infektion erfolgreich behandelt werden, aber eine Reihe von Faktoren können dazu beitragen, dass das Virus mutiert und resistent wird, was schließlich zu einem Anstieg der Viruslast verbunden mit der Notwendigkeit zur Umstellung der ART führt. Im Falle von HIV sind seit 1989 Fälle von behandlungsresistenten Stämmen bekannt, wobei die Medikamentenresistenz eine der Hauptursachen für das Scheitern der Behandlung im Sinne eines Therapieversagens ist [28]. Die weltweite Inzidenz von Resistenzen ist zwar regional sehr unterschiedlich, doch ist insgesamt eine Zunahme der HIV-Medikamentenresistenz zu verzeichnen [29]. Die beiden Hauptarten der Resistenz sind die Primärresistenz (übertragen resistente Virusvarianten) und die Therapie-assoziierte (selektierte resistente Virusvarianten) Resistenz. Sie unterscheiden sich vor allem in der Ursache, wobei die häufigste Ursache für Therapie-assoziierte Resistenzen die unregelmäßige Einnahme der antiretroviralen Substanzen ist. Bei subtherapeutischen Wirkstoffspiegeln der antiretroviralen Medikamente können resistente Virusvarianten selektiert und ggf. weiterübertragen werden. Diese neu entstandenen resistenten HIV-Stämme stellen ein Problem für die öffentliche Gesundheit dar, da sie eine wachsende Zahl von Menschen infizieren, und so auch auf andere Personen übertragen werden können [30], und dann auch als übertragene Resistenzen (*TDR, transmitted drug resistance*) bezeichnet werden. Diese Menschen sind dann mit bereits resistenten HIV-Virusvarianten infiziert, obwohl sie noch nie eine ART eingenommen haben, und haben dadurch häufig nur noch eingeschränkte Therapieoptionen. In Deutschland und auch in anderen Ländern Europas liegt die Prävalenz von übertragenen resistenten Virusvarianten zwischen 12,8% und 17,2%, wobei jedoch innerhalb der letzten 20 Jahre rückläufige Tendenzen beobachtet wurden, was zum großen Teil auf die Verbesserung der antiretroviralen Substanzen zurückgeführt werden kann [31, 32].

Der Grad der Resistenz ist abhängig von den Eigenschaften und der Position von Mutationen oder den Mutationskombinationen, die durch die antiretroviralen Substanzen selektiert werden. Mutationen, die unter einem bestimmten Medikament selektiert werden, resultieren in der Regel in einer verminderten Wirksamkeit bis hin zu einem vollständigen Wirkungsverlust des eingesetzten Medikaments. Wird dadurch sogar ein Wirkungsverlust von mehreren oder sogar allen Substanzen einer Klasse induziert, spricht man auch von einer Kreuzresistenz, wodurch therapeutische Folgeoptionen stark limitiert sein können [33]. Die Resistenzentwicklung ist ein gradueller Prozess, wobei sich die Anzahl der Mutationen und die Zeit, die für die Selektion der Resistenzmutationen benötigt wird, zwischen den antiretroviralen Substanzen unterscheidet. Substanzen, die mit nur einzelnen oder wenigen Mutationen in einem kurzen Zeitraum eine ausgeprägte Resistenz induzieren können, haben eine niedrige Resistenzbarriere. Sind für die Selektion einer Resistenz viele Mutationen notwendig oder benötigt die Selektion der Mutationen unter einer nicht suppressiven Therapie einen langen Zeitraum, dann spricht man von Substanzen mit einer hohen Resistenzbarriere [34-36].

Wenn HIV-1 durch den Erwerb von Mutationen eine Resistenz gegen antiretrovirale Medikamente entwickelt, ist dies häufig mit einer verringerten Replikationskapazität und verminderter Pathogenität, auch virale Fitness bezeichnet, assoziiert. Die Akkumulation von Mutationen dient daher in der Regel nicht nur der Erhöhung der Resistenz gegenüber antiretroviralen Substanzen, sondern auch der Wiederherstellung der viralen Fitness [37].

4.2.3 HIV-Resistenztestung

Der Erfolg einer ART wird anhand der HIV-RNA-Konzentration im Plasma - üblicherweise bezeichnet als Viruslast - bestimmt, die durch molekularbiologische Methoden quantifiziert werden kann und als Maß für die Aktivität der Virusreplikation gilt. Damit ist die Viruslast der wichtigste Laborparameter zur Kontrolle des Therapieerfolges. Dabei ist das Therapieziel eine HIV-RNA Plasmakonzentration von <50 Kopien/ml [24]. Bei einem wiederholten Nachweis einer HIV-RNA über 50 Kopien/ml sollte ein virologisches Versagen ausgeschlossen werden, indem engmaschige Kontrollen durchgeführt werden. Ein virologisches Versagen ist bei einer HIV-RNA Plasmakonzentration >200 Kopien/ml wahrscheinlich und ist mit einem erhöhten Resistenzrisiko assoziiert [38, 39]. Daher sollte nicht nur vor Therapiestart zum Ausschluss von Primärresistenzen, sondern auch bei wiederholt erhöhten Viruslasten unter Therapie eine Resistenztestung durchgeführt werden, um eine mögliche Resistenzentwicklung frühzeitig zu identifizieren und durch eine Therapieumstellung zu unterbinden. Zur Messung der HIV-Resistenzentwicklung können zwei Methoden verwendet werden, die phänotypische und die genotypische Resistenzanalyse [40].

4.2.3.1 Phänotypische Resistenztestung

Bei einem phänotypischen Resistenztest wird die Empfindlichkeit gegenüber Medikamenten experimentell quantifiziert. Die Replikationsfähigkeit von Virusisolaten wird in der Zellkultur unter dem Selektionsdruck der einzelnen antiretroviralen Substanzen in steigenden Konzentrationen gemessen und mit der des Wildtyp-Virus verglichen. Die Medikamentenkonzentration, die benötigt wird, um in der Zellkultur die Replikation eines Virusisolats um 50% zu hemmen, wird IC_{50} (mittlere inhibitorische Konzentration) genannt. Die Empfindlichkeit wird als Quotient aus gemessener IC_{50} eines mutierten Stammes und der gemessenen IC_{50} eines Wildtyp-Referenzstammes angegeben. Zur Interpretation wird dieser Quotient, der auch Resistenzfaktor (RF) oder „Fold-change“ (FC) genannt, mit einem so genannten Cut-off Wert verglichen. Dieser gibt idealerweise an, bis zu welchem Wert der Resistenzfaktor des HIV-Isolats im Vergleich zum Wildtyp-Virus erhöht sein kann, ohne dass ein klinisch relevanter Wirkverlust besteht [41]. Die phänotypische Resistenztestung ist damit ein wichtiges Verfahren, um den Grad der Resistenz von Mutationen gegenüber neuen antiretroviralen Substanzen zu ermitteln, um so ein besseres Verständnis für die Resistenzentwicklung zu erlangen. Gleichzeitig können diese Daten zu Aktualisierung und Optimierung von HIV-Interpretationsalgorithmen genutzt werden.

4.2.3.2 Genotypische Resistenztestung

Die HIV-Resistenztestung ist eine Analyse, bei der die Empfindlichkeit des HI-Virus gegenüber antiretroviralen Medikamenten untersucht wird. Die genotypische Resistenztestung gehört mittlerweile zur Standarddiagnostik bei der Einstellung auf die erste HIV-Therapie und bei jeder folgenden Therapieumstellung. Um der Selektion von resistenten Stämmen entgegenzuwirken, werden in der klassischen antiretroviralen HIV-Therapieregulär drei Wirkstoffe miteinander kombiniert [24]. Für die Resistenzanalyse sind die verschiedenen Angriffsorte der geplanten bzw. verwendeten antiretroviralen Medikamente entscheidend, bei der die einzelnen Therapie-relevanten Genregionen von HIV amplifiziert und sequenziert werden. Die genetische Information der Reversen Transkriptase, der Protease und der Integrase (und ggf. weiterer Therapie-relevanter Genregionen) werden auf Resistenz-vermittelnde Mutationen untersucht und die Wirksamkeit der Medikamente aus den entsprechenden Klassen mit Interpretationsalgorithmen prognostiziert. Es existieren derzeit zwei

grundlegende Varianten zur Interpretation der Ergebnisse von genotypischen Resistenzanalysen, regelbasierte und modell-basierte Systeme. Regelbasierte Algorithmen beinhalten meist *in vitro* und *in vivo* Daten basierend auf Studienveröffentlichungen, Kasuistiken und Expertenwissen. Zu dem weltweit anerkanntesten Algorithmus gehört die „HIV Drug Resistance Database“ (HIVDB) der Stanford University (<https://hivdb.stanford.edu>), aber auch der deutsche Interpretationsalgorithmen HIV-Grade (<https://www.hiv-grade.de>). Bioinformatische Systeme wie beispielsweise geno2pheno (<https://www.geno2pheno.org>) hingegen stützen sich auf mathematische Modelle, die auf Geno- und Phänotyp Korrelationen basieren [34]. Da hier der phänotypische Resistenzfaktor berechnet und nicht gemessen wird, spricht man hier vom virtuellen Phänotyp.

Obwohl die genotypische Resistenztestung eine schnelle und günstige Methode zur HIV-Resistenzanalyse darstellt und daher als Standardverfahren für die Resistenzanalyse eingesetzt wird, hat die phänotypische Resistenztestung doch weiterhin einen wichtigen Stellenwert.

4.2.3.3 HIV-Sequenzanalysen

Die HIV-1-Genotypisierung wird routinemäßig durch Sequenzierung des Virus im Plasma von HIV-infizierten Personen durchgeführt. Wie bereits oben beschrieben dient die genotypische HIV-Resistenztestung nicht nur der wirksamen klinischen Versorgung von HIV-Infizierten, sondern auch der Surveillance von übertragenen resistenten Virusstämmen in der Bevölkerung. Für die Sequenzierung der HIV-Genregionen ist standardmäßig die populationsbasierte Sanger Sequenzierung empfohlen [42, 43]. Obwohl die Sanger-Sequenzierung seit langer Zeit als "Goldstandard" gilt, weist diese Technologie einige Limitationen auf. Im Gegensatz zu neueren Sequenzieretechniken, dem sogenannten Next Generation Sequencing (NGS), hat die Technik der Sanger Sequenzierung nur einen geringen Datendurchsatz und ist nur begrenzt in der Lage, Varianten in einer Quasispezies mit einer Häufigkeit von weniger als 20 % (sogenannte minore Varianten) in der HIV-1 Viruspopulation eines Patienten nachzuweisen [44, 45]. Bei der NGS-Technologie wird nicht wie bei der Sanger Sequenzierung die gesamte Viruspopulation in einer Konsensussequenz dargestellt, sondern die einzelnen Virusvarianten werden in einem hohen Durchsatz parallel sequenziert. Dadurch erreicht man nicht nur eine hohe Sensitivität, sondern zusätzlich eine Quantifizierung der einzelnen und möglicherweise resistenten Virusvarianten [46, 47]. Zudem können alle relevanten Genregionen parallel in einen Sequenzierungsansatz analysiert werden, und nicht in einzelnen Sequenzanalysen, was mit einem reduzierten Zeitaufwand und einer Kostenersparnis einhergeht [48-50]. Mittlerweile gibt es Hinweise, dass auch resistente Virusvarianten mit Prävalenzen von <20% in der Quasispezies eine klinische Relevanz für ein Therapieansprechen und somit für Therapieauswahl haben können. Daher gewinnt die ultratiefe Sequenzierung für die genotypische HIV-Resistenztestung unter Berücksichtigung von minoren Virusvarianten immer mehr an Bedeutung für die individualisierte HIV-Therapie [48, 51, 52]. Für die HIV-Resistenzanalyse zum Nachweis und zur Quantifizierung von resistenten minoren Varianten können unterschiedliche NGS-Plattformen, wie Illumina MiSeq oder Ion Torrent verwendet werden, wohingegen die Auswertung des Sequenzdaten durch die bioinformatische Pipeline bestimmt wird [53, 54]. Und obwohl es für die Analyse der HIV-1-Resistenzdaten zwischen den verschiedenen Pipelines noch keine standardisierten Strategien gibt, hat sich NGS als neuer Standard für die HIV-1 Resistenzanalyse etabliert [54].

4.3 Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

SARS-CoV-2 (Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom Coronavirus 2) wurde Anfang 2020 als Auslöser der Infektionskrankheit COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) identifiziert, welche erstmals Ende 2019 in der chinesischen Stadt Wuhan als „Lungenkrankheit unbekannter Genese“ in Erscheinung trat [55]. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) stufte COVID-19 am 30. Januar 2020 als „gesundheitliche Notlage von internationaler Tragweite“ ein und klassifizierte das Auftreten der Erkrankung auf Grund der weltweiten Ausbreitung am 11. März 2020 als Pandemie (siehe COVID-19-Pandemie) [56].

SARS-CoV-2 ist ein humanpathogenes Coronavirus, welches neben SARS-CoV, MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus), sowie die saisonalen Coronaviren HCoV-HKU1 und HCoV-OC43 zu den Betacoronaviren gehört. Während die saisonalen Coronaviren schon seit vielen Jahren weltweit endemisch verbreitet sind und überwiegend milde Erkältungskrankheiten verursachen, sind SARS-CoV, MERS-CoV und SARS-CoV-2 erst in jüngerer Vergangenheit aus tierischen Reservoirs auf den Menschen übertragen worden [57] und können zu schweren Erkrankungen mit tödlichem Verlauf führen.

Coronaviren sind membranumhüllte RNA-Viren und bilden Virionen mit einem Durchmesser von ca. 80-140 nm, die auf ihrer Oberfläche 20-25 nm lange Spike Proteine tragen [58]. Sie verfügen über ein einzelsträngiges RNA-Genom positiver Polarität von rund 30 Kilobasen Länge, das größte bekannte Genom aller RNA-Viren. Dieses kodiert für nichtstrukturelle Proteine (NsP), die für die RNA-Replikation zuständig sind, sowie für die vier Strukturproteine S, E, M und N. Die S-, E- und M- Proteine sind in die Virusmembran eingelagert, die das Nucleokapsid umhüllt, welches sich aus N-Protein (Nucleoprotein) und Virusgenom zusammensetzt [59]. Das S (Spike)-Protein ist für den Eintritt in die Wirtszelle zuständig und besteht aus zwei Untereinheiten: Die S1-Untereinheit enthält die Receptor binding domain (RBD), die an den Wirtszellrezeptor bindet; die S2-Untereinheit vermittelt danach die Fusion von Virushülle und Zellmembran. Beim Spike-Protein handelt es sich nach derzeitigem Kenntnisstand um die einzige Zielstruktur neutralisierender Antikörper [60, 61], weshalb das Spike Protein das Hauptziel bei der antiviralen Therapie mit monoklonalen Antikörpern und bei der Entwicklung von SARS-CoV-2 Impfstoffen darstellt [62-66].

4.3.1 Variants of Concern (VOCs)

Wie bereits beschrieben ist die Entstehung von Mutationen ein natürlicher Prozess bei der Replikation von RNA-Viren, was in Verbindung mit der Übertragung über längere Infektionsketten zu einer Diversifizierung der Virusvarianten führt. Dies trifft auch auf SARS-CoV-2 zu, obwohl Coronaviren mit der viralen Exonuklease nsp14 einen eigenen Korrekturlesemechanismus besitzen [67]. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens solcher Mutationen hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab, insbesondere der Fehlerrate der viralen RNA-Polymerase und der Gesamtgröße der viralen Population. Ausgehend von einem monophyletischen Ursprung wurde die genetische Diversifizierung von SARS-CoV-2 durch die explosionsartige globale Verbreitung begünstigt. Bei der genetischen Diversifizierung von SARS-CoV-2 entstehen auch Varianten, die sich in ihren Erregereigenschaften wie Übertragbarkeit, Virulenz oder Suszeptibilität gegenüber der Immunantwort unterscheiden und ggf. als sogenannte „besorgniserregende Virusvarianten“ (variants of concern, VOC) eingestuft werden. Einzelne Varianten können dabei einen Selektionsvorteil besitzen, sodass sie sich in der Bevölkerung rasch ausbreiten.

Die etablierten Nomenklatorsysteme zur Benennung und Verfolgung der genetischen Linien von SARS-CoV-2 durch GISAID (<https://gisaid.org>), Nextstrain (<https://nextstrain.org>) und Pango (<https://cov-lineages.org>) werden derzeit von Wissenschaftlern und in der wissenschaftlichen Forschung

verwendet. Mit der Verbreitung von VOCs wurden die Varianten zunächst nach ihrem vermuteten Herkunftsland benannt. Um eine Stigmatisierung von Ländern zu vermeiden, bezeichnet die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die gemäß eigener Einstufung besorgniserregenden oder beobachtungsbedürftigen Varianten (variants of interest, VOI) des Coronavirus SARS-CoV-2 seit dem 31. Mai 2021 mit Buchstaben aus dem griechischen Alphabet. Nach diesem Schema heißt die zuerst in Großbritannien nachgewiesene Virusvariante B.1.1.7 nun Alpha und die in Südafrika entdeckte B.1.351 nun Beta. Die Untervarianten B.1.617.1 und B.1.617.2 der erstmals in Indien nachgewiesenen Virusvariante B.1.617 werden von der WHO mit Kappa und Delta bezeichnet. Die vormals „brasilianische Variante“ genannte Virusvariante P.1 (B.1.1.28.1) erhielt die Bezeichnung Gamma. Die seit November 2021 zirkulierende VOC ist die Omicron Variante, aus der sich im Verlauf der Pandemie die Untervarianten BA.1- BA.5 entwickelt haben, hat die zuvor in Europa dominierende Delta-Variante verdrängt. Diese Variante zeichnet sich durch rund 30 Aminosäureveränderungen im Spikeprotein aus. Davon befinden sich 15 Substitution in der Region des Proteins, die an den ACE2-Rezeptor auf der menschlichen Zelle bindet, der Rezeptorbindedomäne. Diese Substitutionen erhöhen die Übertragungsrate von SARS-CoV-2 und sind zudem mit einer Immunevasion assoziiert [68, 69]. Aufgrund der weltweit zunehmenden Populationsimmunität durch Impfungen und Infektionen steigt der Immunselektionsdruck auf das Virus. Es ist davon auszugehen, dass dies die Mutationsrate im Spike-Gen beschleunigt, was in erweiterten immunesvasiven Eigenschaften resultieren kann. Das Spike-Rezeptorbindeprotein von SARS-CoV-2 weist eine sehr hohe strukturelle Plastizität auf, was die Entstehung von Varianten, welche durch das Immunsystem nur noch erschwert erkannt werden, sogenannte „Escape-Varianten“, begünstigt [70]. Ein Immun-Escape ist mit einem erhöhten Risiko von Reinfektionen oder Durchbruchinfektionen nach Impfung verbunden, was nicht mit einer erhöhten Erkrankungsschwere gleichbedeutend ist [71, 72].

4.3.2 Surveillance von Immun-Escape Varianten

Um das Auftreten und die Verbreitung von VOCs zu überwachen hat sich die Technik der Genomsequenzierung etabliert. Gemäß der Corona-Surveillanceverordnung (CorSurV) des Bundesministeriums für Gesundheit erfolgt für eine Auswahl der in Deutschland nachgewiesenen SARS-CoV-2-Viren eine molekulare Sequenzierung. Diese Auswahl der Proben erfolgt durch das untersuchende Labor zufällig, um einen möglichst ungefilterten Überblick über die Verbreitung der Virusvarianten zu erhalten.

Bereits zu Beginn der Pandemie wurden verschiedene Protokolle für eine NGS-basierte SARS-CoV-2 Ganzgenomsequenzierung (whole genome sequencing, WGS) entwickelt [73, 74]. Im Verlauf hat sich das Amplikon-Sequenzierungsprotokoll aus dem ARTIC-Netzwerk verbreitet und ist mittlerweile in vielen Laboren in der Routinediagnostik für SARS-CoV-2 implementiert [75]. Die im ARTIC-Protokoll verwendeten Primer wurden mit Veränderung der Virusvarianten sukzessive angepasst, sodass auch neue Virusvarianten detektiert werden [76, 77].

4.3.3 Infektion, Klinische Symptomatik und Krankheitsverlauf der SARS-CoV-2 Infektion

Die Übertragung einer SARS-CoV-2 Infektion erfolgt, wie auch bei anderen respiratorischen Erregern, über die Aufnahme virushaltiger Flüssigkeitspartikel über die Schleimhäute der Atemwege [78]. Die Infektionsquelle sind infizierte Personen, die das Virus über Atmen, Husten, Sprechen oder Niesen ausscheiden. Das hohe Infektionsrisiko für SARS-CoV-2 ist dadurch bedingt, dass Infektionen auch von asymptomatischen Trägern bzw. bereits in der präsymptomatischen Phase etwa 1-2 Tage vor

Symptombeginn übertragen werden können. Nach aktueller Datenlage geht bei leichter bis moderater Erkrankung bei immunkompetenten Menschen die Kontagiosität zehn Tage nach Symptombeginn deutlich zurück. Bei schweren Verläufen und immunsupprimierten Patienten werden auch erheblich längere Infektionszeiträume beobachtet [79, 80].

Die Inkubationszeit beträgt durchschnittlich 5-6 Tagen wobei sie in Abhängigkeit von der Virusvariante auch kürzer sein kann; bei Omikron beträgt die Inkubationszeit lediglich 3 Tage. Zu den häufigsten erfassten Symptomen zählen Husten, Fieber, Schnupfen, sowie Geruchs- und Geschmacksverlust. Der Krankheitsverlauf variiert stark in Symptomatik und Schwere, es können symptomlose Infektionen bis hin zu schweren Pneumonien mit Lungenversagen und Tod auftreten. Dabei verlaufen jedoch 80% der COVID-19 Erkrankungen mild bis moderat und nur in etwa 15% der Erkrankten kommt es zu einer Verschlechterung des Gesundheitszustands [81].

Das Risiko eines schweren COVID-19 Verlaufs ist von verschiedenen Prädiktoren abhängig. Neben dem Alter (>50 Jahre) und dem männlichen Geschlecht erhöhen auch verschiedene Vorerkrankungen wie Adipositas (BMI >35), Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen, chronische Lungen- und Lebererkrankungen sowie chronische Nierenerkrankungen das Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf. Auch bei Vorliegen einer angeborenen oder erworbenen Immunschwäche, wie medikamentöser Immunsuppression nach Organ- oder Stammzelltransplantation oder eine HIV-Infektion, muss mit Komplikationen gerechnet werden [78]. In Abhängigkeit von den Risikofaktoren für einen schweren Verlauf von COVID-19 und dem Zeitpunkt des Symptombeginns wird daher in der Frühphase einer SARS-CoV-2 Infektion neben einer anti-inflammatorischen Therapie auch eine antivirale Therapie empfohlen [82].

4.3.4 Antivirale Therapie

Als antivirale Therapeutika stehen unterschiedliche Virostatika sowie neutralisierende monoklonale Antikörper (mABs) zur Verfügung. Während Virostatika (Polymerase- und Proteaseinhibitoren) in den viralen Replikationszyklus eingreifen und die Virusreplikation hemmen, verhindern neutralisierende mABs die Virusaufnahme in die Zelle. Zu den aktuell empfohlenen Virostatika gehören der Protease-Inhibitor Nirmatrelvir/Ritonavir (N/r, Paxlovid™) und die Inhibitoren der viralen RNA-anhängigen RNA-Polymerase (RdRp) Remdesivir (RDV, Veklury®) und Molnupiravir (MPV, Lagerio®). Für alle drei Virostatika wurde die Wirksamkeit gegen SARS-CoV-2 in klinischen Studien bewiesen [83-87]. Ihre Wirksamkeit gegen die Omicron Variante konnte zumindest durch *in vitro* Analysen belegt werden [88, 89].

4.3.4.1 Monoklonale Antikörper und Immun-Escape

SARS-CoV-2 neutralisierende monoklonale Antikörper sind gegen unterschiedliche Epitope an den Rezeptorbindedomänen des viralen Spike-Proteins gerichtet, wodurch sie eine antivirale Wirksamkeit zeigen. Mit dem Ziel der Virusneutralisierung sollen sie frühzeitig nach Infektion oder bereits als Prophylaxe angewendet werden. In klinischen Studien wurden mittlerweile verschiedene monoklonale Antikörper untersucht und zur Therapie in der Frühphase der Infektion oder zur Prophylaxe einer SARS-CoV-2 Infektion zugelassen [90-92]. Den bisherigen Studienergebnissen zufolge senkt der Einsatz von SARS-CoV-2 neutralisierenden monoklonalen Antikörpern bei früher Verabreichung bei Patienten mit hohem Risiko für einen schweren Verlauf die Erkrankungsschwere, gemessen an der Notwendigkeit zur Vorstellung in Notaufnahmen und Krankenhausaufnahmen [90, 93, 94]. Als neutralisierende monoklonale Antikörper für den Einsatz in der Frühphase der Infektion werden aktuell das Sotrovimab

(Xevudy®), ein Antikörper gegen das Spike-Protein, und Tixagevimab/Cilgavimab (Evusheld®) eine Kombination aus zwei neutralisierenden monoklonalen Antikörpern gegen das Spike-Protein mit verlängerter Halbwertszeit zur antiviralen Therapie empfohlen.

Mit zunehmender Verbreitung immunevasiver Virusvarianten hat die Wirksamkeit der therapeutisch eingesetzten SARS-CoV-2-neutralisierenden monoklonalen Antikörper jedoch abgenommen [95-97], sodass aufgrund einer reduzierten Wirksamkeit gegen Omicron VOC von einer Monotherapie abgeraten wird [92, 98-102].

5 Ziele der vorgelegten Arbeiten

In den hier zusammengeführten Arbeiten soll herausgestellt werden, dass die Entwicklung und Weiterentwicklung molekularvirologischer diagnostischer Verfahren für HIV-1 und SARS-CoV-2 Infektionen entscheidend zum Verständnis von Krankheitsverläufen, zur Optimierung von virusspezifischen Therapien und dem damit verbundenen Therapieerfolg beitragen.

Die erfolgreiche Therapie der HIV-1 Infektion ist entscheidend von der Wahl der antiretroviralen Medikamente abhängig. Ihre Wirksamkeit wird jedoch durch die schnelle Selektion von Resistenzmutationen beeinflusst. Demnach ist die HIV-1 Resistenztestung auch weiterhin eine essenzielle Voraussetzung für die Wahl einer wirksamen Kombinationstherapie mit dem Ziel einer vollständigen Suppression der Virusreplikation. Mit der Zulassung der Integrase-Inhibitoren war daher eine Weiterentwicklung der Resistenztestung erforderlich, um auch die Integrase als Angriffziel der antiretroviralen Therapie abzudecken. Ein Ziel meiner Arbeiten war neben der Etablierung der genotypischen und phänotypischen Resistenzanalysen für Integrase-Inhibitoren die Charakterisierung der INSTI Resistenzprofile, sowie die Untersuchung der Evolution von resistenten Virusvarianten unter medikamentösen Selektionsdruck.

Durch die stetige Verbesserung der Substanzen in Bezug auf die antiretrovirale Potenz und der damit einhergehenden Virussuppression, und der Nebenwirkungsprofile mit reduzierten Langzeittoxizitäten, besteht auch bei Personen mit supprimierter Viruslast und langer Therapiehistorie eine medizinische Indikation zur Therapieumstellung. Um weiterhin einem langanhaltenden Therapieerfolg zu ermöglichen, besteht ein großer Bedarf an proviralen Resistenzanalysen unter Verwendung der zellulären proviralen HIV-DNA bei supprimierter Plasma HIV-RNA und zudem sensitiveren Sequenziermethoden um auch minore resistente Virusvarianten detektieren zu können. Daher waren weitere Ziele der dargestellten Arbeiten zur Weiterentwicklung der Resistenzanalysen für Integrase Inhibitoren, die Evaluation der Resistenzanalyse anhand der zellulären proviralen HIV-DNA, sowie die Analyse der Integrase Resistenz unter Verwendung von neuen Sequenziermethoden.

Auch die Therapie der SARS-CoV-2 Infektion spielt bei bestimmten Risikogruppen wie Immunsupprimierte mit einem erhöhten Risiko von schweren COVID-19 Verläufen eine wichtige Rolle. Doch auch der Erfolg dieser Therapien wird durch verschiedene Faktoren wie die SARS-CoV-2 Variante oder die entsprechende antivirale Wirksamkeit der eingesetzten Therapien beeinflusst. Um den Einfluss dieser Faktoren auf den Therapieverlauf zu analysieren ist auch hier eine umfassende molekulare Diagnostik, sowohl zu Diagnose, aber auch zu Verlauf einer SARS-CoV-2 Infektion erforderlich. Die Selektion von Immun-Escape Varianten kann den Therapieerfolg aber auch die Therapieoptionen maßgeblich beeinflussen, sodass auch hier die Sequenzanalysen von SARS-CoV-2 wichtige Informationen für den Therapieerfolg liefern. Die hier vorgestellten Arbeiten zur Analyse der Selektion von Escape-Mutationen durch neutralisierende monoklonale Antikörper und der damit verbundenen verzögerten Viruseliminierung hatten das Ziel zu einem besseren Verständnis der Evolution und Immunevasion von SARS-CoV-2 Virusvarianten beizutragen und darüber hinaus die Entwicklung alternativer Therapiekonzepte für Risikogruppen ermöglichen.

6 Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

6.1 Weiterentwicklung von genotypischen und phänotypischen Resistenzanalysen für HIV-1

Die Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-1 Infektion empfehlen einen sofortigen Therapiestart bereits nach Diagnose [24]. In Deutschland können fast alle Menschen mit einer HIV-Infektion mit den mittlerweile über 30 verschiedenen antiretroviralen Medikamenten so gut behandelt werden, dass sie ein normales Leben führen können. Während bis Mitte der 2000er der Fokus darauf lag, die Virusreplikation stabil zu unterdrücken, liegt seitdem der Schwerpunkt auf einem geringen Nebenwirkungsprofil und auf einer einfachen Anwendbarkeit. Obwohl die neu entwickelten Substanzen i.d.R. eine hohe Potenz und somit bei kontinuierlicher Einnahme ein geringes Risiko der Resistenzentwicklung aufweisen, spielen sowohl übertragene als auch erworbene Resistenzen weiterhin eine wichtige Rolle bei der Therapieempfehlung [103]. Die Zulassung neuer Substanzen und neuer Substanzklassen erfordert daher eine stetige Weiterentwicklung von genotypischen und phänotypischen Resistenzanalysen, um alle antiretroviral-assoziierten Genbereiche von HIV-1 abzudecken und somit ein vollständiges Resistenzprofil zu erlangen.

6.1.1 Analyse der Baseline Resistenz von HIV-1 non-B Subtypen gegenüber dem Integrase Inhibitor Raltegravir

Originalarbeit: Sierra S, Lübke N, Walter H, Schüller E, Reuter S, Fätkenheuer G, Bickel M, da Silva H, Kaiser R, Esser S; SnoB-Study group. The SnoB study: frequency of baseline raltegravir resistance mutations prevalence in different non-B subtypes. *Med Microbiol Immunol*. 2011 Nov;200(4):225-32. doi: 10.1007/s00430-011-0194-1. Epub 2011 Apr 8. PMID: 21475993.

Copyright: Die Verwendung des Bildmaterials aus dieser Veröffentlichung erfolgt mit Genehmigung des Springer-Verlags Berlin/Heidelberg. Lizenz ID: 1292737-2.

Mit der Zulassung des ersten Integrase Inhibitors Raltegravir (RAL) im Jahre 2007 war nicht nur eine komplett neue Substanzklasse zur Therapie der HIV-Infektion verfügbar, sondern zusätzlich auch der Bedarf an Resistenzanalysen der HIV-1 Integrase Genregion, sowohl vor Therapiestart als auch bei Verdacht auf ein virologisches Therapieversagen. Auch wenn zu Beginn keine übertragenen Resistenzen gegenüber den INSTIs zu erwarten waren, war das Wissen über INSTI-Resistenzen zu dem Zeitpunkt nur auf *in vitro* Daten und Studiendaten limitiert. Zudem beruhen die zu dem Zeitpunkt verfügbaren Resistenzdaten vorwiegend auf Daten von HIV-1 Subtyp B Infizierten, der Anteil der HIV-1 non-B infizierten StudienteilnehmerInnen lag dabei gerade mal 13% [104]. Obwohl in Deutschland der HIV-1 Subtyp B weiterhin dominant ist, liegt der Anteil an HIV-1 non-B Infizierten jedoch mittlerweile bei über 30% mit steigender Tendenz (<https://www.rki.de/DE/Content/Institut/OrgEinheiten/Abt1/FG18/HIV-1-Subtypen.html>), sodass ein möglicher Einfluss von HIV-1 non-B Subtyp-spezifischen Polymorphismen einen relevanten Einfluss auf die Wirksamkeit von Integrase Inhibitoren und somit auf verfügbare Therapieoptionen haben könnte. Wie von HIV-2 bekannt, konnte auch eine Subtyp-abhängige natürliche Resistenz gegenüber dieser Substanzklasse derzeit nicht vollständig ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde von uns im Rahmen der SnoB (Subtype non-B)-Studie die Prävalenz von Baseline Raltegravir assoziierten Resistenzmutation bei verschiedenen HIV-1 non-B Subtypen untersucht.

Dabei wurden von insgesamt 427 Therapie-naiven HIV-1 Infizierte der RESINA Studie (primary drug RESistance in treatment NAive HIV-infected patients) die virale Plasma RNA gewonnen, welche dann für die Sequenzanalysen genutzt wurde. Die IN-Genregion wurde amplifiziert, sequenziert und mithilfe von Subtypisierungstools subtypisiert. Daraufhin wurden die Integrase Sequenzen auf Subtyp-spezifische Polymorphismen hin analysiert. Insgesamt konnten 359/427 Proben erfolgreich sequenziert werden. Dabei wurden 170 Proben (47,4%) als HIV-1 non-B-Subtypen klassifiziert (Abbildung 2). Der häufigste non-B Subtyp war die zirkulierende rekombinante Form (CRF) 02_AG mit 26,5 %, gefolgt vom A-Subtyp mit 25,3 %. Der Subtyp C wurde in 13,5 % und der 01_AE in 10 % der untersuchten non-B-Proben gefunden. Die Subtypen D und G wurden ebenfalls in hohen Prozentsätzen nachgewiesen (D: 8,8%; G: 6,5%). Alle anderen Subtypen wurden mit einer Häufigkeit von weniger als 5 % detektiert.

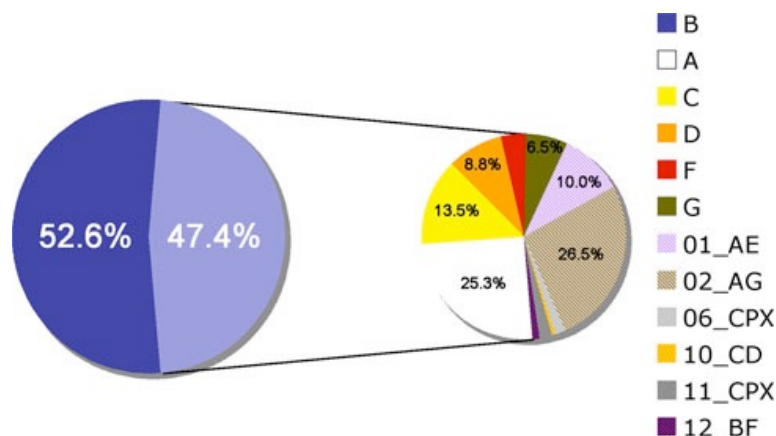


Abbildung 2: Prävalenz von HIV-1-Subtypen in der SnoB-Studie

SnoB: Sequenzen von 359 therapienaiven (naiv für alle Klassen) HIV-1 Infizierten in deutschen HIV-Zentren, die in die SnoB-Studie aufgenommen wurden.

Das Screening auf Raltegravir Resistenz-assoziierte Mutationen (RRAMs) zeigte keine der drei beschriebenen primären bzw. Hauptmutationen N155H, Q148RHK oder Y143RC gegenüber Raltegravir, wie auch bereits in anderen Untersuchungen beschrieben [105-111]. Es wurden jedoch einige sekundäre Mutationen detektiert, die vorwiegend den non-B Subtypen zuzuordnen waren. Die Mutation L74M war signifikant häufiger im Subtyp 02_AG, die T97A in A und 06_cpx, die V151I in 06_cpx und G163R in 12_BF. Darüber hinaus konnten auch verschiedenen zusätzliche Mutationen, sogenannte „additional mutations“ detektiert und mit einen spezifischen HIV-1 Subtyp assoziiert werden. Diese haben zwar selbst keinen direkten Einfluss auf die Wirksamkeit von Raltegravir, können jedoch die Replikationskapazität beeinflussen. Während Mutationen K156N und S230N mit dem B-Subtyp korrelierten, waren die Mutationen V72I, L74I, T112I, T125A, V201I und T206S signifikant häufiger bei bestimmten non-B-Subtypen zu finden (Tabelle 1).

Zum Zeitpunkt der Untersuchung war nicht klar, ob RRAMs zu Baseline eine Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen unter RAL-Therapie spielen, wie dies für PIs beschrieben wurde, bei denen bestimmte Ausgangsmutationen die genetische Barriere senken [112]. Tatsächlich wirken sich sekundäre und zusätzliche Mutationen nicht nur auf die Resistenzfaktoren (RF) aus, sondern stellen die virale Fitness wieder her oder erhöhen sie sogar. Dies begünstigt das Auftreten primärer Resistenzmutationen wie Q148H und N155H, die zu einer 3,4- bis 13,7-fachen Verringerung der relativen viralen Fitness im Vergleich zum Wildtyp in Abwesenheit von RAL führen [113-115]. Einige Studien deuten darauf hin,

dass Baseline RRAMs einen Einfluss auf die Entwicklung einer künftigen RAL-Resistenz haben können. In einer meiner Studien [15] konnte ich zeigen, dass die baseline Mutation T206S in Isolaten mit G148HR bei RAL-Versagen nicht nachweisbar, jedoch in 3/7 Proben mit der N155H-Mutation vorhanden war [110]. Das Auftreten der Y143CR bei RAL-Versagen korrelierte mit der T97A zu Baseline bei 3/4 der Patienten bzw. 1/1 in zwei früheren Studien [110, 116]. Ceccerini-Silberstein und Kollegen zeigten außerdem, dass alle Viren, die zu Beginn der Therapie die V165I-Mutation aufwiesen, bei Therapieversagen die N155H-Mutation entwickelten. Darüber hinaus haben andere Studien ein Versagen der RAL-Therapie festgestellt, ohne dass primäre RRAMs auftraten [117, 118]. Diese Studien verdeutlichen die potenzielle Bedeutung sekundärer und zusätzlicher Mutationen, die zur Resistenz gegen RAL-Therapien beitragen.

Insgesamt konnte in dieser Studie eine höhere Prävalenz von RAL Resistenz-assoziierten Mutationen in HIV-1 non-B Subtypen beobachtet werden. Die Tatsache, dass keine primären RRAMs, wie die N155H, Q148RHK und Y143RC detektiert wurden, deutet darauf hin, dass es vermutlich keine natürlich Subtyp-assoziierte Resistenz gegenüber Raltegravir gibt. Dennoch wurden zahlreiche sekundäre bzw. zusätzlich Mutationen detektiert, deren Auftreten zum Teil auch mit speziellen Subtypen korrelierte. Diese Daten zeigen, dass ein Baseline-Screening vor einer Integrase Inhibitor haltigen Kombinationstherapie durchgeführt werden sollte, um RRAMs zu identifizieren, welche die Selektion einer Raltegravir Resistenz beeinflussen könnten. Die klinische Relevanz dieser sekundären Mutationen vor Therapiestart sollte zudem in prospektiven klinischen Studien untersucht werden.

Tabelle 1: Unterschiede in der Prävalenz von RRAMs zwischen Subtyp B und non-B Subtypen.

	RRAMs*	Subtype		P value (two-tailed)
		B (n = 189) n (%)	Non-B (n = 170) n (%)	
Primary	Y143CR, Q148HKK, N155H	0	0	1.000
Secondary	T66I, E92Q, E138AK, G140AS	0	0	1.000
	L74 M	3 (1.6)	5 (2.9)	0.484
	T97A	2 (1.1)	7 (4.1)	0.091
	Y143H	0	1 (0.6)	0.474
	V151I	4 (2.1)	3 (1.8)	1.000
	G163R	0	1 (0.6)	0.474
Additional	H51Y, T66AK, F121Y, Q146 K, S147G, V249I, R263 K, C280Y	0	0	1.000
	V72I	132 (69.8)	91 (53.5)	0.002
	L74I	13 (6.9)	34 (20.0)	P < 0.001
	T112I	17 (9.0)	30 (17.6)	0.018
	S119GPRT	89 (47.1)	49 (28.8)	P < 0.001
	T125AK	60 (31.7)	147 (86.5)	P < 0.001
	A128T	0	2 (1.2)	0.239
	S153AY	0	1 (0.6)	0.474
	M154I	7 (3.7)	3 (1.8)	0.344
	K156 N	18 (9.5)	1 (0.6)	P < 0.001
	E157Q	4 (2.1)	5 (2.9)	0.741
	V165I	9 (4.8)	16 (9.4)	0.098
	V201I	104 (55.0)	162 (95.3)	P < 0.001
	I203 M	9 (4.8)	8 (4.7)	1.000
	T206S	32 (16.9)	72 (42.4)	P < 0.001
	S230RN	19 (10.1)	2 (1.2)	P < 0.001

* According to Sichtig et al. 2009

Mutations with statistically significant differences between B and non-B subtypes are highlighted in *bold*

6.1.2 Entwicklung eines phänotypischen Resistenztests für HIV-1 Integrase Inhibitoren

Originalarbeit: Heger E, Theis AA, Remmel K, Walter H, Pironti A, Knops E, Di Cristanziano V, Jensen B, Esser S, Kaiser R, Lübke N. Development of a phenotypic susceptibility assay for HIV-1 integrase inhibitors. J Virol Methods. 2016 Dec;238:29-37. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.10.002. Epub 2016 Oct 11. PMID: 27737783.

Copyright: Die Verwendung des Bildmaterials aus dieser Veröffentlichung erfolgt mit Genehmigung des Verlags Elsevier BV. Lizenz ID: 1292737-5.

Mit Zulassung von Raltegravir wurde diese Substanz auch zahlreich in Therapiekombinationen eingesetzt. Da der Einfluss von neu selektierten Mutationen im Integrase Gen auf die Wirksamkeit von Integrase Inhibitoren in vielen Fällen noch unklar war, wurde neben der Erweiterung der genotypischen Resistenzanalysen um die HIV-1 Integrase Genregion auch einen Test zur phänotypischen Resistenzanalyse der Integrase Genregion entwickelt. Wie bereits einleitend beschrieben, ist die phänotypische Resistenzanalyse eine unverzichtbare Methode, um Resistenzen und Kreuzresistenzen gegenüber neuen antiretroviralen Medikamenten zu untersuchen. Diese phänotypischen Resistenzdaten können dann dafür genutzt werden, um einerseits eine Resistenzaussage treffen zu können und andererseits um Interpretationstools wie HIV-GRADE oder geno2pheno[integrase] zur Vorhersage von Resistenzen und der entsprechenden Wirksamkeit der Medikamente zu verbessern.

Zur Gewinnung phänotypischer Resistenzdaten gegen neuere Integrasehemmer und zur Analyse von möglichen Kreuzresistenzen zwischen den verschiedenen INSTIs wurde ein rekombinanter phänotypischer Integrase-Resistenztest entwickelt. Dafür wurden drei verschiedenen Integrase-Inhibitoren verwendet, die INSTIs der ersten Generation, Raltegravir und Elvitegravir (EVG), sowie ein INSTI der zweiten Generation, das Dolutegravir (DTG).

Zur Evaluierung des phänotypischen Resistenztests für INSTIs wurden neun verschiedene von HIV-Infizierten stammende Subtyp-B-Virenstämme mit und ohne RAL-Resistenz-assoziierten Mutationen analysiert. Die Auswahl der Viren erfolgte auf der Grundlage der Integrase-Genotypen, die im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführten Resistenztests analysiert wurden [110]. Die Vorhersage der genotypischen Resistenz der Viren gegen RAL und die Kreuzresistenz gegen EVG und DTG sowie die ermittelten INSTI-Resistenz-assoziierten Mutationen wurden anhand veröffentlichter Resistenzdaten (nachzulesen in [119, 120]) und der *Stanford Drug Resistance Database* (<http://hivdb.stanford.edu>) definiert.

Drei der von RAL-erfahrenen Personen isolierten Viren trugen Mutationen, die *in vivo* Resistenz gegen RAL induzieren, darunter die primäre Mutation N155H in Kombination mit der sekundären Mutation G163R, die primäre Mutation Y143R mit den sekundären Mutationen T97A und E138K und die primäre Mutation Q148H mit der sekundären Mutation G140S. Der weitere untersuchte Virusstamm wies nur die sekundäre RAL-Resistenzmutation V151I auf. Die genotypisierten Viren der RAL naiven Personen wiesen keine der beschriebenen RAL-Resistenzmutationen auf.

Für die Herstellung von rekombinanten Viren wurde zunächst ein Vektorsystem entwickelt. Dabei wurde der Vektor pNL4-3 so modifiziert, dass Patienten-spezifische Integrase Gene in diesen Vektor kloniert werden konnten. Diese rekombinanten Vektoren wurden dann in 293T-Zellen transfiziert, um ein rekombinantes Virus zu erzeugen. Die Empfindlichkeit der rekombinanten Viren gegenüber Integrase-Inhibitoren wurde dann anhand einer Indikator-Zelllinie (CEMx-174) bestimmt (Abbildung 3).

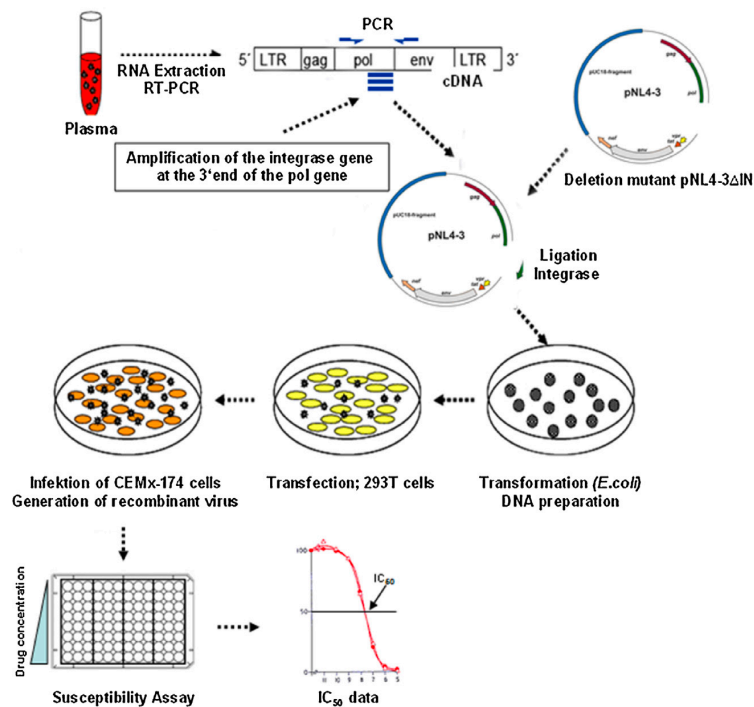


Abbildung 3: Schematische Darstellung des phänotypischen IN-Resistenztests.

IN-RT-PCR-Produkte wurden in ein modifiziertes IN-deletiertes pNL4-3-Backbone kloniert. Die rekombinante Plasmid-DNA wurde transfiziert und die Viren wurden kultiviert. Schließlich wurde die virale Replikation mit einem Reporter-Gen-Assay gemessen.

Nach erfolgreicher Klonierung und Kultivierung von rekombinanten Viren mit repräsentativen Mutationen für RAL-naive und RAL-erfahrene Viren wurden die verschiedenen Klone auf ihre Empfindlichkeit gegenüber RAL, EVG und DTG in Triplikaten untersucht. Die Virusstämme ohne nachgewiesene Resistenzmutationen wiesen für RAL, EVG und DTG überwiegend mit dem Wildtyp-Referenzstamm NL4-3lig IN vergleichbare Resistenzfaktoren (RFs) bzw. *fold changes* FCs) auf, während die Viren mit den beschriebenen RAL-Resistenzmutationen je nach Mutationsmuster eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber den verschiedenen INSTIs aufwiesen. Die primäre RAL-Resistenzmutation N155 und Q148 führten zu einer hohen Resistenz gegenüber RAL (RF 7; Range 3,52-8,81 und RF 231,5; Range 133,27-381,74) und EVG (RF 4,56; Range 2,98-6,66 und RF 318,61; Range 266,37-410,69), während die primäre RAL-Mutation Y143 nur die RAL-Empfindlichkeit beeinflusste (RF 145,75; Range 96,71-229,54) und die geringe Auswirkung von Y143R auf die EVG- und DTG-Resistenz (RFs 3,21 und 0,57) bewies (Tabelle 2) [121, 122]. Die in unserem phänotypischen Resistenztest ermittelten RFs der analysierten Virusstämme mit verschiedenen RAL-spezifischen Mutationsmustern sind mit anderen *in vitro* Daten vergleichbar [123, 124]. Neben der Y143R-Mutation behielt DTG auch die Aktivität gegenüber dem Isolat mit der N155H-Mutation bei. Die Aktivität von DTG war also nur bei dem

Virusstamm mit der Q148H-Mutation in Kombination mit einer sekundären RAL-Resistenzmutation reduziert (RF 3,44; Range 3,13-3,73), wie auch in anderen *in vitro* Studien festgestellt wurde [122].

Insgesamt waren die ermittelten IC₅₀-Werte der Wildtyp-Stämme für RAL und EVG im Vergleich zu DTG um das 5-Fache bzw. 3,2-Fache höher, was die niedrigen DTG-Medikamentenkonzentrationen bestätigt, die für die Hemmung der viralen Replikation erforderlich sind [125]. Die intrinsische Variabilität unseres phänotypischen Integrase-Resistenztests ist vergleichbar mit dem von Walter et al. beschriebenen Reverse-Transkriptase- und Protease-Inhibitor-Test [126].

Tabelle 2: Ermittelte IC₅₀-Werte und berechnete Fold Changes gegenüber den Integrase Inhibitoren Raltegravir, Elvitegravir und Dolutegravir.

Sample	RAL							EVG							DTG						
	RAMs	primary	secondary	IC ₅₀ [nM]	FC mean	± SD	Range	g2p	IC ₅₀ [nM]	FC mean	± SD	Range	g2p	IC ₅₀ [nM]	FC mean	± SD	Range				
NL4-3lig IN	Ø	Ø	Ø	5.6	1.0	–	–	1.7	6.3	1.0	–	–	1.9	1.8	1.0	–	–				
#1-4773	Ø	Ø	Ø	8.23	1.38	0.88	0.48–2.24	0.8	7.27	1.15	0.34	0.90–1.55	1.3	1.67	0.92	0.14	0.78–1.06				
#2-4867	Ø	Ø	Ø	4.16	0.77	0.68	0.06–1.41	0.8	23.78	3.78	0.56	3.32–4.40	0.8	2.89	1.59	0.30	1.41–1.94				
#3-7459	Ø	Ø	Ø	13.53	2.12	1.48	0.70–3.66	3.4	9.55	1.52	0.69	0.80–2.18	0.9	2.06	1.14	0.16	0.97–1.29				
#4-7480	Ø	Ø	Ø	9.29	1.63	0.94	0.86–2.67	1.9	4.00	0.64	0.40	0.36–1.09	1.5	2.02	1.12	0.29	0.88–1.44				
#5-307	Ø	Ø	Ø	8.25	1.53	0.94	0.45–2.21	1	4.42	0.70	0.24	0.44–0.93	1.8	2.14	1.18	0.17	1.00–1.35				
#6-4393	Ø	V151I	Ø	10.30	1.97	0.84	1.20–2.86	1.7	5.97	0.95	0.04	0.92–0.98	1.9	2.37	1.31	0.06	1.23–1.35				
#7-4833	N155H	G163R	Ø	37.31	7.00	3.01	3.52–8.81	30.9	28.69	4.56	1.90	2.98–6.66	41.6	2.40	1.32	0.30	0.99–1.56				
#8-5150	Y143R	T97A, E138 K	Ø	695.56	145.75	72.91	96.71–229.54	562	20.23	3.21	0.59	2.54–3.63	2.1	1.03	0.57	0.35	0.32–0.96				
#9-6834	Q148H	G140S	Ø	1499.96	231.50	132.15	133.27–381.74	622.5	2005.30	318.61	80.07	265.37–410.69	2784.5	6.24	3.44	0.30	3.13–3.73				

RAM: resistance-associated mutation; RAL: Raltegravir; EVG: Elvitegravir; DTG: Dolutegravir; FC: fold change; SD: standard deviation; g2p: geno2pheno_{integrated}; light grey: excluded from the analysis due to insufficient amount of RTUs for reliable phenotypic resistance data.

RAM: resistance-associated mutation; RAL: Raltegravir; EVG: Elvitegravir; DTG: Dolutegravir; FC: fold change; SD: standard deviation; g2p: geno2pheno[*integrase*]; light grey: excluded from the analysis due to insufficient amount of RLUs for reliable phenotypic resistance data.

Zur Überprüfung unserer Daten wurden die berechneten FC-Werte mit den vorhergesagten FC-Werten verglichen, die mit dem Phänotyp basierten Interpretationstool geno2pheno[*integrase*] ermittelt wurden (Tabelle 2). Dabei zeigte sich eine starke positive Korrelation zwischen gemessenen und vorhergesagten FC-Werten (RAL: R=0,98; EVG: R=1,00). Ähnliche Ergebnisse wurden für einen phänotypischen Resistenztest für die HIV-Protease und -Reverse Transkriptase beobachtet, der mit vorhergesagten Werten verglichen wurde, die mit einem Genotyp basierten Phänotypisierungsalgorithmus ermittelt wurden [127, 128].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der entwickelte phänotypischer Resistenztest die Resistenzanalyse des Integrase-Gens von Patientenviren gegenüber Integrase-Inhibitoren durch replikationskompetente Rekombinanten ermöglicht. Somit kann dieser Assay zur Analyse der phänotypischen Medikamentenresistenz von Integrase-Inhibitoren *in vitro* verwendet werden. Er bietet die Möglichkeit, die Auswirkungen neu auftretender Mutationsmuster auf die Empfindlichkeit gegenüber Integraseinhibitoren zu bestimmen.

6.1.3 Untersuchung der HIV-1 Resistenzinformation der archivierten Proviren im Vergleich zur viralen RNA

Originalarbeit: Lübke N, Di Cristanziano V, Sierra S, Knops E, Schülter E, Jensen B, Oette M, Lengauer T, Kaiser R. Proviral DNA as a Target for HIV-1 Resistance Analysis. Intervirology. 2015;58(3):184-9. doi: 10.1159/000431093. Epub 2015 Jun 27. PMID: 26139571.

Copyright: Die Verwendung des Bildmaterials aus dieser Veröffentlichung erfolgt mit Genehmigung des Verlags S./Karger AG. Lizenz ID: 1292737-3.

Mit der Zunahme der verfügbaren antiretroviralen Substanzen und der Verbesserung der Nebenwirkungsprofile ist eine Umstellung der Behandlung zur Vermeidung von Langzeittoxizitäten für immer mehr Menschen, die eine Langzeit-HIV-Behandlung erhalten, möglich. Zudem besteht auch ein wachsendes Interesse daran, die Zahl der antiretroviralen Medikamente, die von HIV-Infizierten eingenommen werden, zu reduzieren, nicht nur um das Risiko von Langzeittoxizität zu verringern, sondern auch um die Therapien zu vereinfachen, indem weniger Tabletten eingenommen werden müssen und zusätzlich, um die Behandlungskosten zu senken.

Die Umstellung der Behandlung von Menschen, die bereits mehrere HIV-Medikamentenkombinationen eingenommen haben, sollte idealerweise nach einem Resistenztest erfolgen, um die Wahl der Medikamente zu erleichtern. Im Gegensatz zu standardmäßigen Resistenztestung der viralen Plasma RNA (vRNA) kann die Resistenztestung auch anhand der proviralen DNA (pDNA) bei supprimierter Viruslast (<50 Kopien/ml) durchgeführt werden. Dabei wird nicht die freie virale Plasma RNA, sondern die zelluläre provirale DNA isoliert und analysiert. Dies kann dazu beitragen, neue, möglichst voll empfindliche Kombinationstherapien auszuwählen, die besser vertragen werden und bei behandlungserfahrenen Menschen leichter einzunehmen sind, und gleichzeitig einen Behandlungswechsel zu verhindern, der aufgrund von möglichen Resistenzen zu einem viralen Rebound führen könnte.

Nicht nur Therapie, Unverträglichkeiten oder der Wunsch nach einer Therapievereinfachung bei erfolgreicher Therapie, sondern auch anhaltende niedrige Viruslasten sind eine Indikation für eine Resistenzanalyse. Nach den deutsch-österreichischen Leitlinien zur Behandlung der HIV-Infektion (<http://www.daignet.de/site-content/hiv-therapie/leitlinien-1>) ist ein Therapieversagen mit einer bestätigten Viruslast von >50 Kopien/ml definiert, weshalb eine genotypische Resistenzanalyse zum Zeitpunkt einer Low Level Virämie (LLV, 50-200 Kopien/ml) durchgeführt werden sollte. Diese Empfehlungen werden auch durch die Tatsache untermauert, dass eine anhaltende LLV mit einem erhöhten Risiko eines virologischen Versagens verbunden ist [129]. HIV-1 Resistenzmutationen gegenüber antiretroviralen Medikamenten, sogenannte *drug resistance mutation* (DRMs), welche während der LLV nachgewiesen werden, sind stark mit einem späteren virologischen Versagen assoziiert [130, 131]. Außerdem haben fast 50% der antiretroviral behandelten Personen mit LLV eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Akkumulation zusätzlicher DRMs, was mit der Anzahl der aktiven Medikamente zusammenhängt. Die Anzahl der aktiven Substanzen und die Dauer der LLV sind beide prädiktiv für die Entstehung von Resistenzen [132].

HIV infiziert langlebige Zellen, so dass die Historie der HIV-1 Genotypen archiviert bleibt [133, 134]. Daher ist es unwahrscheinlich, dass Wildtyp- oder resistente Varianten, die aufgrund einer übertragenen Resistenz oder während der Therapiehistorie des Infizierten erworben wurden, vollständig aus dem Körper verschwinden. Daher tauchen virale Varianten, einschließlich zirkulierender resistenter Stämme, die während ART selektiert wurden, im latenten Reservoir als minore Varianten auf [135-137].

Um den Grad der Resistenzinformation in der proviralen HIV-DNA zu untersuchen, verglichen wir die Resistenzinformation von der HIV Protease (PR) und der Reversen Transkriptase (RT) in viraler RNA und proviraler DNA, die durch genotypische Standardresistenzanalyse in Proben von therapienaiven (TN) und therapieerfahrenen (TE) HIV-1-Infizierten detektiert wurden.

Für diese Untersuchung wurden achtzig HIV-1-Proben nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Sie wurden von 80 HIV-1-Infizierten der RESINA-Kohorte gewonnen, die in kooperierenden HIV-Zentren in Nordrhein-Westfalen, Deutschland, behandelt wurden. Zum Zeitpunkt der Probenentnahmen waren 50 Personen therapienaiv mit einer medianen Viruslast von 102.982 Kopien/ml (Range 50-1.929.370) und 30 therapieerfahren mit einer medianen Viruslast von 10.208 Kopien/ml (Range 425-311.700). Von allen Proben wurde eine genotypische Resistenzanalyse anhand der vRNA und der pDNA der gleichen Blutprobe durchgeführt.

Achtundsiebzig der 80 untersuchten Proben (48 von TN- und 30 von TE-Personen) lieferten Amplikons der PR- und RT-Gene sowohl der vRNA als auch der pDNA, die dann analysiert werden konnten. Insgesamt konnten in 30/78 Proben 175 verschiedene DRMs in 25/30 TE- (83,3 %) und 5/48 TN-Proben (10,4 %) in den PR- oder RT-Genen oder in beiden nachweisen. Einhunderteinundsiebzig DRMs wurden in der vRNA und 135 in der pDNA nachgewiesen (Abbildung 4).

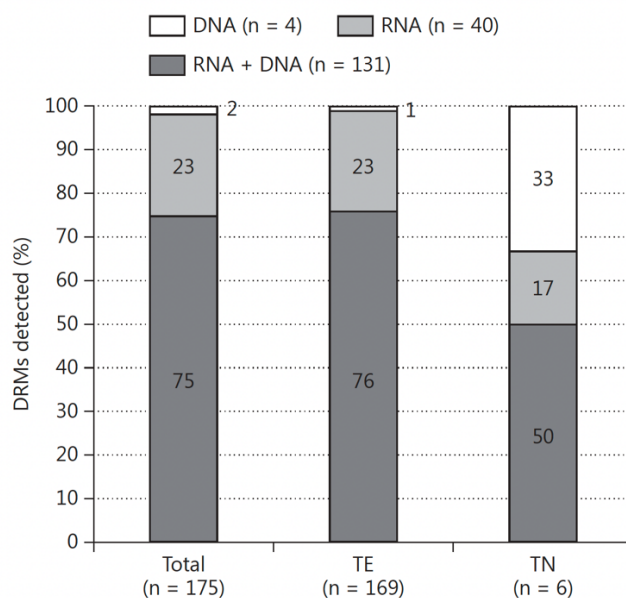


Abbildung 4: Anzahl der detektierten DRMs in viraler RNA und/oder proviraler DNA in Proben von therapienaiven (TN) und therapieerfahrenen HIV-Infizierten (TE).

Insgesamt wurden die meisten DRMs (75 %) gleichzeitig in der vRNA und der pDNA nachgewiesen, während 23 % ausschließlich in der vRNA und 2 % nur in der pDNA detektiert wurden (Abbildung 4). Die Therapieerfahrenen wiesen eine durchschnittliche Anzahl von 6,68 DRMs in der viralen RNA und 5,20 in der proviralen DNA auf. Bei den TN-Personen wurden durchschnittlich 0,8 DRMs in der viralen RNA und 1,0 in der proviralen DNA gefunden. Die Proben der TE-Personen wiesen 76 % der DRMs sowohl in der viralen RNA als auch in der proviralen DNA auf, 23 % ausschließlich in der viralen RNA und 1 % nur in der proviralen DNA. Im Gegensatz dazu ergab die Verteilung der DRMs in viraler RNA und proviraler DNA in den Proben der TN-Personen eine deutlich höhere Häufigkeit von DRMs in proviraler DNA (33 %; $p = 0,006$). Diese Daten stehen im Einklang mit anderen veröffentlichten Studien, die Informationen zur Resistenz in viraler RNA und proviraler DNA identischer Blutproben untersuchten [138-142].

Die Unterschiede zwischen TN- und TE-Personen in Bezug auf die in der proviralen DNA und der viralen RNA nachgewiesenen DRMs lassen sich durch die Kinetik der übertragenen Resistenz erklären. Dabei korrelierte die Anzahl an resistenten Varianten mit der Zeit die sie replizieren konnten [137]. Während Viren in Therapie-Naiven keinem Medikamentendruck ausgesetzt waren, können sich die übertragenen Viren ungehemmt replizieren und die zellulären Reservoirs füllen, was zu einer höheren Häufigkeit von archivierten resistenten Stämmen führt. Wenn Personen mit resistenten Stämmen infiziert sind, ist die Replikation der resistenten Viren nicht im Wettbewerb mit Wildtyp-Stämmen, die sich durch eine höhere Replikationskapazität auszeichnen, was zu einer höheren Häufigkeit von archivierten resistenten Stämmen führt. Im Gegensatz dazu sind bei Therapie-Erfahrenen die Virusvarianten mit antiretroviral selektierten DRMs in Konkurrenz zu Wildtyp-Stämmen, was zu einer vergleichsweise kürzeren Replikationsperiode und einer geringeren Häufigkeit resistenter Varianten, die in das latente Reservoir gelangen, führt.

Obwohl die Vergleichsdaten aufgrund der geringen Stichprobengröße begrenzt sind, erwies sich die Genotypisierung der proviralen HIV-DNA als möglich und lieferte nützliche Informationen. PR- und RT-DRMs wurden gleichzeitig in viraler RNA und proviraler DNA nachgewiesen. Darüber hinaus lieferte die Resistenzanalyse der proviralen DNA zusätzliche Informationen über die übertragenen resistenten Varianten bei TN-Patienten, was die Surveillance der resistenten Virusvarianten und damit die Auswahl aktiver antiretroviraler Substanzen verbessern könnte. Bei Therapie-Erfahrenen wurden mehr Resistenzinformationen über die Resistenz aus der viralen RNA gewonnen. Die Resistenztestung der proviralen DNA könnte jedoch wertvolle zusätzliche Informationen liefern, wenn die RNA-Resistenzanalyse aufgrund von LLV nicht erfolgreich war oder wenn keine historischen Resistenzdaten vorliegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kombinierte Analyse der viralen Plasma RNA und der aus peripheren mononukleären Blutzellen stammenden proviralen DNA komplementäre Informationen zur Resistenz lieferte und somit einen sinnvollen Ansatz für die HIV-Resistenz Analyse darstellt. Darüber hinaus bietet der Test auf provirale DNA eine alternative Möglichkeit, wenn Resistenzanalysen anhand der viralen RNA aufgrund zu niedriger Viruslasten erfolglos sind.

6.2 Evolution von Virusvarianten im Kontext von Medikamentenresistenz und Immunescape

6.2.1 Evolution resistenter HIV-1 Virusvarianten unter Selektionsdruck durch Integrase Inhibitoren

6.2.1.1 Longitudinale Analyse von Raltegravir Resistenzprofilen

Originalarbeit: Sichtig N, Sierra S, Kaiser R, Däumer M, Reuter S, Schülter E, Altmann A, Fätkenheuer G, Dittmer U, Pfister H, Esser S. Evolution of raltegravir resistance during therapy. J Antimicrob Chemother. 2009 Jul;64(1):25-32. Doi: 10.1093/jac/dkp153. Epub 2009 May 14. PMID: 19447792.

Copyright: Diese Veröffentlichung wurde beim Verlag Oxford University Press veröffentlicht. Als Teil der Lizenzvereinbarung ist für Autoren die freie Verwendung aller Inhalte unter Angabe der Originalquelle erlaubt.

Die virale HIV-Integrase ist ein entscheidendes Enzym im HIV-Replikationszyklus, sodass sie ein ausgezeichnetes Ziel für die antiretrovirale Therapie darstellt. Mit Zulassung des ersten Integrase Inhibitors Raltegravir im Jahre 2007, war eine neue Substanzklasse verfügbar, welche gerade für HIV-1 infizierte Menschen mit bereits multiresistenten Virusvarianten neue Behandlungsmöglichkeiten lieferte. Raltegravir zeigte bei stark vorbehandelten PatientInnen eine starke antivirale Wirkung, ein günstiges Verträglichkeits- und Sicherheitsprofil sowie wenige und überschaubare Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln [143-145]. Weitere Daten belegten auch seine Wirksamkeit bei therapie-naiven HIV-Infizierten [146]. Aber wie zu erwarten, zeigte auch Raltegravir nicht nur eine Selektion von Integrase Mutationen *in vitro* [147, 148], sondern auch *in vivo* bei Personen unter einer RAL-basierten ART was zu einem schnellen Anstieg der HIV Viruslast im Plasma führte. Dabei wurden zwei verschiedene genetische Resistenzpfade beschrieben, bei denen entweder das Codon 148 oder das Codon 155 des Integrase-Gens beteiligt sind, die alle in der katalytischen Domäne des Enzyms lokalisiert sind [143, 145, 149, 150]. In den ersten *in vivo* Daten reichte eine einzige Mutation im HIV-Integrase-Gen aus, um die Ausgangsviruslast zu erreichen [19], wodurch Raltegravir als eine Substanz mit einer niedrigen Resistenzbarriere charakterisiert ist.

Zum Zeitpunkt der Studie wurden 47 Aminosäure Substitutionen an 33 verschiedenen Positionen im HIV-1 Integrase-Gen mit unterschiedlichen Graden der *in vitro*- und *in vivo*-Resistenz gegenüber Integrase Inhibitoren assoziiert [108, 151, 152]. Davon wurden *in vivo* insgesamt 14 Mutationen an 10 verschiedenen Positionen mit Resistenz gegenüber Raltegravir beobachtet [19, 108, 114, 116, 150, 151, 153], wobei jedoch der Beitrag der einzelnen Mutationen zur klinisch relevanten Resistenz noch unklar war. Eine Übersicht über die Klassifikation der Raltegravir Resistenz-assoziierten Mutationen ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Klassifikation der Raltegravir Resistenz-assoziierten Mutationen.

Klassifikation	Substitutionen
Primäre Mutationen	Q148R/H/K, N155H, (Y143R?)
Sekundäre Mutationen	L74M, E92Q, T97A, E138A/K, G140S/A, Y143H, V151I, G163R
Zusätzliche Mutationen	H51Y, T66I, V72I, L74A/I, S119R/G/P/T, T112I, F121Y, T125A/K, A128T, Q146K, S147G, S153Y/A, M154I, K156N, E157Q, K160D, V165I, V201I, I203M, T206S, S230R/N, V249I, R263K, C280Y

Die Klassifikation basiert auf eigenen und bereits publizierten Daten [19, 108, 114, 116, 149, 150, 152, 153].

Um die Resistenzentwicklung unter Raltegravir genauer zu charakterisieren, wurde in dieser Studie die Prävalenz von Raltegravir-Resistenz-assoziierten Mutationen zu Beginn der RAL basierten Therapie und ihre Entwicklung während der Therapie bei stark vorbehandelten HIV-Infizierten untersucht.

Bei der Studie wurde die Integrase Genregion von insgesamt 209 Plasmaproben von 94 Subtyp B und 115 non-B Infizierten erfolgreich sequenziert. Zu Baseline wurden keine primären Raltegravir-Resistenzmutationen, jedoch 23 sekundäre oder zusätzliche Mutationen detektiert, wie auch bereits in anderen Studien beschrieben [106, 107, 109, 111]. Die sekundären Mutationen L74M, T97A, V151I und G163R wurden mit einer Häufigkeit von <4% beobachtet, jedoch mit einer unterschiedlichen Prävalenz in Anhängigkeit vom HIV-1 Subtyp, wie bereits in der SnoB Studie beschrieben wurde [154].

Die Auswirkung von Baseline Mutationen auf die Resistenzentwicklung gegenüber Raltegravir ist ein kritischer Punkt, der beobachtet werden muss, da besonders bei Substanzen mit einer niedrigen Resistenzbarriere eine erhöhtes Risiko für ein vorzeitiges Therapieversagen vorliegt [155].

Einundsechzig der 209 Personen mit INSTI Baseline Resistenzanalyse wurden anschließend mit Raltegravir-haltigen Kombinationstherapien behandelt. Bei der longitudinalen Beobachtung wurde bei 10/61 Personen unter der Raltegravir-haltigen Therapie ein virologisches Versagen (VL > 500 Kopien/ml) festgestellt. Zwei der 10 TherapieversagerInnen waren mit dem HIV-1 Subtyp CRF02_AG infiziert, während die anderen acht einen HIV-1 Subtyp-B Stamm aufwiesen (Tabelle 4). Die mediane Zeitspanne bis zum Versagen der Raltegravir-Therapie betrug 36 Wochen (Range: 16-106 Wochen). Bei fünf Personen (eine mit CRF02_AG und vier mit Subtyp B) konnte unter nicht-suppressiver Raltegravir-Therapie (8-44 Wochen nach Versagen) eine weitere Plasmaprobe gewonnen werden, was eine longitudinale Resistenzanalyse ermöglichte.

Tabelle 4: Longitudinaler Analyse der Integrase Mutationsprofile vor Raltegravir Therapie und nach einem virologischen Versagen.

Patient	Clade	GenBank ID	Weeks on raltegravir	H 51	V 72	<u>L</u> <u>74</u>	<u>E</u> <u>92</u>	<u>T</u> <u>97</u>	S 119	T 125	<u>E</u> <u>138</u>	<u>G</u> <u>140</u>	<u>Y</u> <u>143</u>	Q 146	Q <u>148</u>	<u>V</u> <u>151</u>	M 154	<u>N</u> <u>155</u>	<u>G</u> <u>163</u>	V 201	T 206	S 230
1	B	FJ183681	-29	G ₀	I				G	A										I		
		FJ183691	31	G ₁	I				G	A		GA			QR					I		
		FJ183692	47	G ₂	HR	I	M		A	G			R							I		
2	B	FJ183684	-3	G ₀	I					A									E	I		
		FJ183700	35	G ₁	I					A		S			H				K	I		
		FJ183701	79	G ₂	I					A		S			H				K	I		
3	B	FJ183682	-89	G ₀	I				R	A										I		
		FJ183693	35	G ₁	I		EQ	AT	R	A								NH		I		
		FJ183694	44	G ₂	I			A	R	A			YH					NH	GR	I		
4	B	FJ183706	-4	G ₀	I					A												N
		FJ183697	37	G ₁	I					A						VI		H	GR			N
		FJ183698	45	G ₂	I					A						I		H	R			N
5	AG	FJ183683	-280	G ₀	I					A										I	S	
		FJ183695	34	G ₁	I				SR	A								H		I	S	
		FJ183696	66	G ₂	I					A			R							I	S	
6	AG	FJ183627	-2	G ₀		I				A										I	S	
		FJ183705	16	G ₁	I					A								H		I	S	
7	B	FJ183629	-51	G ₀	I				P	A										I	S	
		FJ183699	62	G ₁	I				P	A				QK				H		I	S	
8	B	FJ183686	-224	G ₀	I												MI			I		
		FJ183703	75	G ₁	I												I		H	GR	I	
9	B	FJ183687	-13	G ₀													VI			I		
		FJ183704	106	G ₁	VI													H		I		
10	B	FJ183685	-17	G ₀	I																	
		FJ183702	106	G ₁	I	M		A	T		D		R									

Raltegravir resistance patterns

G₀, IN genotype at baseline; G₁, IN genotype at time of raltegravir therapy failure; G₂, IN genotype under non-suppressive raltegravir therapy; -, weeks before raltegravir treatment. All positions listed in Table 1 were inspected, but only the positions with detected mutations are shown. The underlined and bold positions are signature/primary raltegravir-associated mutations, the underlined positions are secondary raltegravir-related mutations and the unmarked positions are additional mutations.

Die Resistenzanalyse der Integrase zeigte vor Therapiestart weder primäre noch sekundäre RAL-assoziierte Resistenzmutationen. Bei Therapieversagen wurden drei verschiedene Mutationsprofile identifiziert, wobei jedes Profil durch das Vorhandensein einer primären RAL-Resistenzmutation N155H, Q148R/H/K oder Y143R charakterisiert war. Die Mutation N155H wurde bei sieben Personen detektiert. Während die N155H in drei Fällen isoliert, also ohne sekundäre Mutationen vorlag, war in vier Fällen die N155H mit sekundären Mutationen, entweder V151I und/oder G163R, oder mit E92Q und T97A assoziiert. Zwei Personen zeigten zum Zeitpunkt des Therapieversagens Primärmutationen an der Position Q148, entweder die Q148H oder Q148R assoziiert mit einer sekundären Mutation an der Position G140. Bei Patient #10, wurden als drittes Mutationsprofil die primäre Mutation Y143R assoziiert mit den sekundären Mutationen L74M und T97A nachgewiesen. Während die Mutationen N155H und Q148R/H/K zum Zeitpunkt der Studie bereits klar als Primärmutationen mit einer deutlichen reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Raltegravir charakterisiert waren [19, 143, 148, 149,

156], war die Rolle der Y143R Mutation im Rahmen der Resistenzentwicklung gegenüber Raltegravir noch nicht vollständig geklärt [145]. Die Ergebnisse unsere Studie unterstützen die Beobachtung, dass neben den Mutationen N155H und Q148R/H/K auch die Y143R eine Schlüsselrolle bei der Resistenzentwicklung gegenüber Raltegravir einnimmt. Diese Daten deuten darauf hin, dass unter einer versagenden Raltegravir-haltigen Therapie drei verschiedene Resistenzprofile selektiert werden können, die auf drei unterschiedliche Resistenzpathways schließen lassen.

Darüber hinaus konnten unter anhaltender nicht-suppressiver Raltegravir-haltigen Therapie eine Veränderung der Mutationsprofile beobachtet werden. Dabei wurde nicht nur eine Selektion weiterer Sekundärmutationen beobachtet, welche den Grad der Resistenz erhöhen und/oder die virale Fitness verbessern [113], sondern auch ein Wechsel der primären Resistenzmutation in zwei von fünf Fällen. In beiden Fällen wurde ein Switch der Primärmutation von der Q148R oder der N155H zu einer Y143R Mutation in einem Zeitraum von 16 und 32 Wochen beobachtet. Das Auftreten der einzelnen Primärmutationen N155H, Q148R/H oder Y143R variierte in Abhängigkeit von der Dauer der Raltegravir Gabe. Während die Q148R/H und die N155H Mutationen eher zu einem frühen Zeitpunkt des virologischen Versagens detektiert wurden, trat die Y143R Mutation erst nach einem längeren Selektionsdruck durch Raltegravir auf, wie auch in anderen longitudinalen Studien beobachtet wurde [19, 114]. Die Beobachtung, dass das Y143R Muster nur in späteren Stadien der Raltegravir-Resistenzentwicklung zu beobachten war, lässt Schwierigkeiten bei seiner Entwicklung schließen. Ein Grund dafür könnte die Anzahl und Art der Nukleotidsubstitutionen sein, die für den Aminosäureaustausch erforderlich sind. Während die Substitutionen N155H und Q148R/H nur einen Nukleotidaustausch erfordern (CAR zu CGR für Q148R, CAG/A zu CAC/T für Q148H, oder AAY zu CAY für N155H), benötigt die Substitution Y143R mindestens zwei Nukleotidaustausche (TAC zu CGC).

Die Analyse der Raltegravir-Resistenz Mutationsmuster während einer nicht-suppressiven Raltegravir-Therapie bestätigte, dass die Erhöhung der Raltegravir-Resistenz und/oder verbesserte Fitness auch durch eine Veränderung der primären Mutation erreicht werden kann, statt durch den Erwerb von mehr sekundären Mutationen [114, 157, 158]. Die IC_{50} von Q148R/H in Kombination mit G140S/A steigt um das bis zu 500-fache und die virale Fitness ist ähnlich der des Wildtyps [114]. Die N155H-Mutation erhöht die IC_{50} nur um das 13-fache und reduziert die virale Fitness auf 60% [114, 115]. Die IC_{50} Veränderung der Y143R/C-Mutation ist vergleichbar mit der der N155H (13-fach), führt aber zu einem Anstieg der viralen Fitness um bis zu 140% [114]. Die Mechanismen, die der Selektion der primären Mutationen bei Versagen der Raltegravir-Therapie und der anschließenden Evolution der Mutationsmuster zugrunde liegen sind jedoch noch unklar. Wahrscheinlich ist es ein Zusammenspiel zwischen verschiedenen Faktoren, wie z. B. den genetischen Merkmalen der Patienten, Art und Wirksamkeit der optimierten Backbone-Therapie oder Mutationen in anderen viralen Regionen, die die Aktivität der Integrase beeinflussen.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass bei einem Therapieversagen unter einer Raltegravir-haltigen ART drei verschiedenen Resistenzprofile selektiert werden konnten, welche durch die Primärmutationen N155H, Q148R/H und Y143R charakterisiert sind. In der longitudinalen Analyse der Resistenzprofile unter nicht suppressiver Therapie zeigte sich, dass eine Erhöhung der Raltegravir Resistenz nicht nur durch Akkumulationen sekundärer Mutationen, sondern auch durch Switch der Primärmutationen und somit einem Wechsel des Resistenzpathways erlangt werden konnte. Ein Wechsel der Primärmutation korrelierte dabei mit der Dauer der nicht-suppressiven Therapie.

6.2.2 Therapieversagen einer Dolutegravir-haltigen Erstlinientherapie unter Selektion von resistenten Virusvarianten

Correspondence: Lübke N, Jensen B, Hüttig F, Feldt T, Walker A, Thielen A, Däumer M, Obermeier M, Kaiser R, Knops E, Heger E, Sierra S, Oette M, Lengauer T, Timm J, Häussinger D. Failure of Dolutegravir First-Line ART with Selection of Virus Carrying R263K and G118R. N Engl J Med. 2019 Aug 29;381(9):887-889. doi: 10.1056/NEJMc1806554. PMID: 31461601.

Copyright: Diese Veröffentlichung wurde beim Verlag Massachusetts Medical Society (USA) veröffentlicht. Als Teil der Lizenzvereinbarung ist für Autoren die freie Verwendung aller Inhalte unter Angabe der Originalquelle erlaubt.

Dolutegravir (DTG) ist ein Integrase Inhibitor der zweiten Generation, der bereits 2013 von der FDA und kurze Zeit später (2014) auch von der EMA für die Behandlung sowohl von therapienaiven als auch von therapieerfahrenen HIV-1-Infizierten zugelassen wurde. Im Vergleich zu den INSTIs der ersten Generation, Raltegravir und Elvitegravir, hat Dolutegravir jedoch erhebliche Vorteile. Es hat nicht nur eine verlängerte intrazelluläre Halbwertszeit, was eine einmal tägliche Gabe ohne Boosterung ermöglicht, sondern zeigt zudem nur eine geringe Kreuzresistenz gegenüber Raltegravir und Elvitegravir und eine hohe Resistenzbarriere, sodass Dolutegravir auch bei INSTI-erfahrenen Personen eingesetzt werden kann. Ein virologisches Versagen bei DTG-haltigen Dreifach-Therapieschemata ist ein seltenes Ereignis, über das bisher nur wenige Fälle bei behandlungserfahrenen Personen berichtet wurden [159-161]. Es wird häufig mit dem Auftreten einer R263K-Integrasemutation in Verbindung gebracht, einer Substitution, die eine geringe Resistenz gegen DTG verleiht und die HIV-DNA-Integration und die virale Fitness beeinträchtigt [161]. In klinischen Studien wurden bei der Erstlinientherapie nach 96 oder 148 Wochen keine DTG-Mutationen festgestellt [162-165]. Auch unabhängig von klinischen Studien wurden nur wenige Fälle von Therapieversagen unter DTG-haltigem Regime in der Erstlinientherapie berichtet, wobei die Bedeutung der selektierten Resistenzmutationen noch unklar war [166, 167]. Die geringe Anzahl an Fällen mit Resistenzentwicklung erschwert die Analyse der viralen Evolution unter dem Selektionsdruck von Dolutegravir, was die genaue Untersuchung der Einzelfälle bedeutender macht.

Im Folgenden wird ein Fall von einem virologischen Versagen mit Auftreten der Dolutegravir Resistenz-assoziierten Mutationen R263K und G118R bei einem Therapie-naiven HIV-1-Infizierten unter der ART Emtricitabin (FTC), Tenofovir Disoproxil Fumarat (TDF) und Dolutegravir (DTG) vorgestellt.

Ein 27-jähriger Mann, der Sex mit Männern hat (MSM) und mit HIV-1 Subtyp F infiziert war, wurde mit einer fortgeschrittenen HIV-1-Infektion ins Krankenhaus eingeliefert. Er hatte eine HIV-1 Viruslast von $1,4 \times 10^6$ Kopien/ml, einer CD4 Zellzahl von 22 pro Kubikmillimeter und einer Mycobacterium Tuberkulose-Koinfektion. Die Behandlung mit FTC/TDF und DTG wurde eingeleitet, wobei ein gutes Therapieansprechen, charakterisiert durch einen Abfall der Viruslast um 3 Logstufen innerhalb der 3 Wochen nach dem Krankenhausaufenthalt und eine langsame Erholung der CD4-Zellzahl, beobachtet werden konnte. Disseminierte Tuberkulose, einschließlich tuberkulöser Perikarditis, wurde diagnostiziert, und die Behandlung mit Isoniazid, Rifabutin Ethambutol und Pyrazinamid wurde 1 Woche nach Beginn der ART eingeleitet. Mit der Diagnose eines inflammatorischen Immunrekonstitutionssyndroms (IRIS) wurde die Therapie durch Prednisolon ergänzt.

Nachdem der Patient aus dem Krankenhaus entlassen wurde, stieg seine Viruslast auf 311.894 Kopien/ml, was zunächst als Folge eines Problems mit der Adhärenz interpretiert wurde. Unter Weiterführung der initialen Therapie sank die Viruslast auf etwa 500 Kopien/ml, aber eine virale Suppression unter die Nachweisgrenze (LOD, limit of detection) wurde jedoch nicht erreicht (Abbildung 5A). Bei einer Resistenzanalyse 8 Monate nach Beginn der Therapie wurde die Emtricitabin-Resistenz-assoziierte Mutation M184V und die Dolutegravir-Resistenz assoziierten Mutationen G118R und R263K nachgewiesen. Retrospektive Resistenzanalysen mittels ultratiefer Sequenzierung (NGS) zeigten, dass die detektierten Resistenz-assoziierte Mutationen vor Therapiestart nur mit einer sehr geringen Häufigkeit (<0,2%) vorlagen. In Woche 8, zum Zeitpunkt des ersten viralen Rebounds, war neben der FTC-assoziierten Resistenzmutation M184V (85,8%) auch bereits die DTG-assoziierte Mutation R263K mit einer Häufigkeit von 64,1% nachweisbar. In Woche 15 nach Therapiebeginn konnte zusätzlich noch die DTG-assoziierte Mutation G118R mit einer Häufigkeit von 23,0 % nachgewiesen werden (Abbildung 5B).

Die Beobachtung, dass die DTG-assoziierte Mutationen unter nicht-suppressiver DTG-haltiger Therapie mittels NGS Analyse in unterschiedlichen Häufigkeiten nachgewiesen wurden, deutet auf eine Evolution verschiedener Varianten innerhalb der Quasispezies hin, wie auch bereits bei einer anderen Studie vermutet wurde [168].

Die ART-Medikamentenspiegel waren während der Tuberkulosebehandlung weitestgehend angemessen (Abbildung 5A). In Übereinstimmung mit der Produktbeschreibung von Dolutegravir und früheren Beobachtungen schienen die unzureichenden Dolutegravir-Spiegel in den Wochen 3 und 26 nicht auf Wechselwirkungen mit Rifabutin zurückzuführen zu sein [169].

Nach der Umstellung der Kombinationstherapie auf FTC, TDF, Rilpivirin (RPV) und Ritonavir geboostertes Darunavir (DRV/r) wurde eine stabile Virussuppression erreicht und die Tuberkulose Therapie wurde erfolgreich abgeschlossen.

Zusammenfassend konnte anhand dieses Falles gezeigt werden, dass eine Resistenz gegenüber Dolutegravir auch bei einer Erstlinientherapie auftreten kann, und sollte daher auch bei einem unzureichenden Therapieansprechen in Betracht gezogen werden. Risikofaktoren wie eine Infektion mit einem HIV-1 non-B-Subtyp [168], eine hohe initiale Viruslast und eine niedrige CD4-Zellzahl [170], eine unzureichende Adhärenz der HIV-Infizierten, sowie Koinfektionen welche möglicherweise die Medikamentenspiegel beeinflussen, können die Selektion von Dolutegravir-resistenten Varianten erleichtern und so zu Therapieversagen begünstigen.

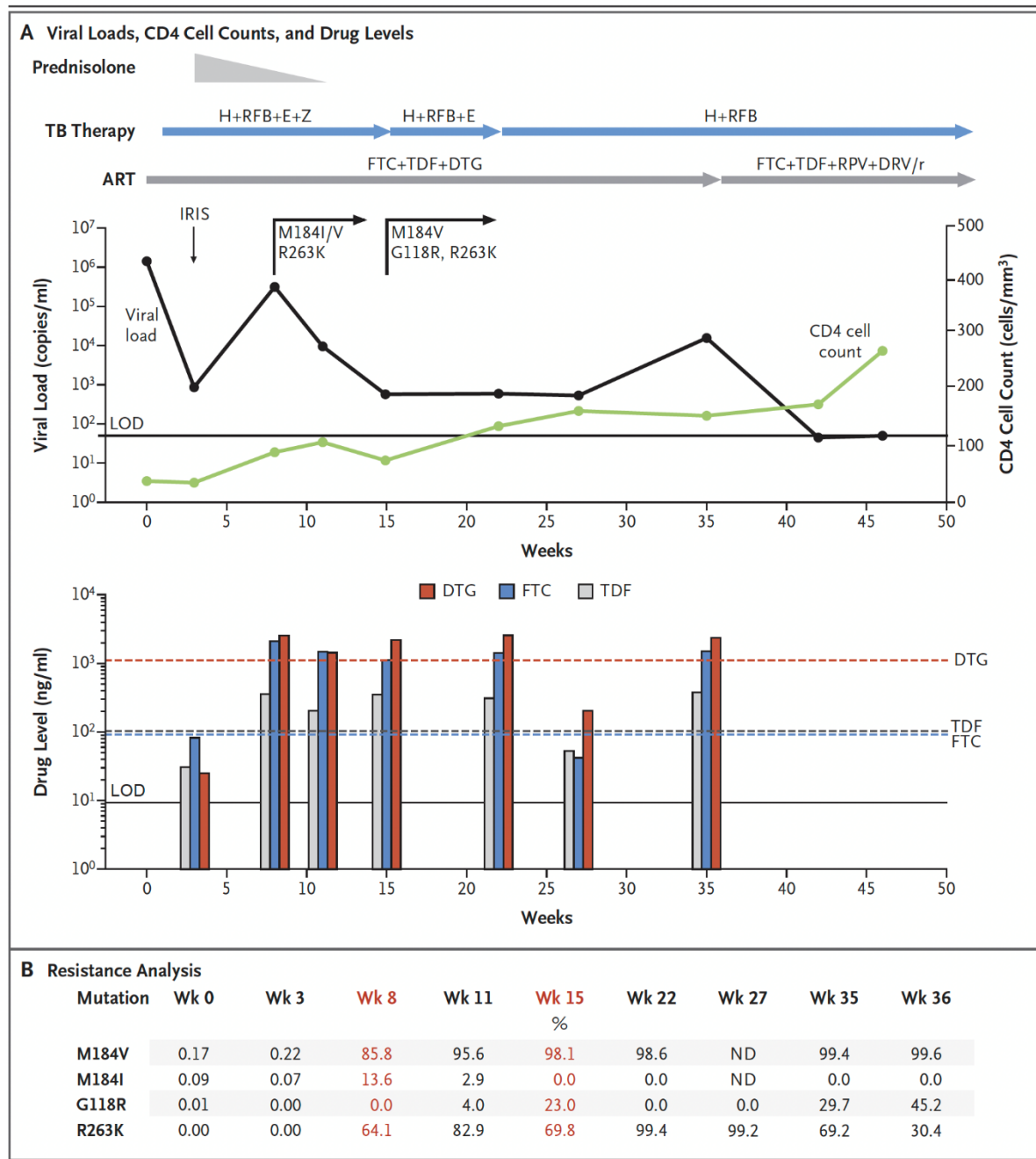


Abbildung 5: Klinischer Verlauf eines Therapieversagens mit einem Dolutegravir-haltigen Regime in der Erstlinientherapie.

A: Verlauf der HIV-1 Viruslast, der Anzahl der CD4-Zellen und der Medikamentenspiegel im Plasma. B: Longitudinale Resistenzanalyse und Quantifizierung der resistenten Virusvarianten mittels ultratiefer Sequenzierung.

Abkürzungen: TB, Tuberkulose; H, Isoniazid; RFB, Rifabutin; E, Ethambutol; Z, Pyrazinamid; Emtricitabin; TDF, Tenofovir Disoproxil Fumarat; DTG, Dolutegravir; RPV, Rilpivirin; DRV/r, Ritonavir geboostertes Darunavir; IRIS, inflammatorisches Immunrekonstitutionssyndrom; LOD, limit of detection (Nachweisgrenze).

6.2.3 Evolution von SARS-CoV-2 Escape Varianten unter Selektionsdruck durch monoklonale Antikörper

Auch bei Infektionen mit SARS-CoV-2 ist mittlerweile eine antivirale Therapie möglich. Eine Indikation ist abhängig von dem Risiko von schweren COVID-19 Verläufen. Für den Einsatz der einzelnen Substanzen sind, neben der richtigen Indikation, der zeitliche Kontext und die Erkrankungsphase entscheidend [171]. Als antivirale Therapeutika stehen neutralisierende monoklonale Antikörper (mAb), welche die Virusaufnahme in die Zelle verhindern, sowie unterschiedliche Virostatika (Polymerase- und Proteaseinhibitoren), die in den viralen Replikationszyklus eingreifen, zur Verfügung. Die klinische Effektivität dieser Substanzen wurde in klinischen Studien bewiesen, die bei Infizierten durch andere Virusvarianten, überwiegend Alpha- und Delta-VOC (variants of concern), als die aktuell vorherrschende Omikron-Variante durchgeführt wurden. Somit kann sich das Ausmaß des klinischen Vorteils bei Infektion mit Omikron-VOC unterscheiden. Den bisherigen Studienergebnissen zufolge senkt der Einsatz von SARS-CoV-2 neutralisierenden monoklonalen Antikörpern bei früher Verabreichung bei Patienten mit hohem Risiko für einen schweren Verlauf die Rate schwerer Verläufe, gemessen an der Notwendigkeit von Vorstellungen in Notaufnahmen und Krankenhausaufnahmen [93, 94, 172, 173].

6.2.3.1 Selektion der E484K Spike Mutation bei SARS-CoV-2-infizierten immunsupprimierten Patienten unter Therapie mit Bamlanivimab

Originalarbeit: Jensen B*, Luebke N*, Feldt T*, Keitel V, Brandenburger T, Kindgen-Milles D, Lutterbeck M, Freise NF, Schoeler D, Haas R, Dilthey A, Adams O, Walker A, Timm J, Luedde T. Emergence of the E484K mutation in SARS-COV-2-infected immunocompromised patients treated with bamlanivimab in Germany. Lancet Reg Health Eur. 2021 Sep;8:100164. doi: 10.1016/j.lanepe.2021.100164. Epub 2021 Jul 14. PMID: 34278371; PMCID: PMC8278033.

*geteilte Erstautorenschaft

Copyright: Die Verwendung des Bildmaterials aus dieser Veröffentlichung erfolgt mit Genehmigung des Verlags Elsevier Ltd. Lizenz ID: 1292737-4.

Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (mAb) hat sich mittlerweile als eine effektive Behandlungsmöglichkeit für frühe SARS-CoV-2-Infektionen herausgestellt. Sie haben das Potenzial, die Komplikationen einer schweren COVID-19-Erkrankung für den einzelnen Patienten zu verhindern und könnten daher dazu beitragen, die Belastung der Gesundheitssysteme zu verringern [174, 175]. Im Vergleich zu früheren Therapieansätzen mit Rekonvaleszenzplasmen haben monoklonale Antikörper mehrere Vorteile. Sie haben eine hohe Bindungsspezifität und Homogenität und eine mögliche Übertragung von Infektionserregern ist ausgeschlossen. In anderen Krankheitskontexten, wie z. B. bei der HIV-Therapie, sind jedoch auch die potenziellen Nachteile monoklonaler Antikörper deutlich geworden, wie z. B. das Entkommen des Immunsystems durch Selektion viraler Escape-Varianten [176]. Auch bei der SARS-CoV-2-Infektion wurden bereits mehrere VOCs identifiziert, welche einen Immun-Escape neutralisierter Antikörper nach Infektion oder Impfung begünstigen, was die Wirksamkeit von Präventions- und Behandlungsstrategien beeinträchtigen kann [177, 178]. Aufgrund pathophysiologischer Bedingungen besteht bei immungeschwächten COVID-19-Patienten ein

erhöhtes Risiko, dass sie keine rasche Viruselimination erreichen, wodurch die Selektion viraler Escape-Mutationen unter Therapiedruck begünstigt wird. Es wurde bereits berichtet, dass virale Persistenz und Evolution von SARS-CoV-2 mit Selektion von Immun-Escape-Mutanten in immunsupprimierten Menschen auftreten kann [178, 179].

In dieser Studie wurde die virale Evolution bei immungeschwächten Patienten mit verzögerter Viruselimination nach Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Bamlanivimab untersucht.

Alle Personen wurden wegen ihres erhöhten individuellen Risikos für eine schwere COVID-19-Infektion wegen einer SARS-CoV-2-Infektion mit Bamlanivimab behandelt. Die SARS-CoV-2 Viruslast wurde vor und nach der Bamlanivimab Behandlung in regelmäßigen Abständen gemessen. Dabei wurden sechs Personen mit verzögerter Viruselimination identifiziert (Tabelle 5). Die verfügbaren SARS-CoV-2-Isolate mit einem nachgewiesenen Ct-Wert von <30 sowohl vor Therapiestart, als auch nach der Bamlanivimab Gabe wurden mittels Ganzgenomsequenzierung analysiert [180]. Die Sequenzierungen erfolgte im Rahmen der Routine Diagnostik, bei der die Sequenzierung mittel Nanopore Technologie und zusätzlicher ARTIC-Pipeline durchgeführt wird. Eine Quantifizierung der Varianten war daher nicht möglich [181].

Tabelle 5: Charakteristika der SARS-CoV-2 Infizierten mit verzögerter Viruselimination.

	Age	Sex	Medical Condition	Immunosuppressive medication	Days post first positive SARS-CoV-2 qPCR at the time of bamlanivimab administration	Immune escape	Viral strain	Outcome
Patient 1	early seventies	male	ANCA-associated vasculitis with end-stage renal disease	rituximab, prednisolon	D2	yes, E484K and E484Q	B.1	Died
Patient 2	early forties	female	AIDS		D3	yes, E484K	B.1.1	Discharge from Hospital
Patient 3	early sixties	male	relapsed follicular lymphoma	obinutuzumab, thiopeta, cytarabine, etoposide	D76	yes, E484K	B.1.177	Discharge from Hospital
Patient 4	late sixties	male	Heart transplant recipient (about 30 years ago)	cyclosporine, azathioprine, prednisolone	D2	yes, E484K	B.1.177	Discharge from Hospital
Patient 5	late sixties	male	Chronic lymphatic leukemia	—	D45	yes, E484K	B.1.258	Discharge from Hospital
Patient 6	mid sixties	female	Kidney transplant recipient (about 2 months ago)	tacrolimus, mycophenolate mofetil, prednisolone	D17	no	B.1.160	Discharge from Hospital

Von sechs schwer immunsupprimierten SARS-CoV-2-Infizierten, die mit Bamlanivimab behandelt wurden, konnten wir bei fünf Personen eine Selektion der E484K Mutation beobachten, welche als Immun-Escape Mutation charakterisiert ist (Abbildung 6). Die E484K-Mutation findet man auch natürlicherweise in verschiedenen VOCs die mit Immun-Escape assoziiert sind, darunter die ursprünglich in Südafrika beschriebene Variante B.1.351 Afrika (WHO-Bezeichnung Beta) und die Varianten P1 (WHO-Bezeichnung Gamma) und P2 (WHO-Kennzeichnung Zeta), die ursprünglich in Brasilien nachgewiesen wurden [182-184]. Zur Untersuchung der lokalen Prävalenz der E484K-Mutation, wurden alle verfügbaren SARS-CoV-2 Ganzgenomsequenzen aus der Düsseldorfer Region gescreent. Dabei zeigte sich, dass nur 3 der 1270 verfügbaren Sequenzen die E484K Mutation aufwiesen welche als B.1.351-Isolate charakterisiert wurden. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass alle Behandelten initial Varianten mit der E484E Wildtyp-Aminosäure aufwiesen, unterstützen unsere Hypothese, dass die E484K Mutation tatsächlich unter dem spezifischen Immundruck von Bamlanivimab bei fünf von sechs Personen mit gestörter humoraler und zellvermittelter Immunität selektiert wurde.

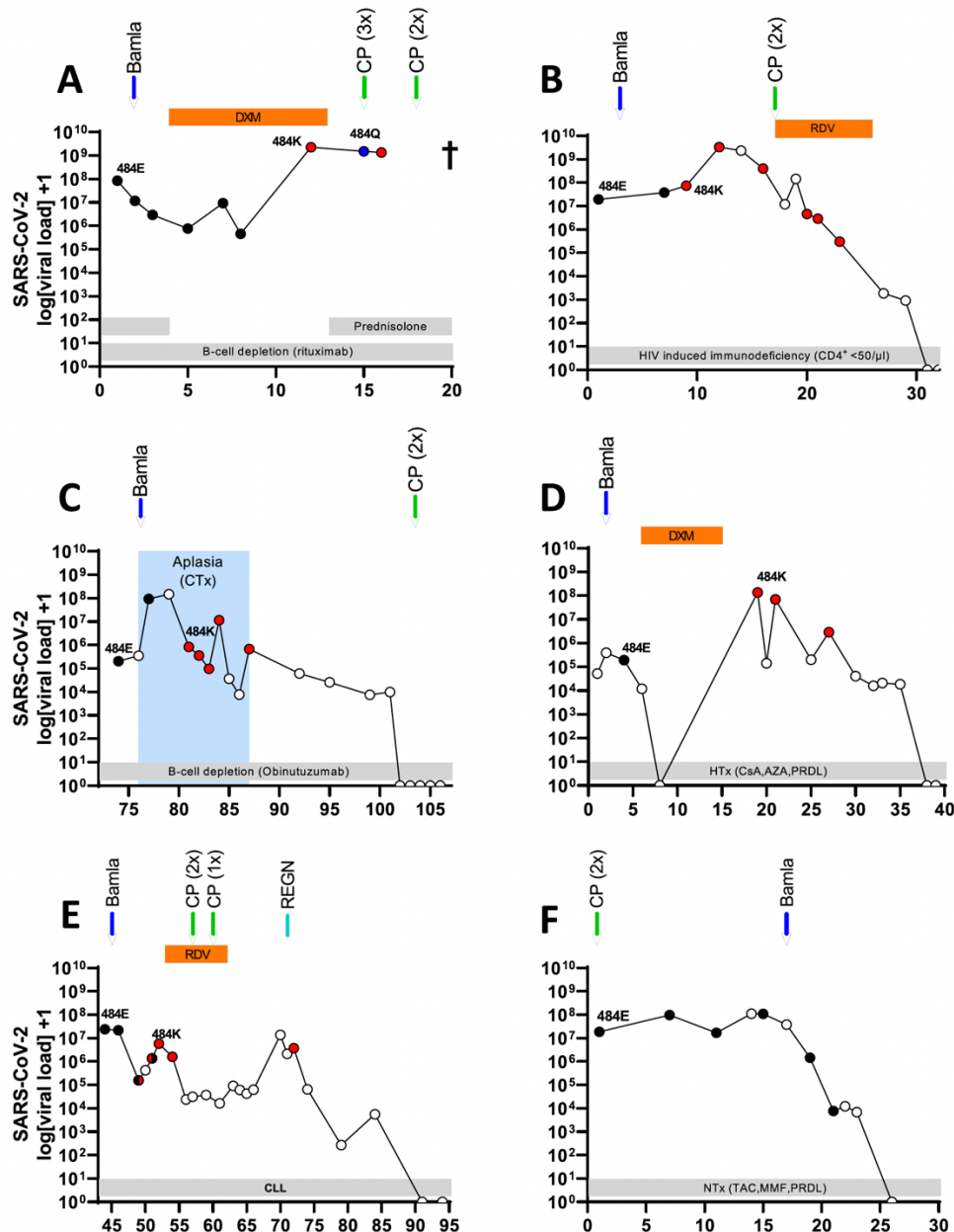


Abbildung 6: Selektion der E484K Mutation nach Bamlanivimab Therapie bei SARS-CoV-2 infizierten Personen mit schwerer Immunsuppression.

(A) Patient 1 mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis und ausgeprägter Immunsuppression; (B) Patient 2 mit schwerer HIV-assoziiierter Immunsuppression; (C) Patient 3 mit follikulärem Lymphom und schwerer Immunsuppression aufgrund einer hochdosierten Chemotherapie; (D) Patient 4 mit schwerer Immunsuppression aufgrund einer Herztransplantation; (E) Patient 5 mit schwerer Immunsuppression aufgrund von chronischer lymphatischer Leukämie; (F) Patient 6 mit schwerer Immunsuppression aufgrund einer Nierentransplantation. Bamla, Bamlanivimab; CP, Rekonvaleszenzplasma; RDV, Remdesivir; REGN, REGN COV2, Casirivimab/Imdevimab; CTx, Chemotherapie; HTx Herztransplantation; PRDL, Prednisolon; DXM, Dexamethason; MMF, Mycophenolatmofetil; TAC, Tacrolimus; CsA, Cyclosporin A; AZA, Azathioprin; CLL, chronische lymphatische Leukämie; E484K, Substitution in der rezeptorbindenden Domäne (RBD), die mit Immunflucht assoziiert ist. Die Zeitpunkte sind entsprechend ihrer Abfolge farblich kodiert. Weiß, nicht bestimmt; schwarz, 484E; rot, 484K; blau, 484Q.

In einer Studie von Gottlieb und KollegInnen wurde das Auftreten von Escape-Mutanten (E484K; E484Q; F490S und S494P) bei 28/297 (9,4%) Personen nach Bamlanivimab-Monotherapie, und sogar bei 7/145 (4,8%) der Personen, die in der Phase-2/3-Studie BLAZE-1 ein Placebo erhielten, berichtet [174]. Die Tatsache, dass in unserer Kohorte von schwer Immunsupprimierten die E484K in einem viel höheren Prozentsatz (5/6; 83,3%) detektiert wurde, deutet auf ein deutlich höheres Risiko eines viralen

Immun-Escapes bei dieser Patientengruppe hin. Während der genaue Grund für das vermehrte Auftreten von Immun-Escape-Mutanten vorwiegend bei Immunsupprimierten unklar ist, ist es wahrscheinlich, dass die anhaltende Beeinträchtigung der humoralen und zellulären Immunkontrolle bei diesen Personen zu verlängerten Intervallen der viralen Replikation führt. Diese verlängerte Replikationsdauer erhöht somit die Wahrscheinlichkeit einer Selektion von Escape-Varianten.

Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass der einzige schwer immunsupprimierte Patient ohne viralen Rebound zuvor mit Rekonvaleszenzplasmen behandelt worden war (Abbildung 6F) und somit eigentlich keine mAb-Monotherapie erhalten hatte. Eine Kombination von zwei oder mehr mAbs oder polyklonale Antisera können daher die genetische Barriere ausreichend erhöhen, um ein Immun-Escape weitgehend zu verhindern, wie auch von anderen Virusinfektionen bekannt [185].

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Behandlung von SARS-CoV-2 Infektion mit Bamlanivimab bei Immunsupprimierten in einem erheblichen Anteil der Fälle zur raschen Entwicklung von Immun-Escape-Varianten führte. Da die E484K-Mutation die natürliche Immunität, die Wirksamkeit von Impfungen und antikörperbasierten Therapien beeinträchtigen kann, könnten diese Ergebnisse nicht nur für individuelle Behandlungsentscheidungen von Bedeutung sein, sondern auch eine Gefahr für allgemeine Präventions- und Behandlungsstrategien darstellen.

6.2.3.2 Selektion von Sotrovimab-Escape-Varianten bei immunsupprimierten Personen mit SARS-CoV-2 Omicron Infektion

Originalarbeit: Gliga S*, Lübke N*, Killer A*, Gruell H, Walker A, Dilthey AT, Thielen A, Lohr C, Flaßhove C, Krieg S, Ventura Pereira J, Seraphin TP, Zaufel A, Däumer M, Orth HM, Feldt T, Bode JG, Klein F, Timm J, Luedde T, Jensen BO. Rapid selection of sotrovimab escape variants in SARS-CoV-2 Omicron infected immunocompromised patients. Clin Infect Dis. 2022 Oct 3:ciac802. doi: 10.1093/cid/ciac802. Epub ahead of print. PMID: 36189631; PMCID: PMC9619606.

*geteilte Erstautorenschaft

Copyright: Diese Veröffentlichung wurde beim Verlag Oxford University Press veröffentlicht. Als Teil der Lizenzvereinbarung ist für Autoren die freie Verwendung aller Inhalte unter Angabe der Originalquelle erlaubt.

Während der SARS-CoV-2 Pandemie haben zahlreiche Studien gezeigt, dass Behandlungsoptionen, die direkt auf SARS-CoV-2 abzielen, in der frühen Phase der Coronaviruserkrankung 2019 (COVID-19) am erfolgreichsten sind, während in den späten Phasen von COVID-19 mit Lungenentzündung und Hyperinflammation die Immunmodulation das wichtigste therapeutische Prinzip ist. Mehrere monoklonale Antikörper (mAbs), die auf SARS-CoV-2 abzielen, wie z. B. Bamlanivimab/Etesevimab oder Casirivimab/Imdevimab, sind seit Ende 2020 verfügbar und wurden in der Frühphase von COVID-19 erfolgreich eingesetzt, um das Fortschreiten der Krankheit bei Hochrisikopatienten zu verhindern [186]. Mit dem Auftreten der weiterhin dominierenden Omicron-Variante im November 2021 wurde ein deutlicher Anstieg der Infektionsraten beobachtet. Dies ging einher mit einem Verlust der *In-vitro*-Aktivität der bis dahin gebräuchlichen mAb-Kombination Casirivimab/Imdevimab, da die Zielregionen im Spike-Protein durch mehrere Mutationen verändert waren [95]. Im Januar 2022 wurde Sotrovimab in Deutschland verfügbar. Es war eines der wenigen mAbs, die sich als wirksam gegen die Omicron-

Variante erwiesen hat und stellte damit eine vielversprechende Behandlungsoption für eine frühe SARS-CoV-2-Infektion dar [90, 102, 172]. Diese Studien schlossen jedoch keine schwer Immunsupprimierte ein, wie z. B. Empfänger von soliden Organtransplantaten (SOT). Fallserien sowie zwei Kohortenstudien untersuchten die Wirksamkeit und Sicherheit von Sotrovimab bei SOT-Patienten im Rahmen von Omicron und berichteten über eine Verringerung der Krankheitsschwere [187, 188]. Wie jedoch bereits in der oben gezeigten Studie beobachtet wurde, besteht besonders bei immungeschwächten SARS-CoV-2 Infizierten ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Escape Mutationen im Spike-Protein unter Monotherapie mit einem mAb [189]. Auch nach einer Sotrovimab Therapie wurde bereits über eine virale Persistenz und Mutationen im Spike berichtet, wobei jedoch die Risikofaktoren noch weitgehend unklar waren [190, 191].

Um mögliche Risikofaktoren für eine verzögerte Viruselimination nach Sotrovimab Therapie zu identifizieren, wurde in dieser Studie der Verlauf der SARS-CoV-2 Infektionen bei Personen mit einem erhöhten Risiko von schweren COVID-19 Verläufen und mit Sotrovimab behandelt wurden analysiert. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung der viralen Evolution unter Sotrovimab Therapie und der vermutlich damit assoziierten Selektion von Immun-Escape Mutationen.

Dafür wurden insgesamt 57 mit Omicron-Varianten infizierte Personen, die Sotrovimab allein oder in Kombination mit Remdesivir erhielten, beobachtet. Die Endpunkte der Studie waren ein Rückgang der SARS-CoV-2-RNA $<10^6$ Kopien/ml in Nasopharyngealabstrichen am Tag 21 und das Auftreten von Escape-Mutationen am Tag 7, 14 und 21 nach der Verabreichung von Sotrovimab. Eine verzögerte SARS-CoV-2 Elimination war definiert als eine persistierende SARS-CoV-2 RNA-Konzentration über 10^6 Kopien/ml 21 Tage nach Verabreichung von Sotrovimab. Alle SARS-CoV-2-Proben wurden mittels Ganzgenomsequenzierung analysiert. Einzelne Varianten innerhalb der Quasispezies wurden anschließend quantifiziert und mithilfe eines Pseudovirus-Neutralisationstests weiter charakterisiert.

Der Großteil der behandelten Personen (43 von 57, 75,4 %) war immundefizient, vor allem aufgrund von Immunsuppression nach Organtransplantationen oder hämatologischen Malignomen. Einundzwanzig Tage nach der Verabreichung von Sotrovimab wiesen 12 von 43 (27,9 %) immundefizienten Personen eine verlängerte Virusausscheidung auf, verglichen mit 1 von 14 (7,1 %) Immunkompetenten ($p=0,011$). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Immunsupprimierte ein signifikant erhöhtes Risiko für eine virale Persistenz, auch unter Therapie mit mABs aufweisen, wie auch bereits in unserer Bamlanivimab Studie beobachtet wurde [189].

Um die Evolution der Virusvarianten unter Sotrovimab zu untersuchen, wurden alle verfügbaren Virusproben mit einer Viruslast $>10^6$ Kopien/ml mittels Ganzgenom-Nanopore Sequenzierung analysiert. Dabei wurden keine Escape-Mutationen bei Immunkompetenten, sondern ausschließlich bei Immundefizienten detektiert (14 von 43, 32,6 %), von denen die meisten eine verlängerte Virusausscheidung aufwiesen. Die Kombinationstherapie mit Remdesivir hingegen reduzierte das Auftreten von Escape-Varianten erheblich (Daten nicht gezeigt). Für eine genauere Charakterisierung der Escape-Varianten wurden die Proben mit nachgewiesenen Escape-Mutationen und dazugehörige Baseline Proben mittels quantitativer Illumina-Sequenzierung weiter analysiert.

Während vor der Sotrovimab Gabe keine Sotrovimab-assoziierten Escape Mutationen detektiert wurden, konnten bei fünf Immunsupprimierten bereits an Tag 7 nach Sotrovimab Therapie Escape-Mutationen nachgewiesen werden. Am Tag 14 wurden dann bei 13/14 (92,9%) Immunsupprimierten Escape-Mutationen detektiert (Abbildung 7).

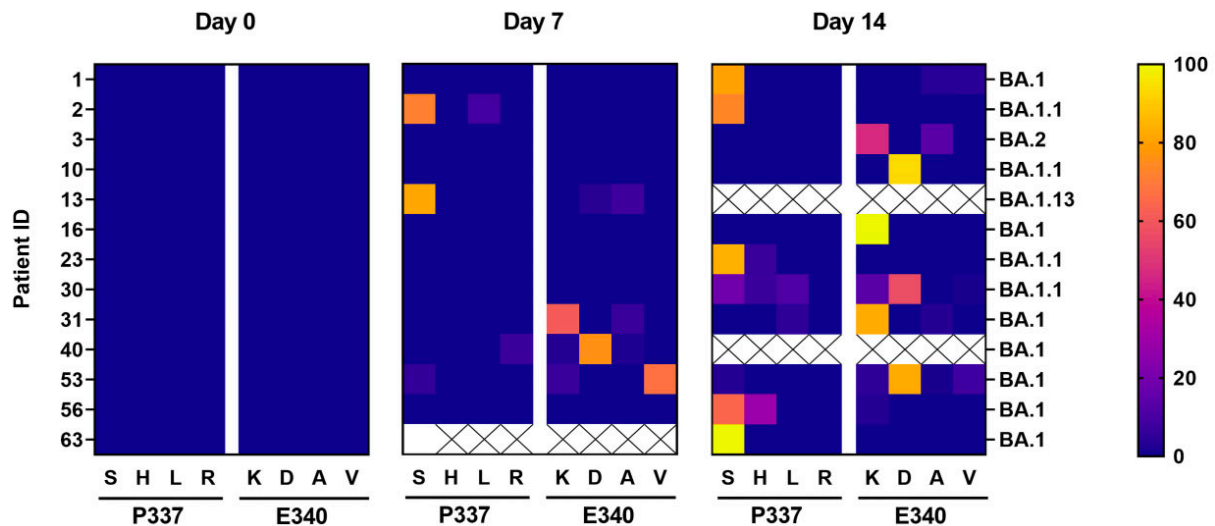


Abbildung 7: Prävalenz und Evolution von Escape-Mutationen im Spike-Protein von SARS-CoV-2 nach Behandlung mit Sotrovimab.

Detektierte Aminosäureaustausche im Spike-Protein an den Positionen 337 und 340 an Tag 0, Tag 7 und Tag 14 nach Sotrovimab Infusion. Die Frequenz der nachgewiesenen Varianten in % wird durch die Farbskala angezeigt. Die durch Sequenzanalyse ermittelten SARS-CoV-2 Omicron Varianten ist dargestellt. Es werden nur Patienten angezeigt, bei denen nach der Sotrovimab-Behandlung eine Mutation nachgewiesen wurde. Personen, bei denen erst nach Tag 14 eine Spike-Protein-Mutation selektiert wurde, sind in dieser Abbildung nicht enthalten (Patient ID 51).

Alle detektierten Escape-Mutationen wurden ausschließlich an den Positionen 337 oder 340 im Spike-Protein nachgewiesen, wie auch bereits in einer Australischen Kohorte bei Delta Infektionen nach Sotrovimab Gabe beobachtet wurde [192]. Am häufigsten wurden in unserer Kohorte mit Omicron Infektionen die Mutationen P337S (n=8), E340K (n=9) und E340D (n=5) detektiert. Diese Aminosäureaustausche unterscheiden sich jedoch von anderen Beobachtungen. Bei der Genomsequenzierung von Proben aus der COMET-ICE-Studie wurden bei 20 Patienten Sotrovimab-Escape-Mutationen nachgewiesen. Dabei zeigten die P337L, E340A und E340K eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Sotrovimab in Pseudovirus Neutralisationsassays [172, 193]. In der von Rockett et al. veröffentlichten Studie entwickelten 8 von 100 Personen eine der folgenden Mutationen, E340A/K/V oder P337L, kombiniert mit der E340-Mutation, die 6-13 Tage nach der Verabreichung von Sotrovimab auftrat [194]. Die Selektion der Aminosäure scheint demnach mit der SARS-CoV-2 Variante zusammenzuhängen. Während die P337L und E340A primär in Delta-Varianten selektiert wurden, konnten wir in den Omicron-Varianten andere Aminosäuren an denselben Positionen nachweisen, vor allem P337S/R und E340D/K, wie auch in anderen Studien berichtet wurde [190, 191].

Darüber hinaus wurden während unseres Beobachtungszeitraums von bis zu 28 Tagen die Aminosäuresubstitutionen P337H/L und E340A/V nachgewiesen. Dabei wurde nicht nur eine Zunahme der Escape-Varianten (z. B. Patienten 2, 31, 53), sondern auch ein Switch der Aminosäuren beobachtet, z. B. Patient 10, E340D (d21) zu E340K (d28) (Daten nicht gezeigt) und Patient 53, E340V (d7) zu E340D (d14), wie auch bei Delta Infektionen beobachtet wurde [194].

Um den Effekt der nachgewiesenen Sotrovimab-spezifischen Escape-Mutationen auf die Empfindlichkeit gegenüber Sotrovimab zu untersuchen, wurden die an Tag 7 detektierten Mutationen P337S, E340D/K/V im BA.1- und BA.2 Omicron-Hintergrund mit Hilfe eines Pseudovirus-Neutralisationstests analysiert (Abbildung 8).

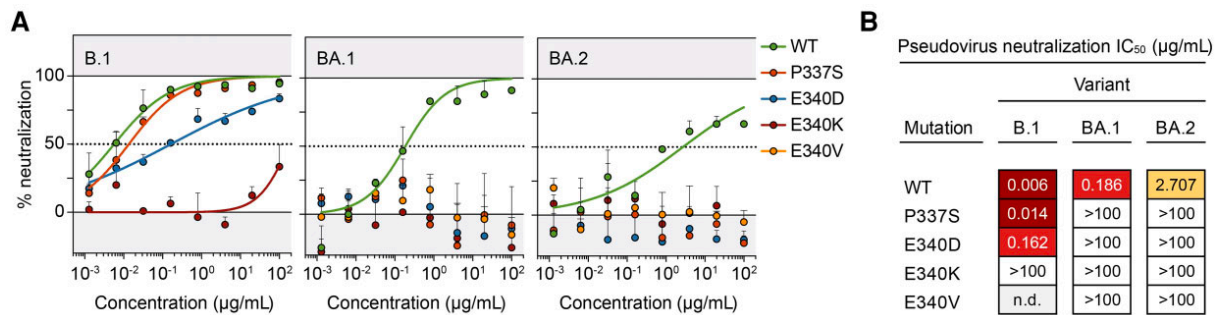


Abbildung 8: Neutralisierung von SARS-CoV-2 Spike-Mutanten durch Sotrovimab.

A, SARS-CoV-2 variantenspezifische Pseudoviren mit Mutationen, die nach der Behandlung mit Sotrovimab auftraten, wurden in Sotrovimab-Neutralisierungstests analysiert. Alle Proben wurden in Duplikaten getestet. Symbole und Balken geben den Mittelwert bzw. die Standardabweichung an. Die ermittelten IC_{50} -Werte sind in (B) dargestellt. Abkürzungen: IC_{50} , halbe maximale Hemmkonzentration.

Während im B.1-Hintergrund (SARS-CoV-2 Variante von Anfang 2020 [195]) nur die E340K und E340D Mutationen eine reduzierte Neutralisationsaktivität durch Sotrovimab (IC_{50} , >100 $\mu\text{g/mL}$ bzw. IC_{50} , 0,162 $\mu\text{g/mL}$) induzierten, hoben alle anderen untersuchten Mutationen die Neutralisationsaktivität von Sotrovimab, sowohl im BA.1- und BA.2-Hintergrund vollständig auf (IC_{50} , >100 $\mu\text{g/mL}$). Diese Daten zeigen deutlich, dass nicht nur die Escape-Mutation selbst, sondern auch der breitere genetische Hintergrund des Spike-Proteins die Auswirkungen einer spezifischen Escape-Mutation auf die Wirksamkeit von mAbs beeinflusst, wie dies in mehreren Wirksamkeitsstudien für mAbs beobachtet wurde [196, 197].

Zusammenfassend zeigte diese Studie, dass immundefiziente im Vergleich zu immunkompetenten SARS-CoV-2-infizierte Personen nach der Behandlung mit Sotrovimab eine deutlich längere Virusausscheidung aufwiesen, was mit einer Selektion von zum Teil Omicron-spezifischen Escape Varianten einherging. Eine Komedikation mit Remdesivir reduzierte das Risiko eines Immun-Escapes. Diese Ergebnisse bestärken die Beobachtung, dass immungeschwächte Personen ein erhöhtes Risiko für die Selektion von Immun-Escape Mutationen haben, und daher eine mAb Monotherapie in dieser Patientengruppe vermieden werden sollte.

7 Literaturverzeichnis

1. Sanjuan R, Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol Life Sci* **2016**; 73(23): 4433-48.
2. Modrow S, Truyen U, Schätzl H. Die Evolution der Viren. *Molekulare Virologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, **2021**:139-44.
3. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**; 220(4599): 868-71.
4. Gallo RC. HIV-1: a look back from 20 years. *DNA Cell Biol* **2004**; 23(4): 191-2.
5. Gallo RC, Montagnier L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *The New England journal of medicine* **2003**; 349(24): 2283-5.
6. Weiss RA. How does HIV cause AIDS? *Science* **1993**; 260(5112): 1273-9.
7. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol* **2012**; 10(4): 279-90.
8. Peeters M, Jung M, Ayoub A. The origin and molecular epidemiology of HIV. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2013**; 11(9): 885-96.
9. Easterbrook PJ, Smith M, Mullen J, et al. Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *J Int AIDS Soc* **2010**; 13: 4.
10. Siemieniuk RA, Beckthold B, Gill MJ. Increasing HIV subtype diversity and its clinical implications in a sentinel North American population. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **2013**; 24(2): 69-73.
11. RKI. HIV-Infektion/AIDS. Available at: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HIV_AIDS.html;jsessionid=0BF5925F4FA7F629111302308DA6EF76.internet051#doc2374480bodyText6.
12. NIH. The Stages of HIV-Infection. Available at: <https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/factsheets/stages-hiv-infection>.
13. Yarchoan R, Broder S. Development of antiretroviral therapy for the acquired immunodeficiency syndrome and related disorders. A progress report. *The New England journal of medicine* **1987**; 316(9): 557-64.
14. Craigie R, Bushman FD. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**; 2(7): a006890.
15. Hindmarsh P, Leis J. Retroviral DNA integration. *Microbiol Mol Biol Rev* **1999**; 63(4): 836-43, table of contents.
16. Metifiot M, Marchand C, Pommier Y. HIV integrase inhibitors: 20-year landmark and challenges. *Adv Pharmacol* **2013**; 67: 75-105.
17. Stribild® [package insert]. Foster City, CA Gilead Sciences, Inc 1 2019.
18. Anstett K, Brenner B, Mesplede T, Wainberg MA. HIV drug resistance against strand transfer integrase inhibitors. *Retrovirology* **2017**; 14(1): 36.
19. Malet I, Delelis O, Valantin MA, et al. Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52(4): 1351-8.
20. EMA. Tivicay received a marketing authorisation valid throughout the EU on 16 January 2014. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tivicay>.
21. EMA. Biktarvy received a marketing authorisation valid throughout the EU on 21 June 2018. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/biktarvy>.
22. Llibre JM, Clotet B. [Resistance profile and genetic barrier of dolutegravir]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica* **2015**; 33 Suppl 1: 20-5.
23. Tsiang M, Jones GS, Goldsmith J, et al. Antiviral Activity of Bictegravir (GS-9883), a Novel Potent HIV-1 Integrase Strand Transfer Inhibitor with an Improved Resistance Profile. *Antimicrob Agents Chemother* **2016**; 60(12): 7086-97.

24. DAIG. Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-1-Infektion. **2020**.
25. EACS. EACS Leitlinien 2019. Available at: https://www.eacsociety.org/files/guidelines-10.0_final_german.pdf.
26. Cabenuva® and Vocabria® [Product Monograph]. Laval, Quebec Viiv Healthcare ULC 3 2020. .
27. Vocabria [package insert]. Research Triangle Park, NC; ViiV; January 2021. .
28. Larder B. Mechanisms of HIV-1 drug resistance. *Aids* **2001**; 15 Suppl 5: S27-34.
29. WHO. HIV drug resistance. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-drug-resistance>.
30. UNAIDS. HIV and drug resistance, **2016**.
31. Machnowska P, Meixenberger K, Schmidt D, et al. Prevalence and persistence of transmitted drug resistance mutations in the German HIV-1 Seroconverter Study Cohort. *PloS one* **2019**; 14(1): e0209605.
32. Miranda MNS, Pingarilho M, Pimentel V, et al. Trends of Transmitted and Acquired Drug Resistance in Europe From 1981 to 2019: A Comparison Between the Populations of Late Presenters and Non-late Presenters. *Front Microbiol* **2022**; 13: 846943.
33. Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *The New England journal of medicine* **2004**; 350(10): 1023-35.
34. Beerenwinkel N, Daumer M, Sing T, et al. Estimating HIV evolutionary pathways and the genetic barrier to drug resistance. *The Journal of infectious diseases* **2005**; 191(11): 1953-60.
35. Lubber AD. Genetic barriers to resistance and impact on clinical response. *J Int AIDS Soc* **2005**; 7(3): 69.
36. van de Vijver DA, Wensing AM, Angarano G, et al. The calculated genetic barrier for antiretroviral drug resistance substitutions is largely similar for different HIV-1 subtypes. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* **2006**; 41(3): 352-60.
37. De Luca A. The impact of resistance on viral fitness and its clinical implications. In: AM G. *Antiretroviral Resistance in Clinical Practice*. London: Mediscript, **2006**.
38. Delaugerre C, Flandre P, Chaix ML, et al. Protease inhibitor resistance analysis in the MONARK trial comparing first-line lopinavir-ritonavir monotherapy to lopinavir-ritonavir plus zidovudine and lamivudine triple therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53(7): 2934-9.
39. Garcia-Gasco P, Maida I, Blanco F, et al. Episodes of low-level viral rebound in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: frequency, predictors and outcome. *J Antimicrob Chemother* **2008**; 61(3): 699-704.
40. Wilson JW. Update on antiretroviral drug resistance testing: combining laboratory technology with patient care. *AIDS Read* **2003**; 13(1): 25-30, 5-8.
41. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **1973**; 22(23): 3099-108.
42. Hirsch MS, Brun-Vezinet F, D'Aquila RT, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* **2000**; 283(18): 2417-26.
43. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1977**; 74(12): 5463-7.
44. Casadella M, Paredes R. Deep sequencing for HIV-1 clinical management. *Virus Res* **2017**; 239: 69-81.
45. Stella-Ascariz N, Arribas JR, Paredes R, Li JZ. The Role of HIV-1 Drug-Resistant Minority Variants in Treatment Failure. *The Journal of infectious diseases* **2017**; 216(suppl_9): S847-S50.
46. Gibson RM, Schmotzer CL, Quinones-Mateu ME. Next-Generation Sequencing to Help Monitor Patients Infected with HIV: Ready for Clinical Use? *Curr Infect Dis Rep* **2014**; 16(4): 401.
47. Tzou PL, Ariyaratne P, Varghese V, et al. Comparison of an In Vitro Diagnostic Next-Generation Sequencing Assay with Sanger Sequencing for HIV-1 Genotypic Resistance Testing. *Journal of clinical microbiology* **2018**; 56(6).

48. Inzaule SC, Hamers RL, Noguera-Julian M, et al. Clinically relevant thresholds for ultrasensitive HIV drug resistance testing: a multi-country nested case-control study. *The lancet HIV* **2018**; 5(11): e638-e46.
49. Ji H, Li Y, Graham M, et al. Next-generation sequencing of dried blood spot specimens: a novel approach to HIV drug-resistance surveillance. *Antiviral therapy* **2011**; 16(6): 871-8.
50. Lapointe HR, Dong W, Lee GQ, et al. HIV drug resistance testing by high-multiplex "wide" sequencing on the MiSeq instrument. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 59(11): 6824-33.
51. Derache A, Iwuji CC, Baisley K, et al. Impact of Next-generation Sequencing Defined Human Immunodeficiency Virus Pretreatment Drug Resistance on Virological Outcomes in the ANRS 12249 Treatment-as-Prevention Trial. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2019**; 69(2): 207-14.
52. Fisher RG, Smith DM, Murrell B, et al. Next generation sequencing improves detection of drug resistance mutations in infants after PMTCT failure. *J Clin Virol* **2015**; 62: 48-53.
53. Jennings C, Parkin NT, Zaccaro DJ, et al. Application of a Sanger-Based External Quality Assurance Strategy for the Transition of HIV-1 Drug Resistance Assays to Next Generation Sequencing. *Viruses* **2020**; 12(12).
54. Lee ER, Parkin N, Jennings C, et al. Performance comparison of next generation sequencing analysis pipelines for HIV-1 drug resistance testing. *Sci Rep* **2020**; 10(1): 1634.
55. WHO. COVID-19 - China, **2020**.
56. WHO. Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID19 -March 2020.
57. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **2019**; 17(3): 181-92.
58. Laue M, Kauter A, Hoffmann T, Moller L, Michel J, Nitsche A. Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. *Sci Rep* **2021**; 11(1): 3515.
59. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol* **2015**; 1282: 1-23.
60. Enjuanes L, Smerdou C, Castilla J, et al. Development of protection against coronavirus induced diseases. A review. *Adv Exp Med Biol* **1995**; 380: 197-211.
61. Liu L, Wang P, Nair MS, et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature* **2020**; 584(7821): 450-6.
62. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *The New England journal of medicine* **2021**; 384(5): 403-16.
63. Heath PT, Galiza EP, Baxter DN, et al. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *The New England journal of medicine* **2021**; 385(13): 1172-83.
64. Heo YA. Sotrovimab: First Approval. *Drugs* **2022**; 82(4): 477-84.
65. Kuritzkes DR. Bamlanivimab for Prevention of COVID-19. *JAMA* **2021**; 326(1): 31-2.
66. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *The New England journal of medicine* **2020**; 383(27): 2603-15.
67. Bouvet M, Imbert I, Subissi L, Gluais L, Canard B, Decroly E. RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**; 109(24): 9372-7.
68. Gupta R. SARS-CoV-2 Omicron spike mediated immune escape and tropism shift. *Res Sq* **2022**.
69. Willett BJ, Grove J, MacLean OA, et al. SARS-CoV-2 Omicron is an immune escape variant with an altered cell entry pathway. *Nat Microbiol* **2022**; 7(8): 1161-79.
70. Cameroni E, Bowen JE, Rosen LE, et al. Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Omicron antigenic shift. *Nature* **2022**; 602(7898): 664-70.
71. Mensah AA, Lacy J, Stowe J, et al. Disease severity during SARS-COV-2 reinfection: a nationwide study. *J Infect* **2022**; 84(4): 542-50.
72. Pulliam JRC, van Schalkwyk C, Govender N, et al. Increased risk of SARS-CoV-2 reinfection associated with emergence of Omicron in South Africa. *Science* **2022**; 376(6593): eabn4947.

73. Charre C, Ginevra C, Sabatier M, et al. Evaluation of NGS-based approaches for SARS-CoV-2 whole genome characterisation. *Virus Evol* **2020**; 6(2): veaa075.
74. To KK, Hung IF, Ip JD, et al. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Re-infection by a Phylogenetically Distinct Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Strain Confirmed by Whole Genome Sequencing. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2021**; 73(9): e2946-e51.
75. consortiumcontact@cogconsortium.uk C-GU. An integrated national scale SARS-CoV-2 genomic surveillance network. *Lancet Microbe* **2020**; 1(3): e99-e100.
76. Lambisia AW, Mohammed KS, Makori TO, et al. Optimization of the SARS-CoV-2 ARTIC Network V4 Primers and Whole Genome Sequencing Protocol. *Front Med (Lausanne)* **2022**; 9: 836728.
77. NEB. NEBNext® ARTIC products for SARS-CoV-2 sequencing. Available at: <https://international.neb.com/applications/ngs-sample-prep-and-target-enrichment/nebnext-artic-products-for-sars-cov-2-sequencing>.
78. RKI. Epidemiologischer Steckbrief zu SARS-CoV-2 und COVID-19. Available at: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Steckbrief.html.
79. Aydillo T, Gonzalez-Reiche AS, Aslam S, et al. Shedding of Viable SARS-CoV-2 after Immunosuppressive Therapy for Cancer. *The New England journal of medicine* **2020**; 383(26): 2586-8.
80. Koff AG, Laurent-Rolle M, Hsu JC, Malinis M. Prolonged incubation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in a patient on rituximab therapy. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2021**; 42(10): 1286-8.
81. STAKOB. Hinweise zu Erkennung, Diagnostik und Therapie von Patienten mit COVID-19. **2022**.
82. COVRIIN. Antivirale Therapie in der Frühphase einer SARS-CoV-2-Infektion. Available at: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/COVRIIN_Dok/Antivirale_Therapie_Fruehphase.pdf?__blob=publicationFile.
83. Ganatra S, Dani SS, Ahmad J, et al. Oral Nirmatrelvir and Ritonavir in Non-hospitalized Vaccinated Patients with Covid-19. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2022**.
84. Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, et al. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. *The New England journal of medicine* **2022**; 386(4): 305-15.
85. Hammond J, Leister-Tebbe H, Gardner A, et al. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. *The New England journal of medicine* **2022**; 386(15): 1397-408.
86. Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, et al. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *The New England journal of medicine* **2022**; 386(6): 509-20.
87. Butler CaH, F.D. Richard and Gbinigie, Oghenekome and Rahman, Najib M. and Hayward, Gail and Richards, Duncan and Dorward, Jienchi and Lowe, David and Standing, Joseph F. and Breuer, Judith and Khoo, Saye and Petrou, Stavros and Hood, Kerenza and Nguyen-Van-Tam, Jonathan S. and Patel, Mahendra and Saville, Benjamin R. and Marion, Joe and Ogburn, Emma and Allen, Julie and Rutter, Heather and Francis, Nick and Thomas, Nicholas and Evans, Philip and Dobson, Melissa and Madden, Tracie-Ann and Holmes, Jane and Harris, Victoria and Png, May Ee and Lown, Mark and van Hecke, Oliver and Detry, Michelle and Saunders, Christina and Fitzgerald, Mark and Berry, Nicholas and Mwandigha, Lazaro and Galal, Ushma and Jani, Bhautesh and Hart, Nigel and Butler, Daniel and Chalk, Jeremy and Lavallee, Layla and Hadley, Elizabeth and Cureton, Lucy and Benysek, Magdalena and Andersson, Monique and Coates, Maria and Barrett, Sarah and Bateman, Clare and Davies, Jennifer and Raymundo-Wood, Ivy and Ustianowski, Andrew and Carson-Stevens, Andrew and Yu, Ly-Mee and Little, Paul, Molnupiravir Plus Usual Care Versus Usual Care Alone as Early Treatment for Adults with COVID-19 at Increased Risk of Adverse Outcomes (PANORAMIC). Preliminary Analysis from the United Kingdom Randomised, Controlled Open-Label, Platform Adaptive Trial SSRN **2022**.
88. Vangeel L, Chiu W, De Jonghe S, et al. Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern. *bioRxiv* **2022**: 2021.12.27.474275.

89. Wong CKH, Au ICH, Lau KTK, Lau EHY, Cowling BJ, Leung GM. Real-world effectiveness of early molnupiravir or nirmatrelvir-ritonavir in hospitalised patients with COVID-19 without supplemental oxygen requirement on admission during Hong Kong's omicron BA.2 wave: a retrospective cohort study. *The Lancet Infectious diseases* **2022**; 22(12): 1681-93.
90. Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, et al. Effect of Sotrovimab on Hospitalization or Death Among High-risk Patients With Mild to Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *Jama* **2022**; 327(13): 1236-46.
91. Sidebottom DB, Gill D. Ronapreve for prophylaxis and treatment of covid-19. *BMJ* **2021**; 374: n2136.
92. Takashita E, Yamayoshi S, Halfmann P, et al. In Vitro Efficacy of Antiviral Agents against Omicron Subvariant BA.4.6. *The New England journal of medicine* **2022**.
93. Dougan M, Nirula A, Azizad M, et al. Bamlanivimab plus Etesevimab in Mild or Moderate Covid-19. *The New England journal of medicine* **2021**; 385(15): 1382-92.
94. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, et al. REGEN-COV Antibody Combination and Outcomes in Outpatients with Covid-19. *The New England journal of medicine* **2021**; 385(23): e81.
95. Hoffmann M, Kruger N, Schulz S, et al. The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: Implications for control of the COVID-19 pandemic. *Cell* **2022**; 185(3): 447-56 e11.
96. Liu L, Iketani S, Guo Y, et al. Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2. *Nature* **2022**; 602(7898): 676-81.
97. Wilhelm A, Widera M, Grikscheit K, et al. Limited neutralisation of the SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.1 and BA.2 by convalescent and vaccine serum and monoclonal antibodies. *EBioMedicine* **2022**; 82: 104158.
98. Arora P, Kempf A, Nehlmeier I, et al. Omicron sublineage BQ.1.1 resistance to monoclonal antibodies. *The Lancet Infectious diseases* **2022**.
99. Cao Y, Yisimayi A, Jian F, et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. *Nature* **2022**; 608(7923): 593-602.
100. Iketani S, Liu L, Guo Y, et al. Antibody evasion properties of SARS-CoV-2 Omicron sublineages. *Nature* **2022**; 604(7906): 553-6.
101. Sheward DJ, Kim C, Fischbach J, et al. Omicron sublineage BA.2.75.2 exhibits extensive escape from neutralising antibodies. *The Lancet Infectious diseases* **2022**; 22(11): 1538-40.
102. Yamasoba D, Kosugi Y, Kimura I, et al. Neutralisation sensitivity of SARS-CoV-2 omicron subvariants to therapeutic monoclonal antibodies. *The Lancet Infectious diseases* **2022**; 22(7): 942-3.
103. Guo C, Wu Y, Zhang Y, et al. Transmitted Drug Resistance in Antiretroviral Therapy-Naive Persons With Acute/Early/Primary HIV Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in pharmacology* **2021**; 12: 718763.
104. Rockstroh JK, Teppler H, Zhao J, et al. Clinical efficacy of raltegravir against B and non-B subtype HIV-1 in phase III clinical studies. *Aids* **2011**; 25(11): 1365-9.
105. Anies G, da Silva D, Recordon-Pinson P, et al. Analysis of Raltegravir-Resistant Patterns Including Mutations at Positions 143 and 155 in the HIV-1 Integrase. In: 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). San Francisco, CA, USA, 2009:Abstract 619.
106. Garrido C, Geretti AM, de Mendoza C, Booth C, Strang A, Soriano V. Polymorphisms at the integrase gene in distinct HIV populations may influence the susceptibility to integrase inhibitors. In: 6th European HIV Drug Resistance Workshop. Budapest, Hungary: Virology Education, BJ Utrecht, Netherlands, 2008:Abstract 12.
107. Hackett Jr J, Harris B, Holzmayer V, et al. Naturally Occurring Polymorphisms in HIV-1 Group M, N, and O Integrase: Implications for Integrase Inhibitors. In: 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Boston, MA, USA: Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA, 2008:Abstract 872.

108. Lataillade M, Chiarella J, Kozal MJ. Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. *Antiviral therapy* **2007**; 12(4): 563-70.
109. Myers RE, Pillay D. HIV-1 integrase sequence variation and covariation. *Antiviral Ther* **2007**; 12: 5.
110. Sichtig N, Sierra S, Kaiser R, et al. Raltegravir resistance mutation profiles: baseline situation and modification during treatment. *J Antimicrob Chemother* **2009**; 64(1): 25,32.
111. Yerly S, Hirschel B, Gaille C, Kaiser L, Perrin L. Polymorphism of HIV-1 Subtypes B and Non-B Integrase Gene. In: 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Los Angeles, CA, USA: Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA, 2007:Abstract 626.
112. Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, et al. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med* **2005**; 2(4): e112.
113. Hu Z, Kuritzkes DR. Effect of raltegravir resistance mutations in HIV-1 integrase on viral fitness. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* **2010**; 55(2): 148-55.
114. Miller MD, Danovich RM, Ke Y, et al. Longitudinal analysis of resistance to the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir: results from P005 a Phase II study in treatment-experienced patients. *Antiviral Ther* **2008**; 13(Suppl 3): A8.
115. Van Baelen K, Rondelez E, Van Eygen V, Smits V, Van den Zegel P, Stuyver LJ. Validation of a genotypic and phenotypic recombinant viruses assay to determine resistance against HIV-1 inhibitors. *Antiviral Ther* **2008**; 13(Suppl 3): A127.
116. Ceccherini-Silberstein F, Armenia D, D'Arrigo R, et al. Virological response and resistance in multi-experienced patients treated with raltegravir. *Antiviral ther* **2008**; 13(Suppl 3): A15.
117. Brenner BG, Lowe M, Moisi D, et al. Subtype diversity associated with the development of HIV-1 resistance to integrase inhibitors. *J Med Virol* **2011**.
118. da Silva D, Van Wesenbeeck L, Breilh D, et al. HIV-1 resistance patterns to integrase inhibitors in antiretroviral-experienced patients with virological failure on raltegravir-containing regimens. *J Antimicrob Chemother* **2010**; 65(6): 1262-9.
119. Blanco JL, Varghese V, Rhee SY, Gatell JM, Shafer RW. HIV-1 integrase inhibitor resistance and its clinical implications. *The Journal of infectious diseases* **2011**; 203(9): 1204-14.
120. Quashie PK, Mesplede T, Wainberg MA. Evolution of HIV integrase resistance mutations. *Current opinion in infectious diseases* **2013**; 26(1): 43-9.
121. Metifiot M, Vandegraaff N, Maddali K, et al. Elvitegravir overcomes resistance to raltegravir induced by integrase mutation Y143. *Aids* **2011**; 25(9): 1175-8.
122. Underwood MR, Johns BA, Sato A, Martin JN, Deeks SG, Fujiwara T. The activity of the integrase inhibitor dolutegravir against HIV-1 variants isolated from raltegravir-treated adults. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* **2012**; 61(3): 297-301.
123. Canducci F, Ceresola ER, Boeri E, et al. Cross-resistance profile of the novel integrase inhibitor Dolutegravir (S/GSK1349572) using clonal viral variants selected in patients failing raltegravir. *The Journal of infectious diseases* **2011**; 204(11): 1811-5.
124. Van Wesenbeeck L, Rondelez E, Feyaerts M, et al. Cross-resistance profile determination of two second-generation HIV-1 integrase inhibitors using a panel of recombinant viruses derived from raltegravir-treated clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55(1): 321-5.
125. Seki T, Suyama-Kagitani A, Kawauchi-Miki S, et al. Effects of raltegravir or elvitegravir resistance signature mutations on the barrier to dolutegravir resistance in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 59(5): 2596-606.
126. Walter H, Schmidt B, Korn K, Vandamme AM, Harrer T, Uberla K. Rapid, phenotypic HIV-1 drug sensitivity assay for protease and reverse transcriptase inhibitors. *J Clin Virol* **1999**; 13(1-2): 71-80.
127. Pattery T, Verlinden Y, De Wolf H, et al. Development and performance of conventional HIV-1 phenotyping (Antivirogram(R)) and genotype-based calculated phenotyping assay

- (virco(R)TYPE HIV-1) on protease and reverse transcriptase genes to evaluate drug resistance. *Intervirology* **2012**; 55(2): 138-46.
128. Van Houtte M, Picchio G, Van Der Borght K, Pattery T, Lecocq P, Bacheler LT. A comparison of HIV-1 drug susceptibility as provided by conventional phenotyping and by a phenotype prediction tool based on viral genotype. *Journal of medical virology* **2009**; 81(10): 1702-9.
129. Laprise C, de Pokomandy A, Baril JG, Dufresne S, Trottier H. Virologic failure following persistent low-level viremia in a cohort of HIV-positive patients: results from 12 years of observation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2013**; 57(10): 1489-96.
130. Gonzalez-Serna A, Min JE, Woods C, et al. Performance of HIV-1 drug resistance testing at low-level viremia and its ability to predict future virologic outcomes and viral evolution in treatment-naïve individuals. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2014**; 58(8): 1165-73.
131. Swenson LC, Min JE, Woods CK, et al. HIV drug resistance detected during low-level viraemia is associated with subsequent virologic failure. *Aids* **2014**; 28(8): 1125-34.
132. Li JZ, Gallien S, Do TD, et al. Prevalence and significance of HIV-1 drug resistance mutations among patients on antiretroviral therapy with detectable low-level viremia. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**; 56(11): 5998-6000.
133. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* **2003**; 9(6): 727-8.
134. Strain MC, Gunthard HF, Havlir DV, et al. Heterogeneous clearance rates of long-lived lymphocytes infected with HIV: intrinsic stability predicts lifelong persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**; 100(8): 4819-24.
135. Lambotte O, Chaix ML, Gubler B, et al. The lymphocyte HIV reservoir in patients on long-term HAART is a memory of virus evolution. *Aids* **2004**; 18(8): 1147-58.
136. Turriziani O, Andreoni M, Antonelli G. Resistant viral variants in cellular reservoirs of human immunodeficiency virus infection. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2010**; 16(10): 1518-24.
137. Verhofstede C, Noe A, Demecheleer E, et al. Drug-resistant variants that evolve during nonsuppressive therapy persist in HIV-1-infected peripheral blood mononuclear cells after long-term highly active antiretroviral therapy. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* **2004**; 35(5): 473-83.
138. Bon I, Alessandrini F, Borderi M, Gorini R, Re MC. Analysis of HIV-1 drug-resistant variants in plasma and peripheral blood mononuclear cells from untreated individuals: implications for clinical management. *The new microbiologica* **2007**; 30(3): 313-7.
139. Bon I, Gibellini D, Borderi M, et al. Genotypic resistance in plasma and peripheral blood lymphocytes in a group of naïve HIV-1 patients. *J Clin Virol* **2007**; 38(4): 313-20.
140. Ghosn J, Pellegrin I, Goujard C, et al. HIV-1 resistant strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time. *Aids* **2006**; 20(2): 159-70.
141. Kabamba-Mukadi B, Duquenne A, Henrivaux P, et al. HIV-1 proviral resistance mutations: usefulness in clinical practice. *HIV medicine* **2010**; 11(8): 483-92.
142. Parisi SG, Boldrin C, Cruciani M, et al. Both human immunodeficiency virus cellular DNA sequencing and plasma RNA sequencing are useful for detection of drug resistance mutations in blood samples from antiretroviral-drug-naïve patients. *Journal of clinical microbiology* **2007**; 45(6): 1783-8.
143. Cooper D, Gatell J, Rockstroh J, et al. Results of BENCHMRK-1, a phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. In: 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Los Angeles, CA, USA, 2007:Abstract 105aLB.

144. Grinsztejn B, Nguyen, B., Katlama, C., B. , Gatell J, Lazzarin A, et al. 48 week efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. In: 47th ICAAC. Chicago, 2007:Abstract H-713.
145. Steigbigel R, Kumar P, Eron J, et al. Results of BENCHMRK-2, a phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. In: 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Los Angeles, CA, USA, 2007:Abstract 105bLB.
146. Markowitz M, Nguyen BY, Gotuzzo F, al e. Potent antiretroviral effect of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, as part of combination ART in treatment-naïve HIV-1 infected patients. In: XVI International AIDS Conference. Toronto, Canada, 2006:Abstract THLB0214.
147. Kobayashi M, Nakahara K, Seki T, et al. Selection of diverse and clinically relevant integrase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1 mutants. *Antiviral Res* **2008**; 80(2): 213-22.
148. Wai J, Embrey T, Embrey M, et al. Next Generation of Inhibitors of HIV-1 Integrase Strand Transfer Inhibitor: Structural Diversity and Resistance Profiles. In: 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Los Angeles, CA, USA: Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA, 2007:Abstract 87.
149. Hazuda DJ, Miller MD, Nguyen BY, Zhao J. Resistance to HIV-integrase inhibitor raltegravir: analysis of protocol 005, a Phase II study in patients with triple-class resistant HIV-1 infection. *Antiviral Ther* **2007**; 12: 10.
150. McColl DJ, Fransen S, Gupta S, et al. Resistance and cross-resistance to first generation integrase inhibitors: insights from a Phase II study of elvitegravir (GS-9137). *Antiviral Ther* **2007**; 12: 11.
151. Hazuda DJ, Anthony NJ, Gomez RP, et al. A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**; 101(31): 11233-8.
152. Kehlenbeck S, Betz U, Birkmann A, et al. Dihydroxythiophenes are novel potent inhibitors of human immunodeficiency virus integrase with a diketo acid-like pharmacophore. *Journal of virology* **2006**; 80(14): 6883-94.
153. Malet I, Delelis O, Valantin MA, et al. Biochemical characterizations of the effect of mutations selected in HIV-1 integrase gene associated with failure to raltegravir (MK-0518). *Antiviral Ther* **2007**; 12: 9.
154. Sierra S, Lubke N, Walter H, et al. The SnoB study: frequency of baseline raltegravir resistance mutations prevalence in different non-B subtypes. *Medical microbiology and immunology* **2011**; 200(4): 225-32.
155. Lubber AD. Genetic barriers to resistance and impact on clinical response. *MedGenMed* **2005**; 7(3): 69.
156. Fransen S, Gupta S, Danovich R, et al. Loss of raltegravir susceptibility in treated patients is conferred by multiple non-overlapping genetic pathways. *Antiviral Ther* **2008**; 13(Suppl 3): A9.
157. Da Silva D, Pellegrin I, Anies G, et al. Mutations patterns in the HIV-1 integrase related to virological failure on raltegravir-containing regimens. *Antiviral Ther* **2008**; 13(Suppl 3): A14.
158. Katlama C, Caby F, Andrade RM, et al. Virological evolution in HIV-1 treatment-experienced patients with raltegravir-based salvage regimens. *Antiviral Ther* **2008**; 13(Suppl 3): A13.
159. Cahn P, Pozniak AL, Mingrone H, et al. Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naïve adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. *Lancet* **2013**; 382(9893): 700-8.
160. Cardoso M, Baptista T, Diogo I, et al. Two cases of dolutegravir failure with R263K mutation. *Aids* **2018**; 32(17): 2639-40.
161. Mesplede T, Leng J, Pham HT, et al. The R263K Dolutegravir Resistance-Associated Substitution Progressively Decreases HIV-1 Integration. *mBio* **2017**; 8(2).

162. Clotet B, Feinberg J, van Lunzen J, et al. Once-daily dolutegravir versus darunavir plus ritonavir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (FLAMINGO): 48 week results from the randomised open-label phase 3b study. *Lancet* **2014**; 383(9936): 2222-31.
163. Raffi F, Jaeger H, Quiros-Roldan E, et al. Once-daily dolutegravir versus twice-daily raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (SPRING-2 study): 96 week results from a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *The Lancet Infectious diseases* **2013**; 13(11): 927-35.
164. Sax PE, Pozniak A, Montes ML, et al. Coformulated bictegravir, emtricitabine, and tenofovir alafenamide versus dolutegravir with emtricitabine and tenofovir alafenamide, for initial treatment of HIV-1 infection (GS-US-380-1490): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet* **2017**; 390(10107): 2073-82.
165. Walmsley SL, Antela A, Clumeck N, et al. Dolutegravir plus abacavir-lamivudine for the treatment of HIV-1 infection. *The New England journal of medicine* **2013**; 369(19): 1807-18.
166. Fulcher JA, Du Y, Zhang TH, Sun R, Landovitz RJ. Emergence of Integrase Resistance Mutations During Initial Therapy Containing Dolutegravir. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2018**; 67(5): 791-4.
167. Taiwo BO, Zheng L, Stefanescu A, et al. ACTG A5353: A Pilot Study of Dolutegravir Plus Lamivudine for Initial Treatment of Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1)-infected Participants With HIV-1 RNA <500000 Copies/mL. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2018**; 66(11): 1689-97.
168. Quashie PK, Oliviera M, Veres T, et al. Differential Effects of the G118R, H51Y, and E138K Resistance Substitutions in Different Subtypes of HIV Integrase. *Journal of virology* **2015**; 89(6): 3163-75.
169. Dooley KE, Sayre P, Borland J, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the HIV integrase inhibitor dolutegravir given twice daily with rifampin or once daily with rifabutin: results of a phase 1 study among healthy subjects. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* **2013**; 62(1): 21-7.
170. Lepik KJ, Harrigan PR, Yip B, et al. Emergent drug resistance with integrase strand transfer inhibitor-based regimens. *Aids* **2017**; 31(10): 1425-34.
171. STAKOB. Hinweise zu Erkennung, Diagnostik und Therapie von Patienten mit COVID-19. Available at: https://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/Stakob/Stellungnahmen/Stellungnahme-Covid-19_Therapie_Diagnose.pdf?__blob=publicationFile.
172. Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, et al. Early Treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab. *The New England journal of medicine* **2021**; 385(21): 1941-50.
173. Streinu-Cercel A, Sandulescu O, Preotescu LL, et al. Efficacy and Safety of Regdanvimab (CT-P59): A Phase 2/3 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Outpatients With Mild-to-Moderate Coronavirus Disease 2019. *Open Forum Infect Dis* **2022**; 9(4): ofac053.
174. Gottlieb RL, Nirula A, Chen P, et al. Effect of Bamlanivimab as Monotherapy or in Combination With Etesevimab on Viral Load in Patients With Mild to Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2021**; 325(7): 632-44.
175. Pallotta AM, Kim C, Gordon SM, Kim A. Monoclonal antibodies for treating COVID-19. *Cleve Clin J Med* **2021**.
176. Schoofs T, Klein F, Braunschweig M, et al. HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. *Science* **2016**; 352(6288): 997-1001.
177. Collier DA, De Marco A, Ferreira I, et al. SARS-CoV-2 B.1.1.7 sensitivity to mRNA vaccine-elicited, convalescent and monoclonal antibodies. *medRxiv* **2021**.
178. Kemp SA, Collier DA, Datir RP, et al. SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection. *Nature* **2021**.
179. Choi B, Choudhary MC, Regan J, et al. Persistence and Evolution of SARS-CoV-2 in an Immunocompromised Host. *The New England journal of medicine* **2020**; 383(23): 2291-3.

180. Walker A, Houwaart T, Finzer P, et al. Characterization of SARS-CoV-2 genetic structure and infection clusters in a large German city based on integrated genomic surveillance, outbreak analysis, and contact tracing. **2021**.
181. Gliga S, Lübke N, Killer A, et al. Rapid Selection of Sotrovimab Escape Variants in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Omicron-Infected Immunocompromised Patients. *Clinical Infectious Diseases* **2022**.
182. Starr TN, Greaney AJ, Dingens AS, Bloom JD. Complete map of SARS-CoV-2 RBD mutations that escape the monoclonal antibody LY-CoV555 and its cocktail with LY-CoV016. *bioRxiv* **2021**.
183. Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat Med* **2021**.
184. Widera M, Wilhelm A, Hoehl S, et al. Bamlanivimab does not neutralize two SARS-CoV-2 variants carrying E484K in vitro. **2021**.
185. Margolis DM, Koup RA, Ferrari G. HIV antibodies for treatment of HIV infection. *Immunol Rev* **2017**; 275(1): 313-23.
186. Kreuzberger N, Hirsch C, Chai KL, et al. SARS-CoV-2-neutralising monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Cochrane Database Syst Rev* **2021**; 9: CD013825.
187. Martin-Blondel G, Marcelin AG, Soulié C, et al. Outcome of very high-risk patients treated by Sotrovimab for mild-to-moderate COVID-19 Omicron, a prospective cohort study (the ANRS 0003S COCOPREV study). *J Infect* **2022**; 84(6): e101-e4.
188. Solera JT, Arbol BG, Alshahrani A, et al. Impact of Vaccination and Early Monoclonal Antibody Therapy on COVID-19 Outcomes in Organ Transplant Recipients During the Omicron Wave. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2022**.
189. Jensen B, Luebke N, Feldt T, et al. Emergence of the E484K mutation in SARS-COV-2-infected immunocompromised patients treated with bamlanivimab in Germany. *Lancet Reg Health Eur* **2021**; 8: 100164.
190. Destras G, Bal A, Simon B, Lina B, Josset L. Sotrovimab drives SARS-CoV-2 omicron variant evolution in immunocompromised patients. *Lancet Microbe* **2022**.
191. Vellas C, Tremeaux P, Del Bello A, et al. Resistance mutations in SARS-CoV-2 omicron variant in patients treated with Sotrovimab. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2022**.
192. Vellas C, Del Bello A, Debarb A, et al. Influence of treatment with neutralizing monoclonal antibodies on the SARS-CoV-2 nasopharyngeal load and quasispecies. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2022**; 28(1): 139 e5- e8.
193. FDA updates Sotrovimab emergency use authorization. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-sotrovimab-emergency-use-authorization>. Accessed 14th of May.
194. Rockett R, Basile K, Maddocks S, et al. Resistance Mutations in SARS-CoV-2 Delta Variant after Sotrovimab Use. *The New England journal of medicine* **2022**; 386(15): 1477-9.
195. Tallarita M, Giardina F, Novazzi F, et al. Spread of multiple SARS-CoV-2 lineages April-August 2020 anticipated the second pandemic wave in Lombardy (Italy). *Pediatr Allergy Immunol* **2022**; 33 Suppl 27: 89-92.
196. Singh DD, Sharma A, Lee HJ, Yadav DK. SARS-CoV-2: Recent Variants and Clinical Efficacy of Antibody-Based Therapy. *Front Cell Infect Microbiol* **2022**; 12: 839170.
197. Takashita E, Kinoshita N, Yamayoshi S, et al. Efficacy of Antiviral Agents against the SARS-CoV-2 Omicron Subvariant BA.2. *The New England journal of medicine* **2022**; 386(15): 1475-7.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nadine Lübke (geb. Sichtig)
Adresse: Domkapitelweg 5, 50259 Pulheim
E-Mail: nadine.luebke@med.uni-duesseldorf.de
Geburtsdatum / -ort: 05.08.1976 / Frechen
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Ausbildung und beruflicher Werdegang

- 09/2015 – heute **Institut für Virologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**
Medizinische Fachvirologin
- Diagnostik – klinische Virologie
 - Bereichsleitung Resistenztestung und Genotypisierung von Viren (Schwerpunkt HIV, HBV, HCV und CMV)
- 02/2007 – 08/2015 **Institut für Virologie, Uniklinik Köln**
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
- Diagnostik – klinische Virologie
 - Aufgabenschwerpunkt: HIV-, HBV- und HCV-Resistenztestung
- 11/2002 – 12/2006 **Promotion im Fachbereich Biologie**
Universität zu Köln
Experimentelle Arbeit am Institut für Virologie, Uniklinik Köln
Thesis-Thema: Charakterisierung des zellulären Proteins Papillomavirus Binding Factor PBF
Abschluss: **Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)**
- 10/1996 – 10/2002 Studium der Biologie - Universität zu Köln
Hauptfach: Genetik
Diplomarbeit am Institut für Virologie, Uniklinik Köln
Thesis-Thema: Modulation der Oct1-Aktivierung des HPV16 Onkogenpromotors P97
Abschluss: **Diplom**

Funktionen im Institut für Virologie

- Betreuung der serologischen und molekularbiologischen Routinediagnostik
- Etablierung und Validierung von Nachweisverfahren für molekularvirologische Diagnostik
- Betreuung, Koordination und Etablierung virologischer Resistenzanalysen
- Koordination von Ringversuchen zur externen Qualitätssicherung
- Studienkoordination
- Risikomanagement

Mitwirkung in akademischen Gremien

- **Gleichstellungsbeauftragte** der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- **Mitglied der Promotionskommission** der Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Auszeichnungen

02/2019 **Wissenschaftspreis „Klinische Virologie 2019“**
Die Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) und die Gesellschaft für Virologie (GfV)

Zusatzqualifikationen

2018 Zertifikat für Medizinische Virologie und Infektionsprävention
(**Medizinische Fachvirologin**) der Gesellschaft für Virologie e.V. (GfV)

Medizinididaktik

2018 Clinical Teaching
2021 Effektiver Medieneinsatz

Kernkompetenzen

2021 Führungskompetenzen für Promotionsbetreuende und promovierte
WissenschaftlerInnen
2020 Projektmanagement für promovierte WissenschaftlerInnen
2019 Gute wissenschaftliche Praxis für promovierte WissenschaftlerInnen

Software

2019 Statistik für WissenschaftlerInnen in der Medizin (SPSS-Grundkurs)

Sonstiges

Seit 2021 Mentee im Selma Meyer-Mentoring Programm
Linie SelmaMeyerPROF zur Vorbereitung von Wissenschaftlerinnen
und Ärztinnen auf dem Weg zur Professur

- Peer-Support-Groups: Kollegiale Beratung
- Vorbereitung zum Berufungsverfahren: Erstes Vorsingen
- Stresskompetenz
- Selbstpräsentation vor der Kamera
- Mentoring Prozessbegleitung

2021 Gentechnik Aktualisierungskurs
2019 Kurs und Zertifizierung „Good Clinical Practice“ (GCP-Grundkurs)
Koordinierungszentrum für klinische Studien, Uniklinik Düsseldorf

2007	Fortbildung für Projektleiter und Beauftragte für Biologische Sicherheit nach §15 (2) und (4) GenTSV
------	--

Mitgliedschaften

GfV	G esellschaft für V irologie e.V.
ESAR	E uropean S ociety for Translational A ntiviral R esearch
HIV GRADE	HIV G enotypic R esistance- A lgorithm D eutschland e.V. (Vorstand)
DAIG	D eutsche A IDS- G esellschaft e.V.

Förderungen

2021	„Stiftung zur Erforschung infektiös-immunologischer Erkrankungen“ Fördermittel: 9.889,85 €
------	---

9 Danksagung

Als allererstes gilt mein Dank Professor Jörg Timm, der mir durch die Anstellung in seinem Institut nicht nur die Möglichkeit gegeben hat meine diagnostische und wissenschaftliche Karriere im Bereich klinische Virologie weiter zu betreiben, sondern hat dies mit großem Vertrauen auch dauerhaft unterstützt und gefördert. Ein weiterer wichtiger Mensch, dem ich hier besonders danken möchte, ist mein Mentor und guter Freund Rolf Kaiser. Während meiner Tätigkeit im Institut für Virologie in Köln hat er mir den Weg in die klinische Virologie bereitet und mich im Bereich der HIV-Resistenztestung ausgebildet. Durch ihn habe ich meine Begeisterung für die Resistenztestung entdeckt, die mich heute sowohl in meiner klinischen, aber auch wissenschaftlichen Karriere definiert. Ebenso danke ich Professor Ortwin Adams, der mich vom ersten Tag in Düsseldorf immer unterstützt hat. Er ist nicht nur ein toller Kollege, sondern auch ein toller Lehrer, dem ich viel zu verdanken habe. Nur durch ihn konnte ich meine Erfahrungen im Bereich der virologischen Diagnostik so weit ausbauen, sodass ich mein Zertifikat zur medizinischen Fachvirologin erlangen konnte. Ein weiterer besonderer Dank gilt meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen aus Köln, Elena Knops, Eva Heger, Saleta Sierra, Veronica Di Cristanziano, Michael Böhm und dem leider mittlerweile verstorbenen Kollegen Eugen Schülter. Sie haben mich auf vielen Etappen meines Werdegangs begleitet und sind mit mir auch heute noch in einer sehr engen Kooperation und Freundschaft verbunden. Natürlich möchte ich auch bei meine Kolleginnen Sandra Hauka und Inga Tometten und meinem Kollegen Marcel Andrée bedanken. Sie haben mich bei allen meinen Aktivitäten unterstützt und mir für meine wissenschaftlichen Tätigkeiten den Rücken freigehalten. Sie sind wirklich besondere Menschen und dafür möchte ich mich hier nochmal ausdrücklich bedanken. Ein besseres Team kann ich mir kaum vorstellen. An der Stelle muss ich meinem Wegbegleiter, Freund und Büronachbarn Andreas Walker danken, ohne den es diese Habilitationsschrift vermutlich nicht gegen hätte. Wir diskutieren nicht nur wissenschaftliche Fragestellungen, um uns gegenseitig zu inspirieren oder auch um uns gegenseitig Hilfestellungen zu leisten, sondern wir tauschen auch private Belange aus, um uns so eine kurze Auszeit vom täglichen Routinestress zu gönnen. Danke Andreas, dass Du immer ein offenes Ohr für mich hast. Natürlich möchte ich mich auch bei der AG Timm bedanken, darunter besonders Christine Cosmovici, Eugen Bäcker, Alexandra Graupner, Tina Senff, Christopher Menne und noch viele andere die mich von Anfang an im Institut herzlich aufgenommen haben, sodass ich mich direkt wohl gefühlt habe. Auch bei Jennifer Camdereli möchte ich mich besonders bedanken. Sie ist im Labor meine rechte Hand und hat meine Arbeit immer mit Begeisterung unterstützt. Ein besonderer Dank gilt dabei auch Christiane Cramer, die mir immer in allen Belangen geholfen hat, egal wie nervenzerreibend es auch war. Ohne ihre Hilfe hätte ich viele Dinge nicht so mühelos umsetzen können. Dann möchte ich auch noch Martha Paluschinski danken. Ohne Ihre Unterstützung bei der Antragsvorbereitung zur Habilitation hätte ich vermutlich noch ewig bis zur Abgabe gebraucht. Ein weiterer großer Dank geht an Björn Jensen. Schon während meiner Tätigkeit in Köln haben wir eine sehr enge Kooperation aufgebaut, die sich seit meinem Wechsel nach Düsseldorf noch deutlich verstärkt hat. Durch unsere enge Zusammenarbeit haben sich viele Projekte entwickelt, sich wir auch erfolgreich durchführen und publizieren konnten. Darüber hinaus hat sich auch eine großartige Freundschaft entwickelt, von der ich hoffe, dass sie noch lange bestehen bleibt. Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Freunden Lucas Norek, Jennifer Lüdemann, Selma Hässy, Judith Roth, und natürlich allen anderen Freunden bedanken. Dadurch, dass ich durch meine Arbeit immer wenig Zeit habe, habt ihr mich trotzdem immer unterstützt und für alles Verständnis gezeigt. Ich hoffe daher, dass unsere Freundschaften auch weiter so besonders bleiben, wie sie sind, danke für alles. Ein ganz besonderer Dank gilt meine Eltern und meiner Schwester Ivonne. Ohne ihre Fürsorge und ihre ausnahmslose Unterstützung wäre diese Kapitel meines Lebens nicht

möglich gewesen. Dabei möchte ich besonders meiner Mutter danken. Egal ob ich eine seelische Unterstützung, eine Kinderbetreuung, eine Putzhilfe, eine Bügelfee oder eine warme Mahlzeit brauchte, war sie stets für mich da und hat immer dafür gesorgt, dass ich mich auf meine Arbeit konzentrieren konnte. Nochmal tausend Dank, auch wenn man es nicht in Worte fassen kann. Und zuletzt gilt mein größter Dank meinem Mann Mathias, der mich täglich in allen Belangen unterstützt. Er ist bereits seit meiner Diplomarbeit an meiner Seite und hat mich auf meinem kompletten Karriereweg begleitet. Ohne seine liebevolle und zum Teil aufopfernde Unterstützung hätte ich es nicht bis hierhin geschafft. Ich danke auch meinen Kinder Liam und Laura, ich liebe euch über alles.

10 Eigene Veröffentlichungen

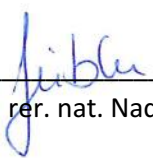
In dieser Habilitationsschrift sind folgende Originalarbeiten thematisch zusammengefasst:

1. Sierra S, Lübke N, Walter H, Schülter E, Reuter S, Fätkenheuer G, Bickel M, da Silva H, Kaiser R, Esser S; SnoB-Study group. The SnoB study: frequency of baseline raltegravir resistance mutations prevalence in different non-B subtypes. *Med Microbiol Immunol*. 2011 Nov;200(4):225-32. doi: 10.1007/s00430-011-0194-1. Epub 2011 Apr 8. PMID: 21475993.
2. Heger E, Theis AA, Remmel K, Walter H, Pironti A, Knops E, Di Cristanziano V, Jensen B, Esser S, Kaiser R, Lübke N. Development of a phenotypic susceptibility assay for HIV-1 integrase inhibitors. *J Virol Methods*. 2016 Dec;238:29-37. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.10.002. Epub 2016 Oct 11. PMID: 27737783.
3. Lübke N, Di Cristanziano V, Sierra S, Knops E, Schülter E, Jensen B, Oette M, Lengauer T, Kaiser R. Proviral DNA as a Target for HIV-1 Resistance Analysis. *Intervirology*. 2015;58(3):184-9. doi: 10.1159/000431093. Epub 2015 Jun 27. PMID: 26139571.
4. Sichtig N, Sierra S, Kaiser R, Däumer M, Reuter S, Schülter E, Altmann A, Fätkenheuer G, Dittmer U, Pfister H, Esser S. Evolution of raltegravir resistance during therapy. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Jul;64(1):25-32. Doi: 10.1093/jac/dkp153. Epub 2009 May 14. PMID: 19447792.
5. Lübke N, Jensen B, Hüttig F, Feldt T, Walker A, Thielen A, Däumer M, Obermeier M, Kaiser R, Knops E, Heger E, Sierra S, Oette M, Lengauer T, Timm J, Häussinger D. Failure of Dolutegravir First-Line ART with Selection of Virus Carrying R263K and G118R. *N Engl J Med*. 2019 Aug 29;381(9):887-889. doi: 10.1056/NEJMc1806554. PMID: 31461601.
6. Jensen B*, Luebke N*, Feldt T*, Keitel V, Brandenburger T, Kindgen-Milles D, Lutterbeck M, Freise NF, Schoeler D, Haas R, Dilthey A, Adams O, Walker A, Timm J, Luedde T. Emergence of the E484K mutation in SARS-COV-2-infected immunocompromised patients treated with bamlanivimab in Germany. *Lancet Reg Health Eur*. 2021 Sep;8:100164. doi: 10.1016/j.lanepe.2021.100164. Epub 2021 Jul 14. PMID: 34278371; PMCID: PMC8278033.
*geteilte Erstautorenschaft
7. Gliga S*, Lübke N*#, Killer A*, Gruell H, Walker A, Dilthey AT, Thielen A, Lohr C, Flaßhove C, Krieg S, Ventura Pereira J, Seraphin TP, Zaufel A, Däumer M, Orth HM, Feldt T, Bode JG, Klein F, Timm J, Luedde T, Jensen BO. Rapid selection of sotrovimab escape variants in SARS-CoV-2 Omicron infected immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*. 2022 Oct 3:ciac802. doi: 10.1093/cid/ciac802. Epub ahead of print. PMID: 36189631; PMCID: PMC9619606.
*geteilte Erstautorenschaft
korrespondierende Autorin

11 Erklärungen und eidesstattliche Versicherung

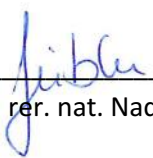
Hiermit erkläre ich, dass bei den wissenschaftlichen Arbeiten, die Gegenstand meiner Habitationsleistung sind, ethische Grundsätze und die jeweils gültigen Empfehlungen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis durch mich beachtet wurden.

Düsseldorf, 12.12.2022


Dr. rer. nat. Nadine Lübke

Hiermit erkläre ich, dass keine weiteren Habitationsverfahren eingeleitet oder erfolglos abgeschlossen worden sind.

Düsseldorf, 12.12.2022


Dr. rer. nat. Nadine Lübke

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Beiträge zu den Publikationen, die meiner Habilitationsschrift zugrunde liegen, eigenständig geleistet habe.

Düsseldorf, 12.12.2022


Dr. rer. nat. Nadine Lübke

12 Zugrunde liegende Originalarbeiten

The SnoB study: frequency of baseline raltegravir resistance mutations prevalence in different non-B subtypes

Saleta Sierra · Nadine Lübke · Hauke Walter · Eugen Schülter · Stefan Reuter · Gerd Fätkenheuer · Markus Bickel · Hugo da Silva · Rolf Kaiser · Stefan Esser · On behalf of the SnoB-Study group

Received: 21 December 2010 / Published online: 8 April 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract The SnoB study analysed the variability of the integrase (IN) gene of non-B viruses from treatment-naïve patients to determine whether non-B subtypes carry natural resistance mutations to raltegravir (RAL). Plasma viral RNA from 427 patients was gained, and IN sequences were subtyped and screened for subtype-specific highly-variable residues. Seven viruses of different subtypes were phenotypically tested for RAL susceptibility; 359/427 samples could be sequenced. One hundred and seventy samples (47%) were classified as non-B subtypes. No primary RAL resistance-associated mutations (RRAMs) were detected.

S. Sierra (✉) · N. Lübke · E. Schülter · R. Kaiser
Institute of Virology, University of Cologne,
Fürst-Pückler-Str. 56, 50935 Cologne, Germany
e-mail: saleta.sierra-aragon@uk-koeln.de

H. Walter
Institute for Clinic and Molecular Virology,
University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany

S. Reuter
Department of Gastroenterology,
University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

G. Fätkenheuer
Department of Internal Medicine I,
University of Cologne, Cologne, Germany

M. Bickel
Department of Internal Medicine I,
University Hospital of Frankfurt, Frankfurt, Germany

H. d. Silva
Merck Research Laboratories, EMEAC, Munich, Germany

S. Esser
Department of Dermatology,
University Hospital of Duisburg Essen, Essen, Germany

Certain secondary mutations were found, mostly related to specific non-B subtypes. L74 M was significantly more prevalent in subtype 02_AG, T97A in A and 06_cpx, V151I in 06_cpx, and G163R in 12_BF. Various additional mutations were also detected and could be associated with the subtype too. While K156 N and S230 N were correlated with B subtype, V72I, L74I, T112I, T125A, V201I and T206S were more frequent in certain non-B subtypes. The resistance factors (RF) of 7 viral strains of different subtypes ranged from 1.0 to 1.9. No primary or secondary but subtype-associated additional RRAMs were present. No correlation between RF and additional RRAMs was found. The prevalence of RRAMs was higher in non-B samples. However, the RFs for the analysed non-B subtypes showed lower values to those reported relevant to clinical failure. As the role of baseline secondary and additional mutations on RAL therapy failure is actually not known, baseline IN screening is necessary.

Keywords Integrase inhibitors · Raltegravir · Polymorphisms · Non-B subtypes · Resistance mutations · Phenotypic analysis

Introduction

The HIV-1 integrase inhibitor (INI) raltegravir (RAL, MK-0518, Isentress®) is indicated for the treatment of adult HIV-infected patients in combination with other antiretroviral agents. RAL blocks the strand-transfer activity of the viral integrase (IN), necessary for the integration of the proviral DNA into the host genome. In addition, other strand-transfer inhibitors are already in clinical studies [1–7].

So far, clinical studies illustrating the effectiveness of RAL were focused on HIV-1 subtype B [3, 4, 8–11].

However, more than 90% of HIV-1-infected people worldwide harbour non-B subtypes [12]. Caused by migration movements and international tourism, a large number of HIV-positive patients with different non-B subtypes are meanwhile treated in Germany. The non-B prevalence in the German State of NRW (RESINA Study) from 2001 to 2009 was on average 28% (SD 3.9%).

As known for the protease and the reverse transcriptase, subtype-specific mutations in the target gene may also have an impact on the activity of antiretroviral drugs [13, 14].

The purpose of the SnoB study was to analyse the variability of the HIV-1 IN gene of non-B subtypes from anti-retroviral treatment-naïve patients to determine whether non-B subtypes carry natural resistance-associated mutations to RAL.

Methods

The SnoB study is a prospective cohort study enrolling HIV-1-infected patients being treated in 24 German centres. Patients included in this study were suspected to carry non-B subtype viruses, therapy-naïve for all classes of anti-retroviral drugs and signed an informed consent prior to any study procedures.

At the Institute of Virology of the University of Cologne, 427 plasma samples were analysed centrally. Viral RNA was isolated, amplified and sequenced as described recently [15]. Each IN sequence was subtyped with the geno2pheno_[integrase] tool (<http://integrase.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>) and screened for mutations in comparison with the subtype B reference strain HXB2 to identify subtype-specific polymorphisms. It was analysed whether the detected variations corresponded to reported RAL resistance-associated mutations (RRAMs). The detected B sequences served as comparison group.

RRAMs were classified in primary, secondary and additional mutations, according to Sichtig et al. [15]. Briefly, primary RRAMs significantly increase the IC₅₀ for RAL and are selected in vivo under RAL treatment. Secondary RRAMs further increase the IC₅₀ for RAL and/or restore the viral fitness of viruses carrying primary mutations. Additional mutations have been selected under RAL treatment in vitro, and their importance for RAL resistance in vivo is still not clear.

M7 cells were used for the phenotypic determination of RAL resistance of 12 viral isolates comprising different subtypes. M7 cells contain a luciferase gene under the control of the HIV-1-LTR so that after integration of proviral DNA into the host cell genome, luciferase is produced. For the RAL susceptibility assay, infectious doses inducing approximately 10,000 relative light units within 3 days were used to infect 25,000 M7 cells cultivated in 200 µl

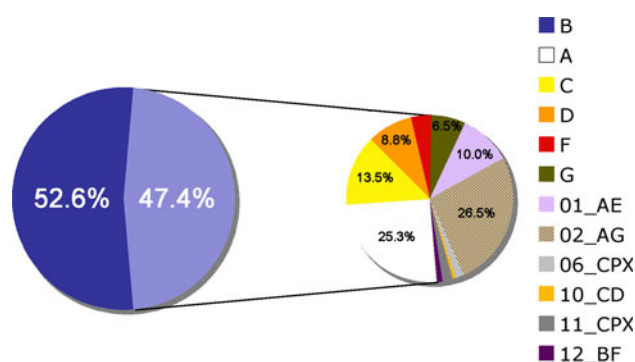


Fig. 1 Prevalence of HIV-1 subtypes in the SnoB Study. SnoB: sequences from 359 therapy naïve (naïve for all classes) patients attending German HIV centres and included in the SnoB Study

RPMI media supplemented with SPG, 10% FCS, and either without or with increasing concentrations of RAL (from 3.2nM to 1 µM). The IC₅₀ values were calculated via the luciferase activity. The IC₅₀ shown are mean values from three valid runs.

Clinical data like gender, birth date, country of origin, year of first HIV diagnosis, transmission risk, suspected place of infection, CDC stage, CD4⁺-T-cell counts and viral loads were collected. Clinical data and results of the genotypic and phenotypic tests were compared with each other.

P-values were calculated by Fisher's exact probability test, 2010 (<http://faculty.vassar.edu/lowry/tab2x2.html>).

Results

Subtyping

In this study, 427 patients were included; 359/427 samples could be amplified and sequenced; 189 (52.6%) were classified as B; and 170 (47.4%) as non-B subtypes by the geno2pheno_[integrase] tool (Fig. 1). The most frequent non-B subtype was the circulating recombinant form (CRF) 02_AG with 26.5% followed by the A subtype with 25.3%. Subtype C was found in 13.5% and the 01_AE in 10% of the analysed non-B samples. The subtypes D and G were also detected in high percentages (D: 8.8%; G: 6.5%). All other subtypes were found in frequencies less than 5%.

Clinical characteristics

The clinical characteristics of the 427 patients are summarised in Table 1.

Although the patients included in our SnoB study were predominantly men (64.2%), the proportion of men and women differed depending on viral subtypes they were carrying; while 88.4% of the patients with B viruses were men, only 51.8% of the patients with non-B viruses were men, so

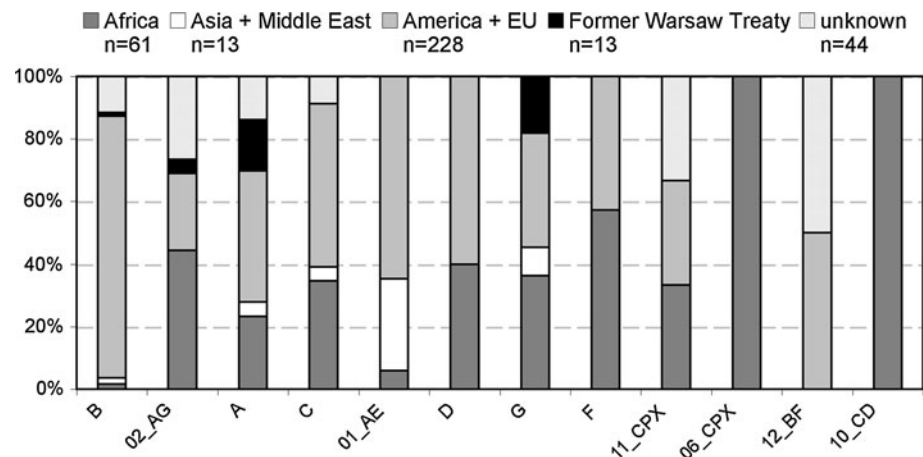
Table 1 Patients' characteristics

	All patients <i>n</i> = 427	Patients according subtype (<i>n</i> = 359)	
		B (<i>n</i> = 189)	Non-B (<i>n</i> = 170)
Gender	26.5% Female 64.2% Male	7.4% Female 88.4% Male	48.2% Female 41.2% Male
Median (range)			
Age (years)	36 (5 d–77 y)	37 (5 d–77 y)	35 (8 d–71 y)
Time to analysis ^a	4 m (5 d–35 y)	1 m (5 d–19 y)	6 m (8 d–35 y)
VL (copies/ml)	45,900 (<40–6,615,859)	71,740 (<40–6,615,859)	48,997 (88–163,000)
CD4 ⁺ -T-cell counts (cells/μl)	330 (3–1,056)	321 (3–989)	309 (8–859)

y years, m months, d days

^a time span from first

HIV + diagnosis to IN analysis

Fig. 2 HIV-1 subtypes: prevalence and origin

the percentage of women infected with non-B subtypes was 6.5-fold higher than B-infected women.

Subtype B-infected patients had in median higher viral loads than patients with non-B subtypes.

Patients harbouring subtype-B strains originated mainly from Europe (83.6%), while those with non-B viruses, comprising many different subtypes, came from all over the world. The CRFs 06_CPX and 10_CD were only detected in patients with an African origin (Fig. 2).

RRAMs

Subtype B viruses displayed a median of 2 (range 0–6) RRAMs per genome while non-Bs showed 3 (0–6). No primary RRAMs were detected (Table 2).

The secondary mutations L74 M, T97A Y143H, V151I and G163R were detected in frequencies $\leq 2.5\%$ and limited to ≤ 1 per genome. They statistically correlated with specific non-B subtypes (Table 3). L74 M was present in 8.9% of the CRF 02_AG samples, T97A in 7.0% and 33.3% of the A and 06_cpx isolates (respectively), V151I in 66.7% of the 06_cpx, and G163R in 50% of the 12_BF samples. Y143H was not detected in clade B viruses but in 4.3% of the C viruses, although the different prevalence lacked statistical significance.

Additional RRAMs were also detected, yet in a higher prevalence ($\leq 73.8\%$) and with a median prevalence of 3 (0–7) mutations/genome in B isolates and 4 (0–6) in non-Bs. Certain additional mutations were associated with specific HIV-1 subtypes. The mutations K156 N and S230 N were present in a significantly higher proportion in the B isolates (Table 2). S119GPRT and V72I were more frequent in subtype B isolates than the total of non-B sequences (Table 2), although they significantly correlated with specific non-B subtypes (Table 3). S119GPRT was found in 51.2% of the subtype A isolates, and V72I was more frequent in subtype C (91.3%). The mutations L74I, T112I, T125A, V201I and T206S were more prevalent in non-B subtypes. The L74I, found in 20% of the non-B isolates (Table 2), had a higher prevalence in subtype A (46.5%) and 02_AG (20.9%). T112I was found in 17.6% of the non-B samples, but in 71.4 and 54.5% of F and G isolates, respectively, and the T206S, detected in only 42.4% of the non-B subtypes, was predominant in the subtypes 02_AG (95.6%), G (90.9%) and F (57.1%). The mutations T125A and V201I, with the highest frequencies in our analysed non-B samples (T125A = 86.5%; V201I = 95.3%), associated with most non-B subtypes. The prevalence of the mutations A128T, M154I, E157Q, V165I, and I203 M could not be significantly associated with any specific subtype.

Table 2 Differences in RRAMs prevalence of B vs. non-B subtypes

	RRAMs*	Subtype		<i>P</i> value (two-tailed)
		B (<i>n</i> = 189) <i>n</i> (%)	Non-B (<i>n</i> = 170) <i>n</i> (%)	
Primary	Y143CR, Q148HKR, N155H	0	0	1.000
Secondary	T66I, E92Q, E138AK, G140AS	0	0	1.000
	L74 M	3 (1.6)	5 (2.9)	0.484
	T97A	2 (1.1)	7 (4.1)	0.091
	Y143H	0	1 (0.6)	0.474
	V151I	4 (2.1)	3 (1.8)	1.000
	G163R	0	1 (0.6)	0.474
Additional	H51Y, T66AK, F121Y, Q146 K, S147G, V249I, R263 K, C280Y	0	0	1.000
	V72I	132 (69.8)	91 (53.5)	0.002
	L74I	13 (6.9)	34 (20.0)	<i>P</i> < 0.001
	T112I	17 (9.0)	30 (17.6)	0.018
	S119GPRT	89 (47.1)	49 (28.8)	<i>P</i> < 0.001
	T125AK	60 (31.7)	147 (86.5)	<i>P</i> < 0.001
	A128T	0	2 (1.2)	0.239
	S153AY	0	1 (0.6)	0.474
	M154I	7 (3.7)	3 (1.8)	0.344
	K156 N	18 (9.5)	1 (0.6)	<i>P</i> < 0.001
	E157Q	4 (2.1)	5 (2.9)	0.741
	V165I	9 (4.8)	16 (9.4)	0.098
	V201I	104 (55.0)	162 (95.3)	<i>P</i> < 0.001
	I203 M	9 (4.8)	8 (4.7)	1.000
	T206S	32 (16.9)	72 (42.4)	<i>P</i> < 0.001
	S230RN	19 (10.1)	2 (1.2)	<i>P</i> < 0.001

* According to Sichtig et al. 2009

Mutations with statistically significant differences between B and non-B subtypes are highlighted in *bold*

Phenotypic RAL resistance determination

Twelve viral strains corresponding to different subtypes were analysed for phenotypic susceptibility to RAL.

Nine of twelve viral supernatants induced sufficient amounts of luciferase activities after initial infection and could be used for to infect M7 cells in the presence of increasing concentrations of RAL. Six independent runs were performed for each viral supernatant and twelve for the reference virus NL4-3. For the isolate corresponding to the subtype 01_AE, the IC₅₀ value could not be calculated due to too low luciferase activities. For all other supernatants, IC₅₀ values from at least three independent runs could be calculated. All other runs had to be excluded because the curves cut 50% more than once. The resistance factors (RF) ranged from 1.0 to 1.9 (Fig. 3).

The genotypic analysis of the phenotypic tested samples revealed no primary or secondary but different additional

mutations. No correlation between RF and additional RRAMs could be found.

Discussion

The clinical studies conducted to analyse the effectiveness of RAL have been focused on HIV-1 subtype B [3, 4, 8–11]. However, over 90% of HIV-1 infections worldwide and 26.2% of the infected patients in Germany carry non-B viruses.

The SnoB study confirmed the distribution of non-B viruses circulating in therapy-naïve patients in Germany. The high proportion of detected 02_AG isolates in Germany can be related to the high migration rate of patients with an African origin. The total prevalence of B viruses (44.3%) in this study is exceptionally low as predominantly patients with known or assumed non-B infection were enrolled in this study.

Table 3 Prevalence of RRAMs in the specific non-B subtypes versus B isolates

RRAMs	Number of sequences with the specific RRAMs																							
	B ($n = 189$)																							
	02_AG ($n = 45$)		A ($n = 43$)		C ($n = 23$)		01_AE ($n = 17$)		D ($n = 15$)		G ($n = 11$)		F ($n = 7$)		06_cpx ($n = 3$)		11_cpx ($n = 3$)		12_BF ($n = 2$)		10_CD ($n = 1$)			
	n	P -value	n	P -value	n	P -value	n	P -value	n	P -value	n	P -value	n	P -value	n	P -value	n	P -value	n	P -value	n	P -value		
Secondary	L74 M	3	4	0.027	0	–	1	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–		
	T97A	2	2	–	3	0.045	0	–	0	–	0	–	1	–	1	0.046	0	–	0	–	0	–		
	Y143H	0	0	–	0	–	1	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–		
	V151I	4	0	–	0	–	0	–	0	–	1	–	0	–	0	–	2	0.002	0	–	0	–		
Additional	G163R	0	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–		
	V72I	132	34	–	9	–	21	0.046	4	–	4	–	8	–	6	–	2	–	2	–	1	–		
	L74I	13	9	0.012	20	<0.001	2	–	1	–	0	–	2	–	0	–	0	–	0	–	0	–		
	T112I	17	9	–	2	–	2	–	1	–	4	–	6	<0.001	5	<0.001	1	–	0	–	0	–		
	S119GPRT	89	8	–	22	–	5	–	2	–	4	–	3	–	2	–	0	–	1	–	2	–		
	T125A	60	42	<0.001	38	<0.001	21	<0.001	16	<0.001	1	0.002	7	0.045	3	–	3	0.034	3	0.034	2	–		
	K156 N	18	0	–	1	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–		
	V201I	104	45	<0.001	39	<0.001	21	0.001	16	0.001	15	<0.001	11	<0.003	7	<0.002	3	–	1	–	2	–		
	T206S	32	43	<0.001	5	–	3	–	1	–	4	–	10	<0.001	4	0.023	1	–	1	–	0	–		
	S230 N	19	0	–	1	–	0	–	0	–	1	–	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–		

P-values values >0.05 (not significant) are indicated as “–”

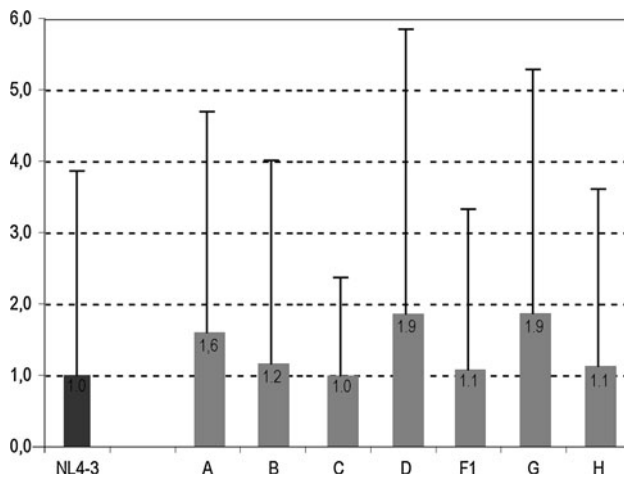


Fig. 3 RAL resistance in cell culture. NL4-3 was used as reference strain ($RF = 1$). IC_{50} values are given as means of all remaining runs, and assay variability is given as standard deviation

Three primary mutations N155H, Q148RHK or Y143RC conferring RAL resistance *in vivo* have been described [3, 4, 10, 15–17]. In addition, the replacement of one resistance mutational pattern by another has been observed in patients experiencing prolonged virological failure of a RAL-containing regimen [15, 18–20]. Secondary mutations, which further increase the RAL resistance level, are frequently observed in these profiles. E92Q, in addition to being a secondary mutation for RAL resistance *in vivo* and *in vitro*, may play a critical role in the development of resistance to another INI, namely elvitegravir (EVG) [21].

No primary but certain secondary and additional RRAMs were detected in this cohort of therapy-naïve patients, in accordance with previous reports [15, 20, 22–26]. The number and type of RRAMs varied between B and non-B subtypes. B isolates displayed, on average, less RRAMs per genome than non-Bs. No secondary RRAMs correlated with the B subtype, while L74 M, T97A, V151I and G163R could be significantly associated with specific non-B subtypes. For all the subtypes analysed, only the CRF 06_cpx correlated with more than one baseline secondary RRAMs. Concerning the additional mutations, V72I, L74I, T112I, T125A, V201I and T206S could also be related to certain non-B subtypes, and only K156 N and S230RN were significantly more prevalent in B isolates.

In a first attempt to investigate whether these mutational patterns led to different RAL susceptibilities among subtypes, 12 viral isolates corresponding to different HIV-1 clades were tested in a phenotypic resistance assay. The RFs detected in 7 viral isolates ranged from 1.0–1.9, values far below to those reported for the single primary mutations ($RF \sim 13$ for N155H and Y143RC and $18 < RF < 38$ for Q148RHK), which correlate with *in vivo* RAL treatment

failure [19, 27, 28]. Taken together, our results support the idea that baseline RRAMs do not seem to severely reduce RAL susceptibility and that RAL may be safely administered to most patients carrying non-B viruses [3, 4, 29].

However, to date, it is not clear whether baseline RRAMs may have a role in the development of resistance under RAL therapy, as it has been described for PIs, where certain baseline mutations lower the genetic barrier [14]. In fact, secondary and additional mutations do not only affect the RF but also restore or even increase the viral fitness, facilitating the appearance of primary resistance mutations such as the Q148H and the N155H that lead to a 3.4–13.7-fold reduction in the relative viral fitness in comparison with the wild type in the absence of RAL [19, 27, 30]. Indeed, certain studies suggest that baseline RRAMs may have an influence on future RAL resistance development. In a study by Sichtig and colleagues [15], it has been shown that the baseline T206S was not detectable in isolates harbouring the G148HR at RAL failure, but was present in 3/7 samples presenting the N155H mutation. The appearance of the Y143CR at RAL failure correlated with the baseline T97A in 3/4 patients or 1/1 in two previous studies [15, 31]. Ceccerini-Silberstein and colleagues also showed that all three viruses displaying the V165I at baseline developed the N155H at therapy failure. In addition to this, other studies have found RAL therapy failure without the emergence of primary RRAMs [32, 33]. These studies illustrate the potential importance of secondary and additional mutations in contributing to resistance to RAL regimens.

Therefore, although RAL may be safely administered to most patients carrying non-B viruses, baseline screening should be always performed, in order to identify RRAMs that may influence future RAL resistance development. In addition, prospective studies analysing large numbers of antiretroviral therapy naïve patients taking raltegravir as part of a first-line regimen are mandatory to clarify the clinical significance of baseline RRAMs.

Acknowledgments The authors thank Dörte Hammerschmidt for invaluable help in sample processing and MSD for supporting this study.

Ethical standards Ethics approval was given from the responsible ethics committees.

Conflicts of interest The authors have not any commercial or other association that may pose a conflict of interest with this manuscript.

References

1. Markowitz M, Morales-Ramirez JO, Nguyen BY, Kovacs CM, Steigbigel RT, Cooper DA, Liporace R, Schwartz R, Isaacs R, Gilde LR, Wenning L, Zhao J, Teppler H (2006) Antiretroviral activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-0518, a novel

- inhibitor of HIV-1 integrase, dosed as monotherapy for 10 days in treatment-naïve HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 43(5):509–515
2. Grinsztejn B, Nguyen BY, Katlama C, Gatell J, Lazzarin A, Vittecoq D, Gonzalez C, Chen J, Isaacs R, Team Tps (2006) Potent antiretroviral effect of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. In: 13th conference on retroviruses and opportunistic infections (CROI), Denver, USA, 5–8 February 2006. p Abstract 159LB
 3. Cooper D, Gatell J, Rockstroh J, Katlama C, Yeni P, Lazzarin A, Chen J, Isaacs R, Teppler H, Nguyen B, Group B-S (2007) Results of BENCHMRK-1, a phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. In: 14th conference on retroviruses and opportunistic infections (CROI), Los Angeles, CA, USA, 25–28 February 2007. p Abstract 105aLB
 4. Steigbigel R, Kumar P, Eron J, Schechter M, Markowitz M, Loufty M, Zhao J, Isaacs R, Nguyen BY, Teppler H, Group tB-S (2007) Results of BENCHMRK-2, a phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. In: 14th conference on retroviruses and opportunistic infections (CROI), Los Angeles, CA, USA, 25–28 February 2007. p Abstract 105bLB
 5. Zolopa AR, Berger DS, Lampiris H, Zhong L, Chuck SL, Enejosa JV, Kearney BP, Cheng AK (2010) Activity of elvitegravir, a once-daily integrase inhibitor, against resistant HIV Type 1: results of a phase 2, randomized, controlled, dose-ranging clinical trial. *J Infect Dis* 201(6):814–822. doi:10.1086/650698
 6. Arribas J, Lazzarin A, Raffi F, Rakhmanova A, Richmond G, Rockstroh J, van Lunzen J, Young B, Almond S, Brothers C, Min S, Nichols G (2010) Once-daily S/GSK1349572 as part of combination therapy in antiretroviral naïve adults: rapid and potent antiviral responses in the interim 16-week analysis from SPRING-1 (ING112276). In: 18th international conference on AIDS, Vienna, Austria, 2010. p Abstract THLB205
 7. Eron J, Durant J, Poizot-Martin I, Reynes J, Soriano V, Kumar P, Richmond G, Vittecoq D, Fujiwara T, Ait-Khaled M, Min S, Thomas D, Cuffe R, Yeo J (2010) Activity of a next generation integrase inhibitor (INI), S/GSK1349572, in subjects with HIV exhibiting raltegravir resistance: initial results of VIKING study (ING112961). In: 18th international conference on AIDS, Vienna, Austria, 2010. p Abstract MOAB0105
 8. DeJesus E, Berger D, Markowitz M, Cohen C, Hawkins T, Ruane P, Elion R, Farthing C, Zhong L, Cheng AK, McColl D, Kearney BP (2006) Antiviral activity, pharmacokinetics, and dose response of the HIV-1 integrase inhibitor GS-9137 (JTK-303) in treatment-naïve and treatment-experienced patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 43(1):1–5
 9. Grinsztejn B, Nguyen B, Katlama CB, Gatell J, Lazzarin A, Vittecoq D, Gonzalez C, Chen J, Isaacs R, Team TP (2007) 48 week efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. In: 47th ICAAC, Chicago, 2007. Abstract H-713
 10. Hazuda DJ, Miller MD, Nguyen BY, Zhao J (2007) Resistance to HIV-integrase inhibitor raltegravir: analysis of protocol 005, a Phase II study in patients with triple-class resistant HIV-1 infection. *Antiviral Ther* 12:10
 11. Lennox J, DeJesus E, Lazzarin A, Pollard R, Madruga JVR, Zhao J, Xu X, Williams-Diaz A, Rodgers A, DiNubile M, Nguyen BY, Leavitt R, Sklar P, Investigators tS (2008) Safety and efficacy of Raltegravir-based versus Efavirenz-based combination therapy in treatment naïve HIV-1 infected patients. STARTMRK protocol 021. In: ICAAC-IDS Washington DC, USA, 2008. Abstract H-896a
 12. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM (2008) The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 358(15):1590–1602
 13. Deforche K, Silander T, Camacho R, Grossman Z, Soares MA, Van Laethem K, Kantor R, Moreau Y, Vandamme AM (2006) Analysis of HIV-1 pol sequences using Bayesian networks: implications for drug resistance. *Bioinformatics* 22(24):2975–2979
 14. Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Clarke J, Sirivichayakul S, Soares MA, Snoeck J, Pillay C, Rudich H, Rodrigues R, Holguin A, Ariyoshi K, Bouzas MB, Cahn P, Sugiura W, Soriano V, Brigido LF, Grossman Z, Morris L, Vandamme AM, Tanuri A, Phanuphak P, Weber JN, Pillay D, Harrigan PR, Camacho R, Schapiro JM, Shafer RW (2005) Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med* 2(4):e112
 15. Sichtig N, Sierra S, Kaiser R, Däumer MP, Reuter S, Schülter E, Altmann A, Fäktenheuer G, Dittmer U, Pfister H, Esser S (2009) Raltegravir resistance mutation profiles: baseline situation and modification during treatment. *J Antimicrob Chemother* 64(1):25–32
 16. Stürmer M, Doerr HM, Gürtler L (2009) Human immunodeficiency virus: 25 years of diagnostic and therapeutic strategies and their impact on hepatitis B and C virus. *Med Microbiol Immunol* 198(3):147–155. doi:10.1007/s00430-009-0117-6
 17. Fransen S, Gupta S, Danovich R, Hazuda DJ, Miller M, Witmer M, Petropoulos CJ, Parkin NT, Huang W (2008) Loss of raltegravir susceptibility in treated patients is conferred by multiple non-overlapping genetic pathways. *Antiviral Ther* 13(Suppl 3):A9
 18. Fransen S, Karmochkine M, Huang W, Weiss L, Petropoulos CJ, Charpentier C (2009) Longitudinal analysis of raltegravir susceptibility and integrase replication capacity of human immunodeficiency virus type 1 during virologic failure. *Antimicrob Agents Chemother* 53(10):4522–4524. doi:10.1128/AAC.00651-09
 19. Miller MD, Danovich RM, Ke Y, Witmer M, Zhao J, Harvey CM, Nguyen BY, Hazuda DJ (2008) Longitudinal analysis of resistance to the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir: results from P005 a phase II study in treatment-experienced patients. *Antiviral Ther* 13(Suppl 3):A8
 20. Anies G, da Silva D, Recordon-Pinson P, Reigadas S, Wittkop L, Neau D, Morlat P, Fleury H, Masquelier B (2009) Analysis of raltegravir-resistant patterns including mutations at positions 143 and 155 in the HIV-1 integrase. In: 16th conference on retroviruses and opportunistic infections (CROI), San Francisco, CA, USA, February 16–19, 2009. Abstract 619
 21. Jones G, Ledford R, Yu F, Miller M, Tsiang M, McColl D (2007) Resistance profile of HIV-1 mutants in vitro selected by the HIV-1 integrase inhibitor, GS-9137 (JTK-303). In: 14th conference on retroviruses and opportunistic infections (CROI), Los Angeles, CA, USA, 25–28 February 2007. Foundation for retrovirology and human health, Alexandria, VA, USA, p Abstract 627
 22. Hackett Jr J, Harris B, Holzmayer V, Yamaguchi J, Luk KC, Brennan C, Schochetman G, Devare S, Swanson P (2008) Naturally occurring polymorphisms in HIV-1 group M, N, and O integrase: implications for integrase inhibitors. In: 15th conference on retroviruses and opportunistic infections (CROI), Boston, MA, USA, 3–6 February 2008. Foundation for retrovirology and human health, Alexandria, VA, USA, p Abstract 872
 23. Garrido C, Geretti AM, de Mendoza C, Booth C, Strang A, Soriano V Polymorphisms at the integrase gene in distinct HIV populations may influence the susceptibility to integrase inhibitors. In: 6th European HIV Drug Resistance Workshop, Budapest, Hungary, 26–28 March 2008. Virology Education, BJ Utrecht, Netherlands, p Abstract 12
 24. Yerly S, Hirschel B, Gaille C, Kaiser L, Perrin L (2007) Polymorphism of HIV-1 subtypes B and non-B integrase gene. In: 14th conference on retroviruses and opportunistic infections (CROI), Los Angeles, CA, USA, 25–28 February 2007. Foundation for retrovirology and human health, Alexandria, VA, USA, p Abstract 626

25. Lataillade M, Chiarella J, Kozal MJ (2007) Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. *Antivir Ther* 12(4):563–570
26. Myers RE, Pillay D (2007) HIV-1 integrase sequence variation and covariation. *Antiviral Ther* 12:5
27. Van Baelen K, Rondelez E, Van Eygen V, Smits V, Van den Zegel P, Stuyver LJ (2008) Validation of a genotypic and phenotypic recombinant viruses assay to determine resistance against HIV-1 inhibitors. *Antiviral Ther* 13(Suppl 3):A127
28. Goodman D, Hluhanich R, Waters J, Margot NA, Fransen S, Gupta S, Huang W, Parkin N, Borroto-Esoda K, Svarovskaia ES, Miller MD, McColl DJ (2008) Integrase inhibitor resistance involves complex interactions among primary and secondary resistance mutations: a novel mutation L68 V/I associates with E92Q and increases resistance. In: XVII international HIV drug resistance workshop sitges, Spain, 2008. p Abstract 7
29. Van Baelen K, Van Eygen V, Rondelez E, Stuyver LJ (2008) Clade-specific HIV-1 integrase polymorphisms do not reduce raltegravir and elvitegravir phenotypic susceptibility. *AIDS* 22(14):1877–1880. doi:[10.1097/QAD.0b013e32830f9703](https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32830f9703)
30. Hu Z, Kuritzkes DR (2010) Effect of raltegravir resistance mutations in HIV-1 integrase on viral fitness. *J Acquir Immune Defic Syndr* 55(2):148–155. doi:[10.1097/QAI.0b013e3283181e9a87a](https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3283181e9a87a)
31. Ceccherini-Silberstein F, Armenia D, D'Arrigo R, Micheli V, Fabeni L, Meraviglia P, Capetti A, Zaccarelli M, Trotta MP, Narciso P, Antinori A, Perno CF (2008) Virological response and resistance in multi-experienced patients treated with raltegravir. *Antiviral ther* 13(Suppl 3):A15
32. Brenner BG, Lowe M, Moisi D, Hardy I, Gagnon S, Charest H, Baril JG, Wainberg MA, Roger M (2011) Subtype diversity associated with the development of HIV-1 resistance to integrase inhibitors. *J Med Virol*
33. da Silva D, Van Wesenbeeck L, Breilh D, Reigadas S, Anies G, Van Baelen K, Morlat P, Neau D, Dupon M, Wittkop L, Fleury H, Masquelier B (2010) HIV-1 resistance patterns to integrase inhibitors in antiretroviral-experienced patients with virological failure on raltegravir-containing regimens. *J Antimicrob Chemother* 65(6):1262–1269



Development of a phenotypic susceptibility assay for HIV-1 integrase inhibitors



Eva Heger^a, Alexandra Andrée Theis^a, Klaus Rummel^a, Hauke Walter^b,
Alejandro Pironti^c, Elena Knops^a, Veronica Di Cristanziano^a, Björn Jensen^d, Stefan Esser^e,
Rolf Kaiser^a, Nadine Lübke^{a,*}

^a Institute of Virology, University of Cologne, Germany

^b Medical Center for Infectiology, Berlin, and Medical Laboratory Stendal, Stendal, Germany

^c Department of Computational Biology and Applied Informatics, Max Planck Institute for Informatics, Saarbrücken, Germany

^d Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectiology, Heinrich-Heine-University, University Hospital Düsseldorf, Germany

^e Department of Dermatology and Venerology, University Hospital Duisburg-Essen, Germany

ABSTRACT

Article history:

Received 5 October 2015

Received in revised form 2 September 2016

Accepted 7 October 2016

Available online 11 October 2016

Keywords:

HIV-1

Integrase

Phenotypic resistance

Geno2pheno

Cross-resistance

Dolutegravir

Phenotypic resistance analysis is an indispensable method for determination of HIV-1 resistance and cross-resistance to novel drug compounds. Since integrase inhibitors are essential components of recent antiretroviral combination therapies, phenotypic resistance data, in conjunction with the corresponding genotypes, are needed for improving rules-based and data-driven tools for resistance prediction, such as HIV-Grade and geno2pheno_[integrase]. For generation of phenotypic resistance data to recent integrase inhibitors, a recombinant phenotypic integrase susceptibility assay was established. For validation purposes, the phenotypic resistance to raltegravir, elvitegravir and dolutegravir of nine subtype-B virus strains, isolated from integrase inhibitor-naïve and raltegravir-treated patients was determined. Genotypic resistance analysis identified four virus strains harbouring RAL resistance-associated mutations. Phenotypic resistance analysis was performed as follows. The HIV-1 integrase genes were cloned into a modified pNL4-3 vector and transfected into 293T cells for the generation of recombinant virus. The integrase-inhibitor susceptibility of the recombinant viruses was determined via an indicator cell line. While raltegravir resistance profiles presented a high cross-resistance to elvitegravir, dolutegravir maintained *in-vitro* activity in spite of the Y143R and N155H mutations, confirming the strong activity of dolutegravir against raltegravir-resistant viruses. Solely a Q148H+G140S variant presented reduced susceptibility to dolutegravir. In conclusion, our phenotypic susceptibility assay permits resistance analysis of the integrase gene of patient-derived viruses for integrase inhibitors by replication-competent recombinants. Thus, this assay can be used to analyze phenotypic drug resistance of integrase inhibitors *in vitro*. It provides the possibility to determine the impact of newly appearing mutational patterns to drug resistance of recent integrase inhibitors.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Since HIV-1 requires lifelong treatment, it is highly desirable that antiretroviral drugs have the following characteristics: (1) High potency against viral replication, (2) good long-term tolerability, and (3) a high barrier to resistance. These characteristics

are displayed by HIV-1 integrase inhibitors (INIs), the most recent class of antiretroviral drugs. Antiretroviral activity of INIs arises from their ability to inhibit the strand-transfer activity of HIV-1 integrase (IN), thus preventing the integration of proviral DNA into the host genome, which is an indispensable step in viral replication (Hazuda et al., 2000). Raltegravir (RAL), elvitegravir (EVG), and dolutegravir (DTG) are the currently available INIs.

In 2007, the first INI, RAL, was approved for the treatment of patients infected with HIV-1, followed by EVG in 2012. These first-generation INIs are highly efficacious in the treatment of HIV-1-infected subjects, but suffer from a low barrier to resistance, resulting in rapid emergence of resistance mutations (Geretti

* Corresponding author at: Institute of Virology, Heinrich-Heine-University, University Hospital Düsseldorf, Universitätsstraße 1, 40225, Düsseldorf, Germany.

E-mail address: nadine.luebke@med.uni-duesseldorf.de (N. Lübke).

¹ Institute of Virology, Heinrich-Heine-University, University Hospital Düsseldorf, Germany.

et al., 2012; Grobler and Hazuda, 2014; Quashie et al., 2013). Resistance to RAL is induced by three clearly identified major resistance pathways, involving primary/major mutations at the IN residues Y143, Q148, and N155, respectively. Since primary/major resistance mutations for EVG include T66I, E92Q, Q148H/R/K, and N155H, RAL and EVG present broad cross resistance (Blanco et al., 2011; Garrido et al., 2012; Geretti et al., 2012; McColl et al., 2007; Sichtig et al., 2009). In contrast, pathways leading to primary resistance to DTG have not yet been identified, but likely involve the accumulation of multiple mutations (Kobayashi et al., 2011).

DTG is a second-generation INI that was approved in 2014 for use in treatment-naïve and treatment-experienced patients, including INI-experienced patients. Compared to RAL and EVG, DTG has a higher resistance barrier since resistance is only slowly selected *in vitro* and has not emerged in studies of therapy-naïve patients, up to date (Llibre et al., 2015; Raffi et al., 2013; Wainberg et al., 2013; White et al., 2014). Antiviral activity of DTG in spite of resistance to RAL and EVG has been shown *in vitro*, with only limited cross resistance to RAL and EVG resistant viruses (Seki et al., 2015; Underwood et al., 2012; Van Wesenbeeck et al., 2011). This has been confirmed in clinical studies with patients harbouring RAL-resistant HIV-1 strains (Arribas et al., 2010; Eron et al., 2010). Nevertheless, decreased susceptibility to DTG is shown by isolates with a major INI-resistance mutation at residue Q148 and additional minor INI-resistance mutations (Abram et al., 2013; Underwood et al., 2012). DTG is highly efficacious in treatment-naïve and treatment-experienced patients, regardless of previous therapies. In the clinic, this has led to an increase in INI use in first and second-line therapies. Some mutations selected *in vitro* and *in vivo* are potentially involved in resistance to DTG, e.g. mutations at residues G118, F121, E138, S153, and R263 (Kobayashi et al., 2011; Quashie et al., 2012). However, their impact on DTG resistance and cross-resistance to other INIs remains unclear.

Resistance development is characterized by the appearance of a major resistance mutation followed by the accumulation of resistance mutations that further increase drug resistance or restore viral replication capacity. Thus, it is important to investigate the complete mutation patterns of HIV-1 IN and not only single resistance mutations. We therefore developed a phenotypic IN susceptibility assay that allows for assessment of resistance and cross-resistance to INIs in patient-derived viruses.

We will use our newly developed phenotypic resistance assay for generating genotype-phenotype pairs, which will in turn be used for analysing INI resistance in different HIV-1 strains. Specifically, we want to produce genotype-phenotype pairs that are independent of controlled clinical studies and use them for characterization of INI-resistance mutations that are associated with therapy failure. Furthermore, this data will be used for improving the interpretation of HIV-1 genotypes with respect to resistance to INIs. Genotype-phenotype pairs can be used for identifying complex resistance patterns and for the improvement of the bioinformatics tool geno2pheno_[integrase], which offers freely available phenotype-based INI-resistance predictions. geno2pheno_[integrase] version 2.0 was trained on 285 RAL- and 228 EVG genotype-phenotype pairs from the Stanford HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu>). These genotype-phenotype pairs originate from controlled clinical studies and were predominantly generated with commercial phenotypic assays.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Viral samples

Subtype-B viral samples were obtained from patients of the RESINA cohort (BMG: IIA5-2013-2514AUK375). Analysis of INI

resistance was performed on nine plasma samples harbouring viruses with different genotypic integrase profiles. Five samples were obtained of patients without INI treatment history harbouring viruses presenting genotypically none of the known INI resistance mutations (#1–5) as negative control. For phenotypic determination of INI resistance, four plasma samples of patients after RAL-therapy failure harbouring viruses with described RAL resistance mutations (#6–9) were analysed. Subtyping was performed with the COMET HIV-1 subtyping tool, version 0.2 (<http://comet.retrovirology.lu/>).

2.1.2. Integrase inhibitors

RAL was kindly provided by Merck. EVG and DTG were purchased from Selleckchem (pure substances).

2.2. Methods

We performed genotypic and phenotypic INI-resistance analyses on the IN gene region of nine patient-derived HIV-1 subtype-B virus strains. For this purpose, we considered RAL, EVG, and DTG. The samples were selected according to their genotypic resistance profile.

2.2.1. Genotypic INI-resistance analysis

For the selection of convenient plasma samples for the validation of the phenotypic susceptibility assay for INIs, genotypic resistance analysis of the integrase gene region was performed as previously described (Sichtig et al., 2009). Mutations in each IN sequence were determined by comparison to HXB2, an HIV-1 subtype-B reference strain. The prediction of genotypic resistance of the viruses against RAL, and cross-resistance against EVG and DTG and the scored INI resistance-associated mutations were defined according to published data (reviewed in (Blanco et al., 2011; Quashie et al., 2013)) and the Stanford Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu>).

2.2.2. Vector design

We cloned the HIV-1 IN region of each viral isolate into the HIV-1 complete-genome vector pNL4-3 (GenBank accession no. AF324493 constructed by (Adachi et al., 1986)). For this purpose, the vector had to be modified to pNL4-3ΔIN. The EcoRI restriction site at nucleotide (nt) positions 5743–5748 and the NcoI site at nt positions 10,565–10,570 were deleted. Furthermore, we inserted an EcoRI site at nt positions 4171–4176 (*pol* gene) and an NcoI site at nt position 5098–5103 (Fig. 1a). We used site-directed mutagenesis for inserting the EcoRI and the NcoI sites and for deleting the EcoRI at nt positions 5743–5748 (see primers in Table 1), in accordance with the manufacturer's protocol (QuickChange™ Site Directed Mutagenesis Kit, Stratagene). For deleting the NcoI site at nt position 10565 in pNL4-3, we digested the vector with the NcoI enzyme, subsequently filling up the 5'-overlapping single-stranded DNA via Klenow fragment and religating the vector. In addition to deleting the NcoI site, this resulted in a 4 nt insertion (CATG).

2.2.3. IN amplification and purification

Viral RNA from 1000 µl plasma was isolated automatically using the MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I and the MagNA Pure™ Compact System (Roche Diagnostics), according to the manufacturer's instructions. cDNA of the RNA was generated using the SuperScript III RT Kit (Invitrogen) with the primer 5220as (Table 1). Amplification of the integrase gene was performed via nested PCR with the HotStarTaq-Polymerase (Qiagen), according to the company's protocol. The first PCR was performed with the outer primers 4140s and 5220as and the second PCR was performed with the inner primers 4166Mfel and 5077Pcil (Table 1). These primers are

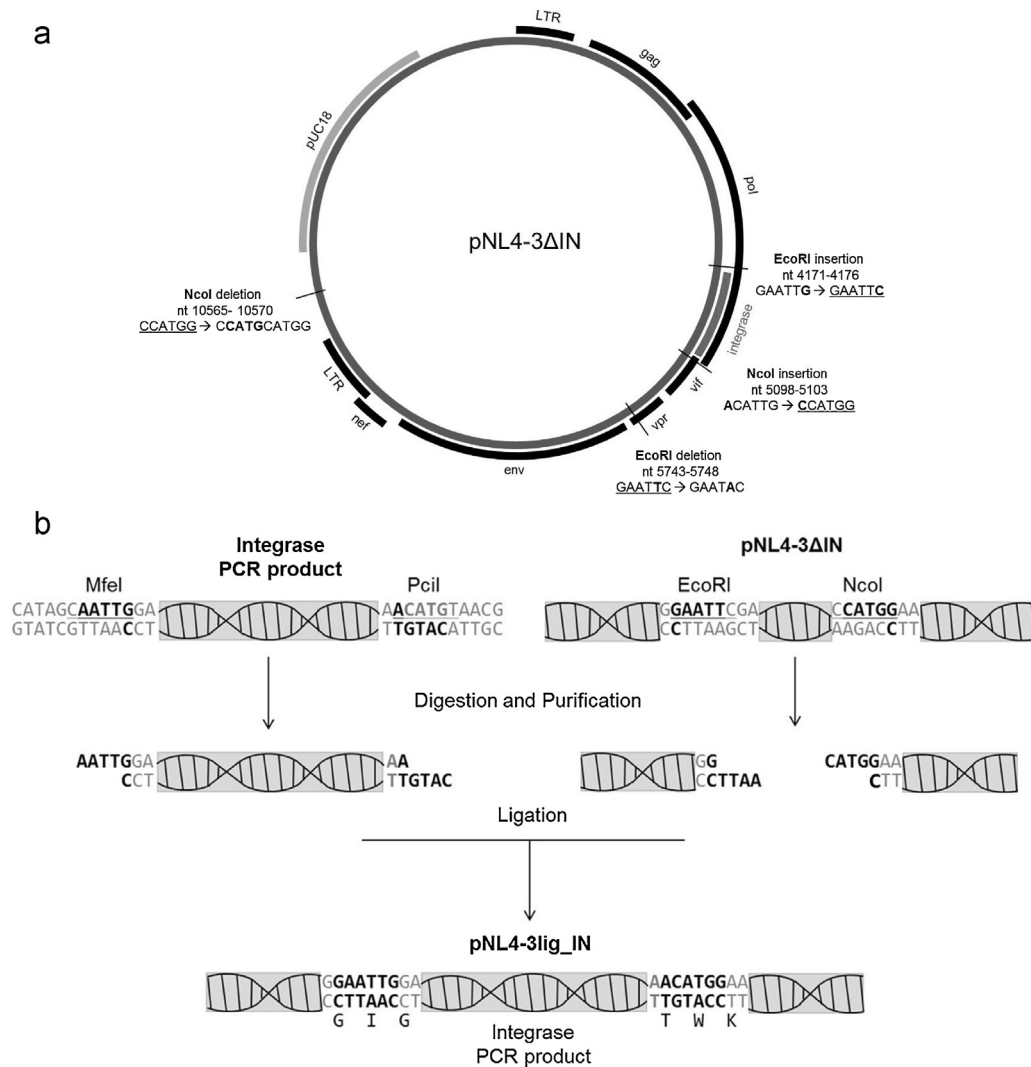


Fig. 1. (a) Schematic representation of the pNL4-3ΔIN construct.

The EcoRI restriction site at position 5743–5748 and the NcoI restriction site at position 10565–10570 were deleted, while an EcoRI (4171–4175) and an NcoI (5098–5103) restriction site flanking the integrase gene were introduced. The nucleotide positions highlighted in bold were exchanged by site-directed mutagenesis. (b) Schematic representation of the cloning of the amplified IN gene into pNL4-3ΔIN to pNL4-3lig_IN. The IN PCR amplicons were flanked with the recognition sites for MfeI and PciI, which overhangs are compatible cohesive to the EcoRI and NcoI sites of pNL4-3ΔIN allowing a ligation without produced amino acid exchanges. The nucleotides highlighted in bold present the restriction overhangs generated by the different enzymes.

Table 1

Oligonucleotides used for vector preparation, IN cloning and IN sequencing.

Primer	Sequence 5' → 3'	Position (NL4-3)	Application
t5747a-s	AAGCCATAATAAGAATACTGCAACAACCTGCTTTATCCATTTC	5731 → 5774	EcoRI-Deletion
t5747a-as	GATAAACAGCAGTTGTTGCAGTATTCTTATTATGGCTTCCACTC	5725 ← 5768	EcoRI-Deletion
g4176c-s	GTACCAGCACACAAGGAATTCGAGGAAATGAACAAG	4155 → 4191	EcoRI-Insertion
g4176c-as	CTTGTTCAITTCCTCGAATTCCTTTGTGTGCTGGTAC	4155 ← 4191	EcoRI-Insertion
a5098c-s	CAAGTAGACAGGATGAGGATTAACCCATGGAAAAGATTAGTAAACA	5074 → 5120	NcoI-Insertion
a5098c-as	TGTTTACTAATCTTTCCATGGGTAAATCCTCATCTGTCTACTTG	5120 ← 5174	NcoI-Insertion
5'-INT	ATTGGAGGAAATGAACAAGT	4173 → 4192	PCR
3p31	ATCCTGTCTACTGCCACACA	5066 ← 5087	PCR
4140s	GTCTACCTGGCATGGGTACCAGCAC	4140 → 4164	PCR
5220as	CCCTAGTGGGATGTGTACTTCTGA	5197 ← 5220	PCR
4166MfeI	CAAAGCAATTGGAGGAAATGAACAAGT	4166 → 4192	PCR
5077PciI	CGTTACATGTTCTAATCCTCATCTGTCTAC	5077 → 5107	PCR

flanked with restriction sites for MfeI and PciI which have compatible cohesive ends to the restriction sites EcoRI and NcoI, allowing a successful cloning of the integrase gene into pNL4-3ΔIN (Fig. 1b). Thermal cycling of both PCR consisted of an activation step at 95 °C for 15 min. The first PCR consisted of 35 cycles. Each cycle spent 30s at 95 °C, 30s at 58 °C and 2 min at 72 °C. The second PCR was a touch-

down PCR comprising 45 cycles of 30s at 95 °C, 45s at 65 °C down to 58 °C in 4 cycles and 3 min at 72 °C. Both PCRs had a final elongation step for 10 min at 72 °C.

The 911 bp PCR amplicons were purified (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) and quantified.

2.2.4. Cloning strategy

In order to produce pNL4-3 Δ IN vectors for ligation with IN PCR-products, the restriction sites of the modified pNL4-3 vector were digested with the endonucleases EcoRI and NcoI for 6 h at 37 °C. Subsequently, the NL4-3 Δ IN-fragment (13902 bp) was purified by gel extraction.

In order to enhance the ligation efficiency of IN PCR-products (IN-MfeI/PciI) and the pNL4-3 Δ IN vector, we used the pDrive cloning vector (Qiagen) in an intermediate step. Specifically, 100 ng of the purified IN PCR product and 1 μ l of the pDrive cloning vector were ligated and transformed into competent JM109 cells. After cultivation and plasmid preparation, the DNA clones were verified by restriction analysis and sequencing. The integrase genes of the respective clones were cleaved using the framed endonucleases MfeI and PciI and extracted with a gel. 20 ng of the extracted fragments and 60 ng of pNL4-3 Δ IN (ratio 1:5) were used for the ligation reaction (15 h at 15 °C). After transformation into JM109 cells, plasmid DNA was isolated and controlled by restriction analysis with MfeI with expected fragment sizes of 1747, 3930, and 9151 bp. All positive clones were analysed by sequencing in order to verify the mutations. For the generation of a wildtype reference strain pNL4-3lig.IN, the integrase gene of pNL4-3 was amplified and ligated in into pNL4-3 Δ IN, using exactly the same procedure applied to the patients' virus variants. Note that neither the insertion nor the deletion restriction sites changed the amino acid sequence of the pNL4-3lig.IN after cloning, since compatible restriction sites were used for ligating the vector and the insert, thus restoring the original amino acid sequence of the NL4-3 backbone (Fig. 1b).

2.2.5. Cultivation of recombinant virus

For the generation of recombinant virus, the plasmid DNA (10 μ g), which contained the recombinant virus genome, was transfected into 293T cells (1.5 million cells per plate), using the SuperFect transfection reagent (Qiagen), in accordance with the manufacturer's protocol. Recombinant viral particles were generated by the transfected 293T cells and were harvested from the supernatant two days after transfection. For this purpose, the supernatant was centrifuged at 1500 rpm for 5 min, aliquoted and stored at –80 °C. In order to generate high-titer infectious-virus supernatants, 2 ml of the 293T supernatants were used to infect 10 ml CEMx174 cells (100,000 cells/mL) and cultured for 3–5 days until a cytopathic effect (CPE) was visible. Supernatant aliquots were stored at –80 °C. The IN genotype of the cultivated viruses was verified by sequencing analysis. Due to the differential replication capacity of each recombinant strain, virus titers varied between samples. For this reason, phenotypic susceptibility was tested with sample-specific supernatant volumes. These volumes were determined with a virus titration assay. Specifically, the indicator cell line CEMx174-SIV-SEAP (Means et al., 1997) was infected with 1, 5, 10, or 20 μ l of the virus stock as, described by Walter et al. (Walter et al., 1999). In CEMx174-SIV-SEAP cells, HIV-1 Tat protein transactivates the stably integrated SEAP reporter construct, which leads to a strong increase in SEAP activity. This activity can be measured in the supernatant using the Phospha-Light™ SEAP (Secreted Placental Alkaline Phosphatase) Reporter Gene Assay System (Applied Biosystems, Part Number T1015) three days after infection. Equivalent supernatant volumes were determined by normalization with respect to 20,000 relative light units (RLU). The equivalent supernatant volume for each sample was used as the input for the susceptibility assay.

2.2.6. Susceptibility assay

Walter et al., 1999; describes a procedure for phenotypic resistance analysis (Fig. 2). (Walter et al., 1999). Since this procedure had only been established for NRTIs, NNRTIs, and PIs, it was adapted in order to perform INI resistance and cross resistance analysis of the

recombinant clones, as follows. The INIs were used in a serial dilution with a dilution factor of 3. The concentrations of RAL, EVG, and DTG ranged between 0 and 10 μ M, 0–3 μ M, and 0–0.1 μ M, respectively. Equivalent supernatant volumes, as calculated by the virus titration assay, were used to determine the viral susceptibility to INIs in a 96-well format. For this purpose, CEMx174-SIV-SEAP cells were infected in triplicate with the calculated 20,000 RLU dose of the recombinant virus clones in the presence of the respective drug concentrations. For standardisation, the susceptibility of the reference strain NL4-3lig.IN to the different INIs was determined on every 96-well plate, additionally.

The replicative capacity of the recombinant viruses was determined three days after infection by measuring the SEAP activity of the virus cultures and of the reference virus. Using the decline of RLUs in the serial drug dilutions, the mean 50% inhibitory drug concentration (IC₅₀) was determined. The fold change (FC) values were calculated by dividing the determined mean IC₅₀ value of a recombinant virus clone by that for the reference strain NL4-3lig.IN.

2.2.7. Analysis

The correlation of the determined FC values measured in the established phenotypic susceptibility assay and the predicted FC values by geno2pheno_[integrase] was calculated with Pearson's correlation coefficient (R) (<http://www.socscistatistics.com/tests/pearson/Default2.aspx>).

3. Results

3.1. Genotypic resistance analysis

For evaluating the phenotypic resistance test for INIs, nine different patient-derived subtype-B virus strains with and without RAL resistance-associated mutations were analysed. The selection of the viruses was based on the integrase genotypes which were analysed in the context of routine diagnostics of resistance testing.

Three of the viruses isolated from RAL-experienced patients harboured mutations conferring resistance to RAL *in vivo*, including the primary mutation N155H combined with the secondary mutation G163R (#7), the primary mutation Y143R associated with the secondary mutations T97A and E138K (#8), and the primary mutation Q148H with the secondary mutation G140S (#9). The virus strain #6 presented only the secondary RAL-resistance mutation V151I (Table 2). The genotyped viruses #1–5 presented none of the described RAL-resistance mutations.

3.2. Phenotypic resistance analysis

After characterization of the IN genotypes, the integrase region of the selected viruses was amplified and cloned into the modified pNL4-3 vector (pNL4-3 Δ IN) for generating recombinant viruses in cell culture. Sample-specific volumes of virus supernatants (20,000 RLU dose determined via virus titration assay) were used for the measurement of virus replication under drug exposure by means of the susceptibility assay. A schematic overview of the IN susceptibility assay is pictured in Fig. 2.

The determined IC₅₀ values of the five HIV-1 clones without genotypic resistance to all INIs (#1–5) were predominately comparable to those of the reference strain NL4-3lig.IN, with the exception of clone #2 (Table 3, Fig. 3). This wildtype strain (#2) presented unexpected susceptibility results to EVG and DTG. The mean IC₅₀-value for EVG was 23.78 nM (range 3.32–4.40) and for DTG 2.89 nM (range 1.41–1.94), with a mean calculated fold change (FC) of 3.78 and 1.59, respectively. As these increased fold changes are most probably a result of a reduced replication capacity of the recombinant virus and not of an initial reduced susceptibility to the drugs, clone #2 was excluded of the analysis. The mean IC₅₀-values

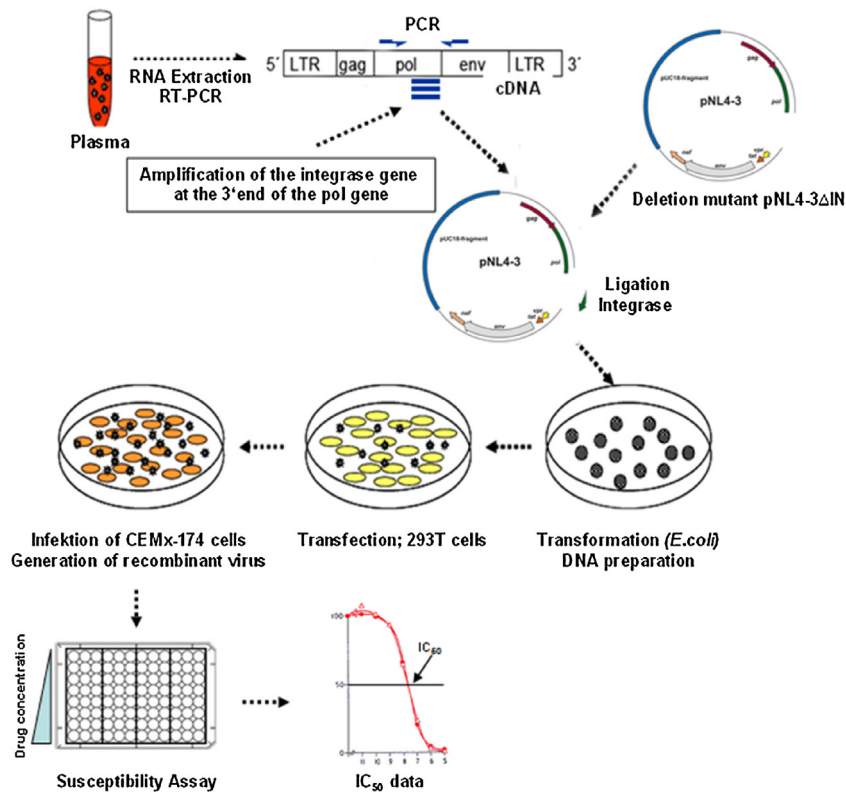


Fig. 2. Schematic representation of the phenotypic IN resistance assay.

IN RT-PCR products were cloned into a modified IN-deleted pNL4-3 backbone. Recombinant plasmid DNA was transfected and viruses were cultivated. Finally, viral replication was measured with a reporter gene assay.

Table 2
Substitutions of RAL-treated patients analysed for phenotypic INI-susceptibility.

Sample	Substitutions (relative to the reference strain HXB2)
#1–4773	D10E, K14R, R20 K, A23 V, V31I, V72I, G123S, A124T, R127 K, T206S, N232D, L234G, N254Q
#2–4867	D3G, D10E, E11D, R20 K, V31I, M50I, L101I, T112I, G123S, A124T, R127 K, K136Q, G163E, G193E, S230N, N232D
#3–7459	D10E, K14R, R20 K, V31I, P90S, S119G, T122I, G123S, A124T, T125A, R127 K, K156N, V201I, T206S, D229N, S230N, N232E, S283G
#4–7480	D10E, K14R, V72I, A91E, L101I, T112A, S119R, G123S, A124N, R127 K, K156N, S195C, N232D, M275L
#5–307	D10E, E11D, V31I, V72I, L101I, K111T, S119P, G123S, A124T, R127 K, F181Y, K219N, N222 K, N232D
#6–4939	D10E, I113 V, G123S, A124T, R127 K, V151I, N232D, L234V
#7–4833	D10E, S17N, V31I, V72I, V75A, T112 V, G123S, A124N, T125A, V126L, R127 K, N155H , G163R, S230N, N232D, D256E, D278G
#8–5150	D10E, S17N, M22I, A23 V, L28I, L45 V, L68 V, V72I, <u>T97A</u> , L101I, S119T, G123S, A124T, R127 K, E138 K, Y143R , N232D, D256E
#9–6834	D10E, S17N, L28I, S39C, L45 V, V72I, I113L, G123S, A124N, T125A, R127 K, <u>G140S</u> , Q148H , G163Q, V201I, N232D, V259I, K266R, S283G

Mutations highlighted bold: Primary RAL resistance-associated mutations.

Mutations underlined: Secondary RAL resistance-associated mutations.

for the remaining four strains without defined RAL resistance mutations was 9.83 nM for RAL (range 8.23–13.53 nM), compared with 6.31 nM for EVG (range 4.00–9.55 nM), and only 1.97 nM for DTG (range 1.67–2.14 nM). Their calculated mean fold changes (FC) for RAL ranged from 1.38 to 2.12, for EVG from 0.64 to 1.52, and for DTG from 0.92–1.18.

The IC_{50} values and FCs of clone #6, harbouring only the minor RAL resistance mutation V151I, were comparable to the wild-type values for all INIs with a mean FCs of 1.97 for RAL (range 1.20–2.86), 0.95 for EVG (range 0.92–0.98) and 1.31 for DTG (range 1.23–1.35) (Table 3).

The clones harbouring RAL resistance mutations, #7, #8, and #9, revealed higher IC_{50} and FC values for RAL and EVG compared to the wildtype strains, as expected (Table 3; Fig. 4). Regarding DTG, the RAL-resistant clones #7 and #8 presented no reduction in susceptibility (mean FCs of 1.3 and 0.6, respectively). Overall, clone #9 (Q148H + G140S) presented the highest resistance against RAL and

EVG (FC > 200), and also reduced sensitivity to DTG (mean FC 3.44; range 3.13–3.73).

For the determination of the IC_{50} values and the calculation of the FC values, the phenotypic analyses were performed in triplicate, independently (see standard deviation). For proving our data, the calculated FC values were compared to predicted FC values obtained with geno2pheno_[integrase] (Table 3). There is a strong positive correlation between measured and predicted FC values. The Pearson's correlation coefficients (R) were 0.98 for RAL and 1.00 for EVG. As this phenotype-based interpretation tool only offers predictions for RAL and EVG, virtual determination of FC values for DTG was not possible.

4. Discussion

HIV integrase inhibitors are potent antiretroviral drugs that efficiently decrease viral load in HIV-1 infected patients. Since 2007,

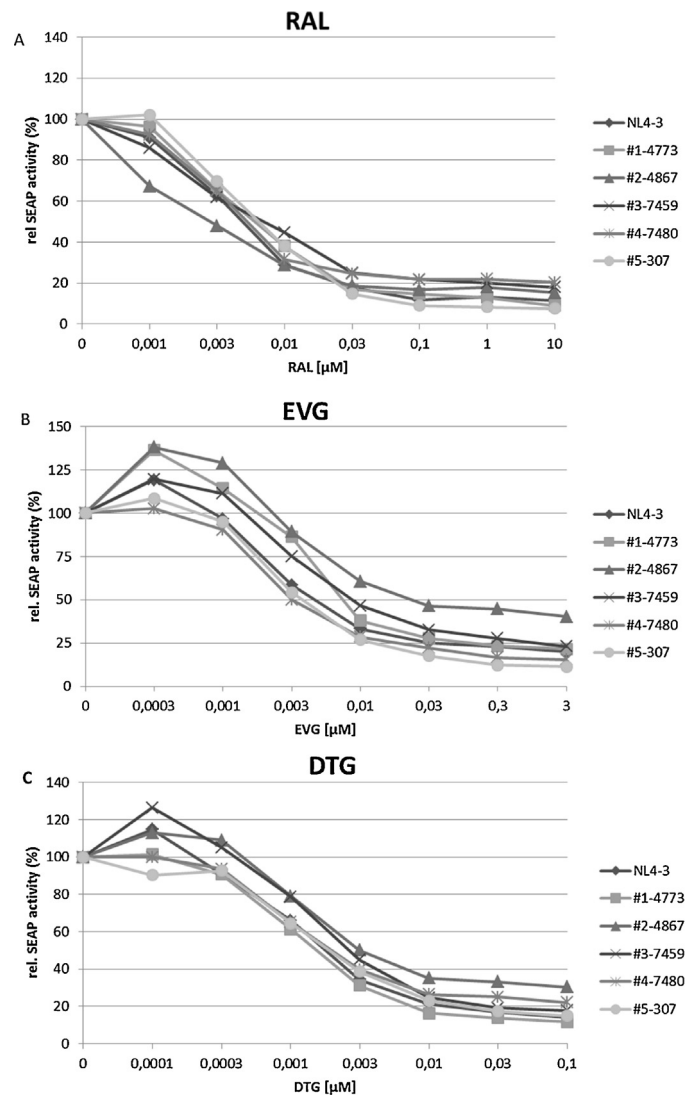


Fig. 3. Relative SEAP activity of the HIV-1 clones #1-5 without described RAL-associated mutations in the presence of the integrase inhibitors RAL, EVG and DTG. Relative SEAP (Secreted Placental Alkaline Phosphatase-gene) activity of the HIV-1 subtype B clones #1-5 in the presence of increasing concentrations of A: raltegravir (RAL), B: elvitegravir (EVG) and C: dolutegravir (DTG).

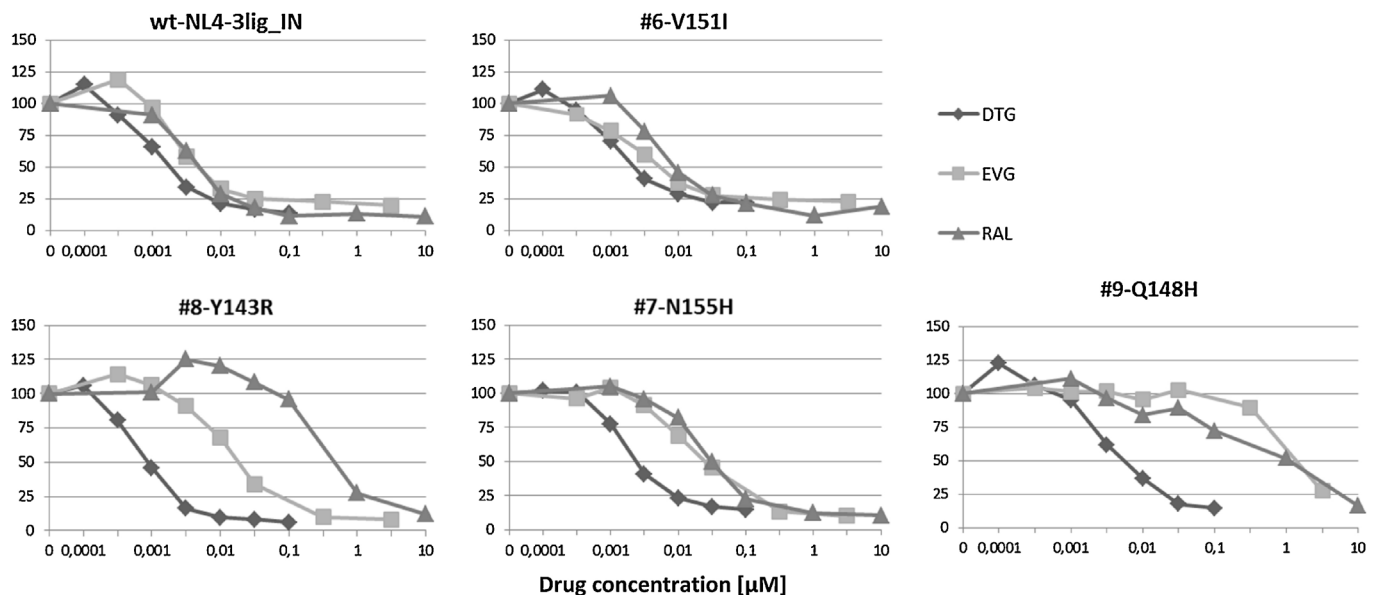


Fig. 4. Relative SEAP activity of the HIV-1 clones #6-9 harbouring described RAL-associated mutations in the presence of the integrase inhibitors RAL, EVG and DTG.

There is a significant influence of *pol* fragments on the replication capacity of HIV-1; the conditions for the phenotypic resistance analysis of chimeric viruses are complex (Brumme et al., 2011; Iordanskiy et al., 2010). This limitation was also observed during our first attempt to generate chimeric viruses of non-B integrase genes in the pNL4-3 subtype-B backbone, as these recombinants were not able to generate a sufficient number of recombinant particles as required by the susceptibility assay.

Overall, the determined IC₅₀ values of the wild type strains were 5-fold and 3.2-fold higher for RAL and EVG compared to DTG, confirming the low DTG drug concentrations needed for the inhibition of viral replication (Seki et al., 2015). The intrinsic variability of our phenotypic IN susceptibility assay is comparable to the reverse-transcriptase and protease inhibitor assay described by Walter et al. (Walter et al., 1999).

Mean FC values for RAL and EVG measured by our phenotypic susceptibility assay are strongly positively correlated to FC values predicted by geno2pheno_[integrase]. Similar results were observed for a phenotypic drug susceptibility assay for HIV protease and reverse transcriptase which was compared to predicted values produced with a genotype-based phenotyping algorithm (Pattery et al., 2012; Van Houtte et al., 2009).

Phenotypic resistance testing is time consuming and fails to produce (accurate) results in a variety of settings, e.g. low viral load of the plasma samples and reduced fitness of the generated recombinants. However, it is an invaluable tool for resistance determination in patients who harbour viruses with complex genetic patterns or for drugs with insufficiently characterized mutational resistance profiles.

In order to improve the INI-resistance predictions by geno2pheno_[integrase], more genotype-phenotype pairs are required. In this context, it is especially important that independent data describing phenotypic resistance after therapy failure in routine clinical practice be generated. Furthermore, the generation of resistance data for DTG and other, investigational INIs will allow geno2pheno_[integrase] to offer predictions for these drugs. Last but not least, the generation of a sufficient amount of phenotypic resistance data for INIs will allow for the robust determination of clinically-relevant cutoffs for the fold-change in drug resistance.

In conclusion, the established phenotypic INI resistance assay permits resistance analysis of the complete IN gene of patient-derived viruses for INIs. Thus, the assay can be used for the analysis of newly appearing mutational resistance patterns of recent INIs providing resistance data for interpretation system geno2pheno_[integrase] in future.

Acknowledgements

The authors thank Dörte Hammerschmidt for technical assistance, and Saleta Sierra for helpful discussions.

References

Abram, M.E., Hluhanich, R.M., Goodman, D.D., Andreatta, K.N., Margot, N.A., Ye, L., Niedziela-Majka, A., Barnes, T.L., Novikov, N., Chen, X., Svarovskaia, E.S., McColl, D.J., White, K.L., Miller, M.D., 2013. Impact of primary elvitegravir resistance-associated mutations in HIV-1 integrase on drug susceptibility and viral replication fitness. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2654–2663.

Adachi, A., Gendelman, H.E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., Martin, M.A., 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* 59, 284–291.

Arribas, J., Lazzarin, A., Raffi, F., Rakhmanova, A., Richmond, G., Rockstroh, J., van Lunzen, J., Young, B., Almond, S., Brothers, C., Min, S., Nichols, G., 2010. Once-daily S/GSK1349572 as part of combination therapy in antiretroviral naïve adults: rapid and potent antiviral responses in the interim 16-week analysis from SPRING-1 (ING112276). XVIII. Int. AIDS Conf., Abstract THLB20.

Blanco, J.L., Varghese, V., Rhee, S.Y., Gatell, J.M., Shafer, R.W., 2011. HIV-1 integrase inhibitor resistance and its clinical implications. *J. Infect. Dis.* 203, 1204–1214.

Boyd, S.D., Maldarelli, F., Sereti, I., Ouedraogo, G.L., Rehm, C.A., Boltz, V., Shoemaker, D., Pau, A.K., 2011. Transmitted raltegravir resistance in an HIV-1 CRF-AG-infected patient. *Antivir. Ther.* 16, 257–261.

Brumme, Z.L., Li, C., Miura, T., Sela, J., Rosato, P.C., Brumme, C.J., Markle, T.J., Martin, E., Block, B.L., Trocha, A., Kadie, C.M., Allen, T.M., Pereyra, F., Heckerman, D., Walker, B.D., Brockman, M.A., 2011. Reduced replication capacity of NL4-3 recombinant viruses encoding reverse transcriptase-integrase sequences from HIV-1 elite controllers. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 56, 100–108.

Canducci, F., Ceresola, E.R., Boeri, E., Spagnuolo, V., Cossarini, F., Castagna, A., Lazzarin, A., Clementi, M., 2011. Cross-resistance profile of the novel integrase inhibitor Dolutegravir (S/GSK1349572) using clonal viral variants selected in patients failing raltegravir. *J. Infect. Dis.* 204, 1811–1815.

De Luca, A., Weidner, J., Di Giambenedetto, S., Coakley, E., Cingolani, A., Bates, M., Lie, Y., Pesano, R., Cauda, R., Schapiro, J., 2007. Association of HIV-1 replication capacity with treatment outcomes in patients with virologic treatment failure. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 45, 411–417.

Eron, J., Livrozet, J.M., Morlat, P., Lazzarin, A., Katlama, C., Hawkins, T., Fujiwara, T., Cuffe, R., Vavro, C., Santiago, J., Ait-Khaled, M., Min, S., Yeo, J.M., 2010. Activity of integrase inhibitor S/GSK1349572 in Subjects with HIV Exhibiting Raltegravir Resistance: Week 24 Results of VIKING Study (ING112961). 10th Int. Congr. Drug Ther. HIV Infect., O435.

Garrido, C., Villacian, J., Zahonero, N., Pattery, T., Garcia, F., Gutierrez, F., Caballero, E., Van Houtte, M., Soriano, V., de Mendoza, C., 2012. Broad phenotypic cross-resistance to elvitegravir in HIV-infected patients failing on raltegravir-containing regimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2873–2878.

Geretti, A.M., Armenia, D., Ceccherini-Silberstein, F., 2012. Emerging patterns and implications of HIV-1 integrase inhibitor resistance. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 677–686.

Grobler, J.A., Hazuda, D.J., 2014. Resistance to HIV integrase strand transfer inhibitors: in vitro findings and clinical consequences. *Curr. Opin. Virol.* 8, 98–103.

Hazuda, D.J., Felock, P., Witmer, M., Wolfe, A., Stillmock, K., Grobler, J.A., Espeseth, A., Gabrylski, L., Schleif, W., Blau, C., Miller, M.D., 2000. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* 287, 646–650.

Hurt, C.B., 2011. Transmitted resistance to HIV integrase strand-transfer inhibitors: right on schedule. *Antivir. Ther.* 16, 137–140.

Iordanskiy, S., Waltke, M., Feng, Y., Wood, C., 2010. Subtype-associated differences in HIV-1 reverse transcription affect the viral replication. *Retrovirology* 7, 85.

Kobayashi, M., Yoshinaga, T., Seki, T., Wakasa-Morimoto, C., Brown, K.W., Ferris, R., Foster, S.A., Hazen, R.J., Miki, S., Suyama-Kagitani, A., Kawauchi-Miki, S., Taishi, T., Kawasuji, T., Johns, B.A., Underwood, M.R., Garvey, E.P., Sato, A., Fujiwara, T., 2011. In Vitro antiretroviral properties of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 813–821.

Llibre, J.M., Pulido, F., Garcia, F., Garcia Delatoro, M., Blanco, J.L., Delgado, R., 2015. Genetic barrier to resistance for dolutegravir. *AIDS Rev.* 17, 56–64.

McColl, D.J., Fransen, S., Gupta, S., Parkin, N., Margot, N., Chuck, S., Cheng, A.K., Miller, M.D., 2007. Resistance and cross-resistance to first generation integrase inhibitors: insights from a Phase II study of elvitegravir (GS-9137). *Antivir. Ther.* 12, 11.

Means, R.E., Greenough, T., Desrosiers, R.C., 1997. Neutralization sensitivity of cell culture-passaged simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 71, 7895–7902.

Metifiot, M., Marchand, C., Maddali, K., Pommier, Y., 2010. Resistance to integrase inhibitors. *Viruses* 2, 1347–1366.

Metifiot, M., Vandegraaff, N., Maddali, K., Naumova, A., Zhang, X., Rhodes, D., Marchand, C., Pommier, Y., 2011. Elvitegravir overcomes resistance to raltegravir induced by integrase mutation Y143. *AIDS* 25, 1175–1178.

Pattery, T., Verlinden, Y., De Wolf, H., Nauwelaers, D., Van Baelen, K., Van Houtte, M., McKenna, P., Villacian, J., 2012. Development and performance of conventional HIV-1 phenotyping (Antivirogram(R)) and genotype-based calculated phenotyping assay (virco(R)TYPE HIV-1) on protease and reverse transcriptase genes to evaluate drug resistance. *Intervirology* 55, 138–146.

Quashie, P.K., Mesplede, T., Han, Y.S., Oliveira, M., Singhroy, D.N., Fujiwara, T., Underwood, M.R., Wainberg, M.A., 2012. Characterization of the R263 K mutation in HIV-1 integrase that confers low-level resistance to the second-generation integrase strand transfer inhibitor dolutegravir. *J. Virol.* 86, 2696–2705.

Quashie, P.K., Mesplede, T., Wainberg, M.A., 2013. Evolution of HIV integrase resistance mutations. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 26, 43–49.

Raffi, F., Jaeger, H., Quiros-Roldan, E., Albrecht, H., Belonosova, E., Gatell, J.M., Baril, J.G., Domingo, P., Brennan, C., Almond, S., Min, S., extended, S.-S.G., 2013. Once-daily dolutegravir versus twice-daily raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (SPRING-2 study): 96 week results from a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet. Infect. Dis.* 13, 927–935.

Seki, T., Suyama-Kagitani, A., Kawauchi-Miki, S., Miki, S., Wakasa-Morimoto, C., Akihisa, E., Nakahara, K., Kobayashi, M., Underwood, M.R., Sato, A., Fujiwara, T., Yoshinaga, T., 2015. Effects of raltegravir or elvitegravir resistance signature mutations on the barrier to dolutegravir resistance in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 2596–2606.

Sichtig, N., Sierra, S., Kaiser, R., Däumer, M.P., Reuter, S., Schülter, E., Altmann, A., Fäktenheuer, G., Dittmer, U., Pfister, H., Esser, S., 2009. Raltegravir resistance mutation profiles: baseline situation and modification during treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* 64 (25), 32.

- Underwood, M.R., Johns, B.A., Sato, A., Martin, J.N., Deeks, S.G., Fujiwara, T., 2012. The activity of the integrase inhibitor dolutegravir against HIV-1 variants isolated from raltegravir-treated adults. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 61, 297–301.
- Van Houtte, M., Picchio, G., Van Der Borgh, K., Pattery, T., Lecocq, P., Bachelier, L.T., 2009. A comparison of HIV-1 drug susceptibility as provided by conventional phenotyping and by a phenotype prediction tool based on viral genotype. *J. Med. Virol.* 81, 1702–1709.
- Van Wesenbeeck, L., Rondelez, E., Feyaerts, M., Verheyen, A., Van der Borgh, K., Smits, V., Cleybergh, C., De Wolf, H., Van Baelen, K., Stuyver, L.J., 2011. Cross-resistance profile determination of two second-generation HIV-1 integrase inhibitors using a panel of recombinant viruses derived from raltegravir-treated clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 321–325.
- Wainberg, M.A., Mesplede, T., Raffi, F., 2013. What if HIV were unable to develop resistance against a new therapeutic agent? *BMC Med.* 11, 249.
- Walter, H., Schmidt, B., Korn, K., Vandamme, A.M., Harrer, T., Uberla, K., 1999. Rapid, phenotypic HIV-1 drug sensitivity assay for protease and reverse transcriptase inhibitors. *J. Clin. Virol.* 13, 71–80.
- Walter, H., Low, P., Harrer, T., Schmitt, M., Schwingel, E., Tschochner, M., Helm, M., Korn, K., Uberla, K., Schmidt, B., 2002. No evidence for persistence of multidrug-resistant viral strains after a 7-month treatment interruption in an HIV-1-infected individual. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 31, 137–146.
- White, K.L., Raffi, F., Miller, M.D., 2014. Resistance analyses of integrase strand transfer inhibitors within phase 3 clinical trials of treatment-naïve patients. *Viruses* 6, 2858–2879.
- Xiao, H., Neuveut, C., Tiffany, H.L., Benkirane, M., Rich, E.A., Murphy, P.M., Jeang, K.T., 2000. Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11466–11471.
- Young, B., Fransen, S., Greenberg, K.S., Thomas, A., Martens, S., St Clair, M., Petropoulos, C.J., B. Ha, 2011. Transmission of integrase strand-transfer inhibitor multidrug-resistant HIV-1: case report and response to raltegravir-containing antiretroviral therapy. *Antivir. Ther.* 16, 253–256.

Proviral DNA as a Target for HIV-1 Resistance Analysis

Nadine Lübke^a Veronica Di Cristanziano^a Saleta Sierra^a Elena Knops^a
Eugen Schülter^a Björn Jensen^c Mark Oette^b Thomas Lengauer^d
Rolf Kaiser^a on behalf of the Resina Study Group

^aInstitute of Virology, University of Cologne, and ^bDepartment of Gastroenterology, KH. d. Augustinerinnen, Cologne, ^cDepartment of Gastroenterology, Hepatology and Infectiology, University of Düsseldorf, Düsseldorf, and ^dThe Computational Biology and Applied Algorithmics Department, Max Planck Institute for Informatics, Saarbrücken, Germany

Key Words

HIV-1 resistance testing · Proviral DNA · Cellular reservoirs · Low-level viremia · Drug resistance

is also a reliable alternative for TE patients with unsuccessful RNA testing and can provide valuable information when no records are available.

© 2015 S. Karger AG, Basel

Abstract

Background: Resistance analysis from viral RNA is restricted to detectable viral load. Therefore, analysis from proviral DNA could help in cases with low-level or suppressed viremia. **Methods:** Viral plasma RNA and the corresponding cellular proviral DNA of 78 EDTA samples from 48 therapy-naïve (TN) and 30 therapy-experienced (TE) HIV-1-infected patients were isolated and analyzed for their resistance profiles in the protease and reverse transcriptase genes. **Results:** Overall, 175 drug-resistance mutations (DRMs) were detected in 25/30 TE (83.3%) and 5/48 TN (10.4%) samples. The TE patients displayed a mean number of 6.68 DRMs in RNA and 5.20 in DNA. In the TN patients, a mean of 0.8 DRMs was found in RNA and 1.0 in DNA; 75% of the DRMs were detected in RNA and DNA simultaneously. In the TE samples, 76% of the DRMs were detected simultaneously in RNA and DNA, 23% exclusively in RNA and 1% in DNA only. The TN samples revealed a significantly higher frequency of DRMs in DNA than in RNA. **Conclusions:** Proviral DNA resistance testing provides additional resistance information for TN patients. It

Introduction

The European guidelines for the clinical use of HIV drug resistance testing recommend the genotypic analysis of protease (PR) and reverse transcriptase (RT) for drug-naïve patients with acute and chronic infection as well as monitoring the efficacy of antiretroviral therapy (ART) of HIV-infected patients in the event of virologic failure [1].

According to the German-Austrian guidelines for the management of HIV infection (<http://www.daignet.de/site-content/hiv-therapie/leitlinien-1>), therapy failure is defined as having a viral load of >50 copies/ml, so genotypic drug resistance analysis should be performed at the time of low-level viremia (LLV). These recommendations are also strengthened by the fact that persistent LLV is associated with an increased risk of virologic failure [2]. HIV drug resistance mutations (DRMs) detected during LLV are strongly associated with subsequent virologic failure, thus patients with resistance during LLV have a

higher risk of therapy failure [3, 4]. Furthermore, almost 50% of ART-treated patients with LLV have an increased probability of accumulation of additional DRMs, which is linked to the number of active drugs. The amount of fully active drugs and the duration of LLV are both predictive of emerging resistance [5].

HIV infects long-lived cells, so the history of genotypes remains archived [6, 7]. Therefore, wild-type or resistant variants acquired due to transmitted resistance or during the treatment history of the patient are unlikely to completely disappear from the body with or without currently available drug treatment. Thus, viral variants, including circulating drug-resistant strains selected during ART, appear in the latent reservoir as minor variants [8–10]. For the detection of such minor variants, the analysis of proviral DNA can be a useful technique [11]. This analysis can also be helpful in clinical practice in cases of planned therapy switch in suppressed HIV-1-infected patients with good virologic control [12–14].

To study the degree of information in proviral HIV DNA with respect to resistance, we compared the resistance information of HIV PR and RT in viral RNA and proviral DNA detected by standard genotypic resistance analysis in samples of therapy-naïve (TN) and therapy-experienced (TE) HIV-1-infected patients.

Materials and Methods

Viral Samples

Eighty HIV-1 samples were randomly selected for this study. They were obtained from 80 RESINA cohort patients treated in cooperating HIV centers in North Rhine-Westphalia, Germany. There were 50 TN patients and 30 TE patients at the time of sample collection.

Genotypic Resistance Analysis

The viral RNA and the corresponding proviral DNA of the 80 EDTA samples were isolated, amplified, sequenced and analyzed for resistance in the PR and RT genes.

Viral RNA from 500 µl plasma and proviral DNA from 100 µl buffy coat were isolated automatically using the MagNA Pure™ LC total nucleic acid isolation kit (large volume) with the MagNA Pure LC System (Roche Diagnostics).

RT-PCR and nested PCR were performed as previously described [15, 16]. For RT-PCR, we used the primers PRRT-nonB-F: 5'-GCTACACTAGAAGAAATGATGACAGCATG-3' (nt 1,356–1,384 in HXB2) and 3532a: 5'-TTCTGCTATTAAGTCTTTT-GATGGGTCA-3. For nested PCR, we used the primers 2001s: 5'-TGCAGGGCCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTT-3' and 3454as: 5'-AGTGCTAGCTCTGCTTCTTCTGTTAGTGGTA-3'. PCR purification was performed via ExoSap described by Sierra 2011 and sequencing with the ViroSeq HIV genotyping kit v2.0 (Applied Biosystems).

Table 1. Detection rate of DRMs in viral RNA and proviral DNA

	Viral RNA	Proviral DNA	p value
Total (n = 30)	171 5.70±4.79	135 4.50±4.58	0.3311
PR (n = 9)	28 3.11±2.26	22 2.44±1.59	0.5452
RT (n = 30)	143 4.77±3.39	113 3.77±3.34	0.2564
TN (n = 5)	4 0.80±0.84	5 1.00±0.00	0.6089
TE (n = 25)	167 6.68±4.65	130 5.20±4.72	0.2756

Comparison of DRMs present in viral plasma RNA and proviral cellular DNA in the PR and RT genes in TN and TE patients. Values show the number of DRMs and the mean ± SD for each category. $p < 0.05$ was considered significant.

The sequences generated on an ABI 3130 XL sequencer were aligned with the HIV-1 subtype B reference strain HXB2. DRMs in the PR and RT genes were identified according to the 2014 International Aids Society USA resistance list (www.iasusa.org). Minor PR inhibitor mutations with polymorphic characteristics were not considered in this analysis.

Statistical Analysis

The comparison of quantitative variables was calculated by means of the Student t test (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD>) and categorical variables with the Fisher exact test (<http://vassarstats.net/tab2x2.html>). The significance level was defined as $p < 0.05$.

Results

The 80 randomly collected samples of the RESINA cohort consisted of 50 from TN patients and 30 from TE patients. The median viral load of the TN samples was 102,982 copies/ml (range 50–1,929,370) and that of the TE samples was 10,208 copies/ml (range 425–311,700). The mean minimal duration of infection in the cohort was 2 years (range 0–8) for TN patients and 12 years (range 1–23) for TE patients.

Seventy-eight of the 80 tested samples (48 from TN and 30 from TE patients) provided amplicons of the PR and RT genes of both viral RNA and proviral DNA, which could then be analyzed. In total, we detected 175 different DRMs in 30/78 samples in the PR or RT genes or in both. One hundred and seventy-one DRMs were detected in the viral RNA and 135 in the proviral DNA (table 1). Thus, the mean number of total *pol* gene mutations was

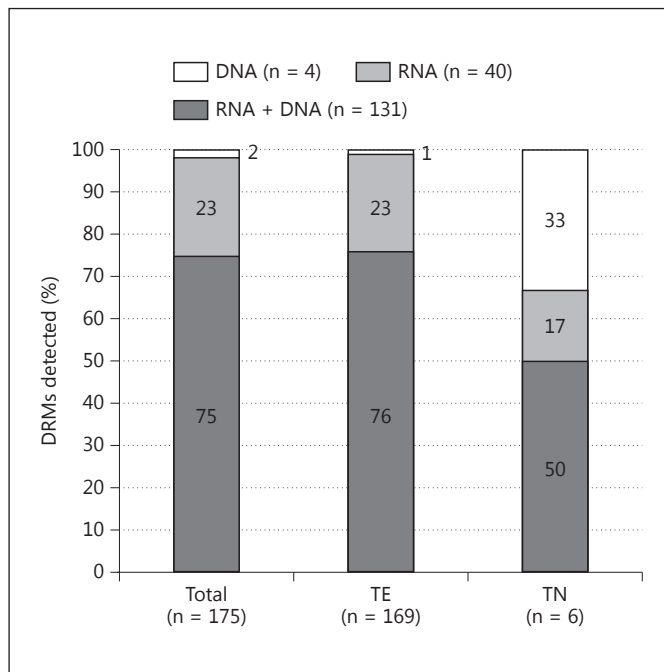


Fig. 1. DRMs detected in viral RNA and proviral DNA in all analyzed samples (Total) and in samples from TE and TN patients.

higher in viral RNA (5.70 ± 4.79) than in proviral DNA (4.50 ± 4.58 ; table 1), but did not reach statistical significance ($p = 0.3311$). Regarding the particular gene regions, a mean $\pm$ SD of 4.77 ± 3.39 RT and 3.11 ± 2.26 PR mutations were detected in viral RNA, and 3.77 ± 3.34 RT and 2.44 ± 1.59 PR mutations in proviral DNA (table 1).

When considering the therapy background, the samples from the TE patients, as expected, presented a higher rate of mutations (169 vs. 6; fig. 1). Overall, DRMs were detected in 83.3% (25/30) of the positive samples as opposed to in 10.4% (5/48) of the samples from the TN patients (table 1). The greater mean number of DRMs in viral RNA (6.68 ± 4.65) compared to in proviral DNA (5.20 ± 4.72) in the TE patients was not observed in the TN patients, who displayed 0.8 ± 0.84 mutations in viral RNA and 1.0 ± 0.0 mutations in proviral DNA.

Overall, most DRMs (75%) were detected in the RNA and DNA simultaneously, while 23% were found exclusively in viral RNA and 2% in proviral DNA only (fig. 1). The samples from the TE patients presented 76% of the DRMs in both RNA and DNA, 23% exclusively in RNA and 1% in DNA only. In contrast, the distribution of the DRMs in RNA and DNA found in the samples of TN patients revealed a significantly higher frequency of DRMs in proviral DNA (33%; $p = 0.006$).

Considering the drug classes, the majority of detected DRMs were nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) mutations (46%, $n = 141$), followed by non-NRTI (NNRTI) mutations (38%, $n = 115$) and PR inhibitor mutations (16%, $n = 50$). In total, 34 different resistance-associated positions were affected, 22 in the RT and 12 in the PR gene (fig. 2). Only 5 DRMs were more frequent in proviral DNA, with the substitutions at positions 74, 100 and 230 in the RT and at positions 32 and 47 in the PR gene. In summary, the frequency of DRMs was predominantly higher in the viral RNA genotypes.

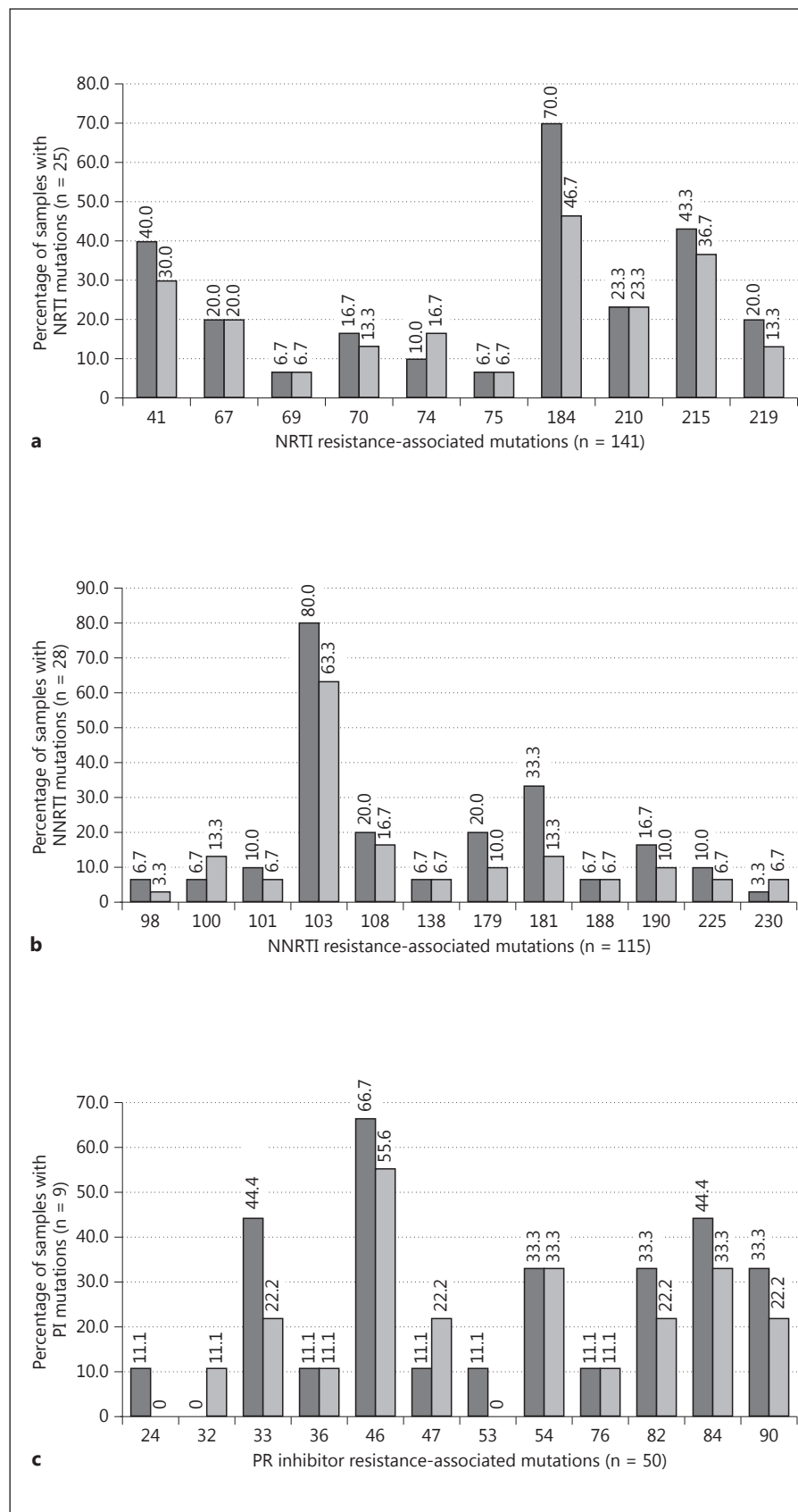
Discussion

At present, the European guidelines for the clinical use of HIV drug resistance testing recommend resistance determination in specific situations, e.g. at the start of ART, at treatment switch or when considering a treatment simplification. HIV-1 resistance testing has been routinely performed from plasma samples, and the European guidelines do not comment on resistance analysis of peripheral blood mononuclear cell-derived proviral DNA. This constitutes a problem for the analysis of samples from patients with LLV or undetectable viremia. Resistant HIV strains acquired at the time of primary infection or selected when ART has failed should be archived intracellularly as proviral DNA. Therefore, resistance analysis from this source may be useful for patients with low viral loads, but also for TE patients without records of previous therapies and resistance tests [11].

We compared the resistance profile from viral RNA and proviral DNA extracted from the very same blood samples in order to determine the informative value of proviral DNA as a basis for HIV resistance testing. PR and RT regions from TN and TE patients were analyzed; 30 samples displayed DRMs either in RNA, DNA or both. Although this analysis revealed an overall higher frequency of DRMs in viral RNA than in proviral DNA, 75% of the DRMs were detected in both materials. Similar results were published in a study by Banks et al. [17], comparing the *pol* genotypes of the circulating viral RNA and proviral DNA in the peripheral blood mononuclear cells in 32 blood samples of 25 subtype C-infected patients receiving ART. They also reported similar mutation patterns in viral RNA and proviral DNA, with unique mutations in >50% of cases.

However, a subanalysis of our studied samples presented different detection rates of DRMs in viral RNA and proviral DNA in relation to therapy experience. In

Fig. 2. Detected DRMs in viral RNA and proviral DNA with regard to drug classes and amino acid positions. Detected NRTI (a), NNRTI (b) and PR inhibitor (c) resistance-associated mutations in viral RNA (dark grey) and proviral DNA (light grey). Codons with detected amino acid substitutions are indicated on the x-axis and the percentage of samples presenting mutations are indicated on the y-axis.



the samples from the TE patients, the majority of DRMs appeared in viral RNA (99%) whereas those from the TN patients displayed a significantly higher proportion of DRMs in proviral DNA (33%). These data are in line with other published studies investigating information on resistance in viral RNA and proviral DNA of identical blood samples [17–22].

The differences between TN and TE patients with regard to the DRMs detected in proviral DNA and viral RNA can be explained by the kinetics of transmitted resistance, as it has been found that the amount of resistant variants correlates with the time they take to replicate [10]. While viruses in TN patients have not been exposed to any drug pressure, the transmitted viruses can replicate and uninhibitedly fill the cellular reservoirs, leading to a higher frequency of archived drug-resistant strains. If patients are infected with drug-resistant strains, the replication of the resistant viruses is not in competition with wild-type strains characterized by a higher replication capacity, leading to a higher frequency of archived drug-resistant strains. In contrast, in TE patients, viruses with on-treatment-selected DRMs are in competition to wild-type strains, resulting in a comparatively shorter period of replication and a smaller quantity of resistant viruses entering the latent reservoir.

Although our data are limited due to the sample size, the genotyping of HIV proviral DNA proved to be pos-

sible and provided useful information. PR and RT DRMs were detected in viral RNA and proviral DNA simultaneously. In addition, the resistance analysis of proviral DNA provided information about transmitted drug resistance in TN patients, and this could lead to improvements in the surveillance of drug resistance for these individuals. In TE patients, more information on resistance was obtained from the viral RNA. However, resistance testing of proviral DNA could provide valuable additional information in cases of an unsuccessful RNA resistance analysis due to LLV or when no historic resistance data are available.

In summary, the combined analysis of viral plasma RNA and peripheral blood mononuclear cell-derived DNA provided complementary information on resistance, representing a meaningful approach for HIV resistance analysis. In addition, proviral DNA testing offers an alternative opportunity when RNA testing is unsuccessful.

Acknowledgements

The authors thank Dörte Hammerschmidt for invaluable help in sample processing, Claudia Müller for collecting patients' therapy history and Eugen Schülter for database management. We also thank all patients and the treating physicians who contributed to the RESINA Study.

References

- Vandamme AM, Camacho RJ, Ceccherini-Silberstein F, de Luca A, Palmisano L, Paraskevis D, Paredes R, Poljak M, Schmit JC, Soriano V, Walter H, Sonnerborg A; European HIV Drug Resistance Guidelines Panel: European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing: 2011 update. *AIDS Rev* 2011;13:77–108.
- Laprise C, de Pokomandy A, Baril JG, Dufresne S, Trottier H: Virologic failure following persistent low-level viremia in a cohort of HIV-positive patients: results from 12 years of observation. *Clin Infect Dis* 2013;57:1489–1496.
- Gonzalez-Serna A, Min JE, Woods C, Chan D, Lima VD, Montaner JS, Harrigan PR, Swenson LC: Performance of HIV-1 drug resistance testing at low-level viremia and its ability to predict future virologic outcomes and viral evolution in treatment-naïve individuals. *Clin Infect Dis* 2014;58:1165–1173.
- Swenson LC, Min JE, Woods CK, Cai E, Li JZ, Montaner JS, Harrigan PR, Gonzalez-Serna A: HIV drug resistance detected during low-level viraemia is associated with subsequent virologic failure. *AIDS* 2014;28:1125–1134.
- Li JZ, Gallien S, Do TD, Martin JN, Deeks S, Kuritzkes DR, Hatano H: Prevalence and significance of HIV-1 drug resistance mutations among patients on antiretroviral therapy with detectable low-level viremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:5998–6000.
- Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF: Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 2003;9:727–728.
- Strain MC, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Smith DM, Leigh-Brown AJ, Macaranas TR, Lam RY, Daly OA, Fischer M, Opravil M, Levine H, Bacheler L, Spina CA, Richman DD, Wong JK: Heterogeneous clearance rates of long-lived lymphocytes infected with HIV: intrinsic stability predicts lifelong persistence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4819–4824.
- Lambotte O, Chaix ML, Gubler B, Nasreddine N, Wallon C, Goujard C, Rouzioux C, Taoufik Y, Delfraissy JF: The lymphocyte HIV reservoir in patients on long-term HAART is a memory of virus evolution. *AIDS* 2004;18:1147–1158.
- Turriziani O, Andreoni M, Antonelli G: Resistant viral variants in cellular reservoirs of human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:1518–1524.
- Verhofstede C, Noe A, Demecheleer E, De Cabooter N, Van Wanzeele F, Van Der Gucht B, Vogelaers D, Plum J: Drug-resistant variants that evolve during nonsuppressive therapy persist in HIV-1-infected peripheral blood mononuclear cells after long-term highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;35:473–483.
- Delgado R: Detection of resistance mutations in proviral DNA in HIV-1 infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013;31(suppl 1):35–39.

- 12 De Castro N, Braun J, Charreau I, Pialoux G, Cotte L, Katlama C, Raffi F, Weiss L, Meynard JL, Yazdanpanah Y, Delaugerre C, Madelaine-Chambrin I, Aboulker JP, Molina JM, E.A.s. group: Switch from enfuvirtide to raltegravir in virologically suppressed multidrug-resistant HIV-1-infected patients: a randomized open-label trial. *Clin Infect Dis* 2009;49:1259–1267.
- 13 Delaugerre C, Braun J, Charreau I, Delarue S, Nere ML, de Castro N, May T, Marchou B, Simon F, Molina JM, Aboulker JP, A.E.s. group: Comparison of resistance mutation patterns in historical plasma HIV RNA genotypes with those in current proviral HIV DNA genotypes among extensively treated patients with suppressed replication. *HIV Med* 2012; 13:517–525.
- 14 Palmisano L, Galluzzo CM, Giuliano M: The importance of testing genotypic resistance in proviral DNA of patients fully responding to highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009;51:233–234.
- 15 Balduin M, Sierra S, Daumer MP, Rockstroh JK, Oette M, Fatkenheuer G, Kupfer B, Beerenwinkel N, Hoffmann D, Selbig J, Pfister HJ, Kaiser R: Evolution of HIV resistance during treatment interruption in experienced patients and after restarting a new therapy. *J Clin Virol* 2005;34:277–287.
- 16 Verheyen J, Litau E, Sing T, Däumer M, Balduin M, Oette M, Fätkenheuer G, Rockstroh JK, Schuldenzucker U, Hoffmann D, Pfister H, Kaiser R: Compensatory mutations at the HIV cleavage sites p7/p1 and p1/p6-gag in therapy-naïve and therapy-experienced patients. *Antiviral Ther* 2006;11:879–887.
- 17 Banks L, Gholamin S, White L, Zijenah E, Katzenstein DA: Comparing Peripheral blood mononuclear cell DNA and circulating plasma viral RNA pol genotypes of subtype C HIV-1. *J AIDS Clin Res* 2012;3:141–147.
- 18 Bon I, Alessandrini F, Borderi M, Gorini R, Re MC: Analysis of HIV-1 drug-resistant variants in plasma and peripheral blood mononuclear cells from untreated individuals: implications for clinical management. *New Microbiol* 2007;30:313–317.
- 19 Bon I, Gibellini D, Borderi M, Alessandrini F, Vitone F, Schiavone P, Re MC: Genotypic resistance in plasma and peripheral blood lymphocytes in a group of naïve HIV-1 patients. *J Clin Virol* 2007;38:313–320.
- 20 Ghosn J, Pellegrin I, Goujard C, Deveau C, Viard JP, Galimand J, Harzic M, Tamalet C, Meyer L, Rouzioux C, Chaix ML; French PRIMO Cohort Study Group (ANRS CO 06): HIV-1 resistant strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time. *AIDS* 2006;20:159–170.
- 21 Kabamba-Mukadi B, Duquenne A, Henrivaux P, Musuamba F, Ruelle J, Yombi JC, Bodeus M, Vandercam B, Goubau P: HIV-1 proviral resistance mutations: usefulness in clinical practice. *HIV Med* 2010;11:483–492.
- 22 Parisi SG, Boldrin C, Cruciani M, Nicolini G, Cerbaro I, Manfrin V, Dal Bello F, Franchin E, Franzetti M, Rossi MC, Cattelan AM, Romano L, Zazzi M, Andreoni M, Palu G: Both human immunodeficiency virus cellular DNA sequencing and plasma RNA sequencing are useful for detection of drug resistance mutations in blood samples from antiretroviral-drug-naïve patients. *J Clin Microbiol* 2007;45:1783–1788.

Evolution of raltegravir resistance during therapy

Nadine Sichtig¹, Saleta Sierra¹, Rolf Kaiser^{1*}, Martin Däumer^{1,2}, Stefan Reuter³, Eugen Schülter¹, Andre Altmann⁴, Gerd Fätkenheuer⁵, Ulf Dittmer⁶, Herbert Pfister¹ and Stefan Esser⁷

¹Institute of Virology, University of Cologne, Germany; ²Institute of Immunology and Genetics, Kaiserslautern, Germany; ³Department of Gastroenterology, University of Düsseldorf, Germany; ⁴The Computational Biology and Applied Algorithmics Department, Max Planck Institute for Informatics, Saarbrücken, Germany; ⁵Department of Internal Medicine I, University of Cologne, Germany; ⁶Department of Virology, University of Duisburg Essen, Germany; ⁷Department of Dermatology, University of Duisburg Essen, Germany

Received 10 December 2008; returned 4 February 2009; revised 1 April 2009; accepted 3 April 2009

Objectives: We investigated the prevalence of raltegravir resistance-associated mutations at baseline and their evolution during raltegravir therapy in patients infected with different HIV-1 subtypes.

Methods: At pre-treatment screening, the integrase gene from plasma samples from patients infected with subtype B and non-B viruses was analysed. Raltegravir resistance evolution was further evaluated in 10 heavily pre-treated patients.

Results: Two hundred and nine plasma samples from 94 subtype B and 115 non-B patients were sequenced. No signature/primary raltegravir resistance mutations were detected at baseline. The secondary mutations L74M, T97A, V151I and G163R were observed with a frequency of <4%. The primary mutations N155H, Q148R/H or Q143R were observed during raltegravir therapy. The Q148R/H was detected only in subtype B. A switch of the primary mutation during raltegravir treatment was not restricted to the subtype B viruses. The prevalence of each primary mutation varied depending on the length of the raltegravir therapy. The Q148R/H was mostly detected after short exposure to raltegravir, while the Y143R was observed only after prolonged raltegravir exposure. We detected an association between the presence of the T206S in the baseline genotype and the absence of the primary Q148R/H mutation or any secondary mutation accompanying the N155H following raltegravir failure.

Conclusions: A number of secondary and additional mutations were found in baseline genotypes. During therapy, when the virus was not optimally suppressed, resistance mutations developed, which were dependent on subtype and time on raltegravir.

Keywords: HIV-1, integrase inhibitors, drug resistance, non-B subtypes, antiviral therapy

Introduction

HIV is an enveloped virus whose RNA genome replicates via a double-stranded DNA intermediate that must integrate into the cellular genome. The integration into the host's genome is performed by the viral enzyme integrase (IN).

HIV-1 IN is a 32 kDa and 288 amino acid (aa) protein excised from the C-terminal portion of the Pol polyprotein by the viral protease (reviewed by Van Maele and Debyser¹). IN is encapsidated within the virion and functions as a tetramer.² Each monomer contains three domains. The N-terminal domain (aa 1–50) contains a HH-CC zinc finger motif (H12, H16, C40, C43) partially responsible for multimerization and required for

IN optimal activity and structural stability.^{3–6} Both the catalytic and the C-terminal domains bind to the viral and cellular DNA, although no crystal structure of IN bound to its DNA substrates is yet available. The catalytic domain (aa 51–212) includes a DDE motif (D64, D116, E152), which is highly conserved among all retroviruses. This motif is responsible for the catalytic activity of IN as a consequence of the coordination of metal ion binding.⁷ The C-terminal domain (aa 213–288) is more variable and responsible for the binding to the cellular DNA.⁸

The first step in the integration process is called *3' processing*. IN removes a dinucleotide at the 3'-end of the long terminal repeat on each proviral DNA strand. The second step, named *strand transfer*, occurs in the nucleus where the IN

*Corresponding author. Tel: +49-221-478-7741; Fax: +49-221-478-3904; E-mail: rolf.kaiser@uk-koeln.de

non-specifically cuts the cellular DNA. The integration process is completed after covalent ligation of both DNAs and gap repair which is probably accomplished by host DNA repair enzymes.

The activity of IN can be inhibited by a new class of antiretroviral compounds, the IN inhibitors (INIs). Since October 2007, the IN strand transfer inhibitor raltegravir (RAL, MK-0518, IsentressTM) has been approved for treating HIV-infected patients and other INIs are already used in clinical studies.^{9–12} Raltegravir is well tolerated and displays a potent activity against HIV-1 and HIV-2 strains, including those resistant to other currently available antiretroviral drugs.

Raltegravir is a naphthyridine carboxamide derivative that binds to the DDE motif in the catalytic domain of IN, blocking its strand transfer activity. In the presence of raltegravir the proviral DNA is recircularized by the host's repair enzymes and the viral replication cycle is aborted.^{13,14}

The development of specific mutations in the catalytic domain of IN during raltegravir treatment has been associated with reduced raltegravir susceptibility.^{15,16} To date, 47 aa substitutions at 33 positions in the HIV-1 IN gene are associated with different degrees of *in vitro* and *in vivo* INI resistance.^{17–19} *In vivo* resistance to raltegravir is associated with 14 mutations at 10 different positions;^{15,16,19–23} however, the net contribution of each mutation to clinically relevant resistance is still unclear.

In this study we analysed the IN mutation patterns before starting raltegravir therapy in therapy-naïve (TN) and therapy-experienced (TE) patients infected with HIV-1 subtype B and non-B viruses. Additionally, samples from TE patients, including non-B samples, with suboptimal viral suppression during raltegravir therapy were screened for mutations.

Materials and methods

Viral samples

Plasma samples from HIV-1-infected INI-naïve patients from the Arevir/Resina cohort, which includes patients treated in cooperating HIV centres in North Rhine-Westphalia (Germany), were collected and analysed. Patients were TN or TE, i.e. experienced with all three drug classes but not INIs. For the analysis of raltegravir resistance evolution, additional samples from patients with triple-class resistance before raltegravir administration were examined. The viral load values of these patients treated subsequently with raltegravir were routinely collected every 12 weeks, on average. The first sample with a detectable viral load was selected for resistance analysis. An additional sample was collected in a subset of patients who continued to fail raltegravir therapy.

All 224 sequences used in this study are available under the GenBank IDs FJ183485–FJ183708.

The retrospective, non-interfering analysis of samples from the Resina cohort was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and national and institutional standards. All patients gave written informed consent for the Resina study (Ethik Nordrhein 2004080).

Genotypic INI resistance analysis

Viral RNA isolation and RT-PCR were performed as previously described^{24,25} with the following primers: 5'-INT, 5'-ATTGGAGGAAATGAACAAGT-3' (nt 4173–4192); and 3p31, 5'-ATCCTGTCTACYTGCCACACA-3' (nt 5087–5066).

PCR product purification and sequencing were performed as previously described.^{24,25} Each IN sequence was screened for mutations in comparison with the subtype B reference strain HXB2 or alternatively to the baseline sequence. Subtyping was assessed by the REGA HIV-1 subtyping tool, version 2.0 (<http://www.dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>).

Raltegravir resistance-associated mutations were classified according to our results and data published by others.^{15,16,19,23}

Statistics

P values were calculated by Fisher's exact probability test (<http://www.faculty.vassar.edu/lowry/tab2x2.html>).

Results

Classification of raltegravir resistance-associated mutations

The raltegravir resistance mutations were classified into signature/primary, secondary and additional mutations (Table 1). Primary and secondary mutations are selected *in vivo* under raltegravir-containing therapies. The additional mutations are described to be associated with resistance to several INIs, both *in vitro* and *in vivo*, and their relevance in clinical raltegravir resistance is not clearly characterized.^{15–23}

Analysis of samples from INI-naïve HIV-1 patients

Of the 209 HIV-1 IN gene samples, 94 were classified as subtype B and 115 as non-B subtypes. The non-B samples comprised 15 different HIV-1 subtypes (Table 2).

The screening revealed that of the 288 aa of the IN, 96 (33.3%) were polymorphic at a level of $\geq 1\%$ when compared with the subtype B reference strain HXB2. Eleven aa were polymorphic at a level of $>50\%$ (Table 3).

High variability in the IN gene. The residues within the catalytic triad and the HH-CC zinc-binding site were fully conserved, irrespective of HIV-1 subtype and treatment history of the infected patient. The most variable positions were G123, R127 and N232, none of which is ascribed to INI resistance.

Regarding raltegravir resistance-associated mutations (Table 1), 23 were found to be natural polymorphisms: V72I, L74I/M, T97A, S119T/P/R/G, T112I, T125A, Q146K, V151I, M154I, K156N, E157Q, G163R, V165I, V201I, I203M, T206S,

Table 1. Classification of raltegravir-resistance-associated mutations

Signature/primary mutations	Y143R/C, Q148R/H/K, N155H
Secondary mutations	L74M, E92Q, T97A, E138A/K, G140S/A, Y143H, V151I, G163R
Additional mutations	H51Y, T66I, V72I, L74A/I, S119R/G/P/T, T112I, F121Y, T125A/K, A128T, Q146K, S147G, S153Y/A, M154I, K156N, E157Q, K160D, V165I, V201I, I203M, T206S, S230R/N, V249I, R263K, C280Y

The classification is based on our results and on previously published data.^{15–23}

Raltegravir resistance patterns

Table 2. Subtype and therapy history of the analysed HIV-1 samples

Subtypes	Total no. of sequences	G ₀		G ₁	G ₂
		TE	TN	TE	TE
A1	14	8	6	0	0
B	106	68	26	8	4
BD	1	1	0	0	0
C	10	8	2	0	0
CRF01_AE	23	16	7	0	0
CRF02_AG	25	15	7	2	1
CRF06_CPX	3	2	1	0	0
CRF11_CPX	1	1	0	0	0
CRF12_BF	4	1	3	0	0
CRF13_CPX	2	1	1	0	0
D	11	6	5	0	0
F1	5	4	1	0	0
F2	2	0	2	0	0
G	12	6	6	0	0
H	3	3	0	0	0
K	2	2	0	0	0
Total	224	142	67	10	5

G₀, IN genotype at baseline; G₁, IN genotype at the time of raltegravir therapy failure; G₂, IN genotype under non-suppressive raltegravir therapy; TE, therapy experienced; TN, therapy naive.

S230R/N and R263K, of which the secondary mutations L74M, T97A, V151I and G163R were found with a prevalence of <4% (2.9%, 1.4%, 3.3% and 0.5%, respectively; Table 4). No primary and none of the secondary mutations E92Q, E138A/K, G140S/A or Y143H were found in INI-naïve patients. The most frequent additional mutations were V201I (71.8%), T125A (54.5%) and V72I (50.2%). In contrast to additional mutations, the incidence of the secondary mutations was limited to ≤1 mutation per baseline sample.

L74I and S119R/G mutations were more frequent in non-B-infected TE patients. The mutation distribution from the 142 TE patients was compared with that obtained from the 67 TN patients (Table 4). With the exception of L74I and S119R/G, which were present in a significantly lower proportion

in TN [TE versus TN: L74I, 4.9% versus 14.9% ($P=0.017$); S119R/G, 4.2% versus 17.9% ($P=0.002$)], the mutation patterns were independent of therapy experience. With regard to the subtype, significantly lower frequencies of L74I and S119R/G in TN than in TE were detected only in non-B subtypes [non-B TE versus non-B TN: L74I, 8.1% versus 24.4% ($P=0.023$); S119R/G, 1.4% versus 14.6% ($P=0.008$)]. In the clade B samples, no significant difference in any INI-related resistance position between TE and TN was detected.

A number of raltegravir resistance mutations are associated with the HIV-1 subtype. Additionally, the raltegravir resistance mutation distribution of the 94 subtype B viruses was compared with that obtained for the 115 non-B viral strains (Table 4). On average, subtype B viruses displayed a lower number of raltegravir resistance-associated mutations per genome than non-B viruses (2.1 versus 3.5, respectively). The mutations M154I, E157Q and S230R/N were detected more frequently in clade B samples [B versus non-B: M154, 6.4% versus 0.9% ($P=0.047$); E157Q, 3.2% versus 0.9% ($P>0.05$); and S230R/N, 9.6% versus 1.7% ($P=0.013$)], whereas L74I, T125A, V201I and T206S were significantly more prevalent in non-B subtypes [B versus non-B: 1.1% versus 13.9%; 22.3% versus 80.9%; 43.6% versus 94.8%; and 9.6% versus 40%, respectively, ($P<0.001$)]. The highest subtype specificity was observed for T206S. This substitution was present in all analysed subtype G samples and in 20 out of 22 of the analysed recombinant CRF02_AG subtype samples (data not shown). K156N was detected exclusively in clade B samples (3.2%).

The incidence of the secondary mutations L74M, T97A, V151I and G163R was slightly different among HIV-1 subtypes. T97A (0% B versus 2.6% non-B) and G163R (0% B versus 0.9% non-B) were found only in non-B subtypes, whereas L74M (2.1% B versus 3.5% non-B) and V151I (2.1% B versus 4.3% non-B) showed no subtype specificity.

Analysis of viral samples from patients during raltegravir therapy

Sixty-one of the 209 patients from the raltegravir baseline analysis were subsequently treated with raltegravir-containing combination therapies. Ten patients failed their raltegravir-containing therapy, their viral loads increased to values >500 copies/mL and amplifications of the IN region were obtained. Two of the

Table 3. Polymorphisms in the IN gene

Prevalence (%)	No. of aa	Amino acid positions
≥1–5	40	D3, K7, E13, M22, L28, P30, K34, V37, A38, D41, S57, I60, I73, E96, T97, Y99, F100, G106, V151, M154, K156, E157, K160, V176, I182, H183, R187, K188, I200, I203, A205, Q216, I217, Q221, Y227, D229, D253, N254, V259, D270
>5–10	24	A21, A23, S24, D25, L45, L63, L74, I84, A91, V126, G163, V165, K173, F181, S195, I208, K211, K215, K219, I220, N222, S230, A265, R269
>10–25	13	E11, S17, R20, V32, S39, M50, K111, I113, T122, D167, G193, T218, S255
>25–50	8	K14, V31, S119, G134, I135, K136, T206, D256
>50–75	8	D10, V72, L101, T112, A124, T125, V201, L234
>75	3	G123, R127, N232

Table 4. Distribution of IN mutations in subtypes B and non-B in therapy-naive as well as therapy-experienced but INI-naive patients

	Subtype B, <i>n</i> =94						Non-B subtype, <i>n</i> =115						Total (B+non-B subtypes)						<i>P</i> values		
	TE		TN		total		TE		TN		total		TE		TN		total		non-B TE vs non-B TN	total TE vs total TN	total B vs total non-B
	<i>n</i> 68	%	<i>n</i> 26	%	<i>n</i> 94	%	<i>n</i> 74	%	<i>n</i> 41	%	<i>n</i> 115	%	<i>n</i> 142	%	<i>n</i> 67	%	<i>n</i> 209	%			
V72I	38	55.9	16	61.5	54	57.4	32	43.2	19	46.3	51	44.3	70	49.3	35	52.2	105	50.2	0.023	0.017	<0.001
L74I	1	1.5	0	0	1	1.1	6	8.1	10	24.4	16	13.9	7	4.9	10	14.9	17	8.1			
L74M	2	2.9	0	0	2	2.1	3	4.1	1	2.4	4	3.5	5	3.5	1	1.5	6	2.9			
T97A	0	0	0	0	0	0	1	1.4	2	4.9	3	2.6	1	0.7	2	3	3	1.4			
S119R/G	5	7.4	6	23.1	11	11.7	1	1.4	6	14.6	7	6.1	6	4.2	12	17.9	18	8.6	0.008	0.002	<0.001
S119P	14	20.6	2	7.7	16	17	11	14.9	7	17.1	18	15.7	25	17.6	9	13.4	34	16.3			
S119T	1	1.5	2	7.7	3	3.2	3	4.1	1	2.4	4	3.5	4	2.8	3	4.5	7	3.3			
T112I	9	13.2	4	15.4	13	13.8	11	14.9	15	36.6	26	22.6	20	14.1	19	28.4	39	18.7			
T125A	16	23.5	5	19.2	21	22.3	58	78.4	35	85.4	93	80.9	74	52.1	40	59.7	114	54.5	0.047	<0.001	0.013
Q146K	0	0	0	0	0	0	1	1.4	0	0	1	0.9	1	0.7	0	0	1	0.5			
V151I	1	1.5	1	3.8	2	2.1	4	5.4	1	2.4	5	4.3	5	3.5	2	3	7	3.3			
M154I	5	7.4	1	3.8	6	6.4	1	1.4	0	0	1	0.9	6	4.2	1	1.5	7	3.3			
K156N	1	1.5	2	7.7	3	3.2	0	0	0	0	0	0	1	0.7	2	3	3	1.4	<0.001	0.013	0.013
E157Q	1	1.5	2	7.7	3	3.2	0	0	1	2.4	1	0.9	1	0.7	3	4.5	4	1.9			
G163R	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2.4	1	0.9	0	0	1	1.5	1	0.5			
V165I	2	2.9	1	3.8	3	3.2	6	8.1	4	9.8	10	8.7	8	5.6	5	7.5	13	6.2			
V201I	28	41.2	13	50	41	43.6	69	93.2	40	97.6	109	94.8	97	68.3	53	79.1	150	71.8	<0.001	<0.001	0.013
I203M	2	2.9	2	7.7	4	4.3	4	5.4	0	0	4	3.5	6	4.2	2	3	8	3.8			
T206S	7	10.3	2	7.7	9	9.6	30	40.5	16	39	46	40	37	26.1	18	26.9	55	26.3			
S230R/N	7	10.3	2	7.7	9	9.6	1	1.4	1	2.4	2	1.7	8	5.6	3	4.5	11	5.3			
R263K	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2.4	1	0.9	0	0	1	1.5	1	0.5			

TE, therapy experienced; TN, therapy naive.

All positions listed in Table 3 were inspected, but only the positions with detected mutations are shown. The underlined positions are classified as secondary raltegravir mutations. Only *P* values <0.05 are indicated. Correlations between subtype B TN versus TE were also analysed, but no statistical association was detected.

Table 5. IN mutation profiles at baseline and after raltegravir failure

Patient	Clade	GenBank ID	Weeks on raltegravir	H 51	V 72	<u>L</u> <u>74</u>	<u>E</u> <u>92</u>	<u>T</u> <u>97</u>	S 119	T 125	<u>E</u> <u>138</u>	<u>G</u> <u>140</u>	<u>Y</u> <u>143</u>	Q 146	<u>Q</u> <u>148</u>	<u>V</u> <u>151</u>	M 154	<u>N</u> <u>155</u>	<u>G</u> <u>163</u>	V 201	T 206	S 230
1	B	FJ183681	−29	G ₀	I				G	A										I		
		FJ183691	31	G ₁	I				G	A		GA			QR					I		
		FJ183692	47	G ₂	HR	I	M		A	G			R							I		
2	B	FJ183684	−3	G ₀	I					A									E	I		
		FJ183700	35	G ₁	I					A		S			H				K	I		
		FJ183701	79	G ₂	I					A		S			H				K	I		
3	B	FJ183682	−89	G ₀	I				R	A										I		
		FJ183693	35	G ₁	I		EQ	AT	R	A								NH		I		
		FJ183694	44	G ₂	I			A	R	A			YH					NH	GR	I		
4	B	FJ183706	−4	G ₀	I					A												N
		FJ183697	37	G ₁	I					A						VI		H	GR			N
		FJ183698	45	G ₂	I					A						I		H	R			N
5	AG	FJ183683	−280	G ₀	I					A										I	S	
		FJ183695	34	G ₁	I				SR	A								H		I	S	
		FJ183696	66	G ₂	I					A			R							I	S	
6	AG	FJ183627	−2	G ₀		I				A										I	S	
		FJ183705	16	G ₁		I				A								H		I	S	
7	B	FJ183629	−51	G ₀	I				P	A											S	
		FJ183699	62	G ₁	I				P	A				QK				H			S	
8	B	FJ183686	−224	G ₀	I												MI			I		
		FJ183703	75	G ₁	I											VI	I	H	GR	I		
9	B	FJ183687	−13	G ₀																I		
		FJ183704	106	G ₁	VI											I		H		I		
10	B	FJ183685	−17	G ₀	I																	
		FJ183702	106	G ₁	I	M		A	T		D		R									

G₀, IN genotype at baseline; G₁, IN genotype at time of raltegravir therapy failure; G₂, IN genotype under non-suppressive raltegravir therapy; −, weeks before raltegravir treatment.

All positions listed in Table 1 were inspected, but only the positions with detected mutations are shown. The underlined and bold positions are signature/primary raltegravir-associated mutations, the underlined positions are secondary raltegravir-related mutations and the unmarked positions are additional mutations.

10 raltegravir patients harboured a subtype CRF02_AG virus, whereas the other eight were carrying a subtype B strain.

The mutation profiles of the IN gene of these 10 patients were analysed at baseline and after virological failure of raltegravir therapy (Table 5). At baseline, all viruses were genetically characterized as multidrug-resistant to nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors [N(t)RTIs], non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) and protease inhibitors (PIs) (data not shown). No INI primary or secondary mutations were detected in the baseline samples (Table 5).

The median time period up to raltegravir therapy failure was 36 weeks (range: 16–106 weeks). For five patients (one carrying CRF02_AG and four subtype B) a subsequent sample with non-suppressive raltegravir therapy (8–44 weeks after failure) was obtained (Table 5).

Three different IN resistance patterns were found at the time of raltegravir therapy failure. The analysis of raltegravir resistance profiles revealed three different mutational patterns, each of them including one of the primary mutations N155H, Q148R/H/K or Y143R.

The mutation N155H was found in seven patients. In four cases, this N155H primary mutation was associated with secondary mutations, either V151I and/or G163R (Patients 4, 8 and 9), or with E92Q and T97A (Patient 3). In three patients (5–7), of which two were carrying a subtype CRF02_AG virus, the N155H was not associated with a secondary mutation but with the additional mutation T206S. Patients 1 and 2 (both with B viruses) developed Q148R/H+G140A/S. In Patient 10, also carrying a subtype B virus, Y143R+L74M+T97A+S119T were detected.

IN mutation profiles could change during non-suppressive raltegravir-containing therapy. A switch of the primary mutation was observed in two patients during non-suppressive raltegravir therapy. The resistance profile changed in Patient 1, infected with subtype B virus, from Q148R+G140A to Y143R+L74M+T97A after 16 weeks of non-suppressive therapy. In Patient 5, harbouring subtype CRF02_AG, a single N155H changed to a single Y143R mutation 32 weeks after raltegravir failure.

Development of raltegravir resistance mutations is explained partly by additional mutations. The absence of secondary mutations at raltegravir treatment failure was associated with the presence of T206S at baseline (Table 5, Patients 5–7). Moreover, the primary mutation Q148 was never detected when T206S was present.

The secondary mutation L74M was detected concomitantly with the primary mutation Y143R and only in clade B samples (Patients 1 and 10). Additionally, the mutation Y143R/H was accompanied by one substitution in S119 in all three B cases (Patients 1, 3 and 10), but not in the G₂ CRF02_AG virus from Patient 5; the substitution S119R (present in G₁) disappeared when N155H switched to Y143R.

Discussion

Our results indicate that HIV-1 IN is a polymorphic protein, displaying a lower conservation compared with the reverse transcriptase (73%) or protease (69%).^{16,20,26} Of the IN aa, 33.3% were

polymorphic at the level of $\geq 1\%$, a lower frequency than reports of previous studies (42%–64%).^{19,27–29} These varieties could be due to the disparity of the datasets in the studies, ranging from 102 to 2081 samples and including different proportions of HIV clades (non-B subtypes were not always included or they built the majority of the analysed samples).^{19,27–29}

No primary mutations but 23 secondary or additional mutations related to raltegravir resistance were found in the 209 INI-naïve patients, as previously reported.^{27,30–32} The number of secondary mutations was limited to ≤ 1 mutation per sample. None of our 10 patients failing raltegravir-containing therapy presented secondary mutations at baseline, so we could not evaluate whether these mutations have any role in future resistance development. However, we detected an association between the presence of the additional mutation T206S and the absence of the primary Q148R/H mutation or any secondary mutation accompanying the N155H after raltegravir failure. The mutation T206S was significantly more frequent in non-B strains than clade B viruses at baseline screening, as observed in another study of B and non-B polymorphisms in the IN gene.³² This substitution is present in the consensus G and AG sequences and, indeed, it was detected in all analysed subtype G and in 90.9% (20/22) of CRF02_AG samples.

The effect of baseline mutations on future raltegravir resistance development is a critical issue that must be analysed as these patients may be at risk of failing their INI therapy, as is the case with NNRTIs, another class with a relatively low genetic barrier to resistance.

In this study no major differences were detected in the raltegravir resistance profiles between TN and TE (but INI-naïve) patients or among different subtypes, as previously published.^{16,29,31}

The development of specific mutations in the catalytic domain of the IN during raltegravir treatment has been associated with reduced raltegravir susceptibility,^{15,16} mainly through the mutations N155H or Q148K/R/H.^{11,15,16,33,34} Secondary mutations further increasing the raltegravir resistance level are observed frequently in both profiles. A third mutation pattern involving Y143R/C as primary mutation, combined with L74A/I, E92Q, I203M and/or S230R has recently been suggested.^{11,12,15,35} Our results from 10 of the patients analysed at baseline and at the time of virological failure support the existence of these three raltegravir resistance profiles. The absence of Q148R/H+G140A/S at the time of raltegravir failure in non-B subtypes has also been shown.³⁵ Therefore, these mutations seem to be subtype-B specific.

Other authors have reported virological failure in patients infected with HIV-1 subtype B, where no N155H, Q148R/H or Y143R, but E92Q or E157Q, with or without other secondary mutations, were detectable.^{11,16,36} Our observations do not corroborate the latter two resistance patterns.

The appearance of each primary mutation N155H, Q148R/H or Y143R varied depending on the length of raltegravir administration. The clade B patients failing their therapy after a short exposure to raltegravir (<36 weeks) preferentially developed the Q148 mutation. The patients failing their therapies after 36 weeks mostly acquired the N155H mutation. The Y143R mutation was detected only at a failing timepoint of 106 weeks of raltegravir or after switches 47 and 66 weeks following raltegravir initiation. The same patterns have been observed in other longitudinal studies.^{16,23} The two patients carrying the

CRF02_AG subtypes (Patients 5 and 6) developed the N155H mutation after a short exposure to raltegravir (16 and 34 weeks after therapy initiation, respectively). The point of their treatment failure was less than the median period to therapy failure observed in this study. This comparatively fast raltegravir therapy failure of non-B patients, as well as the observation that non-Bs presented no secondary mutations, indicates a possible impact of non-B-associated polymorphisms on the genetic barrier of raltegravir. The analysis of raltegravir resistance mutation patterns during non-suppressive raltegravir therapy also corroborated that the increase in raltegravir resistance and/or higher fitness also can be achieved by a change of the primary mutation instead of the acquisition of more secondary mutations.^{23,37,38} The IC₅₀ of the Q148R/H in combination with G140S/A increases up to 500-fold and the viral fitness is similar to that of the wild-type.²³ The N155H mutation raises the IC₅₀ only 13-fold and reduces the viral fitness to 60%.^{23,39} The IC₅₀ fold-change of the Y143R/C is comparable to that of the N155H (~13-fold), but leads to an increase in viral fitness of up to 140%.²³ The switches of primary mutations are, however, non-systematic.²³ In our patients, for instance, in Patient 1 the resistance profile changed from Q148R+G140A to the Y143R mutation within 16 weeks of non-suppressive raltegravir therapy, but in Patient 2, displaying Q148H+G140S, no change was noticed after a further 44 weeks of raltegravir.

In Patient 5, a non-B-infected patient, a switch from a single N155H to a single Y143R within 32 weeks of non-suppressive raltegravir therapy contributed to a higher prevalence of Y143R after prolonged raltegravir exposure. Thus, our results demonstrate that a switch of the primary mutation during raltegravir resistance evolution is not limited to subtype B viruses.

The mechanisms underlying the selection of the primary mutations at raltegravir treatment failure and the subsequent evolution of the mutational patterns are probably an interplay among different factors, such as patient genetic characteristics, type and efficacy of the optimized backbone therapy or mutations in other viral regions affecting IN activity.

The observation that the Y143R pattern is observed only in the later stages of raltegravir resistance evolution presumes difficulties in its development. One reason for this could be the number and type of nucleotide substitutions required for the aa exchange; the substitutions N155H and Q148R/H require only one nucleotide exchange (CAR to CGR for Q148R, CAG/A to CAC/T for Q148H, or AAY to CAY for N155H), while Y143R requires at least two nucleotide exchanges (TAC to CGC).

In our samples, the mutation Y143R was accompanied by T97A and S119G/T in all clade B cases. The Y143R+T97A pattern displays a >400-fold increase of the IC₅₀.⁴⁰ Mutations in the residue S119 have been reported to play a role in the development of elvitegravir resistance.²² S119R/G was found as natural polymorphism and was significantly more abundant in TE samples. The implications of S119 mutations on raltegravir resistance evolution, viral fitness and the efficacy of raltegravir treatments, in B and non-B clades, have to be further analysed.

For PIs it could be shown that certain baseline mutations lower the genetic barrier.⁴¹ To identify mutations related to the lowering of the genetic barrier in order to avoid subsequent early failure, further analyses of the clinical outcome of raltegravir-containing regimens in relation to the individual baseline genotypes are needed.

Acknowledgements

We thank Dörte Hammerschmidt for invaluable help in sample processing and Susanna Trapp for the critical reading of the manuscript.

Funding

This study was supported by BMG (310/4478-02/3), EU (IST-2004-027173) and MSD.

Transparency declarations

None to declare.

Author contributions: all authors contributed to the critical revision of the paper and provided final approval of the version to be published; study conception and design was performed by N. S. and M. D.; substantial contributions to the acquisition of data were made by G. F., S. R., S. E. and U. D.; analysis and interpretation of data was carried out by N. S., E. S. and A. A.; N. S., S. S., H. P. and R. K. were responsible for the writing and drafting of the manuscript; and critical revision and supervision of the study was coordinated by S. E.

References

1. Van Maele B, Debyser Z. HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS Rev* 2005; **7**: 26–43.
2. Cherepanov P, Maertens G, Proost P *et al.* HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem* 2003; **278**: 372–81.
3. Zheng R, Jenkins TM, Craigie R. Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 13659–64.
4. Engelman A, Bushman FD, Craigie R. Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex. *EMBO J* 1993; **12**: 3269–75.
5. Lee SP, Han MK. Zinc stimulates Mg²⁺-dependent 3'-processing activity of human immunodeficiency virus type 1 integrase in vitro. *Biochemistry* 1996; **35**: 3837–44.
6. Bushman FD, Engelman A, Palmer I *et al.* Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 3428–32.
7. Engelman A, Craigie R. Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. *J Virol* 1992; **66**: 6361–9.
8. Engelman A, Hickman AB, Craigie R. The core and carboxyl-terminal domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 each contribute to nonspecific DNA binding. *J Virol* 1994; **68**: 5911–7.
9. Markowitz M, Morales-Ramirez JO, Nguyen BY *et al.* Antiretroviral activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-0518, a novel inhibitor of HIV-1 integrase, dosed as monotherapy for 10 days in treatment-naïve HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; **43**: 509–15.
10. Grinsztejn B, Nguyen BY, Katlama C *et al.* Potent antiretroviral effect of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with

- triple-class resistant virus. In: *Abstracts of the Thirteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver, CO, 2006*. Abstract 159LB. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
11. Cooper D, Gatell J, Rockstroh J *et al.* Results of BENCHMRK-1, a phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. In: *Abstracts of the Fourteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Los Angeles, CA, 2007*. Abstract 105aLB. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
 12. Steigbigel R, Kumar P, Eron J *et al.* Results of BENCHMRK-2, a Phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. In: *Abstracts of the Fourteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Los Angeles, CA, 2007*. Abstract 105bLB. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
 13. Hazuda DJ, Felock P, Witmer M *et al.* Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* 2000; **287**: 646–50.
 14. Butler SL, Johnson EP, Bushman FD. Human immunodeficiency virus cDNA metabolism: notable stability of two-long terminal repeat circles. *J Virol* 2002; **76**: 3739–47.
 15. Hazuda DJ, Miller MD, Nguyen BY *et al.* Resistance to HIV-integrase inhibitor raltegravir: analysis of protocol 005, a Phase II study in patients with triple-class resistant HIV-1 infection. *Antiviral Ther* 2007; **12**: 10.
 16. Malet I, Delelis O, Valantin MA *et al.* Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1351–8.
 17. Hazuda DJ, Anthony NJ, Gomez RP *et al.* A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 11233–8.
 18. Kehlenbeck S, Betz U, Birkmann A *et al.* Dihydroxythiophenes are novel potent inhibitors of human immunodeficiency virus integrase with a diketo acid-like pharmacophore. *J Virol* 2006; **80**: 6883–94.
 19. Lataillade M, Chiarella J, Kozal MJ. Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. *Antivir Ther* 2007; **12**: 563–70.
 20. Malet I, Delelis O, Valantin MA *et al.* Biochemical characterizations of the effect of mutations selected in HIV-1 integrase gene associated with failure to raltegravir (MK-0518). *Antiviral Ther* 2007; **12**: 9.
 21. Ceccherini-Silberstein F, Malet I, Fabeni L *et al.* Specific mutations related to HIV-1 integrase inhibitors are associated with reverse transcriptase mutations in HAART-treated patients. *Antiviral Ther* 2007; **12**: 6.
 22. McColl DJ, Fransen S, Gupta S *et al.* Resistance and cross-resistance to first generation integrase inhibitors: insights from a Phase II study of elvitegravir (GS-9137). *Antiviral Ther* 2007; **12**: 11.
 23. Miller MD, Danovich RM, Ke Y *et al.* Longitudinal analysis of resistance to the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir: results from P005 a Phase II study in treatment-experienced patients. *Antiviral Ther* 2008; **13**: A8.
 24. Balduin M, Sierra S, Daumer MP *et al.* Evolution of HIV resistance during treatment interruption in experienced patients and after restarting a new therapy. *J Clin Virol* 2005; **34**: 277–87.
 25. Verheyen J, Litau E, Sing T *et al.* Compensatory mutations at the HIV cleavage sites p7/p1 and p1/p6–gag in therapy-naïve and therapy-experienced patients. *Antiviral Ther* 2006; **11**: 879–87.
 26. Kozal MJ, Shah N, Shen N *et al.* Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med* 1996; **2**: 753–9.
 27. Hackett J Jr, Harris B, Holzmayer V *et al.* Naturally occurring polymorphisms in HIV-1 group M, N, and O integrase: implications for integrase inhibitors. In: *Abstracts of the Fifteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA, 2008*. Abstract 872. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
 28. Zioni R, Rhee S, Liu T *et al.* Natural variation of HIV-1 group M integrase: implications for integrase inhibitor therapy. In: *Abstracts of the Fourteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Los Angeles, CA, 2007*. Abstract 623. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
 29. Low A, Mohri M, Markowitz M. Frequency of naturally occurring polymorphisms associated with resistance to integrase inhibitors in a recently infected cohort. In: *Abstracts of the Fourteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Los Angeles, CA, 2007*. Abstract 625. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
 30. Myers RE, Pillay D. HIV-1 integrase sequence variation and covariation. *Antiviral Ther* 2007; **12**: 5.
 31. Garrido C, Geretti AM, de Mendoza C *et al.* Polymorphisms at the integrase gene in distinct HIV populations may influence the susceptibility to integrase inhibitors. In: *Abstracts of the Sixth European HIV Drug Resistance Workshop, Budapest, Hungary, 2008*. Abstract 12. Virology Education, BJ Utrecht, The Netherlands.
 32. Yerly S, Hirschel B, Gaille C *et al.* Polymorphism of HIV-1 subtypes B and non-B integrase gene. In: *Abstracts of the Fourteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Los Angeles, CA, 2007*. Abstract 626. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
 33. Wai J, Embrey T, Embrey M *et al.* Next generation of inhibitors of HIV-1 integrase strand transfer inhibitor: structural diversity and resistance profiles. In: *Abstracts of the Fourteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Los Angeles, CA, 2007*. Abstract 87. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
 34. Fransen S, Gupta S, Danovich R *et al.* Loss of raltegravir susceptibility in treated patients is conferred by multiple non-overlapping genetic pathways. *Antiviral Ther* 2008; **13**: A9.
 35. Teppler H, Rockstroh J, Isaacs R *et al.* Raltegravir clinical efficacy against B subtype and non-B subtype HIV-1 is similar. *J Int AIDS Soc* 2008; **11**: 207.
 36. Charpentier C, Karmochkine M, Laureillard D *et al.* Drug resistance profiles of HIV integrase gene in patients failing raltegravir-salvage therapy. In: *Abstracts of the Sixth European HIV Drug Resistance Workshop, Budapest, Hungary, 2008*. Abstract 48. Virology Education, BJ Utrecht, The Netherlands.
 37. Katlama C, Caby F, Andrade RM *et al.* Virological evolution in HIV-1 treatment-experienced patients with raltegravir-based salvage regimens. *Antiviral Ther* 2008; **13**: A13.
 38. Da Silva D, Pellegrin I, Anies G *et al.* Mutational patterns in the HIV-1 integrase related to virological failure on raltegravir-containing regimens. *Antiviral Ther* 2008; **13**: A14.
 39. Van Baelen K, Rondelez E, Van Eygen V *et al.* Validation of a genotypic and phenotypic recombinant viruses assay to determine resistance against HIV-1 inhibitors. *Antiviral Ther* 2008; **13**: A127.
 40. Hatano H, Lampiris H, Huang W *et al.* Virological and immunological outcomes in a cohort of patients failing integrase inhibitors. *Antiviral Ther* 2008; **13**: A12.
 41. Kantor R, Katzenstein DA, Efron B *et al.* Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med* 2005; **2**: e112.

A complete list of authors is available with the full text of this letter at NEJM.org.

The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the official position of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and other funding agencies.

Supported by the U.S. President's Emergency Plan for AIDS Relief (PEPFAR) through the CDC under the terms of grant numbers GH001490 and GH002027.

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this letter at NEJM.org.

This letter was published on July 22, 2019, at NEJM.org.

1. Zash R, Makhema J, Shapiro RL. Neural-tube defects with

dolutegravir treatment from the time of conception. *N Engl J Med* 2018;379:979-81.

2. Daly L. Simple SAS macros for the calculation of exact binomial and Poisson confidence limits. *Comput Biol Med* 1992;22:351-61.

3. Tandberg D. Improved confidence intervals for the difference between two proportions and number needed to treat (NNT), version 1. Albuquerque: University of New Mexico School of Medicine (<https://www.cebm.net/wp-content/uploads/2014/04/Diff2PropCI49.xls>).

4. Zash R, Holmes L, Diseko M, et al. Neural-tube defects and antiretroviral treatment regimens in Botswana. *N Engl J Med* 2019;381:827-40.

DOI: 10.1056/NEJMc1908155

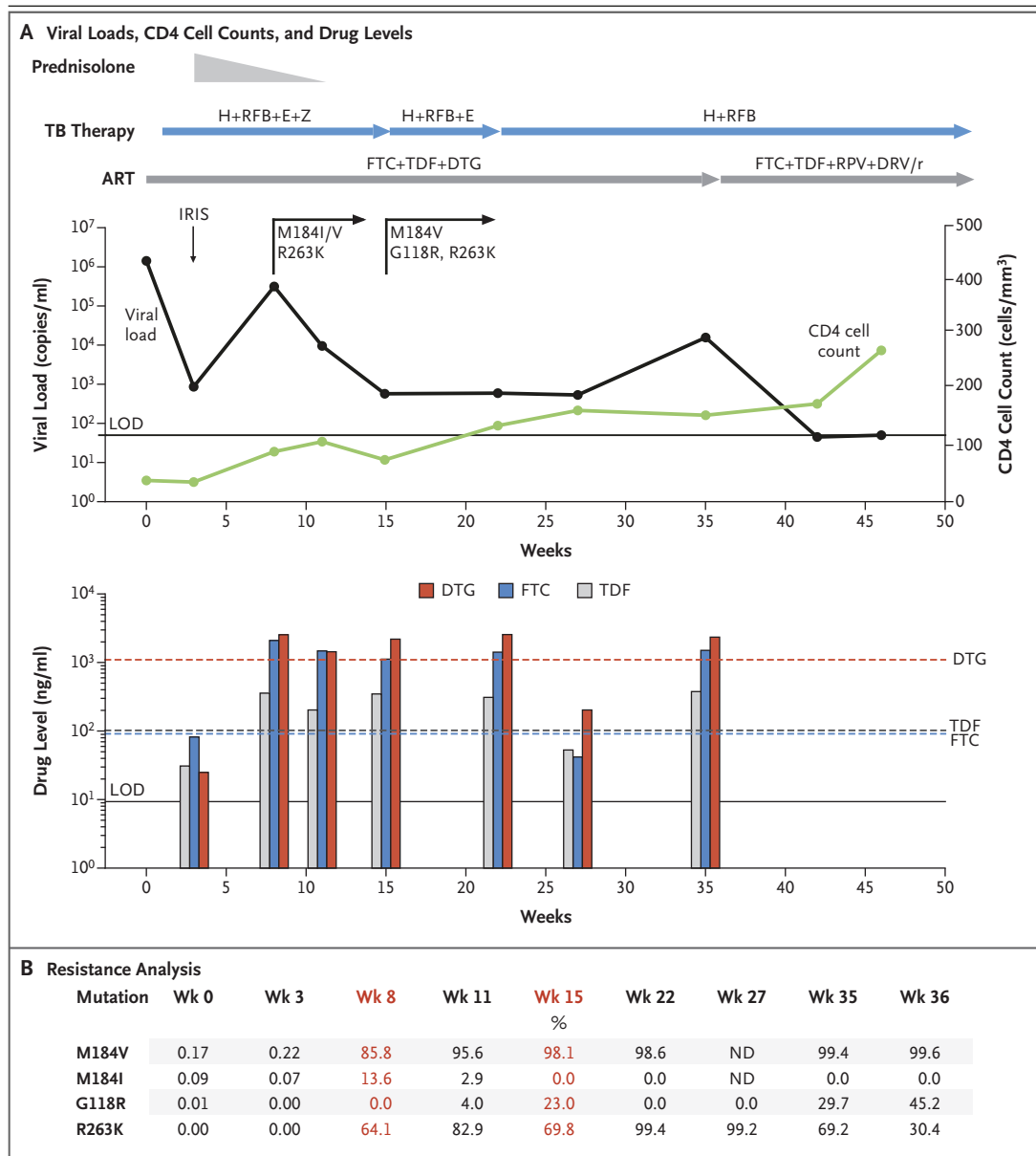
Failure of Dolutegravir First-Line ART with Selection of Virus Carrying R263K and G118R

TO THE EDITOR: The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase inhibitor dolutegravir is recommended in treatment guidelines as first-line therapy for HIV-1 infection and is characterized by high antiviral potency and a high genetic barrier to the emergence of resistance. Few cases of virologic failure of dolutegravir first-line therapy have been reported, but the relevance of resistance-associated mutations in these cases is unclear.^{1,2} Here, we describe a case of virologic failure in an HIV-1-infected patient who had not previously received antiretroviral treatment (ART) and who was receiving emtricitabine, tenofovir disoproxil fumarate, and dolutegravir, with the emergence of the dolutegravir resistance-associated mutations R263K and G118R.

A 27-year-old man who has sex with men who was infected with HIV-1 subtype F was admitted to the hospital with advanced HIV-1 infection, a viral load of 1.4×10^6 copies per milliliter, a CD4 cell count of 22 per cubic millimeter, and *Mycobacterium tuberculosis* coinfection. Treatment with emtricitabine, tenofovir disoproxil fumarate, and dolutegravir was initiated, with a response indicated by a 3-log decline in viral load within the first 3 weeks of hospitalization and a slow recovery of the CD4 cell count. Disseminated tuberculosis, including tuberculous pericarditis, was diagnosed, and treatment with isoniazid, rifabutin, ethambutol, and pyrazinamide was initiated 1 week after the start of ART, supplemented with prednisolone when immune reconstitution in-

flammatory syndrome (IRIS) was diagnosed (Fig. 1A, and the Supplementary Appendix, available with the full text of this letter at NEJM.org).

After the patient was discharged from the hospital, his viral load increased to 311,894 copies per milliliter, which was initially interpreted as resulting from a problem with adherence. During subsequent therapy, the viral load decreased to approximately 500 copies per milliliter, but viral suppression below the limit of detection was not achieved. A resistance analysis conducted 8 months after therapy initiation revealed the emtricitabine resistance-associated mutation M184V and the dolutegravir resistance-associated mutations G118R and R263K. Retrospective resistance analyses showed that resistance-associated mutations were detected at baseline only at very low frequencies (<0.2%); however, R263K was present at a frequency of 64.1% by week 8, during the first viral rebound, and the G118R mutation was present at a frequency of 23.0% by week 15 (Fig. 1B). The mutations associated with dolutegravir resistance were detected at different frequencies by means of ultra-deep sequencing, which indicated that evolution of distinct variants within the quasi-species was occurring, a finding consistent with the presence of distinct resistance pathways.³ The ART drug levels were mostly adequate during treatment for tuberculosis. In line with the dolutegravir prescribing information and previous observations, the insufficient levels of dolutegravir at weeks 3 and 26 seemed not to be related to



drug interactions with rifabutin.⁴ After switching combined ART to emtricitabine, tenofovir disoproxil fumarate, rilpivirine, and darunavir-ritonavir, stable viral suppression was achieved and therapy for tuberculosis was successfully completed.

Resistance to dolutegravir, even in patients who have not previously received ART, can occur and should be considered in the context of an inadequate response to ART. Risk factors like infection with a non-B subtype of HIV-1,³ a high viral load and low CD4 cell count,⁵ insufficient

adherence to ART, and coinfections influencing drug levels may facilitate the selection of dolutegravir-resistant variants — in this case, variants carrying R263K and G118R.

Nadine Lübke, Ph.D.

Björn Jensen, M.D.

Falk Hüttig, M.D.

Torsten Feldt, M.D.

Andreas Walker, Ph.D.

Heinrich Heine University Hospital

Düsseldorf, Germany

nadine.luebke@med.uni-duesseldorf.de

Figure 1 (facing page). Clinical Course of First-Line Therapy Failure with a Dolutegravir-Containing Regimen.

Panel A shows human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral loads, CD4 cell counts, and drug levels in plasma. First-line antiretroviral treatment (ART) was initiated with emtricitabine (FTC), tenofovir disoproxil fumarate (TDF), and dolutegravir (DTG) with a viral load greater than 10^6 copies per milliliter and a low CD4 cell count. CD4 cell counts and viral loads are shown in the top graph, and levels of the ART drugs are shown in the bottom graph. The mean reference trough levels (C_{min}) are indicated by the corresponding colored dashed lines (DTG, 1110 ng per milliliter; FTC, 90 ng per milliliter [range, 20 to 160]; TDF, 100 ng per milliliter [range, 20 to 180]). After a 3-log decrease in viral load within the first 3 weeks of treatment, the viral load had rebounded by week 8 and subsequently decreased to less than 1000 copies per milliliter by week 15; however, viral suppression to below the limit of detection (LOD) was not achieved. Tuberculosis treatment was started with isoniazid (H), rifabutin (RFB), ethambutol (E), and pyrazinamide (Z) 1 week after ART initiation, was reduced to isoniazid, rifabutin, and ethambutol in week 15, and finally continued with isoniazid and rifabutin from week 22 to the end of treatment, approximately 60 weeks after the start of therapy. Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) with severe pericardial effusion, diagnosed in week 3, was managed by emergency pericardiocentesis and treatment with 60 mg of prednisolone that was gradually tapered over 8 weeks. Resistance analysis revealed resistance against FTC (M184V and M184I mutations) and DTG (R263K) in week 8. In addition, the DTG-specific G118R mutation increased substantially in frequency by week 15. By week 35, the viral load had increased again, and ART was switched to FTC, TDF, rilpivirine (RPV), and ritonavir-boosted darunavir (DRV/r); the response to this regimen was adequate (i.e., viral load decreased to below the limit of detection of 50 copies per milliliter). Panel B shows the results of the resistance analysis of target genes by next-generation sequencing. HIV resistance analysis was performed as part of the RESINA (Primary Drug Resistance in Treatment Naive HIV-Infected Patients) study before ART initiation (week 0) and at the time of virologic failure, when viral loads increased after an initial decline, and was performed retrospectively for the analysis of resistance evolution for all available plasma samples. The first detection of HIV-1 with resistance against TDF, FTC, or DTG is shown in red. All resistance analyses were performed by next-generation sequencing with Illumina MiSeq technology. ND denotes not determined.

Alexander Thielen, Ph.D.

Martin Däumer, M.Sc.

Institute of Immunology and Genetics
Kaiserslautern, Germany

Martin Obermeier, M.D.

Medical Center for Infectious Diseases
Berlin, Germany

Rolf Kaiser, Ph.D.

Elena Knops, Ph.D.

Eva Heger, Ph.D.

Saleta Sierra, Ph.D.

University Hospital Cologne
Cologne, Germany

Mark Oette, M.D.

Augustinerinnen Hospital
Cologne, Germany

Thomas Lengauer, Ph.D.

MPI for Informatics
Saarbrücken, Germany

Jörg Timm, M.D.

Dieter Häussinger, M.D.

Heinrich Heine University Hospital
Düsseldorf, Germany

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this letter at NEJM.org.

1. Fulcher JA, Du Y, Zhang TH, Sun R, Landovitz RJ. Emergence of integrase resistance mutations during initial therapy containing dolutegravir. *Clin Infect Dis* 2018;67:791-4.
2. Taiwo BO, Zheng L, Stefanescu A, et al. ACTG A5353: a pilot study of dolutegravir plus lamivudine for initial treatment of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infected participants with HIV-1 RNA <500000 copies/mL. *Clin Infect Dis* 2018;66:1689-97.
3. Quashie PK, Oliviera M, Veres T, et al. Differential effects of the G118R, H51Y, and E138K resistance substitutions in different subtypes of HIV integrase. *J Virol* 2015;89:3163-75.
4. Dooley KE, Sayre P, Borland J, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the HIV integrase inhibitor dolutegravir given twice daily with rifampin or once daily with rifabutin: results of a phase 1 study among healthy subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013;62:21-7.
5. Lepik KJ, Harrigan PR, Yip B, et al. Emergent drug resistance with integrase strand transfer inhibitor-based regimens. *AIDS* 2017;31:1425-34.

DOI: 10.1056/NEJMc1806554

Correspondence Copyright © 2019 Massachusetts Medical Society.

INSTRUCTIONS FOR LETTERS TO THE EDITOR

Letters to the Editor are considered for publication, subject to editing and abridgment, provided they do not contain material that has been submitted or published elsewhere.

Letters accepted for publication will appear in print, on our website at NEJM.org, or both.

Please note the following:

- Letters in reference to a *Journal* article must not exceed 175 words (excluding references) and must be received within 3 weeks after publication of the article.
- Letters not related to a *Journal* article must not exceed 400 words.
- A letter can have no more than five references and one figure or table.



Research paper

Emergence of the E484K mutation in SARS-CoV-2-infected immunocompromised patients treated with bamlanivimab in Germany

Bjoern Jensen^{a,1,*}, Nadine Luebke^{b,1}, Torsten Feldt^{a,1}, Verena Keitel^a, Timo Brandenburger^c, Detlef Kindgen-Milles^c, Matthias Lutterbeck^a, Noemi F Freise^a, David Schoeler^a, Rainer Haas^d, Alexander Diltz^e, Ortwin Adams^b, Andreas Walker^{b,2}, Joerg Timm^{b,2}, Tom Luedde^{a,2}

^a Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, University Hospital Duesseldorf, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany

^b Institute of Virology, University Hospital Duesseldorf, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Duesseldorf, Germany

^c Department of Anaesthesiology, University Hospital Duesseldorf, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany

^d Department of Hematology, Oncology and Clinical Immunology, University Hospital Duesseldorf, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Duesseldorf, Germany

^e Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany

ARTICLE INFO

Article History:

Received 4 May 2021

Revised 4 June 2021

Accepted 10 June 2021

Available online 14 July 2021

ABSTRACT

Background: Monoclonal antibodies (mAb) have been introduced as a promising new therapeutic approach against SARS-CoV-2. At present, there is little experience regarding their clinical effects in patient populations underrepresented in clinical trials, e.g. immunocompromised patients. Additionally, it is not well known to what extent SARS-CoV-2 treatment with monoclonal antibodies could trigger the selection of immune escape viral variants.

Methods: After identifying immunocompromised patients with viral rebound under treatment with bamlanivimab, we characterized the SARS-CoV-2 isolates by whole genome sequencing. Viral load measurements and sequence analysis were performed consecutively before and after bamlanivimab administration.

Findings: After initial decrease of viral load, viral clearance was not achieved in five of six immunocompromised patients treated with bamlanivimab. Instead, viral replication increased again over the course of the following one to two weeks. In these five patients, the E484K substitution – known to confer immune escape – was detected at the time of viral rebound but not before bamlanivimab treatment.

Interpretation: Treatment of SARS-CoV-2 with bamlanivimab in immunocompromised patients results in the rapid development of immune escape variants in a significant proportion of cases. Given that the E484K mutation can hamper natural immunity, the effectiveness of vaccination as well as antibody-based therapies, these findings may have important implications not only for individual treatment decisions but may also pose a risk to general prevention and treatment strategies.

Funding: All authors are employed and all expenses covered by governmental, federal state, or other publicly funded institutions.

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

1. Introduction

Monoclonal antibodies (mAb), such as bamlanivimab (LY-CoV555), represent a promising new treatment option for early SARS-CoV-2 infection. They have the potential to prevent complications of severe COVID-19 disease for the individual patient and therefore might help to reduce the burden on health systems [1,2]. Compared to previous approaches of using convalescent plasma, monoclonal antibodies have several advantages, for example, their

* Corresponding author at: Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, University Hospital Duesseldorf, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Duesseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Duesseldorf, Germany.

E-mail address: bjoern-erikole.jensen@med.uni-duesseldorf.de (B. Jensen).

¹ These authors contributed equally and share first authorship.

² These authors contributed equally and share last authorship.

Research in context

Evidence before this study

We searched PubMed Central for articles published until April 27, 2021, using the key words “SARS-CoV-2”, “bamlanivimab”, “E484K” and “immune escape”. Moreover, we screened preprint servers such as medrxiv, biorxiv and SSRN for relevant articles. There are no clinical reports describing the emergence of the E484K mutant after treatment with bamlanivimab, with the exception of data from a pivotal large randomized trial (BLAZE-1), which reported low frequencies of newly detected bamlanivimab immune escape mutants in patients receiving different doses of bamlanivimab and significantly lower frequencies in patients in the placebo arm. Several publications describe mutations associated with bamlanivimab immune escape in vitro.

Added value of this study

In the context of using the SARS-CoV-2-specific mAb bamlanivimab in patients at increased risk for severe course of COVID-19, we observed viral rebound in five of six severely immunodeficient patients treated with bamlanivimab. Whole genome sequencing revealed the rapid emergence of the immune escape mutation at position 484 within days of bamlanivimab administration in all five patients with viral rebound. Severe clinical course of COVID-19 was not prevented in two of our patients despite early administration of bamlanivimab, one of whom had a fatal outcome. While it is known that escape mutations can evolve upon treatment with monoclonal antibodies, convalescent plasma, or under the selection pressure of natural immunity, our study provides, to our knowledge, for the first time data on a clinical constellation in which selection of the immune escape mutation E484K, which also occurs in epidemiologically important “variants of concern,” occurs in a very high proportion of patients.

Implications of all the available evidence

SARS-CoV-2 immune escape mutants can evolve rapidly in the context of prolonged narrowly focused selection pressure, such as in the treatment of SARS-CoV-2 with single monoclonal antibodies in immunocompromised patients. Viral variants harbouring immune escape mutations not only threaten the individual response to treatment, but also potentially pose a threat to general prevention and treatment strategies due to their transmissibility. From the experience with bamlanivimab presented here, it can be inferred that treatments of immunocompromised SARS-CoV-2 patients with single monoclonal antibodies should be applied with utmost caution.

of SARS-CoV-2 with selection of immune escape mutants can occur in immunocompromised hosts [4,7]. Since this patient group is underrepresented in clinical trials with monoclonal antibodies, we characterized viral evolution in five immunocompromised patients with delayed viral clearance after treatment with the monoclonal antibody bamlanivimab.

2. Methods

2.1. Design and setting

All patients were treated with bamlanivimab for SARS-CoV-2 infection at an academic tertiary referral center in Germany because of their increased individual risk for progression to severe COVID-19. Viral load was measured consecutively before and after bamlanivimab administration. After identifying immunocompromised patients with viral rebound under treatment with bamlanivimab, we characterized the available SARS-CoV-2-isolates with cycle threshold < 30 by whole genome sequencing.

2.2. Isolation of viral genomic material and SARS-CoV-2 quantification

Respiratory samples from nasopharyngeal swabs were used for total nucleic acid extraction using the EZ1 Virus Mini Kit v2.0 on an EZ1 Advanced XL (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. SARS-CoV-2 was detected as previously described [8] by the cobas® SARS-CoV-2 test on the cobas® 6800 system (Roche), or by the SARS-CoV-2 test on the NeuMoDx™ platform (Qiagen) with a plasmid-standard for quantification [9].

2.3. SARS-CoV-2 whole genome sequencing

Viral RNA was reversely transcribed to single-strand cDNA using random hexamers and SuperScript reverse transcriptase (ThermoFisher) [10]. Viral cDNA was PCR-amplified using the ARTIC network SARS-CoV-2 protocol with V3 primers [11,12], employing an extended annealing/extension time of 10 min. Prior to library preparation, for each sample, ARTIC PCR pools 1 and 2 were combined (500 ng DNA per pool). Sequencing was carried out on the Oxford Nanopore MinION device, utilizing MIN106 flow cells and the SQL-LSK109 ligation sequencing kit. Barcoding was carried out with the native Barcoding Expansion 96 Kit (EXP-NBD196).

Data analysis and generation of consensus sequences were carried out as previously described [13]. Briefly, after base-calling with Guppy v3.4.5+fb1fbfb, the ARTIC pipeline1 with default settings was applied to each sequencing run, analyzing each sample independently with Nanopolish and Medaka [14]. Generated VCF files and consensus FASTA sequences were manually curated by a) carrying out a comparison between the Nanopolish- and Medaka-based VCF files and b) visual inspection with IGV [15], checking for i) false-positive calls; ii) polymorphic positions with more than one plausible allele; iii) false-negative calls.

2.4. Role of the funding source

The funders had no role in study design, data collection, data analysis, interpretation or writing of the report.

3. Results

After bamlanivimab became available for clinical use in Germany as the first monoclonal antibody directed against SARS-CoV-2, our clinic treated six patients in whom we feared a severe course in the setting of SARS-CoV-2 with known severe humoral and/or cellular immunodeficiency. The main clinical characteristics of the six patients are presented in Table 1.

high specificity of binding, homogeneity and the lack of potential transmission of infectious agents. However, in other disease contexts, such as HIV therapy, potential drawbacks of monoclonal antibodies have also become clear, such as immune escape by selection of viral mutations [3]. In SARS-CoV-2 infection, several viral variants of concern (VOCs) are associated with immune evasion from neutralizing antibodies after resolved infection or vaccination and therefore potentially compromise the efficacy of prevention and treatment strategies [4,5]. Based on pathophysiological considerations, immunocompromised COVID-19-patients may be at increased risk of not achieving rapid viral clearance, thereby favoring the selection of viral mutations under therapy pressure. For influenza, it has been shown that antiviral resistance to neuraminidase inhibitors readily develops in immunocompromised individuals with persistent viral shedding [6]. It has been already reported that viral persistence and evolution

Table 1
Patient characteristics.

	Age	Sex	Medical Condition	Immunosuppressive medication	Days post first positive SARS-CoV-2 qPCR at the time of bamlanivimab administration	Immune escape	Viral strain	Outcome
Patient 1	early seventies	male	ANCA-associated vasculitis with end-stage renal disease	rituximab, prednisolon	D2	yes, E484K and E484Q	B.1	Died
Patient 2	early forties	female	AIDS		D3	yes, E484K	B.1.1	Discharge from Hospital
Patient 3	early sixties	male	relapsed follicular lymphoma	obinutuzumab, thiotepa, cytarabine, etoposide	D76	yes, E484K	B.1.177	Discharge from Hospital
Patient 4	late sixties	male	Heart transplant recipient (about 30 years ago)	cyclosporine, azathioprine, prednisolone	D2	yes, E484K	B.1.177	Discharge from Hospital
Patient 5	late sixties	male	Chronic lymphatic leukemia	–	D45	yes, E484K	B.1.258	Discharge from Hospital
Patient 6	mid sixties	female	Kidney transplant recipient (about 2 months ago)	tacrolimus, mycophenolate mofetil, prednisolone	D17	no	B.1.160	Discharge from Hospital

Patient 1 (Fig. 1A) was a caucasian male in his early seventies, suffering from ANCA-associated vasculitis with end-stage renal disease. He was on therapy with the CD20-directed antibody rituximab (last infusion approximately three months before admission) and additionally was on prednisolone 20 mg qd. Upon hospital admission (day 1), he presented with mild symptoms of upper respiratory tract infection and fever to the emergency department, leading to the rapid diagnosis of SARS-CoV-2 infection with an initial viral load of 8.47×10^7 copies/mL. Being a patient with significantly increased risk for a severe course of COVID-19 due to his past medical history, he was treated with bamlanivimab (700 mg) intravenously at day 2. On day 4, his respiratory situation deteriorated with the need for oxygen supplementation, thus prednisolone was switched to dexamethasone 6 mg qd. Viral load dropped to 4.62×10^5 copies/mL on day 8. However, his clinical condition further deteriorated and by day 12, the viral load had increased again by four log levels (2.27×10^9 copies/mL). This prompted us to perform whole genome sequence analysis, which revealed the presence of the E484K immune escape mutation in strain B.1. Of note, this substitution was not present before the treatment with bamlanivimab (Fig. 1A). Interestingly, at day 15 we observed continuous evolution to E484Q, reverting back to E484K on day 16 after administration of three units of convalescent plasma (CP). Unfortunately, the patient could not be stabilized and died on day 20 due to multi-organ failure.

Patient 2 (Fig. 1B) was a caucasian female in her early forties presenting with advanced HIV-1 infection (CD4+ cells $0/\mu\text{L}$) and cerebral toxoplasmosis. Antiretroviral treatment was initiated with tenofovir alafenamide, emtricitabine and bictegravir for HIV-1 as well as a combination regimen of pyrimethamine and clindamycin for cerebral toxoplasmosis. Admission screening (d1) revealed a SARS-CoV-2 infection with 2.22×10^7 copies/mL (strain B.1.1, harbouring E484E). The patient reported only mild symptoms (impaired taste). In the high risk setting of severely impaired T-cell response, bamlanivimab 700 mg was administered intravenously on day 3. SARS-CoV-2-RNA levels remained high for about one week and then further increased up to 2.9×10^9 copies/mL with simultaneous detection of the E484K substitution. Due to persistently high viral replication levels, the patient was treated with the antiviral drug remdesivir and two units of CP, resulting in a decrease of SARS-CoV-2 RNA by three log levels over the following 10 days. At day 32 the patient could be discharged from hospital with two consecutive negative SARS-CoV-2 qPCR tests.

Patient 3 (Fig. 1C) was a caucasian male in his early sixties with relapsed follicular lymphoma, who had persistent positive SARS-CoV-2 qPCR approximately 2 months after the first positive SARS-

CoV-2 RT-qPCR in November 2020 (day 1). In order to ensure viral clearance before a scheduled and urgently indicated high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), 2 units of CP were administered on day 57 and one unit on day 59. After nasopharyngeal swabs repeatedly tested negative for SARS-CoV-2, high-dose chemotherapy with obinutuzumab, thiotepa, cytarabine and etoposide was started on day 69. On day 74, SARS-CoV-2 RT-qPCR was positive again on a nasopharyngeal swab with 2.0×10^5 copies/mL (strain B.1.177, harbouring E484E). Although the initial SARS-CoV-2-positive sample was not available for viral sequencing and therefore reinfection cannot be formally excluded, a persistent but undetected infection with loss of immune control after high-dose chemotherapy seems more likely. The patient reported mild symptoms (fatigue), and bamlanivimab 700 mg was administered intravenously on day 76. The patient received autologous HSCT on day 78. Viral load further increased and peaked at day 79 with 1.47×10^8 copies/mL. Whole genome sequencing revealed the E484K mutant on day 87. Following stem cell engraftment and subsequent improvement of cellular immunity, viral titers decreased, and viral clearance was achieved at day 103. The patient could be discharged from hospital in good clinical condition.

Patient 4 (Fig. 1D) was a caucasian male in his late sixties with successful heart transplant for severe myocarditis almost 30 years before. He received 60 mg cyclosporine qd, 12.5 mg azathioprine qd, and 5 mg prednisolone qd as long-term immunosuppressive therapy. He had presented to the emergency room of a peripheral hospital due to unexplained abdominal pain and was transferred to our center after a positive rapid test due to his complex medical history. Two days before the positive SARS-CoV-2 test, the patient reported mild fatigue but no further symptoms. Bamlanivimab 700 mg was administered on day 2. Viral load was initially low with 5.27×10^4 copies/mL (strain B.1.177, harbouring E484E), increased on the day of bamlanivimab administration, then dropped and became negative over the next few days. In parallel, clinical and radiological signs of pneumonia developed during the same period, resulting in short-term therapy with high-flow oxygen and dexamethasone for 10 days. Due to the lack of a thorough clinical improvement, a new nasopharyngeal swab was taken on day 19, which was again positive, with a high viral load of 6.89×10^7 copies/mL. At this point, whole genome sequencing revealed the E484K mutant. Without further specific antiviral therapy the patient improved slowly and could be discharged from the hospital at day 40 with two negative consecutive SARS-CoV-2 qPCR tests.

Patient 5 (Fig. 1E) was a caucasian male in his late sixties with B-cell chronic leukemia (CLL) stage Binet C who had persistent positive

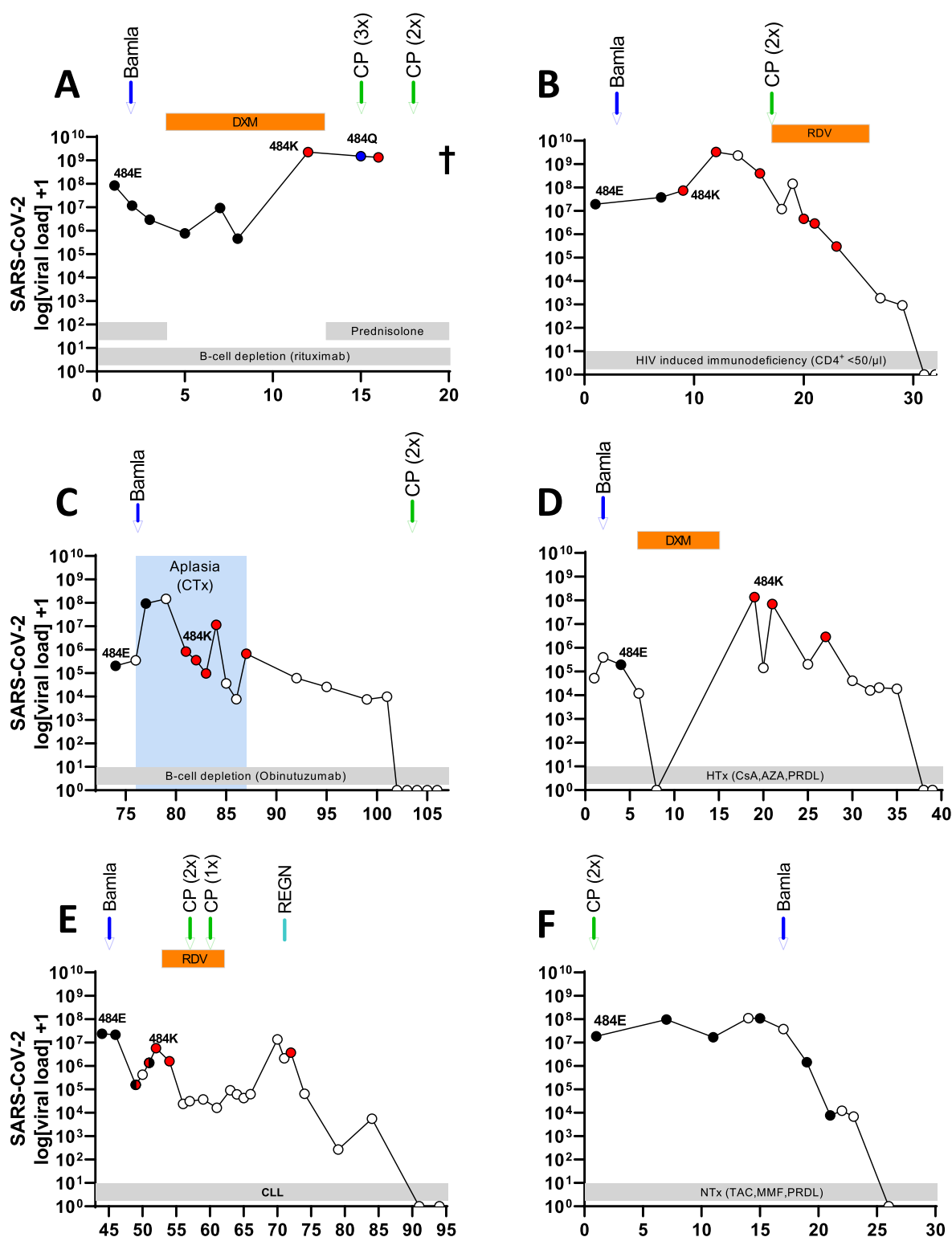


Fig. 1. Selection of E484K in SARS-CoV-2 infected patients with severe immunosuppression.

(A) Patient 1 with ANCA-associated vasculitis and pronounced immunosuppression; (B) Patient 2 with severe HIV-associated immunosuppression; (C) Patient 3 with follicular lymphoma and severe immunosuppression due to high-dose chemotherapy; (D) Patient 4 with severe immunosuppression due to heart transplantation; (E) Patient 5 with severe immunosuppression due to chronic lymphocytic leukemia; (F) Patient 6 with severe immunosuppression due to kidney transplantation. Bamla, bamlanivimab; CP, convalescent plasma; RDV, remdesivir; REGN, REGN—COV2, casirivimab/imdevimab; CTx, chemotherapy; HTx heart transplantation; PRDL, prednisolone; DXM, dexamethasone; MMF, mycophenolate mofetil; TAC, tacrolimus; CsA, cyclosporin A; AZA, azathioprine; CLL, chronic lymphocytic leukemia; E484K, substitution in the receptor-binding domain (RBD) associated with immune escape. Time points are color coded according to their sequence. White, not determined; black, 484E; red, 484 K; blue, 484Q (for details see suppl. Table 1).

SARS-CoV-2 RT-qPCR (3.12×10^7 copies/mL, strain B.1.258, harbouring E484E) 44 days after the first positive SARS-CoV-2 RT-qPCR in December 2020 before scheduled initiation of CLL treatment with ibrutinib. In view of the current risk constellation and the previous illnesses, bamlanivimab 700 mg was applied on day 45, which resulted in only a transient decrease in SARS-CoV-2 viral load. A subsequent increase of the viral load to 4.82×10^6 copies/mL prompted us to perform whole-genome sequencing on day 52 (day 8 after bamlanivimab administration), which identified the E484K mutant. An off-label-use therapy with remdesivir was then initiated for a total of 10 days. In addition, cumulatively 3 units of CP were administered (Fig 1E). In the further course a high SARS-CoV-2 viral load persisted (2.26×10^6 copies/mL, still harbouring E484K) so that we decided to administer imdevimab/casirivimab, which was well tolerated by the patient. Viral load subsequently decreased and became negative on day 91. The patient could be discharged from hospital in moderately reduced clinical condition.

Patient 6 (Fig. 1F) was a caucasian female in her mid-sixties with allogeneic cadaveric kidney transplantation performed about 2 months before hospital admission for SARS-CoV2-infection. Her immunosuppressive therapy consisted of 3 mg tacrolimus bid, mycophenolate mofetil 1 g bid (paused after admission) and prednisolone 20 mg qd. At admission, her SARS-CoV-2 viral load was 9.36×10^6 (strain B.1.160, harbouring E484E). Considering the increased risk for a severe course of COVID-19, we decided to administer 2 units of CP on the day of admission. Because viral load did not decrease over the next 2 weeks, we additionally administered 700 mg of bamlanivimab. Viral load subsequently dropped and became negative on day 26. Without further complications, the patient could be discharged from hospital in good clinical condition.

4. Discussion

Of six severely immunosuppressed SARS-CoV-2-infected patients treated with bamlanivimab, we observed viral immune escape in five patients. The E484K mutation selected here in common SARS-CoV-2 variants is also present in different VOCs associated with immune evasion, including the variant B.1.351 initially described in South Africa (WHO label Beta) and the variants P1 (WHO label Gamma) and P2 (WHO label Zeta) detected in Brazil [16–18] which are currently rare in Germany. To investigate the local baseline prevalence of the E484K mutation, all SARS-CoV-2 whole genome sequences available from the Dusseldorf region at that time were screened. Remarkably, only 3 out of the 1270 available sequences presented the E484K mutation and were characterized as B.1.351 isolates. This observation and the fact that all our patients harboured variants with the E484E mutation at baseline support our hypothesis that the E484K mutation was indeed newly selected under the specific immune pressure of bamlanivimab in five of six patients with impaired humoral and cell-mediated immunity. It should also be mentioned that the recently described variant B.1.617.1 (first documented in India, WHO label Kappa) harbours the E484Q mutation [19], which was also selected in patient 1.

While it was reported in vitro that SARS-CoV-2 variants harbouring the mutations E484K or E484Q are resistant against neutralization by the monoclonal antibody bamlanivimab [16,18], our clinical observation that these mutations newly emerged under bamlanivimab therapy and potentially impaired clinical outcomes of patients could have important implications not only for the clinical management of individual patients but also concerning epidemiological measures for pandemic control. Especially when used in immunocompromised patients in the outpatient setting, there would be a risk of transmission of viruses with immune escape mutations, which may become highly relevant when such mutations are selected in VOCs associated with increased viral transmission such as the variant B.1.1.7. Indeed, there are already different reports that describe the E484K substitution in

the context of B.1.1.7. Due to the complexity of the immunosuppressed patients treated with bamlanivimab, we treated them exclusively as inpatients in single rooms in a dedicated COVID-19 isolation ward with staff trained and highly experienced in PSA, and there was no evidence of transmission of these emerging viral strains harbouring E484K in this setting. After the potential threat was recognized upon receipt of sequencing results, all patients were followed for an extended period of time and only discharged after persistently low and eventually negative SARS-CoV-2 PCR results.

Cautious management and strict adherence to infection prevention and control practices appear to be highly advisable in the context of mAb treatment of SARS-CoV-2-positive immunosuppressed individuals.

Gottlieb and colleagues reported an emergence of escape mutants (E484K; E484Q; F490S and S494P) in 28/297 (9.4%) patients who received bamlanivimab monotherapy and even in 7/145 (4.8%) of patients receiving placebo in the phase 2/3 BLAZE-1 trial [2]. The fact that we observed the occurrence of E484K in a much higher percentage (5/6; 83.3%) when treating severely immunosuppressed patients suggests a significantly higher risk of viral escape in this setting. While the exact reason for the observed emergence of immune escape mutants predominantly in immunocompromised patients is unclear, it is likely that the persistent impairment of humoral and cellular immune control in these patients results in prolonged intervals of viral replication. In addition, with mAb targeting specific epitopes of SARS-CoV-2, escaping antibody neutralization by mutation is easier in the context of a single mAb compared to e.g. polyclonal immune sera and natural immunity. The combination of prolonged intervals of viral replication under narrowly focused selection pressure may explain the rapid viral immune escape observed in our patients.

The differential therapeutic response to bamlanivimab in terms of viral load with at least initial decrease in patients 1, 4, 5, and 6, but on the other hand, unchanged or increasing SARS-CoV-2 viral load after bamlanivimab administration in patients 2 and 3 could be explained by a combination of several factors. First, therapy occurred at different time points within the natural history of SARS-CoV-2 infection, with typically an initial rapid increase in viral load, subsequent stabilization at a high level, and subsequent clearance by the onset of the adaptive immune response. However, this would certainly not explain the course of patient 3, who had been SARS-CoV-2 positive for an extended period of time. Similarly, the development of the immune escape mutation E484K during the course of the disease cannot conclusively explain the lack of timely response to mAb therapy in patients 2 and 3.

We therefore hypothesize that in the context of the severe immunosuppression of these bamlanivimab-treated patients, their own immune function, which changed significantly in some of the patients during the course of the disease, contributed quite substantially to these viral load courses. Patient 2 initially had a very severe cellular immunodeficiency with CD4+ cells of $0/\mu\text{L}$, which improved only gradually after initiation of antiretroviral therapy, whereas in patient 3 cellular immunity was transiently profoundly impaired by high-dose chemotherapy with consecutive aplasia. In our view, it should therefore be discussed to what extent a certain degree of cellular immune function may be essential for a successful therapeutic response after administration of monoclonal antibodies.

CP and casirivimab/imdevimab (REGN—COV2) appeared to remain at least partially effective from a clinical perspective when used in our patients with viral rebound even in the presence of E484K (Fig. 1). However, due to the different disease courses, the additional use of remdesivir in two cases and the small number of patients, further data are needed regarding the efficacy in this specific clinical setting.

It is also noteworthy that the only severely immunosuppressed patient without viral rebound (patient 6) had previously been given CP

and thus had not actually received mAb monotherapy. Combinations of two or more mAbs or polyclonal antisera may therefore increase the genetic barrier sufficiently to largely prevent escape of the immune system as known from other viral infections [20]. Furthermore, in the context of variants of concern that already harbour immune escape mutations, it should be kept in mind that functional monotherapy may also be present when a combination of two mAbs is used. However, this needs to be thoroughly evaluated, especially when treating severely immunocompromised patients infected with SARS-CoV-2. The U.S. Food and Drug Administration has recently withdrawn the Emergency Use Authorization for bamlanivimab in consideration of the increasing prevalence of immune escape mutants in the USA. The European Medicines Agency (EMA) issued a recommendation on treatment with bamlanivimab and etesevimab in early March 2021. The EMA concludes that this mAb combination can be used to treat confirmed COVID-19 in patients who do not require supplemental oxygen and who are at high risk for progression of COVID-19 to a severe disease course. The agency also examined the use of bamlanivimab alone, which was available as monotherapy in Germany from the end of January 2021, and concluded that it could be also considered as a treatment option despite uncertainties about the benefits of monotherapy.

Until further data will be available, our results suggest that caution is warranted in the use of monoclonal antibodies in immunocompromised patients infected with SARS-CoV-2.

Contributors

BJ, NL, TF, AW, JT, TL were responsible for conceptualization and supervised the study. BJ, TF, VK, TL, ML, NF, DS, TB, DK, RH, NL, AW, JT contributed to investigation and data curation. BJ, NL, AW, OA, AD, JT conducted the formal analysis. BJ, TF, NL, AW, JT were responsible for methodology, data validation and visualization. BJ, NL, TF, VK, AW, JT, TL contributed to the original draft. All authors critically revised the manuscript and approved the final version of the manuscript.

Data availability statement

Raw data were generated at University Hospital Duesseldorf. Derived or additional data supporting the findings of this study are available from the corresponding author [BJ] upon reasonable request.

Declaration of interests

BJ received honoraria for presentations from Gilead (Remdesivir) as well as Falk, Janssen-Cilag, MSD, BMS, Abbvie, Viiv, Gilead, Boehringer, Fresenius Medical Care (outside the submitted work) and served on advisory boards for Viiv, BMS, Gilead, Theratechnologies (outside the submitted work). VK received lecture fees from Abbvie, Falk, Albireo, Gilead (outside the submitted work). TF was PI for a Gilead clinical trial (Remdesivir) and served on Gilead advisory boards. All other authors declare no competing interests regarding this work.

Acknowledgements

The authors would like to thank the patients and their relatives, the clinical staff involved in the care of the patients, the laboratory staff involved in the virological analyses, and all others who contributed to the study.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100164>.

References

- [1] Pallotta AM, Kim C, Gordon SM, Kim A. Monoclonal antibodies for treating COVID-19. *Cleve Clin J Med* 2021.
- [2] Gottlieb RL, Nirula A, Chen P, et al. Effect of bamlanivimab as monotherapy or in combination with etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19: a randomized clinical trial. *JAMA* 2021;325(7):632–44.
- [3] Schoofs T, Klein F, Braunschweig M, et al. HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. *Science* 2016;352(6288):997–1001.
- [4] Kemp SA, Collier DA, Datir RP, et al. SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection. *Nature* 2021.
- [5] Collier DA, De Marco A, Ferreira I, et al. SARS-CoV-2 B.1.1.7 sensitivity to mRNA vaccine-elicited, convalescent and monoclonal antibodies. *medRxiv* 2021.
- [6] Kossyvakis A, Mentis AA, Tryfinopoulou K, et al. Antiviral susceptibility profile of influenza A viruses; keep an eye on immunocompromised patients under prolonged treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017;36(2):361–71.
- [7] Choi B, Choudhary MC, Regan J, et al. Persistence and Evolution of SARS-CoV-2 in an Immunocompromised Host. *N Engl J Med* 2020;383(23):2291–3.
- [8] Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020;25(3).
- [9] Lübke N, Senff T, Scherger S, et al. Extraction-free SARS-CoV-2 detection by rapid RT-qPCR universal for all primary respiratory materials. *J Clin Virol* 2020;130:104579.
- [10] Walker A, Houwaart T, Wienemann T, et al. Genetic structure of SARS-CoV-2 reflects clonal superspreading and multiple independent introduction events, North-Rhine Westphalia, Germany, February and March 2020. *Euro Surveill* 2020;25(22).
- [11] Quick J. ARTIC amplicon sequencing protocol for MinION for nCoV-2019. 2020.
- [12] Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc* 2017;12(6):1261–76.
- [13] Walker A, Houwaart T, Finzer P, et al. Characterization of SARS-CoV-2 genetic structure and infection clusters in a large German city based on integrated genomic surveillance, outbreak analysis, and contact tracing. 2021.
- [14] Loman NJ, Quick J, Simpson JT. A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nat Methods* 2015;12(8):733–5.
- [15] Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 2011;29(1):24–6.
- [16] Starr TN, Greaney AJ, Dingens AS, Bloom JD. Complete map of SARS-CoV-2 RBD mutations that escape the monoclonal antibody LY-CoV555 and its cocktail with LY-CoV016. *bioRxiv* 2021.
- [17] Wibmer CK, Ayres F, Hermanus T, et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat Med* 2021.
- [18] Widera M., Wilhelm A., Hoehl S., et al. Bamlanivimab does not neutralize two SARS-CoV-2 variants carrying E484K in vitro. 2021.
- [19] Cherian S, Potdar V, Jadhav S, et al. Convergent evolution of SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *bioRxiv* 2021.04.22.440932.
- [20] Margolis DM, Koup RA, Ferrari G. HIV antibodies for treatment of HIV infection. *Immunol Rev* 2017;275(1):313–23.

Rapid Selection of Sotrovimab Escape Variants in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Omicron-Infected Immunocompromised Patients

Smaranda Gliga,^{1,2,a} Nadine Lübke,^{2,a,*} Alexander Killer,^{1,a} Henning Gruell,³ Andreas Walker,² Alexander T. Diltthey,⁴ Alexander Thielen,⁵ Carolin Lohr,¹ Charlotte Flaßhove,¹ Sarah Krieg,¹ Joanna Ventura Pereira,¹ Tobias Paul Seraphin,¹ Alex Zaufel,¹ Martin Däumer,⁵ Hans-Martin Orth,¹ Torsten Feldt,¹ Johannes G. Bode,¹ Florian Klein,^{3,6} Jörg Timm,² Tom Luedde,^{1,a} and Björn-Erik Ole Jensen^{1,a}

¹Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, University Hospital Düsseldorf, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; ²Institute of Virology, University Hospital Düsseldorf, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; ³Institute of Virology, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, Cologne, Germany; ⁴Institute of Medical Microbiology and Hospital Hygiene, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; ⁵Institute of Immunology and Genetics, Kaiserslautern, Germany; and ⁶Center for Molecular Medicine Cologne, University of Cologne, Cologne, Germany

Background. Monoclonal antibodies (mAbs) that target severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) are predominantly less effective against Omicron variants. Immunocompromised patients often experience prolonged viral shedding, resulting in an increased risk of viral escape.

Methods. In an observational, prospective cohort, 57 patients infected with Omicron variants who received sotrovimab alone or in combination with remdesivir were followed. The study end points were a decrease in SARS-CoV-2 RNA $<10^6$ copies/mL in nasopharyngeal swabs at day 21 and the emergence of escape mutations at days 7, 14, and 21 after sotrovimab administration. All SARS-CoV-2 samples were analyzed using whole-genome sequencing. Individual variants within the quasispecies were subsequently quantified and further characterized using a pseudovirus neutralization assay.

Results. The majority of patients (43 of 57, 75.4%) were immunodeficient, predominantly due to immunosuppression after organ transplantation or hematologic malignancies. Infections by Omicron/BA.1 comprised 82.5%, while 17.5% were infected by Omicron/BA.2. Twenty-one days after sotrovimab administration, 12 of 43 (27.9%) immunodeficient patients had prolonged viral shedding compared with 1 of 14 (7.1%) immunocompetent patients ($P = .011$). Viral spike protein mutations, some specific for Omicron (e.g., P337S and/or E340D/V), emerged in 14 of 43 (32.6%) immunodeficient patients, substantially reducing sensitivity to sotrovimab in a pseudovirus neutralization assay. Combination therapy with remdesivir significantly reduced emergence of escape variants.

Conclusions. Immunocompromised patients face a considerable risk of prolonged viral shedding and emergence of escape mutations after early therapy with sotrovimab. These findings underscore the importance of careful monitoring and the need for dedicated clinical trials in this patient population.

Keywords. immunodeficiency; sotrovimab; SARS-CoV-2; Omicron; escape.

During the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pandemic, numerous studies showed that treatment options that directly target SARS-CoV-2 are most successful in the early phase of coronavirus disease 2019 (COVID-19), whereas in the late phases of COVID-19 with

pneumonia and hyperinflammation, immunomodulation is the main therapeutic principle. Several monoclonal antibodies (mAbs) that target SARS-CoV-2, such as bamlanivimab/etesevimab or casirivimab/imdevimab, became available starting in late 2020 and were successfully used in the early phase of COVID-19 to prevent disease progression in high-risk patients [1]. With the emergence of the currently dominating variant of concern Omicron in November 2021, a significant rise in infection rates was observed. This went along with a loss of in vitro activity of the mAb combination casirivimab/imdevimab, commonly used until then, because the target regions in the spike protein were altered through several mutations [2]. In January 2022, sotrovimab became available in Germany. It was one of the few mAbs found to be effective against the Omicron variant in vitro and thus represented a promising treatment option for early SARS-CoV-2 infection [3–5].

Sotrovimab was approved for use in children aged >12 years and in adults at high to moderate risk for developing severe

Received 01 July 2022; editorial decision 29 September 2022; published online 3 October 2022

^aS. G., N. L., A. K., T. L., and B.-E. O. J. contributed equally to this work.

Correspondence: N. Lübke, Institute of Virology, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany (nadine.luebke@med.uni-duesseldorf.de).

Clinical Infectious Diseases®

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com
<https://doi.org/10.1093/cid/ciac802>

infection [6]. To date, only 2 randomized, controlled trials have evaluated the efficacy of sotrovimab in preventing hospitalization and disease progression, but only the COVID-19 Monoclonal Antibody Efficacy Trial–Intent to Care Early (COMET-ICE) trial showed a benefit [3, 4, 7]. However, these trials did not include severely immunodeficient patients such as solid organ transplant (SOT) recipients. Case series as well as 2 cohort studies evaluated the efficacy and safety of sotrovimab in SOT patients in the context of Omicron and reported a reduction in disease severity [8, 9]. However, it was suggested that therapy of SARS-CoV-2 infections with a single mAb might promote the emergence of escape mutations in the spike protein, especially in immunocompromised patients [10]. Recently, mutations have been reported after sotrovimab therapy in patients infected with the Omicron variant, but the risk factors for the occurrence and the longitudinal development of resistance are still largely unclear [11, 12]. Therefore, we analyzed the outcome and risk factors for viral persistence after treatment with sotrovimab in our cohort of patients treated since January 2022, focusing specifically on the emergence of escape mutations.

METHODS

Study Design

We performed a prospective, observational cohort study in patients diagnosed with SARS-CoV-2 infection who received sotrovimab therapy between 20 January 2022 and 25 February 2022. Patients were either hospitalized or presented to the outpatient clinic at the University Hospital Düsseldorf. Inclusion criteria were polymerase chain reaction (PCR)–confirmed SARS-CoV-2 infection, age >12 years, weight >40 kg, and risk factors for developing a severe course of COVID-19. All patients provided informed consent. Patients were pseudonymized with an ID number. A single dose of 500 mg of sotrovimab was administered intravenously over a 1-hour period as part of routine clinical practice.

Baseline was defined as the day of sotrovimab administration. Nasopharyngeal swabs and clinical parameters were collected at baseline and during the follow-up period: every 7 days (± 2 days) until viral clearance was achieved. The main study end points were percentage of patients with a decrease in SARS-CoV-2 RNA $<10^6$ copies/mL in nasopharyngeal swabs 21 days after sotrovimab administration and characterization of the viral variants including screening for escape mutations during the observation period of 28 days. Patients who did not attend their follow-up appointments and patients for whom viral genome sequencing was unsuccessful at any time during the study were excluded from the statistical analyses.

Definition of Prolonged Viral Shedding

Prolonged viral shedding was defined as a persistent SARS-CoV-2 RNA concentration above 10^6 copies/mL 21 days after sotrovimab

administration. The threshold of 10^6 SARS-CoV-2 RNA copies/mL or a cycle threshold value >25 is considered a measure of infectivity based on in vitro cell culture data that show a correlation between viral load and viral cultivability and the associated probability of transmission [13]. This cutoff value as a correlate of contagiousness was also chosen following the German recommendations of the Robert Koch Institute for the isolation of SARS-CoV-2–infected hospitalized patients.

Laboratory SARS-CoV-2 Analyses

All detailed information on SARS-CoV-2 detection and quantification, SARS-CoV-2 whole-genome sequencing and resistance analysis, pseudovirus cloning, production, and neutralization assays is provided in the [Supplementary Appendix](#).

Statistical Analyses

Detailed information on the statistical programs used and the statistical tests performed is provided in the [Supplementary Appendix](#).

All investigations were performed in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was approved via ethics vote of the local ethics committee of the medical faculty of Heinrich-Heine-University. All patients gave written informed consent.

RESULTS

Patients' Characteristics

A total of 57 patients (21 females; 36 males) were enrolled in the study, 47 (82.5%) of whom were infected with Omicron variant BA.1 and 10 (17.5%) with Omicron variant BA.2 ([Table 1](#)). No symptoms were present in 21 of 57 (36.8%) patients, while the rest had symptoms consistent with early COVID-19. The median time from onset of symptoms to administration of sotrovimab was 3 days (interquartile range, 1–3.3). All participants were in the early phase of COVID-19 when sotrovimab was administered; 2 of them required low levels of oxygen supplementation for reasons unrelated to COVID-19. Forty-two of 57 patients (73.7%) received at least 3 doses of SARS-CoV-2 vaccine in accordance with the recommendations of the Standing Committee on Vaccination ([Supplementary Table 1](#)). The median time span since the last vaccination was 3 months (range, 1–5). Two patients died from causes unrelated to COVID-19: 1 from stage IV malignant melanoma, the other from complications of acute lymphoblastic leukemia. In total, 5 patients could not be monitored because they either died (malignant melanoma) or did not present to follow-up ($n = 4$).

Patients were grouped into immunocompetent ($n = 14$) and immunodeficient ($n = 43$). Immunodeficiency mostly comprised SOT, stem cell transplantation (SCT), active hematologic malignancies, and autoimmune diseases. The full spectrum of diseases is presented in [Table 1](#). Immunosuppressive

Table 1. Baseline Characteristics of Patients Grouped by Immunodeficiency

Variable	n
Total	57
Gender	
Male	36
Female	21
Groups	
Immunocompetent	14
Immunodeficient	43
Solid organ transplantation	
Kidney	18
Heart	2
Heart + kidney	1
Heart + lung	1
Kidney + pancreas	1
Stem cell transplantation	
Allogeneic	5
Autologous	2
Leukemia	
Acute lymphoblastic leukemia	2
AML ^a	2
AML + CMML	1
CMML	1
Lymphoma	
Diffuse large B-cell lymphoma	1
T-cell lymphoma ^a	1
AL amyloidosis/smoldering multiple myeloma ^a	1
Other malignancies	
Stage IV malignant melanoma and stage IV non-small cell lung cancer ^b	1
Common variable immune deficiency	1
Autoimmune diseases	
Cryoglobulinemic vasculitis	1
p-ANCA vasculitis	1
Rheumatoid arthritis	1
Systemic lupus erythematosus	1
Ulcerative colitis	1
Liver cirrhosis Child–Pugh A ^c	1
Liver fibrosis with portal hypertension ^c	1

Abbreviations: ANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibody; AML, acute myeloblastic leukemia; AL, amyloid; CMML, chronic myelomonocytic leukemia.

^aPatients with previous allogeneic (2) and autologous (1) stem cell transplantation and malignancy relapse.

^bDexamethasone therapy for cerebral metastases.

^cPatients with liver fibrosis/cirrhosis had a concurrent autoimmune disease.

medication was given to 39 of 43 patients (90%) classified as immunodeficient (Supplementary Table 1).

Prolonged Viral Shedding in Immunodeficient COVID-19 Patients Infected With an Omicron Variant and Treated With Sotrovimab

We analyzed the kinetics of viral clearance after the first positive SARS-CoV-2 PCR test and after sotrovimab administration in immunocompetent and immunodeficient patients (Figure 1). All but 1 of the immunocompetent patients had a viral load (VL) below 10^6 copies/mL at day 14, while 21 of 43

(48.8%) immunodeficient patients had prolonged viral shedding at this time point ($P = .011$). Moreover, even on day 21, 12 of 43 (27.9%) patients with immunodeficiency had not achieved a VL $<10^6$ copies/mL. The only immunocompetent patient who still had a VL $>10^6$ copies/mL on day 14 was lost to follow-up and therefore considered for analysis as having a VL $>10^6$ copies/mL on day 21 (patient 37; Supplementary Table 2). A higher proportion of patients who presented without COVID-related symptoms had prolonged viral shedding after days 14 and 21 (Supplementary Table 4).

Of note, 6 of 43 (13.9%) immunodeficient patients were infected with the BA.2 Omicron variant, characterized by higher levels of in vitro resistance of sotrovimab compared with Omicron BA.1. Twenty-nine of 43 (67.4%) immunodeficient patients received additional therapy with remdesivir at baseline (Supplementary Table 2). However, in the subgroup analysis, no significant association was found regarding the occurrence of prolonged viral shedding and the following factors: Omicron variant, remdesivir administration, number of vaccinations, and months since last vaccination or time between symptom onset and sotrovimab infusion (Table 2). The only risk factor identified for prolonged viral shedding was immunodeficiency ($r = 0.329$; $P = .016$).

Initial nonresponders, defined as patients whose symptoms either worsened despite sotrovimab administration and required hospitalization (patients 30, 34) or who experienced a viral rebound during the observation period (days 14–21: patients 8, 9, 10, 16; >21 days: patients 3, 26, 54), received further antiviral therapy. All patients who showed a slow but steady decline in SARS-CoV-2 viral load (VL) did not receive further antiviral therapy, and 5 patients were lost to follow-up. In all 10 patients re-treated with additional antiviral drugs, the virus was subsequently eliminated (Supplementary Table 2).

Taken together, these results show that immunocompromised patients have a substantial rate of prolonged viral shedding, even after administration of sotrovimab, which was the standard therapy for patients infected with SARS-CoV-2 at high risk for disease progression at the time of enrollment.

Emergence and Characterization of Escape Mutations in Omicron Variant of Concern After Use of Sotrovimab

Noting the prolonged viral shedding in immunocompromised patients after sotrovimab administration, we then performed whole-genome nanopore sequencing of all available viral samples with VL $>10^6$ copies/mL. Samples with detected resistance mutations were further analyzed with quantitative Illumina sequencing with spike amino acid coverage averaging 98.5% (range, 91.6%–100%; sample overview table on online data repository server, see Data availability section). This analysis revealed that mutations at spike protein residues associated with resistance to sotrovimab occurred in 14 of 57 patients (24.6%). No selection of escape mutations was observed in the

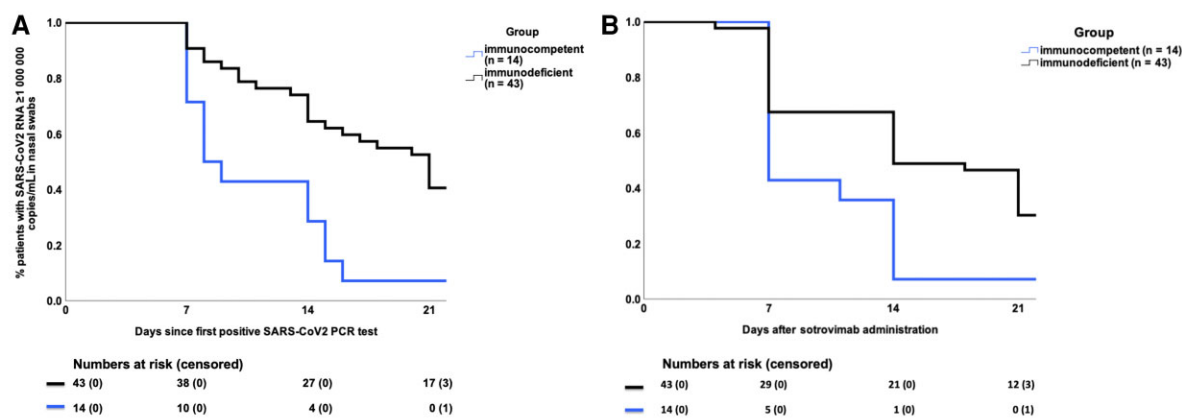


Figure 1. Patients with persistent viral replication ($\geq 10^6$ copies/mL) after sotrovimab administration. *A*, Prolonged viral shedding by day 21 after the first positive SARS-CoV-2 PCR test according to immunocompetence. *B*, Prolonged viral shedding by day 21 after sotrovimab administration in immunocompetent patients and patients with immunodeficiency. Numbers at risk are patients with a viral load $\geq 10^6$ copies/mL; censored are patients lost to follow-up (1 patient was first lost to follow-up on day 28 and was included in numbers at risk). Abbreviations: PCR, polymerase chain reaction; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

immunocompetent patients, only in immunodeficient patients (14 of 43, 32.6%), most of whom had prolonged viral shedding. This group comprised 6 patients with SOT; 2 allogeneic SCT recipients; 2 patients with active hematologic malignancy who were receiving chemotherapy; 1 patient each with cryoglobulinemic vasculitis, systemic lupus erythematosus, and liver cirrhosis (Child–Pugh class A), each of whom received additional immunomodulatory therapies; and 1 patient with common variable immunodeficiency (Supplementary Table 2).

While no variants with reduced susceptibility to sotrovimab were detected at baseline confirmed by Illumina sequence analysis, 5 patients had sotrovimab-resistant variants by day 7, whereas most escape mutations occurred between day 7 and day 14. Details of the quantitative analysis of sotrovimab resistance mutations performed by Illumina sequencing on SARS-CoV-2 samples with evidence of immune escape in nanopore sequencing are shown in Figure 2. The resistance mutations that appeared first were detected exclusively at positions 337 or 340 in the spike protein, predominantly featuring the mutations P337S ($n = 8$), E340K ($n = 9$), and E340D ($n = 5$). In addition, amino acid substitutions P337H/L/R and E340A/V were found during our observation period of up to 28 days (Supplementary Table 3). During the observation period, not only an increase in escape variants (eg, patients 2, 31, 53) but also a change in the frequency of mutated variants were observed, for example, patient 10, E340D (d21) to E340K (d28) and patient 53, E340V (d7) to E340D (d14; Figure 2, Supplementary Table 3).

The sotrovimab-specific escape mutations (P337S, E340D/K/V) detected on day 7 were characterized in the BA.1 and BA.2 Omicron background using a pseudovirus neutralization assay (Figure 3). While in the B.1 background (a common lineage early in 2020 [14]), only E340K and E340D were associated with reduced neutralization by sotrovimab (IC_{50} (half

maximal inhibitory concentration), $>100 \mu\text{g/mL}$ and IC_{50} , $0.162 \mu\text{g/mL}$, respectively), all other detected mutations completely abrogated neutralization by sotrovimab in both the BA.1 and BA.2 backgrounds (IC_{50} , $>100 \mu\text{g/mL}$).

To characterize the risk factors for the selection of escape mutations, correlation analysis was performed (Table 2). This analysis revealed that 2 factors correlated with the emergence of resistance mutations: immunodeficiency ($r = 0.305$, $P = .021$) and days until VL $<10^6$ SARS-CoV-2 RNA copies/mL achieved after sotrovimab administration ($r = 0.322$, $P = .019$). In detail, patients with emergence of mutations had significantly delayed time to viral clearance (mean, 28.2; standard deviation [SD], 16.2 days) compared with those without mutations (mean, 12.9; SD, 9.9 days; odds ratio, 5.04; 95% confidence interval, 1.29–18.3). In addition, for patients with tacrolimus therapy, higher tacrolimus levels at baseline positively correlated with the emergence of escape mutations ($r = 0.523$, $P = .015$). In immunodeficient patients, administration of remdesivir in combination with the corresponding duration correlated negatively with the occurrence of resistance mutations against sotrovimab ($r = -0.392$, $P = .009$). Most patients with selection of sotrovimab-specific escape mutations (13 of 14, 92.8%) were infected with the BA.1 variant; however, only 6 of 43 immunodeficient patients were infected with BA.2.

Together, these findings suggest that sotrovimab monotherapy in immunocompromised patients is associated with the risk of de novo development of specific mutations that lead to immune escape.

DISCUSSION

To our knowledge, this is one of the few studies to report the frequent emergence of escape mutations after sotrovimab

Table 2. Bivariate Correlation Among Clinical Parameters, Duration Until Viral Load $<10^6$ copies/mL, and Escape Mutations

	VL <10 ⁶ Copies/mL Since First Positive Polymerase Chain Reaction Test (d)	VL <10 ⁶ Copies/mL Since Sotrovimab Administration (d)	Mutations Day 7 (0 = None, 1 = Mutation)	Mutations Day 14 (0 = None, 1 = Mutation)	Mutations overall (0 = None, 1 = Mutation)
Parameter	Correlation Coefficient (r) P Value				
Remdesivir therapy at baseline (0 = 0, 1 = 3, and 2 = 5 d)					
Immunocompetent	−0.355	−0.224	NA	NA	NA
	0.234	0.462	NA	NA	NA
Immunodeficient	0.057	−0.036	−0.372	−0.261	−0.392
	0.726	0.827	0.015	0.099	0.009
Omicron variant (0 = BA.1, 1 = BA.2)					
Immunocompetent	0.068	0.207	NA	NA	NA
	0.824	0.498	NA	NA	NA
Immunodeficient	0.032	0.107	−0.150	−0.095	−0.137
	0.844	0.510	0.343	0.555	0.383
Time since last vaccination (mo)					
Immunocompetent	0.073	0.080	NA	NA	NA
	0.822	0.805	NA	NA	NA
Immunodeficient	0.298	0.241	0.011	0.179	0.217
	0.109	0.199	0.953	0.345	0.240
Number of vaccinations					
Immunocompetent	0.408	0.496	NA	NA	NA
	0.167	0.085	NA	NA	NA
Immunodeficient	0.041	0.046	0.117	−0.125	−0.104
	0.804	0.780	0.467	0.422	0.512
Immunodeficiency (0 = immunocompetent, 1 = immunodeficient)	0.329	0.208	0.320	0.275	0.305
	0.016	0.135	0.015	0.042	0.021
Viral clearance after sotrovimab administration (d)					
	NA	NA	0.258	0.401	0.322
	NA	NA	0.062	0.004	0.019
Tacrolimus levels at baseline (ng/mL)					
	0.349	0.275	0.161	0.451	0.523
	0.132	0.240	0.486	0.046	0.015
Days since first symptoms (number of pairs = 35 ^a)					
	0.075	−0.251	0.090	−0.144	−0.10
	0.669	0.146	0.600	0.417	0.955

Significant correlations appear in bold.

Abbreviations: NA, not applicable; VL, viral load.

^aOne patient was lost to follow-up and not included in this analysis.

treatment in a predominantly immunodeficient cohort of patients infected with Omicron variants.

Previous publications showed a decreased severity of SARS-CoV-2 disease with the Omicron variant [15]. Consistent with this, all patients in our high-risk cohort had uncomplicated disease throughout the follow-up period and there was no SARS-CoV-2-related mortality. Due to the observational nature of our study, it remains unclear whether the clinical course might have been less favorable in some patients without early antiviral therapy. When the BA.1 and BA.2 Omicron variants were compared in terms of prolonged viral shedding after sotrovimab administration, there was no significant difference found in our cohort. At this point, however, it must be emphasized that BA.2 was underrepresented in our study cohort compared with BA.1 (17.5% vs 82.5%, respectively). In our pseudovirus neutralization assays (Figure 3), as well as in other studies, a reduced neutralization activity of

sotrovimab against BA.2 was described [16, 17]. These data led the US Food and Drug Administration to revoke the approval of sotrovimab for patients infected with BA.2 in April 2022 [18].

A unique feature of our cohort is the large number of immunodeficient patients, almost half of whom were patients with SOT, resulting in a higher risk of prolonged viral shedding, therefore potentially promoting the emergence of highly mutated viruses [19–21]. In this context, a higher baseline tacrolimus serum level was associated with the selection of escape mutations in our study, which highlights the importance of considering treatment adjustments of immunosuppressive medication during SARS-CoV-2 infection.

In our cohort, all but 1 of the immunocompetent patients (13 of 14, 92.9%) were below the defined viral threshold of 10^6 SARS-CoV-2 RNA copies/mL at day 14 and no selection of resistant variants to sotrovimab was detected. In contrast,

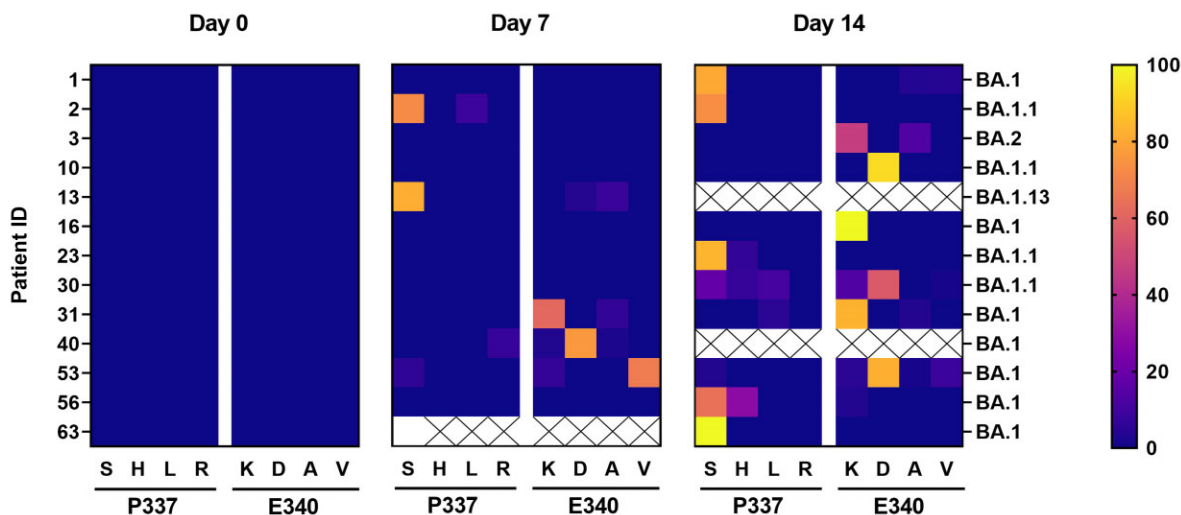


Figure 2. Prevalence and evolution of escape mutations in the spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) after sotrovimab treatment. Detected amino acid exchanges in the spike protein at positions 337 and 340 on day 0, day 7, and day 14 after sotrovimab administration. The frequency of reads in % is indicated by the color scale. The determined patient-related SARS-CoV-2 variant is shown. Only patients with detected mutations after sotrovimab treatment are indicated. Patients selecting a spike protein mutation after day 14 are not included in this figure (patient 51).

sotrovimab escape mutations were detected in 32.6% of immunodeficient patients who predominantly experienced prolonged periods of viral replication. Similarly, treatment with other mAbs or antiviral agents (such as remdesivir) is also reported to promote the selection of viral mutations, particularly in immunosuppressed patients [10, 22–24].

Sotrovimab-specific resistance mutations were first described in an Australian cohort of patients infected with the Delta variant [25]. Genome sequencing of samples from the COMET-ICE trial detected sotrovimab escape mutations in 20 patients, of which P337L, E340A, and E340K showed reduced susceptibility to sotrovimab in pseudotyped viral-like particles (>100-fold change in EC_{50} (half maximal effective concentration) value) [3, 18]. In the study published by Rockett et al, 8 of 100 patients developed 1 of the following

mutations, E340A/K/V or P337L, combined with the E340 mutation that occurred 6–13 days after sotrovimab administration [25]. While P337L and the E340A were selected primarily in the Delta variant of concern, other amino acids were selected in the Omicron variants at the same positions, predominantly P337S/R and E340D/K, as reported in other recent studies [11, 12].

In our longitudinal study, after detection of the sotrovimab-specific escape mutations P337S/L/R and E340A/D/K/V at day 7, an additional variant was detected during our observation period (P337H). Moreover, changes in frequency of different escape variants over time were observed, as described in infections with the Delta variant, presumably indicating ongoing viral evolution [25].

In the *in vitro* analyses carried out in our study, the pseudovirus neutralization assays confirmed that both sotrovimab mutations,

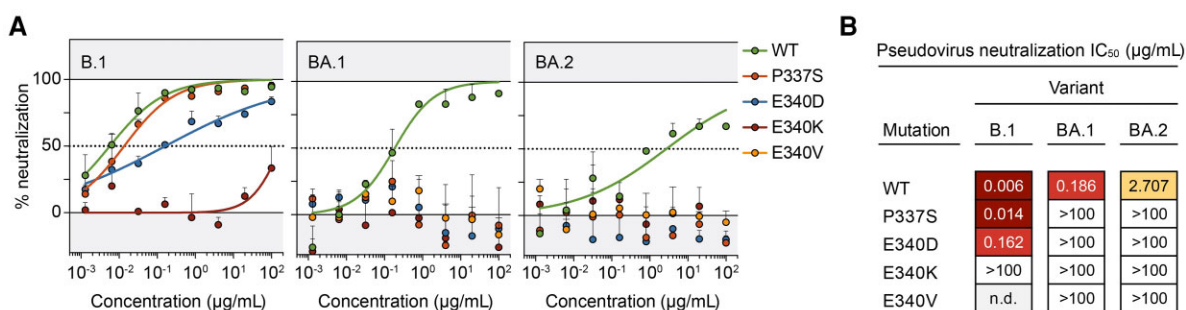


Figure 3. Neutralization of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike mutants by sotrovimab. A, SARS-CoV-2 variant-specific pseudoviruses harboring mutations that emerged after sotrovimab treatment were analyzed in sotrovimab neutralization assays. All samples were tested in duplicate. Symbols and bars indicate mean and standard deviation, respectively. The determined IC_{50} values are shown in (B). Abbreviation: IC_{50} , half maximal inhibitory concentration.

E340K and E340V, which were also selected in Delta, and mutations P337S and E340D, newly described in the Omicron context, completely abrogated the neutralization activity of sotrovimab. In the B.1 background, on the other hand, a strongly reduced neutralization activity could only be observed for E340K, whereas the E340D mutation reduced the neutralization activity of sotrovimab to a much lesser extent. These data clearly show that not only the escape mutation itself but also the broader genetic background of the spike protein influence the impact of a specific escape mutation on mAb efficacy, as has been observed in several efficacy studies for mAbs [17, 26].

In a previous small cohort study conducted before the Omicron era, we found that the E484K mutation occurred with bamlanivimab monotherapy in 83% of patients and in a major portion of the viral population in the respective patients [10]. In contrast, in our study, the frequency of sotrovimab-resistant viral variants was lower in most patients and showed a very heterogeneous mutation spectrum [27, 28].

Our study has limitations that should be considered for future studies. First, the relatively small cohort made subgroup analysis difficult. Second, the quantitative analysis with Illumina sequencing was performed only in patients in whom spike protein mutations were detected in nanopore sequencing. Therefore, the diversity of viral quasiespecies cannot be compared to patients without detection of mutations in nanopore sequencing. However, failure to account for possible viral minorities with spike protein mutations in this group seems unlikely, as these were not detected in the patients with emerging sotrovimab resistance mutations.

There is growing evidence to support the hypothesis that new SARS-CoV-2 variants preferentially occur in immunocompromised patients with persistent SARS-CoV-2 infection. Since some of these variants may be more transmissible or may have better immune escape, this potentially has significant implications for individual medical care and public health. In immunocompromised patients, prolonged viral shedding must therefore be considered with respect to infection control. Given the available data, administration of a single mAb or single antiviral drug should be avoided in immunocompromised patients because of the risk of emergent mutations. In our study, we demonstrated that the presence and length of remdesivir therapy at baseline was associated with a reduced emergence of escape mutations in immunodeficient patients. In addition, a second remdesivir administration over a longer period of 10 days and combination antiviral therapy resulted in a sustained decrease in viral load in the vast majority of patients with persistently high nasopharyngeal VL, and viral shedding was successfully terminated in those patients.

In summary, combination therapies with at least 2 mAbs or other antivirals, such as remdesivir, molnupiravir, and nirmatrelvir/ritonavir, should be considered when treating immunodeficient patients with SARS-CoV-2 infection. These

results also highlight the importance of careful monitoring and the need to conduct dedicated clinical trials to establish the optimal treatment strategy for this patient population. This is especially true at this stage of the pandemic since, with the availability of vaccines that prevent severe disease courses for most patients, immunodeficient patients represent one of the most vulnerable and severely affected patient groups.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Clinical Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

Notes

Author contributions. S. G., N. L., A. K., T. L., and B.-E. O. J. were responsible for conceptualization and supervised the study. S. G., N. L., A. K., H. G., A. W., A. T. D., C. L., C. F., S. K., J. V., T. S., A. Z., T. F., J. B., H.-M. O., F. K., J. T., T. L., and B.-E. O. J. contributed to the investigation and data curation. S. G., N. L., A. K., B.-E. O. J., H. G., and J. T. conducted the formal analysis. S. G., B.-E. O. J., T. L., N. L., A. K., J. T., H. G., and F. K. were responsible for methodology, data validation, and visualization. S. G., N. L., A. K., H. G., J. T., T. L., and B.-E. O. J. contributed to the original draft. All authors critically revised the manuscript and approved the final version. Additionally, S. K., J. V. P., T. P. S., and A. Z. were instrumental in patient management, as well as the coordination of outpatient care for the study participants. A. T. and M. D. coordinated the Illumina sequencing and performed the bioinformatic analysis of the sequencing data.

Acknowledgments. The authors thank the patients and their relatives, the clinical staff involved in patient care, the laboratory staff involved in the virological analyses, and all others who contributed to the study, especially Kanika Vanshylla for support with pseudovirus neutralization assays.

Disclaimer. The funders had no role in study design, data collection, data analysis, interpretation, or writing of the report.

Financial support. This work was supported by COVIM (COVID Immunity) (FKZ, 01KX2021), a joint project funded by the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) reported by B.-E. O. J. and J. G. B.; the EuCARE project “European cohorts of patients and schools to advance response to epidemics,” which is funded by the European Commission as part of the HORIZON HLTH 2021 CORONA 01 (grant 101046016); and the joint project Beyond COVID-19 funded by The Ministry of Culture and Science of North Rhine-Westphalia reported by B.-E. O. J. In addition, this work was supported by the Ministry for Labor, Health and Social Affairs of the State of North Rhine-Westphalia (CPS-1-1A).

Potential conflicts of interest. N. L. received honoraria for presentations from Gilead, MSD, AbbVie, and ViiV (outside the submitted work) and served on advisory boards for ViiV and Theratechnologies (outside the submitted work), including consulting fees from ViiV and Theratechnologies. B.-E. O. J. received honoraria for presentations from Gilead, GSK, Falk, Janssen-Cilag, ViiV, and Fresenius Medical Care (outside the submitted work); received travel support from Gilead; served on advisory boards for ViiV, Gilead, and Theratechnologies (outside the submitted work); received consulting fees from Gilead, ViiV, and Theratechnologies; was involved in the development of the national recommendation on COVID-19 treatment by COVRIIN (COVID-19 Expert Group at the Robert Koch Institute - National Public Health Institute of Germany) (unpaid participation). T. F. was principal investigator (PI) for a Gilead clinical trial and served on Gilead advisory boards (outside the submitted work); was PI for the SIMPLE trials (Study to Evaluate the Safety and Antiviral Activity of Remdesivir in Participants with Moderate Coronavirus Disease (COVID-19) Compared to Standard of

Care Treatment) (no personal fees); authored a publication on remdesivir (Grein J, Ohmagari N, Shin D, et al. Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med* **2020**; 382(24):2327–36. doi:10.1056/NEJMoa2007016; authorships among others including Gilead team members; no personal fees) was involved in the development of the national recommendation on COVID-19 treatment by COVRIIN (COVID-19 Expert Group at the Robert Koch Institute – National Public Health Institute of Germany. T. L. received honoraria for lectures from AbbVie, BMS, and Gilead; received travel support from Gilead and AbbVie; served on advisory boards for Gilead; received honoraria for presentations from AbbVie, BMS, and Gilead; and received travel support from Gilead and AbbVie. H. G. and F. K. are listed as inventors on patent applications for SARS-CoV-2 neutralizing antibodies filed by the University of Cologne. A. K. received lecture fees from Gilead, participated on advisory boards for Gilead, and was supported by AbbVie for attending meetings. All remaining authors: No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

Data availability. Raw data are generated at the University Hospital Düsseldorf and in cooperation with the University Hospital Cologne. Derived or additional data that support the findings of this study can be provided by the corresponding author upon reasonable request. All Nanopore and Illumina sequence data can be found on the Open Science Framework server https://osf.io/q7js6/?view_only=59884b79343e449ea9f7103f99c118a9.

References

- Kreuzberger N, Hirsch C, Chai KL, et al. SARS-CoV-2-neutralising monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Cochrane Database Syst Rev* **2021**; 9: CD013825. doi:10.1002/14651858.CD013825.pub2.
- Hoffmann M, Kruger N, Schulz S, et al. The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: implications for control of the COVID-19 pandemic. *Cell* **2022**; 185:447–56.e11. doi:10.1016/j.cell.2021.12.032.
- Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, et al. Early treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 neutralizing antibody sotrovimab. *N Engl J Med* **2021**; 385: 1941–50. doi:10.1056/NEJMoa2107934.
- Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, et al. Effect of sotrovimab on hospitalization or death among high-risk patients with mild to moderate COVID-19: a randomized clinical trial. *JAMA* **2022**; 327:1236–46. doi:10.1001/jama.2022.2832.
- Yamasoba D, Kosugi Y, Kimura I, et al. Neutralisation sensitivity of SARS-CoV-2 Omicron subvariants to therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet Infect Dis* **2022**; 22:942–3. doi:10.1016/S1473-3099(22)00365-6.
- COVID-19: EMA recommends authorisation of antibody medicine Xevudy. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/news/covid-19-ema-recommends-authorisation-antibody-medicine-xevudy>. Accessed 14 May.
- Group AC-TflwC-S. Efficacy and safety of two neutralising monoclonal antibody therapies, sotrovimab and BRII-196 plus BRII-198, for adults hospitalised with COVID-19 (TICO): a randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* **2022**; 22:622–35. doi:10.1016/S1473-3099(21)00751-9.
- Martin-Blondel G, Marcelin AG, Soulie C, et al. Outcome of very high-risk patients treated by sotrovimab for mild-to-moderate COVID-19 Omicron, a prospective cohort study (the ANRS 0003S COCOPREV study). *J Infect* **2022**; 84: e101–4. doi:10.1016/j.jinf.2022.04.010.
- Solera JT, Arbol BG, Alshahrani A, et al. Impact of vaccination and early monoclonal antibody therapy on COVID-19 outcomes in organ transplant recipients during the Omicron wave. *Clin Infect Dis* **2022**; ciac324. doi:10.1093/cid/ciac324.
- Jensen B, Luebke N, Feldt T, et al. Emergence of the E484K mutation in SARS-CoV-2-infected immunocompromised patients treated with bamlanivimab in Germany. *Lancet Reg Health Eur* **2021**; 8:100164. doi:10.1016/j.lanepe.2021.100164.
- Destras G, Bal A, Simon B, Lina B, Josset L. Sotrovimab drives SARS-CoV-2 Omicron variant evolution in immunocompromised patients. *Lancet Microbe* **2022**; 3:e559. doi:10.1016/s2666-5247(22)00120-3.
- Vellas C, Tremieux P, Del Bello A, et al. Resistance mutations in SARS-CoV-2 Omicron variant in patients treated with sotrovimab. *Clin Microbiol Infect* **2022**; 28:1297–9. doi:10.1016/j.cmi.2022.05.002.
- Jefferson T, Spencer EA, Brassey J, Heneghan C. Viral cultures for coronavirus disease 2019 infectivity assessment: a systematic review. *Clin Infect Dis* **2021**; 73:e3884–e99. doi:10.1093/cid/ciaa1764.
- Tallarita M, Giardina F, Novazzi F, et al. Spread of multiple SARS-CoV-2 lineages April–August 2020 anticipated the second pandemic wave in Lombardy (Italy). *Pediatr Allergy Immunol* **2022**; 33(Suppl 27):89–92. doi:10.1111/pai.13641.
- Abdullah F, Myers J, Basu D, et al. Decreased severity of disease during the first global Omicron variant covid-19 outbreak in a large hospital in Tshwane, South Africa. *Int J Infect Dis* **2022**; 116:38–42. doi:10.1016/j.ijid.2021.12.357.
- Bruel T, Hadjadj J, Maes P, et al. Serum neutralization of SARS-CoV-2 Omicron sublineages BA.1 and BA.2 in patients receiving monoclonal antibodies. *Nat Med* **2022**; 28:1297–302. doi:10.1038/s41591-022-01792-5.
- Takashita E, Kinoshita N, Yamayoshi S, et al. Efficacy of antiviral agents against the SARS-CoV-2 Omicron subvariant BA.2. *N Engl J Med* **2022**; 386:1475–7. doi:10.1056/NEJMc2201933.
- FDA updates Sotrovimab emergency use authorization. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-sotrovimab-emergency-use-authorization>. Accessed 14 May.
- Choi B, Choudhary MC, Regan J, et al. Persistence and evolution of SARS-CoV-2 in an immunocompromised host. *N Engl J Med* **2020**; 383:2291–3. doi:10.1056/NEJMc2031364.
- Corey L, Beyrer C, Cohen MS, Michael NL, Bedford T, Rolland M. SARS-CoV-2 variants in patients with immunosuppression. *N Engl J Med* **2021**; 385:562–6. doi:10.1056/NEJMs2104756.
- Truong TT, Ryutov A, Pandey U, et al. Increased viral variants in children and young adults with impaired humoral immunity and persistent SARS-CoV-2 infection: a consecutive case series. *EBioMedicine* **2021**; 67:103355. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103355.
- Gandhi S, Klein J, Robertson AJ, et al. De novo emergence of a remdesivir resistance mutation during treatment of persistent SARS-CoV-2 infection in an immunocompromised patient: a case report. *Nat Commun* **2022**; 13:1547. doi:10.1038/s41467-022-29104-y.
- Leung WF, Chorlton S, Tyson J, et al. COVID-19 in an immunocompromised host: persistent shedding of viable SARS-CoV-2 and emergence of multiple mutations: a case report. *Int J Infect Dis* **2022**; 114:178–82. doi:10.1016/j.ijid.2021.10.045.
- Vellas C, Del Bello A, Debarb A, et al. Influence of treatment with neutralizing monoclonal antibodies on the SARS-CoV-2 nasopharyngeal load and quasispecies. *Clin Microbiol Infect* **2022**; 28:139.e5–e8. doi:10.1016/j.cmi.2021.09.008.
- Rockett R, Basile K, Maddocks S, et al. Resistance mutations in SARS-CoV-2 Delta variant after sotrovimab use. *N Engl J Med* **2022**; 386:1477–9. doi:10.1056/NEJMc2102019.
- Singh DD, Sharma A, Lee HJ, Yadav DK. SARS-CoV-2: recent variants and clinical efficacy of antibody-based therapy. *Front Cell Infect Microbiol* **2022**; 12: 839170. doi:10.3389/fcimb.2022.839170.
- Peiffer-Smadja N, Bridier-Nahmias A, Ferre VM, et al. Emergence of E484K mutation following bamlanivimab monotherapy among high-risk patients infected with the Alpha variant of SARS-CoV-2. *Viruses* **2021**; 13:1642. doi:10.3390/v13081642.
- Sanjuán R, Domingo-Calap P. Genetic diversity and evolution of viral populations. *Encyclopedia Virol* **2021**; 53–61. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20958-8.