

UiT

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

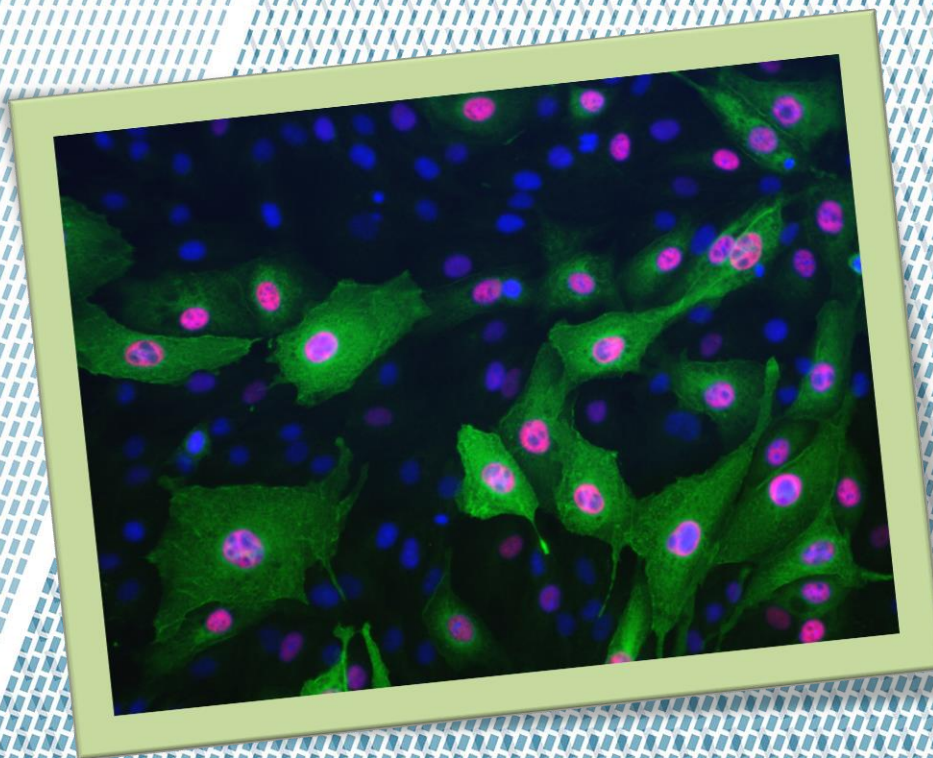
Helsevitenskapelige fakultet

Den nye helikase- og primasehemmeren amenamevir: Antiviral effekt mot BK polyomavirus (BKPyV)?

En in vitro-studie med humane primære nyreepitelceller

Elisabeth Vedahl

Masteroppgave (MED3950), profesjonsstudiet i medisin, mai 2019



Forsidebilde: BK polyomavirus-infiserte primære humane nyreepitelceller tre dager etter infeksjon og behandling med 10 µM amenamevir. Cellene er farget for de virale proteinene stort T antigen (rødt) og agnoprotein (grønt), og DNA er farget blått med DAPI.

Forord

På andre år av medisinstudiet i 2016 hadde jeg BK polyomavirus som tema for valgfri fordypning 1, der jeg undersøkte den antivirale effekten av en ny nukleotidanalogue. Fordi jeg syntes temaet var interessant, likte arbeidsformen og ikke minst grunnet dyktige veiledere var det naturlig å bygge videre på dette prosjektet i masteroppgaven. Jeg hadde da mye kunnskap om BK polyomavirus, og praktiske ferdigheter som kom til nytte i arbeidet.

Nukleotidanalogen fra valgfri fordypning 1 hadde effekt på viruset, men dessverre også uttalt effekt på cellene, noe som indikerer alvorlige bivirkninger. Siden 2016 er det fremdeles ikke funnet noen god behandling mot BK polyomavirus, og problemstillingen blir bare mer og mer aktuell. Etter en del leting kom min hovedveileder over det nye anti-herpesmiddelet amenamevir, som jeg i denne oppgaven har prøvd ut i cellekultur.

Jeg vil rette en stor takk til Christine Hanssen Rinaldo, professor ved Institutt for klinisk medisin, og Stian Henriksen, spesialbioingeniør og PhD-student ved Avdeling for mikrobiologi og smittevern, som har gjort dette prosjektet mulig og brukt mye av sin tid til grundig oppfølging underveis. Christine Hanssen Rinaldo var hovedveileder og har bistått ved planlegging av forsøkene, nyttig litteratur og oppgaveskriving. Stian Henriksen var biveileder og har stått for god opplæring på laben og alltid vært tilgjengelig ved spørsmål om utførelsen av forsøkene. Takk også til PhD Gosert Rainer ved Universitetet i Basel for tilsending av herpes simplexvirus 1 som ble brukt til kontroll av kvaliteten på medikamentet vi brukte, og for at vi fikk lese deres upubliserte studier på herpesvirus, som var nyttig inspirasjon til oppgaven.

Tromsø, 22.05.2019

Elisabeth Vedahl

Elisabeth Vedahl

Innholdsfortegnelse

Forord.....	II
Forkortelser.....	V
Sammendrag.....	VI
1 Innledning.....	1
1.1 BK polyomavirus.....	1
1.1.1 Basal virologi.....	2
1.1.2 Epidemiologi.....	4
1.1.3 Sykdommer.....	5
1.2 Amenamevir.....	7
1.2.1 Effekt og bruk.....	7
1.2.2 Virkningsmekanisme.....	8
1.2.3 Farmakokinetikk.....	9
1.2.4 Bivirkninger.....	10
1.3 Herpesvirus.....	10
1.3.1 Basal virologi.....	10
1.3.2 Epidemiologi.....	12
1.3.3 Sykdommer.....	12
1.4 Formål med oppgaven.....	15
2 Materiale og metode.....	16
2.1 Celler og utsåing.....	16
2.2 Virus.....	17
2.3 Amenamevir.....	17
2.4 Antiviral effekt av amenamevir mot HSV-1.....	18
2.5 Effekt av amenamevir på celleviabilitet av RPTECs.....	20
2.6 Antiviral effekt av amenamevir mot BKPyV.....	22
2.7 Statistiske metoder.....	23
3 Resultater.....	24

3.1	Antiviral effekt av amenamevir mot HSV-1	24
3.2	Effekt av amenamevir på celleviabilitet av RPTECs	32
3.3	Antiviral effekt av amenamevir mot BKPyV	36
4	Diskusjon	40
4.1	Tolkning av funn	40
4.2	Sterke og svake sider	43
4.3	Implikasjoner	44
5	Konklusjon	46
6	Referanser	47
7	Figurliste	57
	Vedlegg 1: Pilotforsøk	i
	Vedlegg 2: Sammendrag av kunnskapsevalueringer av nøkkel-/hovedartikler på referanselisten.....	i

Forkortelser

ACV	aciklovir
ACV-TP	aciklovir-trifosfat
ATP	adenosin trifosfat
BKPyV	BK polyomavirus
CPE	cytopatogen effekt
CC ₅₀	50 % cytotoxisk konsentrasjon
CIT ₅₀	tid for 50 % reduksjon av cell index
dGTP	deoksyguanosintrifosfat
DMSO	dimetylsulfoksid
DNA	deoksyribonukleinsyre
dTTP	deoksytymidintrifosfat
EC ₅₀	50 % effektiv konsentrasjon
HSV	herpes simplexvirus
IC ₅₀	50 % inhibitorisk konsentrasjon
PFA	paraformaldehyd
LTag	stort tumor-antigen
MOI	multiplicity of infection
PBS	fosfatbufret saltvann
PCR	polymerasekjedereaksjon (polymerase chain reaction)
PyVAN	polyomavirus-assosiert nefropati
PyVHC	polyomavirus-assosiert hemorragisk cystitt
RNA	ribonukleinsyre
RPTECs	renale epitelceller fra proksimale tubuli
sTag	lite tumor-antigen
SV40	simian virus 40
TruncTag	trunkert tumor-antigen
VP	viralt protein
VZV	varicella zoster-virus

Sammendrag

Bakgrunn. BK polyomavirus (BKPyV) finnes asymptomatisk i nyreepitelet hos de fleste voksne, men kan gi polyomavirus-assosiert nefropati og hemorragisk cystitt ved henholdsvis nyretransplantasjon og beinmargs-/stamcelletransplantasjon. Det er ikke funnet noen effektiv antiviral behandling mot viruset. Amenamevir er en ny hemmer av helikase-primasekomplekset hos alfaherpesvirus, som i denne oppgaven undersøkes for *in vitro* antiviral effekt mot BKPyV og effekt på viabilitet av nyreepitelceller.

Materiale og metode. Før forsøk med BKPyV, ble aktivitet av amenamevir testet ved behandling av A549-celler infisert med herpes simplexvirus 1 (HSV-1). Humane primære nyreepitelceller fra proksimale tubuli (RPTECs) ble sådd ut og etter 24 timer infisert med BKPyV og/eller behandlet med amenamevir. Metodene som ble brukt for å evaluere effekten på cellene var xCELLigence, ATP-måling og fasekontrastmikroskopi, mens kvantitativ real-time PCR og immunfluorescensmikroskopi ble brukt for å finne virkningen på henholdsvis mengden virus-DNA ekstracellulært og uttrykket av virusproteiner i vertscellene tre dager etter infeksjon.

Resultater. Medikamentet viste seg å gi antiviral effekt på HSV-1-replikasjon. Hos RPTECs behandlet med opptil 40 μM amenamevir fant vi ingen effekt på viabilitet. Mengden ekstracellulært virus-DNA og uttrykk av virale proteiner tre dager etter infeksjon var heller ikke påvirket ved konsentrasjoner opptil 10 μM , som er over 100 ganger høyere enn 50 % effektiv konsentrasjon rapportert for HSV-1. I de siste forsøkene så vi at amenamevir felte ut krystaller i medium, slik at konsentrasjonen nok var noe lavere enn tilsiktet.

Konklusjon. Amenamevir påvirker sannsynligvis hverken celleviabilitet av RPTECs eller replikasjon av BKPyV i de samme cellene. Videre studier er nødvendig for å finne en effektiv og selektiv antiviral behandling mot BKPyV.

1 Innledning

BK polyomavirus (BKPyV) kan gi alvorlig sykdom i nyre eller urinveier etter nyre- eller beinmargs-/stamcelletransplantasjon (1). Med økende antall transplantasjoner er dette en problemstilling som blir mer og mer aktuell. I 2018 ble 240 nyre transplantert i Norge (2), mens antall allogene stamcelletransplantasjoner per år var opptil 55 fra 2008-2012, hovedsakelig som behandling mot leukemi (3). Det finnes i dag ingen effektiv antiviral behandling mot BKPyV-assosierte sykdommer. Flere antivirale midler som virker på vertens DNA-syntese har vært prøvd både *in vitro* og *in vivo*, men de har alle påvirket friske celler, noe som har gitt betydelige bivirkninger uten å effektivt hemme virusreplikasjon (4, 5).

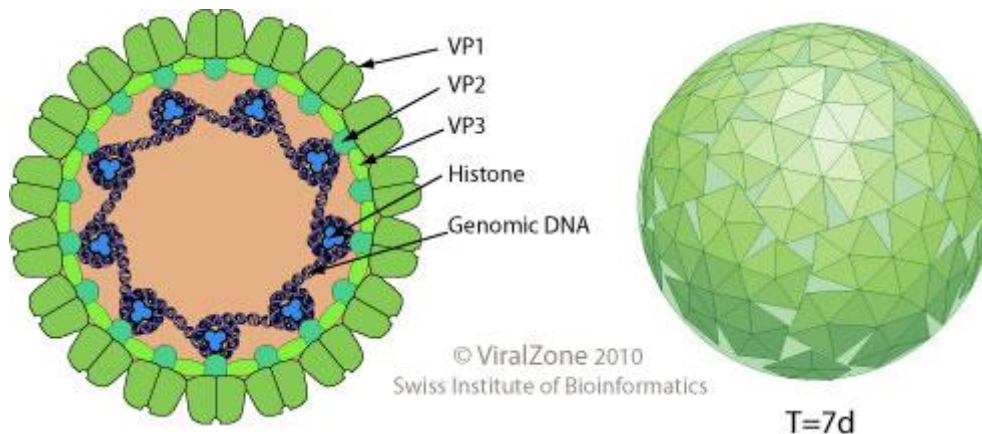
Opprinnelig var planen å for første gang teste ut nye nukleotidlignende stoffer som var utviklet i Tromsø. Et pilotforsøk viste at stoffene felte ut og hadde lite effekt (Vedlegg 1). Da den beste strategien for effektiv og trygg behandling trolig ville være behandling som virker spesifikt på viruset, uten å påvirke kroppens celler, bestemte vi oss for å lete etter eksisterende medikamenter som eventuelt kunne ha effekt. Dette var ikke enkelt da BKPyV har få egne proteiner og dermed få angrepspunkt. Det beste ville sannsynligvis være om vi kunne finne en helikasehemmer som påvirker stort T antigen (LTag), et nøkkelprotein for replikasjon av viruset (6). Vi bestemte oss dermed for å teste ut amenamevir eller ASP2151, et oksadiazolfenylderivat som hemmer helikase-primasekomplekset hos herpesvirus (7), og endret dermed litt på det opprinnelige formålet for studien. Fordeler med dette medikamentet er at det har lite bivirkninger og allerede er tatt i bruk i pasientbehandling, slik at det ved eventuell effekt mot BKPyV *in vitro* ikke ville være nødvendig med omfattende kliniske studier før man kunne behandle pasienter med sykdom forårsaket av BKPyV.

1.1 BK polyomavirus

BK polyomavirus (BKPyV) er et svært vanlig virus som sannsynligvis smitter de fleste mennesker allerede i barndommen (8). Selv om infeksjonen som regel er asymptomatisk og ufarlig, gir BKPyV alvorlig sykdom i nyre eller urinveier hos en del immunsupprimerte pasienter, først og fremst etter nyre- eller beinmargs-/stamcelletransplantasjon (1). Det finnes foreløpig ingen effektiv behandling mot viruset (9). Viruset ble for første gang isolert i 1970, fra urinen til en pasient som hadde gjennomgått nyretransplantasjon. Navnet BK stammer fra initialene til denne pasienten (10).

1.1.1 Basal virologi

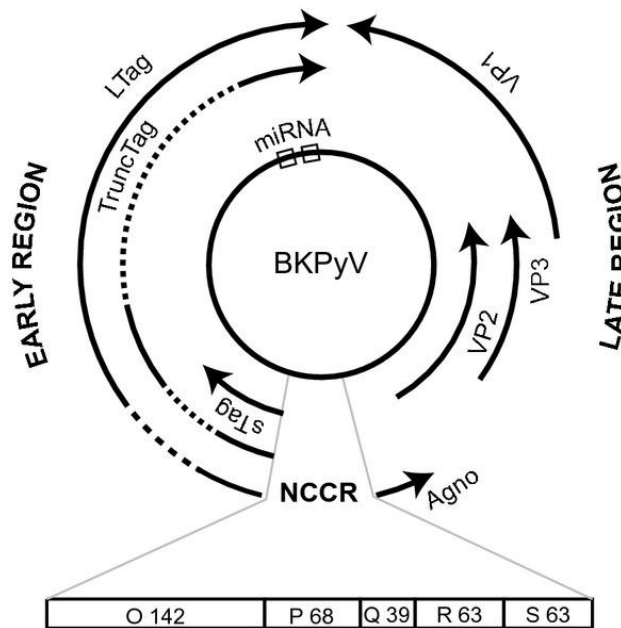
BKPyV tilhører familien *Polyomaviridae* og er ett av 13 kjente humane polyomavirus (11). JC polyomavirus, som ble oppdaget omtrent samtidig som BKPyV (12), og apeviruset simian virus 40 (SV40), ligner mye på BKPyV. Genomlikheten mellom BKPyV og disse to polyomavirusene er på henholdsvis ca. 72 og 69 % (13), og mye av kunnskapen om BKPyV stammer fra forskning på SV40. BKPyV er et lite, nakent virus med en diameter på ca. 45 nm (14). Det har et rundt kapsid med icosahedral symmetri som består av 72 kapsomerer. Hovedbestanddelen i kapsomerene er en pentamer av proteinet VP1, men på innsiden av kapsidet er et av de mindre proteinene VP2 og VP3 festet til hver pentamer (15). Sannsynligvis fester VP2 og VP3 genomet til kapsidet (16), og har også en rolle i transport av virusgenom til kjernen (17). Både SV40 og BKPyV har en leseramme for en kort versjon av VP2/VP3 som er blitt kalt VP4. Man trodde tidligere at VP4 var involvert i transport av nye virus ut av vertscellen, men det ble nylig vist at VP4 ikke har denne funksjonen hverken hos BKPyV eller SV40 (18).



Figur 1: Illustrasjon av en polyomaviruspartikkel. Figuren viser organisering av kapsidproteinene VP1, VP2 og VP3, som omslutter virusets DNA. Figur gjengitt med tillatelse fra (19).

Genomet er et sirkulært, dobbeltrådet DNA på ca. 5000 basepar (20), noe som er 500 ganger mindre enn DNA-et til de største kjente virusene (21). Selv om genomet er lite, er det organisert på en slik måte at det likevel inneholder mye informasjon. Det består av en ikke-kodende kontrollregion som regulerer genuttrykk og er startpunkt for replikasjonen, og to kodende regioner, én på hver tråd. Den ikke-kodende kontrollregionen kan i motsetning til

de kodende regionene variere mellom isolater grunnet duplikasjoner, deleasjoner og rearrangeringer, som blant annet kan påvirke virusets replikasjonshastighet (22).



Figur 2: Illustrasjon av BKPvVs sirkulære DNA. Til venstre ses den tidlige regionen som koder for proteinene LTag, sTag og TruncTag, hvor stiplede linjer markerer intron som ikke oversettes til proteiner. Til høyre ses den sene regionen som koder for agnoprotein og VP1-3. Nederst vises den ikke-kodende kontrollregionen. Figur gjengitt med tillatelse fra (23).

Den kodende regionen som først transkriberes koder for proteinene lite (sTag), trunkert (TruncTag) og stort (LTag) tumor-antigen (24). Stort T antigen, som er best forstått av disse tre, fungerer som et viktig regulatorisk protein som blant annet initierer viral DNA-replikasjon og transkripsjon av den sene genomregionen (6). Proteinene har fått navnet sitt fordi det er vist å kunne gi kreft hos dyr, blant annet ved å påvirke tumor suppressorene pRB og p53. Denne påvirkningen er nyttig for virusreplikasjon gjennom å stimulere til progresjon av cellyklus og hindre apoptose (25). En annen viktig funksjon av LTag er å tvinne ut virusets dobbeltrådede DNA for å muliggjøre replikasjon og transkripsjon. Dette er det C-terminalt helikasedomenene som står for. Helikasedomenene fra tolv LTag-monomerer danner sammen en dobbel heksamer rundt DNA-et, og tvinner ut trådene drevet av LTags ATPase (26). LTags helikase tilhører helikasesuperfamilie 3A, og beveger seg i 3'-5' retning (27).

Den sene regionen koder for agnoprotein, som hovedsakelig lokaliseres til cytoplasma (28), samt kapsidproteinene VP1, VP2 og VP3 (29). Det er foreløpig lite kunnskap om agnoprotein, men det kan ha en viktig rolle under replikasjonen (30) og frigjøring av virus (31). VP3 kommer fra samme sekvens som VP2, men med senere startkodon, slik at proteinet er

kortere (29). Også alternativ spleising og skiftende leserammer bidrar til at lite DNA kan kode for mange ulike proteiner (24, 29).

En replikasjonssyklus av BKPyV i nyreepitelceller fra proksimale tubuli (RPTECs) tar ca. 48-72 timer (32). BKPyV kommer seg inn i en vertscelle ved først å binde med VP1 til en reseptor på celleoverflaten. Gangliosider og glykoproteinbundet sialinsyre er molekyler som er vist å fungere som slike reseptorer for BKPyV (33, 34). Etter binding fraktes viruset inn i cellen med endocytose (35), for så å fraktes via mikrotubuli videre til ER, hvor frigjøringen av DNA (uncoatingen) starter (36, 37). Opptaket av virus i cellekjernen foregår trolig ved hjelp av kjerne-lokaliseringssignaler på VP2/3 (38, 39). Når virus-DNAet er frigjort inne i kjernen, transkriberes først den tidlige regionen slik at de ulike T-antigenene uttrykkes. Deretter bidrar LTag til replikasjon av virusets genom via vertscellens enzymer.

Samtidig med og etter replikasjonen transkriberes den sene regionen, slik at agnoprotein og VP1-3 uttrykkes (40). Nyprodusert VP1-3 transporteres ved hjelp av kjerne-lokaliseringssignaler fra cytoplasma inn i kjernen (41, 42). Der danner de, sammen med replikert virus-DNA, nye viruspartikler (43). Det er mye usikkerhet rundt hvordan de nye virusene frigjøres. Man har lenge trodd at nakne virus utelukkende kan frigjøres lytisk, men en nyere studie indikerer imidlertid at BKPyV kan frigjøres uten å drepe vertscellen (44).

1.1.2 Epidemiologi

Smitte med BKPyV skjer vanligvis tidlig i barndommen, og seroprevalensen er på sitt høyeste i sen barndom eller ung voksen alder. Deretter synker den sakte med økende alder (8, 45-47). To studier på voksne blodgivere i henholdsvis USA og Sveits viste begge en seroprevalens på 82 % (8, 47). Etter den primære infeksjonen etablerer viruset en sannsynligvis livslang persisterende infeksjon, tilsynelatende først og fremst i nyrer og urinveier (48). Selv om infeksjonen er uten symptomer, vil viruspartikler iblant skilles ut i urinen. Slik utskillelse har blitt påvist hos 28 av 400 blodgivere (7 %) (47). Dette sannsynliggjør oral smitte, for eksempel gjennom mat eller drikke forurenset med urin, men smittemåten er imidlertid ikke endelig kjent. Viruset har vist langvarig stabilitet i kloakk og tåler lav pH, som muliggjør oral smitte (49). I dyreforsøk med musepolyomavirus er både oral og respiratorisk smitte påvist, og viruset sprer seg deretter til ulike organer via

blodbanen (50). En respiratorisk smittevei underbygges av at enkelte tilfeller av øvre luftveissymptomer ser ut til å kunne skyldes primærinfeksjon med BKPyV (51).

1.1.3 Sykdommer

Det er særlig to situasjoner der infeksjon med BKPyV kan gi alvorlig sykdom. Polyomavirus-assosiert nefropati (PyVAN) oppstår hos 1-10 % av mottakere av transplantert nyre, mens 5-15 % av pasienter som får allogen stamcelletransplantasjon utvikler polyomavirus-assosiert hemorragisk cystitt (PyVHC) (1). Disse to sykdommene kan også oppstå hos pasienter som har fått transplantert andre organer (52, 53), eller av andre grunner har nedsatt immunforsvar (54, 55). Selv om immunsuppresjonen gir viruset mulighet til å replikere mer ukontrollert, er det langt mer vanlig at sykdom oppstår ved nyre- og stamcelletransplantasjon enn andre transplantasjoner. Dette indikerer at sykdommene også henger nært sammen med påvirkning på nyrene og urinveiene der viruset holder til, og/eller møtet mellom immunceller og virusinfiserte celler fra to forskjellige personer.

Ved PyVAN er replikasjon av viruset i epitelceller i nyretubuli i den transplanterte nyren betydelig økt, med frigjøring til urin, blod og nærliggende vev. Hvis den ukontrollerte replikasjonen får fortsette, kan den gi store skader på den transplanterte nyren slik at funksjonen blir dårligere. I tillegg blir sannsynligheten for at nyren avstøtes mye større (1). Det er vist at viruset som gir PyVAN kommer fra donor, og det spekuleres i at mange av tilfellene oppstår når donor har virus av en genotype som pasienten ikke har antistoffer mot fra før. Under immunsuppresjon hemmes evnen til å danne nye antistoffer, og det humorale immunforsvaret får dermed større betydning (56). Også CD8-T-celler er svært viktige i kroppens forsvar mot BKPyV ved PyVAN (57).

For å stoppe utviklingen av PyVAN er det ikke etablert noen god antiviral behandling (9), men i stedet er det vanlig å redusere den immunsuppressive behandlingen. Dette gir som regel god effekt og stopper progresjon av sykdommen (58). For å beholde mest mulig av nyrefunksjonen og unngå avstøtning er det viktig å gjøre dette på et tidlig tidspunkt (59). En sikker PyVAN-diagnose krever nyrebiopsi som viser cytopatiske forandringer, inflammasjon, tubulær atrofi og fibrose. Avhengig av hvor uttalte forandringene er, varierer risikoen for transplantatsvikt fra under 10 til over 80 %. En enklere og mer sensitiv metode for å identifisere pasienter med høy risiko for PyVAN er påvisning av BKPyV-DNA i pasientens

plasma eller eventuelt urin. Det er anbefalt med slik screening hver måned i ni måneder etter transplantasjon, og deretter hver tredje måned til det har gått to år. På denne måten kan minst 90 % av pasienter med risiko for PyVAN oppdages før signifikant nyreskade har oppstått, og tidlig behandling kan igangsettes (5). Det er imidlertid viktig at den immunsuppressive behandlingen ikke reduseres for mye, ettersom det kan føre til avstøtning. For noen pasienter har ikke reduksjon av immunsuppresjon god nok effekt, og den nye nyren blir gradvis mer skadet. I slike tilfeller brukes sporadisk fluorokinoloner eller cytostatiske antivirale midler som cidofovir og leflunomid, men disse har dessverre ikke vist god effekt (5, 60).

Hvordan PyVHC oppstår er ikke sikkert kjent, men behandlingen med stråling/cellegift som gis før stamcelletransplantasjon for å ødelegge pasientens eget immunforsvar gir skader i urotelet i urinblæren. Det er foreslått at disse skadene og den påfølgende regenereringen reaktiverer BKPyV. Mangelen på et fungerende immunsystem bidrar til at viruset får replikere fritt og gi ytterligere ødeleggelse. Etter transplantasjonen vil så de transplanterte lymfocytene gi inflammasjon i vevet, noe som gir mer skade på blæren og etter hvert PyVHC (61), som vanligvis oppstår i tidsrommet fra to uker til seks måneder etter transplantasjon (4). Hemorragisk cystitt kjennetegnes av smerter, makrohaturi (synlig blod i urinen) og i alvorlige tilfeller postrenal nyresvikt (62). Pasienter med PyVHC har også økt forekomst av transplantat-mot-vert-sykdom (graft versus host disease), altså at det nye immunsystemet angriper vev i kroppen (63).

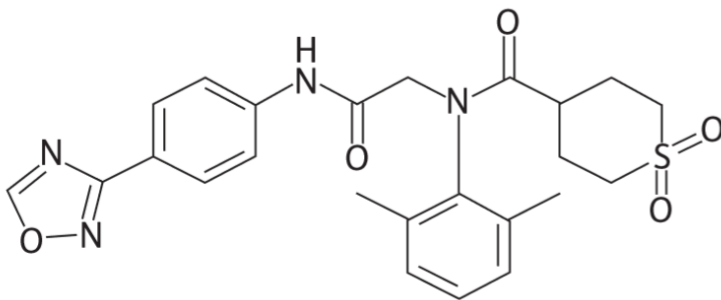
Fordi transplanterte lymfocytter trolig bidrar til sykdommen (61), er det lite hensiktsmessig å redusere en eventuell immunsuppressiv behandling, noe som også ville øke risikoen for transplantat-mot-vert-sykdom. Diagnosen baseres på triaden cystitt, makrohaturi og store mengder BKPyV i urinen, samt utelukkelse av andre tilstander. Til tross for nefrotoksisitet og usikker effekt forsøkes i enkelte tilfeller behandling med nukleotidanalogen cidofovir (4). I mangel på effektiv antiviral behandling står symptomlindring sentralt, som kan inkludere smertelindring, økt væskeinntak, blærekateter som fjerner blodklumper, blæreskylling og opprettholdelse av mengden røde blodceller, blodplater og koagulasjonsfaktorer (64).

I tillegg til disse sykdommene har BKPyV nylig også blitt assosiert med utvikling av kreft. I 2012 rapporterte Den internasjonale organisasjonen for forskning på kreft (International

Agency for Research on Cancer (IARC)) at BKPyV muligens er karsinogent for mennesker. *In vitro* og i dyremodeller har BKPyV evne til å indukere kreft, blant annet gjennom LTags og sTAGs hemming av tumorsuppressorer, og man vet dessuten at Merkelcelle-polyomavirus kan indukere hudkreft hos mennesker. BKPyV DNA har blitt påvist i mange tumorer hos menneske, men da de fleste mennesker infiseres med BKPyV er rollen i kreft hos mennesker likevel usikker (65). En litteraturstudie fra 2016 trekker frem kreft i urinveier som mulig assosiert med BKPyV. Det er rapportert flere tilfeller av kreft i urinveier som har oppstått i årene etter nyretransplantasjon hos pasienter som hadde PyVAN etter transplantasjonen, og felles for disse tumorene er at de oftest er høygradige, samt at de uttrykker BKPyV LTag. Pasientene var også relativt unge, flesteparten under 60 år (66).

1.2 Amenamevir

Amenamevir eller ASP2151 er et oksadiazolfenylderivat som hemmer helikase-primasekomplekset hos herpesvirus.



Figur 3: Strukturformel for amenamevir. Gjengitt med tillatelse fra (7).

1.2.1 Effekt og bruk

Amenamevir i tablettform ble i 2017 tatt i bruk i Japan under merkenavnet Amenalief® for behandling av helvetesild (herpes zoster) forårsaket av varicella zoster-virus (VZV), med anbefalt dose 400 mg en gang daglig (67). Medikamentet var først beskrevet i 2010 av Chono et al., som undersøkte antiviral effekt i humane øsofagusfibroblaster (HEF-celler) (7). Mot ulike isolater VZV fant de en 50 % effektiv konsentrasjon (EC_{50}) på 0,038-0,10 μ M, sammenlignet med 1,3-5,9 μ M for aciklovir, som, eventuelt i form av prodrug valaciklovir, er standardbehandlingen mot VZV og HSV. Amenamevir hadde også god effekt mot aciklovirresistent VZV. Effekten mot herpes simplexvirus 1 (HSV-1) og herpes simplexvirus 2 (HSV-2) var tilsvarende god, med EC_{50} på henholdsvis 0,036 og 0,028 μ M. Amenamevir ble

dessuten testet ut mot cytomegalovirus, respiratorisk syncytialvirus, influensavirus og humant immunsviktvirus-1 (HIV-1), men uten effekt. En annen helikase-primasehemmer, pritelivir eller BAY 57-1293, hemmer HSV-1 og HSV-2, men er mye mindre effektiv mot VZV (7). Det er oss kjent ikke gjort studier av disse helikase-primasehemmernes effekt mot BKPyV eller andre polyomavirus.

I senere kliniske studier har amenamevir vist effekt mot både herpes zoster og genital herpes (kjønns herpes) hos mennesker. I en fase 3 randomisert, kontrollert studie på 750 japanske pasienter med herpes zoster var effekten av 400 mg amenamevir en gang daglig i 7 dager minst like god som 1000 mg valaciklovir tre ganger daglig (68). Det var ingen placebogruppe i denne studien, men en tidligere studie på behandling av herpes zoster viste reduksjon i median smertevarighet fra 58-62 dager med placebo til 28 dager med aciklovir (800 mg fem ganger daglig i 7 dager). Valaciklovir (1000 mg tre ganger daglig) var enda noe mer effektivt (69). Effekten av amenamevir på genital herpes ble undersøkt i en randomisert kontrollert studie på 695 pasienter. 100, 200 eller 400 mg amenamevir en gang daglig i tre dager eller én enkeltdose på 1200 mg reduserte median tid før tilheling av lesjoner like raskt som valaciklovir 500 mg to ganger daglig i tre dager. Tiden ble redusert fra 5,8 døgn for placebo til 4,3-5,0 døgn for henholdsvis 1200 og 100 mg amenamevir (70). Foreløpig brukes amenamevir kun off-label på denne indikasjonen. En mer effektiv strategi mot residiverende genital herpes er muligens forebyggende behandling. En randomisert kontrollert studie viste at 100 mg daglig av en annen helikase-primasehemmer, pritelivir, signifikant halverte antall dager med genitale lesjoner i forhold til valaciklovir 500 mg (71). Forsøk på mus har også vist effekt av amenamevir mot hornhinnebetennelse (keratitt) forårsaket av HSV (72). Kombinert med aciklovir/valaciklovir og penciklovir har amenamevir synergistisk effekt *in vitro* mot HSV-2 og VZV (73).

1.2.2 Virkningsmekanisme

Amenamevir virker ved å hemme herpesvirusenes helikase-primasekompleks. Helikaser er enzymer som tvinner ut og separerer trådene i den dobbeltrådede DNA-spiralen for å gjøre DNA-et tilgjengelig for replikasjon og transkripsjon. Enzymet er altså helt nødvendig for celledeling og proteinsyntese, og finnes i alle levende organismer og mange virus (74). Virale helikaser klassifiseres i seks superfamilier, der herpesvirusenes helikaser tilhører

superfamilie 1B (75). Primaser er enzymer som syntetiserer korte RNA-fragmenter, primere, hvor DNA-syntesen initieres (74).

Amenamevir hemmer både enzymkompleksets helikase- ATPase- og primaseaktivitet. Chono et al. viste at helikaseaktiviteten hemmes ved konsentrasjoner $> 0,1 \mu\text{M}$ og primaseaktiviteten ved konsentrasjoner $> 0,03 \mu\text{M}$. For kompleksets ATPase var 50 % inhibitorisk konsentrasjon (IC_{50}) $0,078 \mu\text{M}$. Ved å behandle med høye konsentrasjoner amenamevir over lang tid fremprovoserte de resistent VZV. Dette viruset hadde to mutasjoner i helikasegenet og én i primasegenet, som underbygget virkningsmekanismen. Sammenlignet med det opprinnelige viruset hadde det resistente viruset en mye lavere replikasjonshastighet (7).

1.2.3 Farmakokinetikk

Amenamevir absorberes hovedsakelig i tyntarmen, og hadde en biotilgjengelighet på 40 % i en studie på mus, og trolig en lignende biotilgjengelighet hos mennesker. Organet som oppnådde høyest konsentrasjon etter administrasjon av amenamevir til mus var leveren. Konsentrasjonen av amenamevir var også høy i nyre, åtte ganger høyere konsentrasjon enn i hud, som i de fleste tilfeller av behandling mot HSV-1, HSV-2 og VZV er målorganet. Det distribueres også til hjerne, men med åtte ganger lavere konsentrasjon enn i hud.

Amenamevir metaboliseres trolig ved oksidering og deretter glukuronidering i lever (76). Hos mennesker absorberes amenamevir raskt, og halveringstiden er 8-9 timer (77), som gjør at dosering en gang daglig er mulig, i motsetning til for valaciklovir som har en halveringstid på bare 2,5 timer (78). Mesteparten, 75 %, skilles ut i avføring, mens 20 % skilles ut i urin (77).

På grunn av farmakokinetiske interaksjoner kan amenamevir påvirke konsentrasjonen av andre legemidler. Amenamvir har *in vitro* og i kliniske studier vist seg å være en svak hemmer av cytokrom P450 2C8 (CYP2C8) og induktor av CYP2B6 og CYP3A4. Dessuten metaboliseres amenamevir selv av CYP3A4, og konsentrasjonen kan dermed påvirkes av CYP3A4 induktorer og inhibitorer. Interaksjonene som ble påvist var imidlertid svake nok til at dosejustering i de fleste tilfeller ikke er nødvendig, men kan være aktuelt ved smalt terapeutisk vindu (79, 80).

1.2.4 Bivirkninger

Amenamevir har vist seg å være svært godt tolerert. *In vitro* er det gjort cytotoxicitetsstudier på humane øsofagusfibroblaster (HEF-celler) med to ulike metoder uten å observere noen cytotoxic effekt ved konsentrasjonene som ble testet, og konkludert med at 50 % cytotoxic konsentrasjon (CC_{50}) må være minst 30 μ M, altså langt høyere enn terapeutisk konsentrasjon (7). I kliniske studier med doser opptil 2400 mg er det heller ikke påvist noen sikre bivirkninger, og antall og type bivirkninger, for eksempel hodepine og kvalme, var på samme nivå som for valaciklovir og placebo (68, 70, 81).

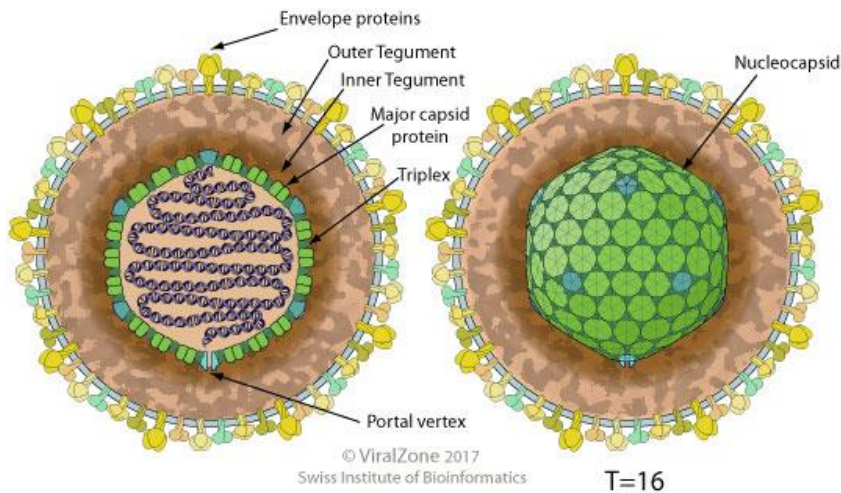
1.3 Herpesvirus

Fordi amenamevir er utviklet som et antiviralt medikament mot alfaherpesvirus, og fordi et alfaherpesvirus brukes i oppgaven for å bekrefte effektiviteten av medikamentet vi fikk tilsendt, er noe bakgrunnskunnskap om herpesvirus nyttig for forståelsen av temaet.

I den store familien *Herpesviridae* er det ni herpesvirus som er kjent for å infisere og gi sykdom hos mennesker; herpes simplexvirus 1 og 2 (HSV-1 og HSV-2), varicella zoster-virus (VZV), Epstein-Barr-virus (EBV), humant cytomegalovirus (HCMV), humant herpesvirus 6A og 6B, humant herpesvirus 7 og kaposi-sarkom-assosiert herpesvirus (82). Amenamevir har effekt mot de tre alfaherpesvirusene, HSV-1, HSV2 og VZV (7), og det er derfor disse tre det vil bli fokusert på her.

1.3.1 Basal virologi

Herpesvirusene har en diameter på ca. 220 nm (83). Ytterst har de en lipidmembran fra vertscellen, og bundet til denne er ulike virale glykoproteiner. Innenfor lipidmembranen er et icosahedralt kapsid av 162 kapsomerer som omgir og beskytter virusets DNA. Rommet mellom kapsidet og lipidmembranen er fylt av et tykt lag av virale proteiner, som kalles tegument (84). Herpesvirusenes genom er lineært, dobbelttrådet DNA. HSV-1 og HSV-2, som har mye mer til felles med hverandre enn med VZV, har et genom på minst 152 000 basepar og ca. 80 gener, mens VZV sitt genom er på 129 000 basepar og rundt 70 gener (85).



Figur 4: Illustrasjon av en herpesviruspartikkel. Figuren viser en ytre lipidmembran, et tykt lag med virale proteiner kalt tegument, og et kapsid som omgir virusets lineære, dobbelttrådede DNA. Figur gjengitt med tillatelse fra (86).

For å komme inn i en celle binder HSV med glykoproteiner på lipidmembranen til overflatemolekyler på cellen. Virusets membran fuserer deretter med cellemembranen, slik at tegumentproteinene og kapsidet frigis i cellens cytoplasma. Tegumentproteinene legger til rette for virustranskripsjon ved å påvirke cellulære funksjoner, mens kapsidet transporteres via mikrotubuli inn gjennom porer i cellens kjernemembran, slik at viralt DNA frigjøres i kjernen. Det er noe usikkert om VZV kommer seg inn i vertscellen på nøyaktig samme måte som HSV (85).

Primærinfeksjon med viruset gir lytisk replikasjon, vanligvis i hud eller slimhinne, med aktiv produksjon av nye viruspartikler. I cellekjernen starter transkripsjonen av viralt DNA, som skjer ved hjelp av vertscellens RNA polymerase II (85). Den cellulære transkripsjonsfaktoren DDX3X fungerer trolig som helikase ved transkripsjonen av HSV DNA (87). Herpesvirusene koder for et stort antall proteiner. Såkalte umiddelbare gener uttrykkes umiddelbart etter infeksjon, og bidrar til videre transkripsjon av tidlige og sene gener (85). Replikasjonen foregår i cellekjernen ved hjelp av virusets egne proteiner; et oribindende protein, viral DNA polymerase og helikase-primasekomplekset, som alle er essensielle for replikasjonen av virusgenom. Andre virale proteiner er involvert i replikasjonen, men ikke essensielle. Det gjelder blant annet tymidin kinase (TK). Dette enzymet omdanner ved fosforylering nukleosider til nukleotider, for eksempel deoksytymidin til deoksytymidintrifosfat (dTTP), som inngår i DNA. I infiserte celler sørger TK for å danne et lager av nukleotider. Også noen cellulære enzymer er involvert i replikasjonen. For å fremme virusets tilgang til metabolitter og enzymer nedregulerer dessuten herpesvirusene vertscellens DNA-replikasjon (85). Etter

replikasjon pakkes nysyntetisert DNA inn i kapsid. Ved budding ut av den indre kjernemembranen får viruset en ytre lipidmembran, men denne fuserer trolig med den ytre kjernemembranen slik at nakne virus transporteres ut i cytoplasma, hvor de pakkes inn i to nye lipidmembraner fra cellulære organeller. Deretter fuserer den ytterste membranen med cellemembranen når viruset frigjøres fra cellen ved eksocytose, mens det beholder den innerste membranen (85).

Etter primærinfeksjonen i hud eller slimhinne tas alfaherpesvirus opp i aksonterminaler på sensoriske nerveceller. De transporteres så trolig via mikrotubuli i aksonet til nervecellens cellekropp, og etablerer en latent infeksjon som persisterer hele vertens liv (88). I denne fasen er sirkulært HSV-DNA lagret i nervecellens kjerne (89), og det produseres ikke infeksjøs virus. Viruset kan derimot reaktiveres, og transporteres da tilbake via aksonet til hud eller slimhinne, hvor det gir ny lytisk infeksjon i samme dermatom som primærinfeksjonen (88).

1.3.2 Epidemiologi

De tre alfaherpesvirusene som gir sykdom hos mennesker har ulik utbredelse og smittevei. HSV-1 smitter ved direkte eller indirekte kontakt med sår, samt via spytt. Minst 50 % av europeere har gjennomgått infeksjon med HSV-1, vanligvis i barndommen. I utviklingsland er HSV-1 enda vanligere, trolig fordi folk bor tettere sammen (90). HSV-2 smitter nesten utelukkende ved seksuell kontakt, og prevalensen varierer fra 15-80 % mellom ulike populasjoner. I de fleste europeiske land er prevalensen 20-30 %, men også HSV-2 er vanligst i utviklingsland. For eksempel er over 60 % av kvinner i Sør-Afrika smittet med HSV-2 ved 21 års alder (90). VZV er mest smittsomt av de tre virusene, og smitter ved kontakt- og dråpesmitte, vanligvis i tidlig barndom. Seroprevalensen er funnet å være > 90 % hos 15-åringer i områder med temperert klima, hvor epidemier vanligvis oppstår i vinterhalvåret. Ved tropisk klima er VZV mindre smittsomt, og smitte skjer noe senere (91).

1.3.3 Sykdommer

Alle de tre alfaherpesvirusene etablerer en livslang, latent infeksjon etter primærinfeksjonen, og kan reaktiveres av en rekke faktorer, for eksempel stress, feber, vevsskade, immunsuppresjon og menstruasjon. HSV-1 og HSV-2 kan affisere hud og slimhinner over hele kroppen, men oral og genital herpes er de vanligste

presentasjonsformene (90). HSV-1 gir i de fleste tilfeller oral herpes, men i økende grad også genital herpes, sannsynligvis som følge av endret seksuell praksis. Symptomene er da ofte mildere enn ved infeksjon med HSV-2. HSV-2 gir nesten utelukkende genital herpes, men kan også i sjeldne tilfeller gi oral herpes (90). Både primærinfeksjon og reaktivering skjer vanligvis uten merkbare symptomer, men frigjøring av virus skjer likevel. I de tilfellene infeksjonen gir symptomer, er de ved primærinfeksjon oftest sterkere og mer langvarige enn ved sekundærinfeksjon. Symptomene er først og fremst smertefulle blemmer og sår i og rundt munnen ved oral herpes, eller på kjønnsorganene ved genital herpes. 20-40 % av voksne opplever residiverende oral herpes, de fleste sjeldnere enn én gang i året, og typisk varighet er 5-10 dager. Residiverende infeksjoner med genital herpes forekommer vanligvis 4-5 ganger i året i starten, og blir deretter for de fleste sjeldnere, men noen får vedvarende hyppige og kraftige residiv som er begrensende for livskvalitet (90). Begge typene HSV kan dessuten gi keratitt (hornhinnebetennelse), som i verste fall kan medføre blindhet, og livstruende infeksjoner som encefalitt (hjernebetennelse), neonatal herpes hos nyfødte og hudinfeksjonen eczema herpeticum. Dette er sykdommer som uten antiviral behandling har høy dødelighet og kan gi varige funksjonsnedsettelse for de overlevende (90).

VZV, i motsetning til HSV, gir ved primærinfeksjon alltid mer eller mindre uttalte symptomer i form av barnesykdommen vannkopper, med feber og utslett. Utslettet skyldes trolig at viruset infiserer epitel i øvre luftveisslimhinne, for så via infeksjon av hvite blodceller å kunne transporteres til hud over store deler av kroppen (91). Vannkopper er vanligvis ufarlig, men sykdommen kan kompliseres med sekundær bakterieinfeksjon i huden, som i sjeldne tilfeller kan spre seg og gi alvorlig sykdom. VZV kan også gi alvorlig lungebetennelse, som er vanligst hos voksne med primærinfeksjon og hos immunsupprimerte. Andre alvorlige manifestasjoner er hepatitt, encefalitt, lillehjerneataksi og blødningstendens.

Primærinfeksjon under graviditet er forbundet med komplikasjoner hos både mor og barn, som misdannelser eller neonatal infeksjon hos barnet, og lungebetennelse hos den gravide (91). Reaktivering av VZV er sjeldnere enn for HSV, men sannsynligheten øker ved økende alder og ved nedsatt immunforsvar. Resultatet av reaktivering er helvetesild eller herpes zoster. Som navnet tilsier er dette en svært smertefull tilstand, hvor det oppstår utslett med blemmer, vanligvis i bare ett dermatom. 10-30 % av befolkningen får herpes zoster løpet av livet, men flesteparten opplever bare én episode. I noen tilfeller vedvarer smertene i flere

måneder etter at utslettet er borte, såkalt postherpetisk smerte. Noen land har innført vaksine mot VZV i barnevaksinasjonsprogrammet. Vaksine i voksen alder kan dessuten forebygge reaktivering av latent virus (91).

På grunn av plagsomme symptomer og i noen tilfeller livstruende infeksjoner som encefalitt, vil det ofte være behov for antiviral behandling mot HSV og VZV. Inntil nylig har alle medikamentene som har vært i bruk mot herpesvirus vært nukleosid- eller nukleotidanaloger som binder til viral DNA polymerase (74).. I de fleste tilfeller brukes aciklovir (ACV), eller produget valaciklovir som absorberes bedre og omdannes til ACV i leveren. Andre medikamenter med samme virkningsmekanisme benyttes også. ACV er en nukleosid analog som omdannes av viral tymidin kinase (TK) i infiserte celler til aktivt medikament, aciklovirtrifosfat (ACV-TP), en analog av deoksyguanosintrifosfat (dGTP). ACV-TP har mye høyere affinitet til viral DNA polymerase enn til vertscellens DNA polymerase, og påvirker dermed selektivt virusets replikasjon. ACV-TP inkorporeres i viralt DNA, og fører til umiddelbar terminering av syntese av den aktuelle DNA-tråden, slik at virusets replikasjon hemmes (74).

ACV er godt tolerert på grunn av selektiviteten for viral replikasjon, men likevel ikke uten utfordringer. En *in vitro*-studie viste at ved behandlingsstart mer enn 7,5 timer etter infeksjon ble effekten av ACV betydelig redusert. For å inkorporeres i viralt DNA må ACV-TP konkurrere med dGTP. Under infeksjon vil TK syntetisere og etter hvert bygge opp et lager av dGTP, slik at desto senere behandlingen starter, desto mer dGTP må medikamentet konkurrere med. Det er derfor viktig med tidlig oppstart av behandling. I motsetning til ACV reduseres effekten av amenamevir lite av viral replikasjon. 12,5 timer etter infeksjon var EC_{50} for ACV 8-11 ganger høyere enn ved behandlingsstart samtidig med infeksjon, men for amenamevir var EC_{50} bare 2-4 ganger høyere (92). I en studie på mus viste det seg at amenamevir, i motsetning til valaciklovir, hadde effekt selv ved behandlingsstart fire dager etter infeksjon (93). Det har også vært en utfordring at ACV har en svakere effekt mot VZV enn mot HSV. Kombinert med kort halveringstid fører det til at ACV og valaciklovir må tas i høye doser flere ganger daglig. Amenamevir derimot, er omtrent like potent mot VZV som mot HSV, og har en lengre halveringstid (7, 74, 77). En annen viktig ulempe med de TK-avhengige nukleosidanalogene i behandling mot herpesvirus er resistens. Hos immunkompetente individer forekommer resistens sjeldent, hos under 1 %, men gjentatt

behandling mot for eksempel genital herpes øker sjansen for resistensutvikling. Hos immunsupprimerte er forekomsten av resistent HSV høyere, rundt 5 %, og opptil 30 % i forbindelse med allogene benmargstransplantasjon. Resistens skyldes vanligvis mutasjon i TK-genet, da dette enzymet ikke er essensielt for virusreplikasjon. I slike tilfeller kan man i stedet behandle med nukleosid- eller nukleotidanaloger som ikke er avhengige av TK, men dermed virker i alle kroppes celler og er mer toksiske. Noen virus har i stedet mutasjon i genen for DNA polymerase, og disse kan være resistente også mot medikamenter som ikke er avhengige av TK (94). Amenamevir har derimot mye mindre resistensproblematikk foreløpig. Ved å undersøke fire subtyper av HSV-1 og HSV-2, ble det funnet en 1389 ganger høyere forekomst av resistens mot ACV enn mot amenamevir. I tillegg replikerte de amenamevirresistente virusene mye dårligere enn ikke-resistente virus (95).

1.4 Formål med oppgaven

Formålet med oppgaven var å for første gang undersøke effekten av den nye helikase- og primasehemmeren amenamevir på replikasjon av BKPyV i nyreepitelceller og på viabilitet av de samme cellene.

2 Materiale og metode

Amenavir ble utprøvd *in vitro* på virusinfiserte celler for å undersøke effekt på virusreplikasjon og uttrykk av virale proteiner ved hjelp av henholdsvis kvantitativ-real-time PCR og immunfluorescensmikroskopi. For å undersøke effekt på viabilitet av nyreepitelceller brukte vi metodene xCELLigence og luminescensbasert ATP-måling. I tillegg ble det ved hjelp av xCELLigence-metoden, fasekontrastmikroskopi og immunfluorescensmikroskopi kontrollert om medikamentet vi fikk tilsendt hadde den forventede effekten mot HSV-1, eller om det var inaktivt. Til alle forsøkene ble det brukt uinfiserte og ubehandlede kontroller til sammenligning, som ellers ble behandlet på nøyaktig samme måte. Laboratoriearbeidet har foregått ved Avdeling for Mikrobiologi og Smittevern på Universitetssykehuset Nord-Norge (UNN) i Tromsø.

2.1 Celler og utsåing

Til forsøkene med BKPyV ble det brukt humane primære nyreepitelceller fra proksimale tubuli (RPTECs) (Lonza), fordi BKPyV ved PyVAN replikerer i epitelceller i nyretubuli (96). Donor var en 52 år gammel mann. Ifølge leverandør har cellene en doblingstid på 14 til 40 timer. Ampuller med RPTECs frosset i flytende nitrogen ble tint og sådd ut i cellekulturflasker med renalt epitelialt vekstmedium (REGM) (Lonza) tilsatt 0,5 % føtalt kalveserum (FBS), 30 µg/mL gentamicin og 15 ng/mL amfotericin B. Medium ble skiftet samme eller neste dag for å fjerne dimetylsulfoksid (DMSO) som var tilsatt de frosne cellene. Det ble tint nye RPTECs før hvert forsøk.

Til kontrollforsøkene med HSV-1 brukte vi A549-celler (ATCC CCL-185), som er en cellelinje fra adenokarsinom i lunge. Disse ble valgt fordi celletypen tidligere er brukt i antivirale studier på HSV-1 (97), og en samarbeidende forskningsgruppe ved Universitetet i Basel hadde gode erfaringer med A549-celler i lignende forsøk. Cellene er dessuten enkle å håndtere, og var allerede tilgjengelig. A549-celler var i likhet med RPTECs fryst i nitrogen. Etter tining ble cellene sentrifugert for å fjerne DMSO, og deretter, også i tråd med forsøk fra Basel, sådd ut i Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) tilsatt 5 % FBS. Cellene ble splittet når de dannet et konfluent lag, slik at de kunne holdes levende og brukes til flere forsøk. De ble alltid splittet minst én gang før bruk.

Alle celler ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i fuktet CO₂-inkubator.

Før forsøkene ble celler løsnet med trypsin, sentrifugert for å fjerne trypsinrester og resuspendert i medium. Ved hjelp av farging med trypanblått og celledelling med Countess™ automated cell counter ble et forhåndsbestemt antall celler sådd ut per brønn i mikrotiterplater. Det ble brukt 48-brønnersplater med brønnareal 0,75 cm², 96-brønnersplater med brønnareal 0,32 cm² og 16-brønners E-plater med brønnareal 0,2 cm². I disse platene ble cellene sådd ut i henholdsvis 250 µL, 125 µL og 200 µL medium per brønn.

2.2 Virus

BKPyV som ble brukt var cesiumkloridrenset BKPyV (Dunlop) produsert i veroceller i 2018. Fokusformende enheter (FFU) er rundt 10⁵/µL, beregnet i RPTECs fra samme donor som brukt i disse forsøkene.

HSV-1 ble tilsendt fra Basel. To 25 cm² cellekulturflasker med A549-celler var infisert med henholdsvis 1,2 x 10⁸ og 2,8 x 10⁷ kopier av hvert sitt kliniske isolat, heretter benevnt som «isolat 1» og «isolat 2». Fire dager etter infeksjon ble flaskene fylt opp med ca. 50 mL medium (MEM) og oppbevart ved 4 °C før sending til Tromsø neste dag. Vi høstet supernatant fra begge flaskene, sentrifugerte for å fjerne celler og debris og frøs supernatant ned ved -80 °C til senere bruk. I tilfelle denne løsningen skulle ha for lav viruskonsentrasjon, ble pellet fra sentrifugering resuspendert i en liten mengde supernatant fra samme isolat. For isolat 2 hvor flere celler fremdeles satt fast i flasken, ble også fastsittende celler skrapet løs og blandet inn. Løsningene ble tre ganger fryst til -80 °C og tint for å forsøke å frigjøre intracellulært virus, og sentrifugert for å fjerne cellulært debris. Dette lysatet ble oppbevart i kjøleskap til uken etter. Noe av supernatanten ble brukt umiddelbart i 10 ganger fortykning til å infisere A549-celler i tre nye flasker for eventuell bruk senere. En flaske med uinfiserte celler ble behandlet på samme måte. Til det første forsøket brukte vi lysat, mens vi i resten av forsøkene endte opp med å bruke supernatant fra de opprinnelige flaskene vi fikk tilsendt, samt sentrifugert supernatant fra de uinfiserte cellene som kontroll (mock).

2.3 Amenamevir

Amenamevir ble kjøpt fra MedChemExpress i pulverform med en renhet på 93,89 % ifølge datablad fra leverandør. Pulveret ble løst i DMSO til en konsentrasjon på 20 mM og

oppbevart ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, hvor det skal ha en holdbarhet på 6 måneder. Rett før behandling ble stoffet tint og fortynnet i cellekulturmedium til ulike konsentrasjoner. Fortynningene ble laget via $20\text{ }\mu\text{M}$ i medium for første forsøk med BKPyV, via $80\text{ }\mu\text{M}$ for de neste forsøkene med BKPyV og via $93\text{ }\mu\text{M}$ for forsøk med HSV-1. DMSO-konsentrasjonen ble justert til å være lik og så lav som mulig i konsentrasjonene av amenamevir som ble sammenlignet, for å utelukke at DMSOs effekt på celler eller virus kunne påvirke resultatet. Til forsøkene brukte vi konsentrasjoner av amenamevir på 0,01, 0,1, 1, 10, 20 og $40\text{ }\mu\text{M}$. I de fire laveste konsentrasjonene var DMSO fortynnet 2000 ganger, ved $20\text{ }\mu\text{M}$ 1000 ganger fortynnet og ved $40\text{ }\mu\text{M}$ 500 ganger fortynnet. Ved sistnevnte konsentrasjon var DMSO-mengden så høy at vi forventet at den ville kunne påvirke cellene (informasjon fra veileder).

2.4 Antiviral effekt av amenamevir mot HSV-1

For å bekrefte at medikamentet vi hadde fått tilsendt var aktivt, ble det undersøkt for antiviral effekt mot HSV-1. Etter råd fra samarbeidende forskningsgruppe ved Universitetet i Basel ble effekten vurdert i A549-celler ved hjelp av xCELLigence (metoden nærmere beskrevet under 2.4). Herpesvirus gir uttalte strukturelle endringer i vertscellen (cytopatogen eller cytopatisk effekt, CPE) (98), slik at cell index i stor grad påvirkes av infeksjonen, og behandlingseffekt enkelt og raskt kan vurderes. Dette i motsetning til BKPyV, som har lite CPE (informasjon fra veileder). xCELLigence er i flere studier brukt til å se på CPE av ulike virus. Effekten kan beskrives ved hjelp av CIT_{50} , tid for 50 % reduksjon av cell index (99, 100). I denne oppgaven defineres CIT_{50} som tiden der normalisert cell index er redusert til 50 % av normalisert cell index for uinfiserte celler. Normalisert cell index er cell index relativt til verdien ved tidspunkt for infeksjon, hvor cell index for alle brønner er satt til 1.

For å finne optimal celletetthet for forsøkene ble, etter bakgrunnsmåling av medium, A549 sådd ut i E-plater i konsentrasjoner på 5000, 10 000, 20 000 og 40 000 celler per brønn med fire paralleller, og cell index målt hvert 30. minutt. Fordi FBS i mediet inneholder fibronektin ble brønnene ikke dekket med fibronektin før utsåing. Etter ca. 3 døgn ble cellene behandlet med amenamevir $20\text{ }\mu\text{M}$ for å undersøke om det var noen effekt på cellenes viabilitet, og cell index ble målt i ytterligere 4 døgn.

For å vurdere optimal viruskonsentrasjon ble deretter 5000 celler sådd ut per brønn i en E-plate for måling av cell index. 48 timer etter utsåing ble $100\text{ }\mu\text{L}$ medium fjernet og erstattet

med lysat med ett av to HSV-1-isolater fortdynnet enten 10, 100 eller 1000 ganger i medium. Noen brønner fikk kun medium. Cell index ble så målt hvert 30. minutt i 112 timer. Parallelt med dette forsøket ble celler sådd ut på samme måte i en annen E-plate for å undersøke effekt av behandlingen. Etter 48 timer ble 100 µL medium erstattet med 100 µL medium med eller uten amenamevir og med eller uten HSV-1. Amenamevir ble gitt i konsentrasjon 1 eller 20 µM, og ubehandlede celler fikk DMSO i samme mengde. Virus som ble brukt var lysat med HSV-1 isolat 1 eller 2 fortdynnet 10 ganger. I tillegg ble 15 000 celler per brønn sådd ut på en 48-brønnersplate som ble infisert og behandlet på samme måte og mikroskopert daglig.

Mengde HSV-1-DNA i lysatet som var brukt, samt i supernatant fra flasken vi fikk tilsendt ble kvantifisert ved real-time semi-kvantitativ PCR. Vi hadde ikke med en standardkurve, men en positiv driftskontroll med kjent mengde HSV-1-DNA for å kunne beregne omtrentlig antall kopier. Foroverprimeren (5'-GGC-CTG-GCT-ATC-CGG-AGA-3'), bakoverprimeren (5'-GCG-CAG-AGA-CAT-CGC-GA-3') og TaqMan[®]-proben (5' 6-FAM-CAG-CAC-ACG-ACT-TGG-CGT-TCT-GTG-T-BHQ-1-3') var rettet mot US5-genet i HSV-1. Dette genet koder for Glycoprotein J. Mastermiksen inneholdt en internkontroll med en indre sekvens som ikke finnes i HSV-1 for å utelukke hemming av PCR-reaksjonen, og en egen probe for påvisning av denne internkontrollen. Det ble brukt 20 µL mastermiks og 5 µL templat per brønn, og et program med 45 sykler. PCR av supernatant ble gjort tre ganger, PTC to ganger og lysat én gang.

Etter kvantifisering av HSV-1-DNA ble forsøket modifisert for å få en tydeligere effekt av behandlingen. Det var mest praktisk å infisere og behandle 24 timer etter utsåing i stedet for 48, og i stedet for lysat brukte vi supernatant fra flaskene vi hadde fått tilsendt, som hadde mer enn høy nok viruskonsentrasjon. Vi brukte kun isolat 1 for å kunne teste flere konsentrasjoner – 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 og 10^4 kopier/mL. De høye konsentrasjonene ble gjentatt i tilfelle supernatant hadde lavere infektivitet enn lysat. 5000 celler per brønn ble sådd ut på E-plater, og infisert og behandlet på samme måte som beskrevet over. Uinfiserte celler fikk enten medium eller supernatant fra uinfiserte celler i stedet for virus, og ble behandlet med medium med DMSO eller amenamevir 20 µM. Infiserte celler ble behandlet med kun DMSO, eller amenamevir i konsentrasjon 1 µM eller 20 µM. Antall paralleller var to eller tre. Cell index ble målt hvert 30. minutt i 4 dager.

For å undersøke CPE av HSV-1 med fasekontrastmikroskopi og uttrykk av virale proteiner med immunfluorescensmikroskopi, ble 15 000 celler per brønn sådd ut i 48-brønnersplater med fire paralleller. Cellene ble infisert og behandlet med samme konsentrasjoner som cellene i E-plate, og mikroskopert daglig med fasekontrast. På ulike tidspunkter ble cellene fiksert, først med 4 % paraformaldehyd (PFA) i 10 minutter for å være skånsom mot celler med dårlig adhesjon, og deretter med metanol i 10 minutter som for RPTeCs. Vi brukte to typer monoklonalt primærantistoff fra kanin mot et cytoplasmatisk protein som enten kun HSV-1 eller kun HSV-2 uttrykker. Dessverre vet vi ikke hvilket HSV-1-protein antistoffet binder til, da leverandøren bare oppgir at det er et cytoplasmatisk protein. Antistoffet var tilsendt fra Basel i bruksfortynning. Cellene ble inkubert med primærantistoff ved 37 °C i 60 minutter. Som sekundærantistoff brukte vi geiteantistoff mot kanin-IgG med Alexa Fluor 488 (grønn) som tidligere beskrevet, og DNA ble farget med DRAQ5 (101).

2.5 Effekt av amenamevir på celleviabilitet av RPTeCs

Viabilitet ble studert ved hjelp av xCELLigence® (ACEA Biosystems), et instrument som kontinuerlig måler cellenes tilstand. Cellene sås ut i tilhørende E-plater med gullelektroder i bunnen av hver brønn. Det settes så spenning på elektrodene slik at det går en vekselstrøm gjennom cellekulturmediet, som leder strøm. Instrumentet kan dermed måle impedans (vekselstrømsmotstand) i mediet, som påvirkes av cellenes størrelse, adhesjon og antall. Impedansen omregnes av programvaren til en cell index som sier noe om celleviabiliteten, eller hvor godt cellene har det. Om cellene får vokse og dele seg uforstyrret, vil impedansen og dermed cell index gradvis øke og nå et platå når cellene har dannet et konfluent lag, mens for et cytostatisk eller cytotoxisk medikament kan få indeksen til å holde seg stabil eller synke (102). En fordel med denne metoden er at den i motsetning til mange andre typer viabilitetmålinger gir kontinuerlige resultater mens cellene er levende, i stedet for å kunne gjøre målingene kun på ett tidspunkt etter å ha lysert cellene.

Før utsåing ble bunnen av brønnene i E-platene dekket med fibronektin for at cellene skulle kunne feste seg, og det ble gjort en bakgrunnsmåling av baseline impedans med kun medium i brønnene. Deretter ble RPTeCs tilsatt slik at totalt volum ble 200 µL per brønn. Cell index ble målt hvert 15. minutt. For å redusere fordampning ble hulrommene rundt brønnene fylt med destillert vann. Ca. 24 timer etter utsåing ble halvparten av mediet erstattet med medium amenamevir, slik at sluttkonsentrasjonen av amenamevir ble 0,01,

0,1, 1,0, 10, 20 eller 40 μM . Som kontroller ble noen celler tilsatt medium med kun DMSO i samme konsentrasjoner som i medium med amenamevir. Cell index ble videre målt hvert 30. minutt i minst tre døgn. I hvert forsøk ble det brukt tre eller fire paralleller av hver behandling, og det ble gjort totalt fire slike forsøk, med 1500, 2000, 3000 og 3000 celler per brønn. Dette for å undersøke effekt av behandlingen både på prolifererende og ikke-prolifererende celler. De to høyeste konsentrasjonene av amenamevir, 20 og 40 μM , ble kun testet på prolifererende celler (1500 og 2000 celler per brønn).

Som et annet mål på cellenes vitalitet ble det gjort måling av ATP-konsentrasjonen i cellene. 6250 RPTECs per brønn ble sådd i 96-brønnersplate. Etter ca. 24 timer ble medium fjernet og erstattet med 125 μL nytt medium, medium tilsatt DMSO eller amenamevir i konsentrasjonene 0,01, 0,1, 1 og 10 μM . Medium ble tilsatt tre brønner uten celler for måling av bakgrunnslyscens. Tre døgn etter behandling ble 125 μL av reagentet CellTiter-Glo (Promega) tilsatt hver brønn. Reagentet reagerer med ATP i en reaksjon som frigjør lys, og inneholder stoffer som ødelegger cellemembranen slik at ATP frigjøres, og hemmer ATPaser for å unngå at mer ATP forbrukes. Brettet ble ristet i 2 minutter og 200 μL fra hver brønn overført til brønner på et hvitt 96-brønners brett og inkubert i romtemperatur i 10 min for stabilisering av luminescenssignalet før luminescens ble målt i et luminometer (Tecan Infinite F200PRO reader (Tecan)). I hvert forsøk ble det brukt tre paralleller, og forsøket ble gjentatt tre ganger.

Sammenhengen mellom luminescens og ATP-konsentrasjon er lineær innenfor et begrenset område. For at vi skulle kunne sammenligne vitaliteten ved ulik behandling, er det derfor viktig å vite om den målte luminescensen er innenfor det lineære området, slik at den er proporsjonal med ATP-konsentrasjonen. Derfor lagde vi før hvert forsøk en standardrekke med ATP i kjente konsentrasjoner, som vi analyserte på samme måte. De kjente ATP-konsentrasjonene var 1 nM, 10 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μM og 10 μM , med to paralleller av konsentrasjon. Etter å ha målt luminescensen ble det laget en standardkurve med lineær regresjon i Excel for å vurdere om den målte luminescensen kunne representere ATP-konsentrasjonen i cellene.

2.6 Antiviral effekt av amenamevir mot BKPyV

For å undersøke antiviral effekt av amenamevir mot BKPyV, ble RPTECs ble sådd ut i 48-brønnersplate med 12 500 celler per brønn. Det ble brukt to paralleller, og forsøket ble gjentatt tre ganger. Ca. 24 timer etter utsåing ble cellene infisert med BKPyV. Som i tidligere forsøk med BKPyV ble det ble brukt en MOI (multiplicity of infection) på 1 (32, 103) ved at det ble tilsatt én fokusformende enhet (FFU), som tilnærmet tilsvarer antall infeksjose virus, per utsådde celle. Medium ble fjernet og erstattet med 100 µL rent medium eller medium med BKPyV. Etter to timers inkubasjon ved 37 °C i CO₂-inkubator ble cellene vasket én gang med fosfatbufret saltvann (PBS) for å fjerne ekstracellulært virus som ikke hadde infisert celler. Deretter ble 250 µL medium med kun DMSO eller amenamevir i konsentrasjoner på 0,01, 0,1, 1 og 10 µM tilsatt.

Én dag etter infeksjon ble det høstet 10 µL supernatant fra de infiserte cellene som kun hadde fått DMSO for å kunne kvantifisere mengden BKPyV-DNA i mediet før frigjøring av nye viruspartikler hadde startet. Denne mengden kalles input og skyldes rester fra da cellene ble infisert. Tre dager etter infeksjon ble det høstet 100 µL medium fra hver brønn. Både dette og inputprøven ble fortynnet 1:100 i destillert vann, kokt ved 100 °C i 5 minutter og analysert med kvantitativ real-time polymerase chain reaction (qPCR) for å finne konsentrasjonen av BKPyV-DNA ekstracellulært tre dager etter infeksjon og behandling i mediet til både ubehandlede og behandlede celler. Metoden amplifiserer opp en bestemt DNA-sekvens som ligger innenfor to primere. Amplifiseringen skjer i temperatursyklus, der mengden DNA er doblet etter hver syklus. En syklus starter med at temperaturen økes slik at DNA-trådene denatureres og dermed blir tilgjengelige for primere, proben og en DNA polymerase fra mastermiksen, som kopierer sekvensen ved en lavere temperatur. Antallet kopier kan enten måles på slutten av reaksjonen, eller etter hver syklus. En probe som binder til DNA-sekvensen og sender ut fluorescens, som måles av PCR-maskinen, gjør dette mulig. Ved real-time PCR måles fluorescensen etter hver syklus. Nummeret på den første syklusen der fluorescensen er stor nok til å skiller fra bakgrunnssignalet er proporsjonalt med logaritmen til startmengden DNA. Denne syklusen benevnes som Ct (threshold cycle).

Vi brukte en kvantitativ real-time PCR med primere og probe komplementær til genet for LTag, som beskrevet tidligere (104). I en 96-brønners PCR-plate ble hver brønn tilsatt 20 µL TaqMan mastermiks (Applied Biosystems) med primere og probe, og deretter 5 µL fortynnet

supernatant fra infiserte celler, hver prøve i triplett. I tillegg hadde vi med en prøve fra én uinfisert brønn, og to brønner fikk destillert vann som negativ kontroll. Vi brukte et program med 45 sykler. For å muliggjøre kvantifisering benyttet vi 5 μL av fire plasmidstandarder med kjent konsentrasjon av BKPyV-DNA som kjøres i triplett: 10, 1000, 10 000 og 1 000 000 kopier/ μL . Ved hjelp av standardene beregnet programvaren antall kopier BKPyV-DNA i prøvene.

For å se på uttrykk av virusproteinene LTag, agnoprotein og VP1 i de infiserte cellene ved ulike konsentrasjoner av amenamevir, brukte vi immunfluorescensmikroskopi. Metoden går ut på å farge proteiner ved hjelp av antistoffer som tidligere beskrevet (101). Vi fikserte cellene med metanol tre dager etter infeksjon og behandling. Cellene ble vasket én gang med PBS, fiksert med 250 μL metanol i 10 minutter og vasket to ganger til før tilsetning av ny PBS. Metanolfikseringen gjør cellemembranen permeabel for antistoffer. Cellene ble oppbevart i kjøleskap frem til farging. Vi brukte indirekte immunfluorescens, som betyr at vi måtte bruke to ulike typer antistoff. Som primærantistoff brukte vi monoklonalt anti-LTag (mus), monoklonalt anti-agnoprotein (kanin) (101) og polyklonalt anti-VP1 (kanin) (105). Anti-VP1 var fortynnet 1:1000. Som sekundærantistoff brukte vi geiteantistoffer mot kanin-IgG og muse-IgG. De to sekundærantistoffene har bundet på seg hvert sitt fluorescerende molekyl, henholdsvis Alexa Fluor 488 (grønn) og Alexa Fluor 568 (rød). Alle brønnene ble også farget med DNA-farge, enten DRAQ5 eller DAPI, fortynnet 1:1000 i PBS. Nikon TE2000 mikroskop og programmet NIS Elements (Nikon Corporation) ble brukt til mikroskopi og fotografering. For å kunne sammenligne proteinuttrykk ble samme kamerainstillinger brukt på alle bilder av samme protein. I tillegg til immunfluorescensmikroskopi brukte vi også fasekontrastmikroskopi, som viser kontrast mellom ulike strukturer uten at man behøver å farge.

2.7 Statistiske metoder

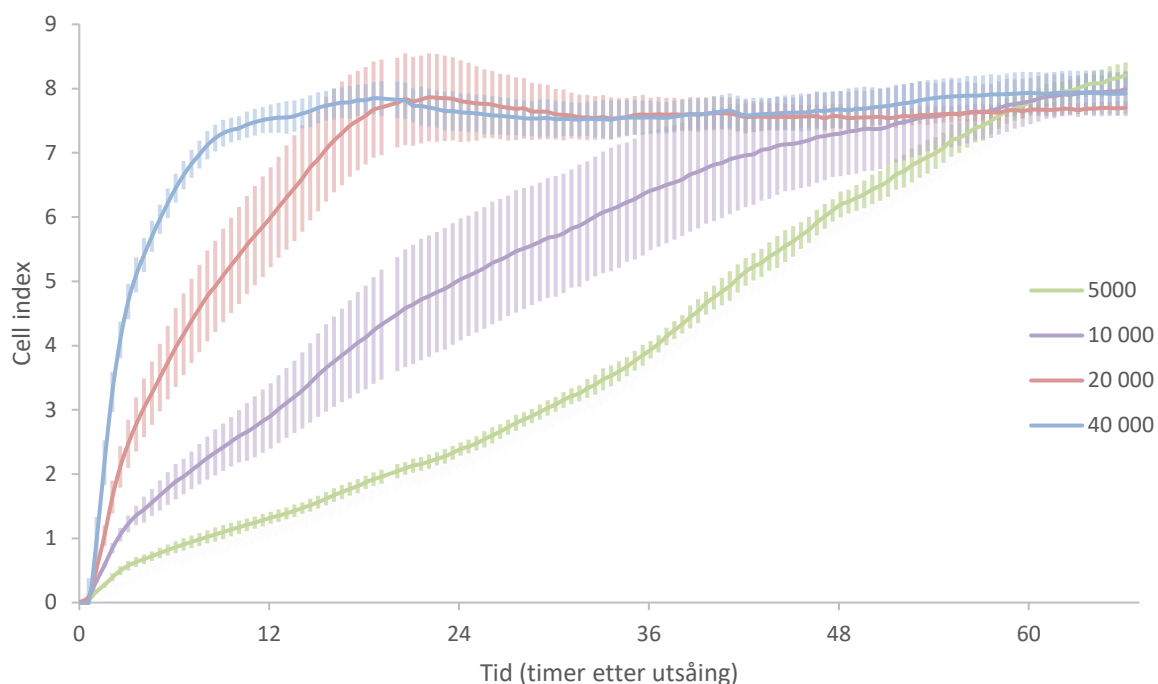
Rådata fra forsøkene ble eksportert til Excel hvor det ble gjort utregninger og grafisk fremstilling av resultatene. De fleste forsøkene ble gjort minst tre ganger, og for resultatene fra ATP-måling og real-time PCR ble gjennomsnittet av alle forsøk med standardavvik vist.

3 Resultater

3.1 Antiviral effekt av amenamevir mot HSV-1

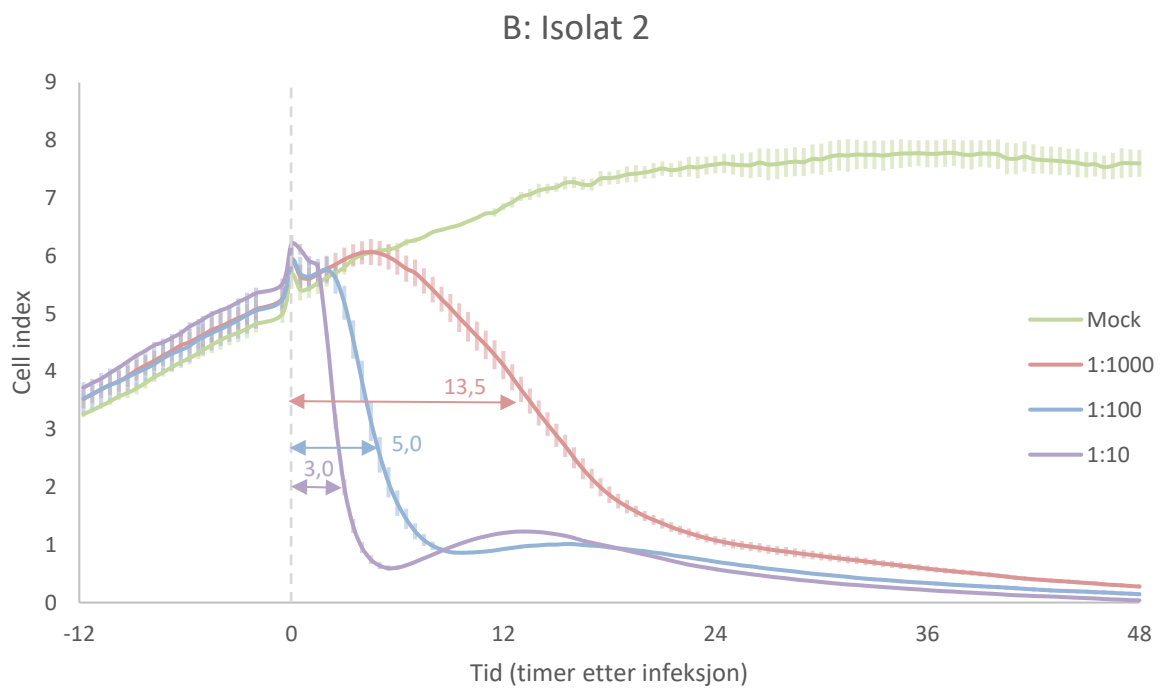
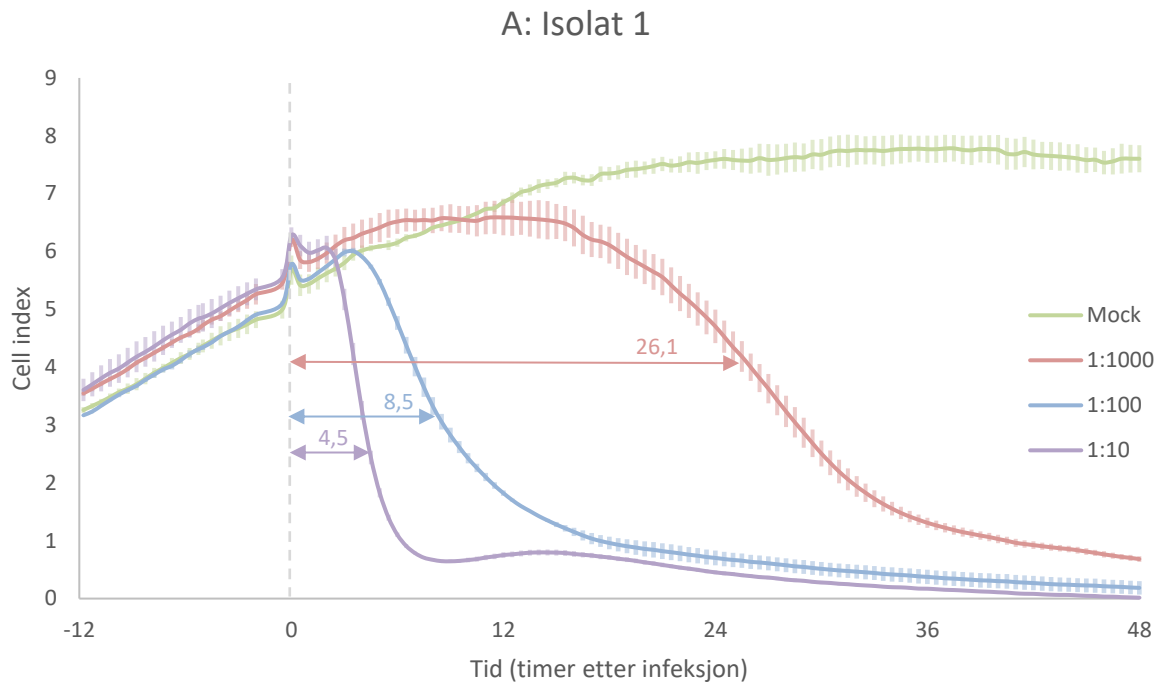
For å kontrollere om medikamentet vi hadde fått tilsendt var aktivt, testet vi det først ut på A549-celler infisert med HSV-1, et av virusene amenamevir har kjent effekt mot. Da vi ikke tidligere hadde utført forsøk med herpesvirus og A549-celler, ønsket vi først å finne optimale konsentrasjoner av celler og virus.

Optimal cellekonsentrasjon. Celler ble sådd ut i ulike tettheter; 5000, 10 000, 20 000 og 40 000 celler per brønn. Cell index, som reflekterer antall, størrelse og adhesjon av cellene, ble målt kontinuerlig med xCELLigence (Figur 5). Vi så tydelig forskjell på hvor raskt cell index steg ved ulik celletetthet, mens maksimal cell index var lik for alle tetthetene. Den høyeste celletettheten på 40 000 celler per brønn viste rask økning i cell index, og nådde et platå med maksimal cell indeks på litt under 8 etter bare 9 timer. Brønnene med 20 000 celler kom til maksimal cell index etter ca 20 timer. Brønnene med 10 000 celler viste en gradvis stigning frem til maksimal cell index etter ca. 48 timer, mens cell index i brønner med 5000 celler fortsatte å stige til ca. 60 timer. Vi ønsket å benytte en konsentrasjon av celler der cellene fremdeles var i proliferasjon etter 48 timer, for å bedre synliggjøre forskjeller i cell index mellom behandlede og ubehandlede celler. Ut fra dette forsøket bestemte vi oss for å bruke 5000 celler per brønn.

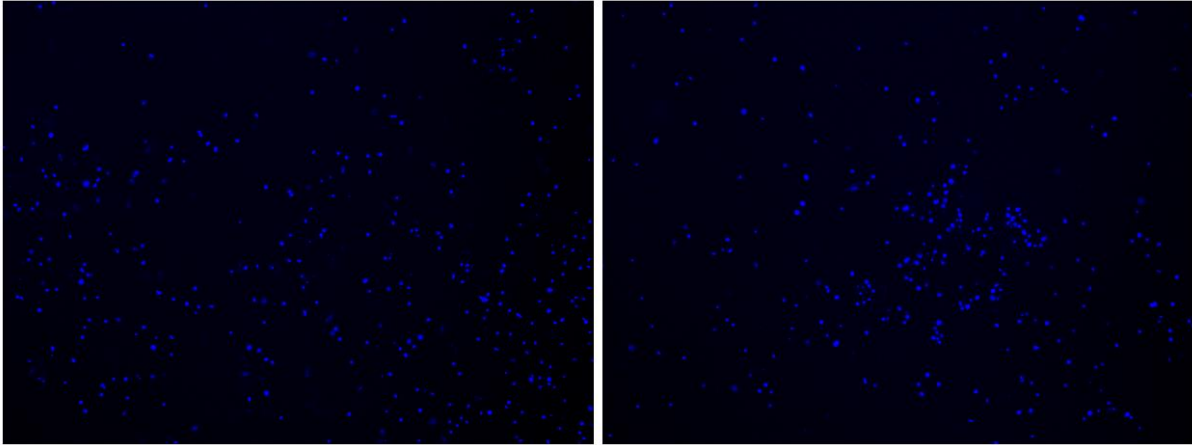


Figur 5: xCELLigence-måling av cell index fra utsåing av A549-celler i fire ulike konsentrasjoner og i totalt 66 timer. Grafene viser gjennomsnitt av fire paralleller med 5000 (grønn), 10 000 (lilla), 20 000 (rød) og 40 000 (blå) celler per brønn. Standardavviket mellom fire paralleller vises som vertikale striper på grafene.

Optimal viruskonsentrasjon. For å finne en optimal viruskonsentrasjon ble A549-celler analysert med xCELLigence og infisert med ulike konsentrasjoner av to kliniske isolater HSV-1 48 timer etter utsåing (Figur 6). Lysatet som ble brukt til infeksjon hadde på dette tidspunktet ukjent konsentrasjon virus. Det var en tydelig sammenheng mellom virusmengde og hvor raskt CPE inntreffer. Celler som ble infisert med 10 ganger fortynnet lysat viste en svært rask nedgang i cell index, som inntreffer raskest for isolat 2. CIT_{50} , tid for 50 % reduksjon i normalisert cell index i forhold til uinfiserte celler (mock), var på bare 4,5 og 3 timer for henholdsvis isolat 1 og 2 ved 10 ganger fortynning. Det ble daglig gjort fasekontrastmikroskopi, som viste at infiserte celler fikk større kjerner og rundere form. Farging for døde celler med DRAQ7 en, to og tre dager etter infeksjon viste ingen forskjell i antall døde celler mellom infiserte og uinfiserte brønner.



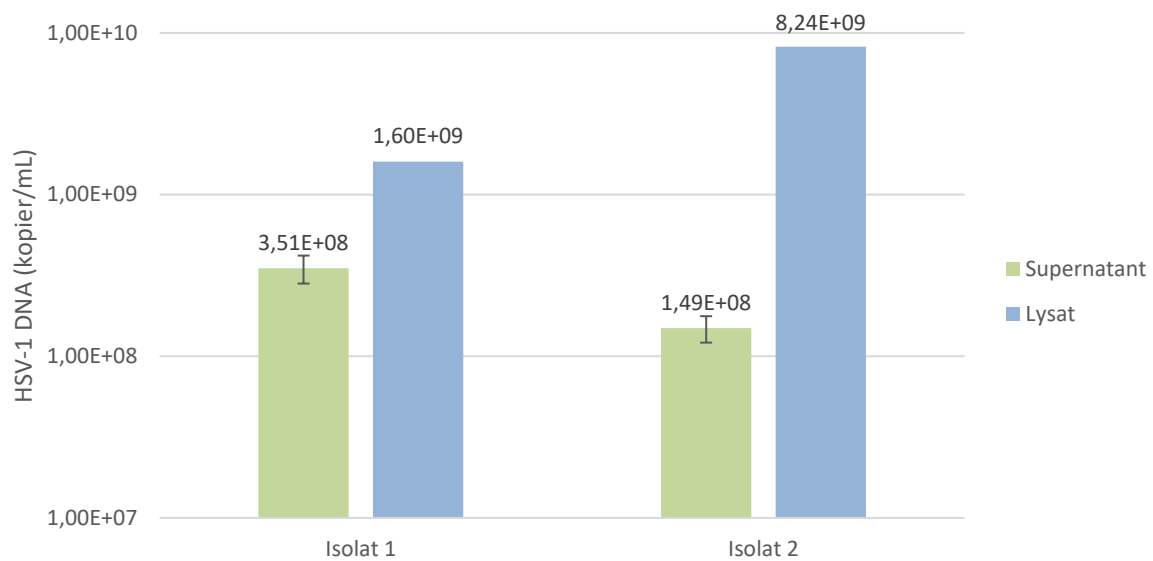
Figur 6: xCELLigence-måling av cell index fra 12 timer før til 48 timer etter infeksjon av A549-celler med HSV-1 isolat 1 (A) og isolat 2 (B). Hver kurve viser gjennomsnitt av tre (1:1000) eller to parallelle infisert med lysat fortynnet 10, 100 eller 1000 ganger, eller kun tilsatt medium. Standardavviket mellom parallelle vises som vertikale striper på grafene. Pilene viser CIT₅₀ (tid for 50 % reduksjon av cell index sammenlignet med uinfiserte celler).



Figur 7: Immunfluorescensmikroskopi hvor døde celler er farget blå med DNA-fargen DRAQ7 to dager etter infeksjon. Bildet til venstre viser uinfiserte celler, mens bildet til høyre viser celler som fikk 10 ganger fortynnet lysat fra celler infisert med HSV-1 isolat 1.

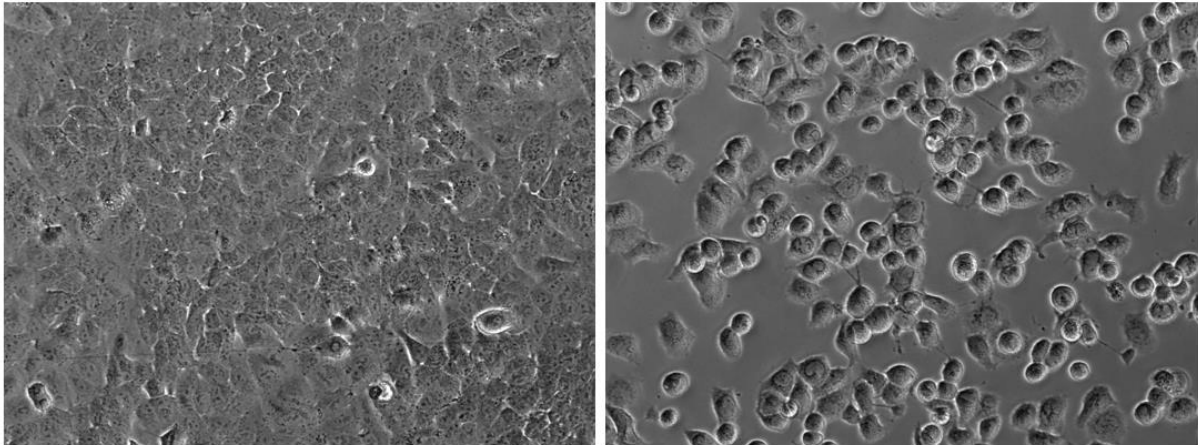
For å kvantifisere virusmengden i lysatet og supernatanten vi infiserte med, ble det gjort en semi-kvantitativ real-time PCR. Resultatet viste at det var høyere konsentrasjon av HSV-1 DNA i lysat fra infiserte A549-celler enn i supernatant høstet fra de samme cellene (Figur 8). Dessuten var det for isolat 2 lavere konsentrasjon i supernatant og høyere konsentrasjon i lysat sammenlignet med isolat 1. Resultatene samsvarte godt med CIT_{50} for de to isolatene. Ut fra disse resultatene vet vi at vi av lysat isolat 1 har benyttet henholdsvis $1,60 \times 10^6$, $1,60 \times 10^7$, $1,60 \times 10^8$ kopier/ml for 1:1000, 1:100 og 1:10 ganger fortynning, mens vi for lysat isolat 2 har benyttet henholdsvis $8,24 \times 10^6$, $8,24 \times 10^7$, $8,24 \times 10^8$ kopier/ml for 1:1000, 1:100 og 1:10 ganger fortynning. Det er viktig å merke seg at resultatene viser antall DNA-kopier, som inkluderer både infeksjøs virus og fritt virus-DNA. Sammenstilt med resultater fra xCELLigence virket konsentrasjoner opptil $1,6 \times 10^7$ aktuelle å arbeide videre med, mens høyere konsentrasjoner ga en for rask CPE. Imidlertid valgte vi å bruke nedfrosset supernatant, og i tilfelle denne hadde lavere infektivitet enn lysatet, inkluderte vi

konsentrasjoner på opptil 10^8 kopier/mL. Vi bestemte oss for å bare benytte ett klinisk isolat i det videre arbeidet og valgte isolat 1.



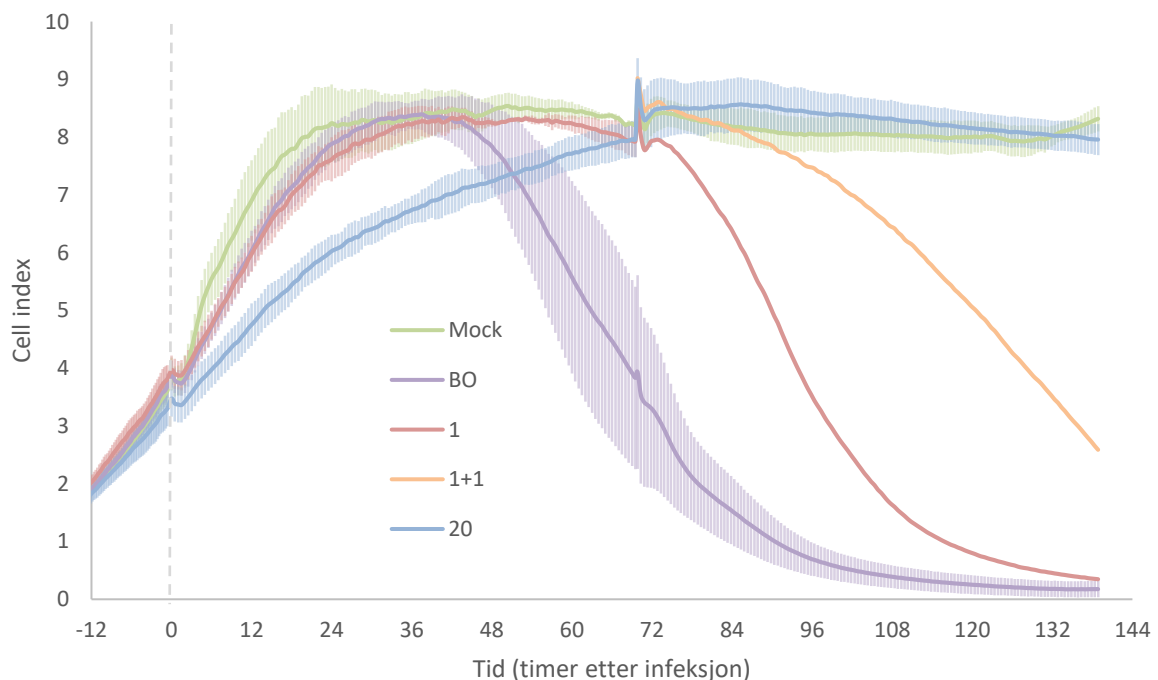
Figur 8: Resultater fra PCR for kvantifisering av HSV-1 DNA i ufortynnet supernatant og lysat fra infiserte A549-celler. For supernatant er det vist gjennomsnitt og standardavvik fra tre PCR-kjøringer. For lysat ble PCR gjort kun én gang.

Effekt av amenamevir på HSV-1 replikasjon. For å undersøke den antivirale effekten av amenamevir ble det først gjort et forsøk der A549-celler infisert med 10 ganger fortynnet lysat ble behandlet med 1 og 20 μM amenamevir, men den raske nedgangen i cell index gjorde at vi ikke kunne se noen tydelig effekt av behandlingen (resultater ikke vist). Videre ble effekten undersøkt på celler infisert med supernatant med HSV-1 isolat 1 i konsentrasjonene 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 og 10^8 kopier/mL, både med xCELLigence, fasekontrastmikroskopi og immunfluorescensmikroskopi. Ved 10^7 og 10^8 kopier/mL var effekten av behandling liten (resultater ikke vist), mens amenamevir tydelig reduserte CPE ved de tre laveste konsentrasjonene av virus. Fasekontrastmikroskopi ble gjort daglig, og viste som tidligere nevnt for HSV-1 lysatinfiserte celler at ubehandlede, infiserte celler etter hvert fikk forstørrede kjerner og en rundere form enn de uinfiserte cellene (Figur 9).



Figur 9: Fasekontrastmikroskopi som viser cytopatogen effekt av HSV-1 to dager etter infeksjon. Bildet til venstre viser celler som fikk supernatant fra uinfiserte celler, mens bildet til høyre viser celler som fikk supernatant fra infiserte celler med en konsentrasjon av HSV-1 DNA på 10^6 kopier/mL.

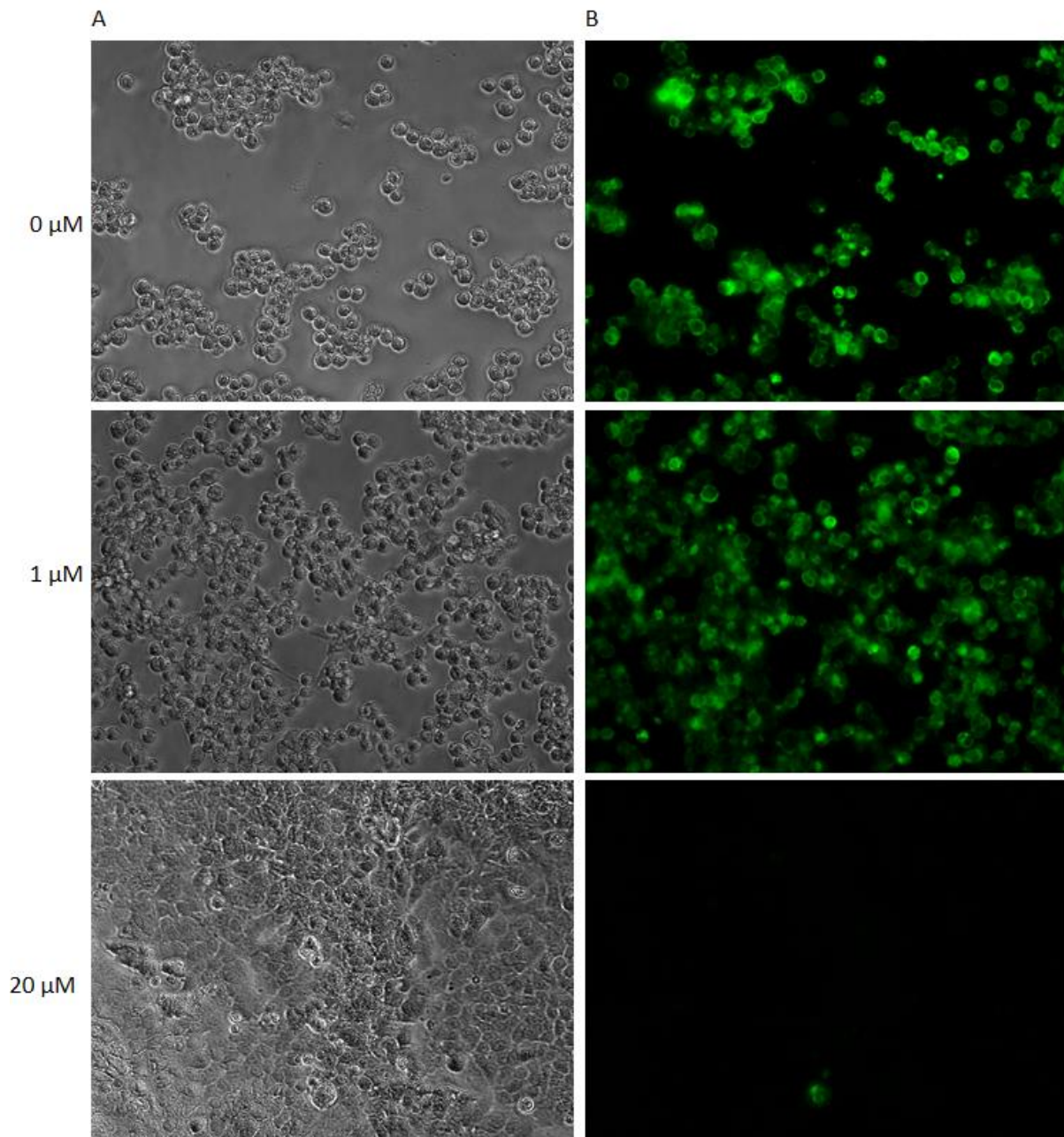
Resultater for xCELLigence-forsøkene er vist for celler infisert med 10^4 kopier/mL. I ubehandlede brønner begynte cell index å synke 38 timer etter infeksjon (Figur 10). Ved behandling med $1 \mu\text{M}$ ble CPE utsatt, men inntrådte etter hvert. Ny tilsetning av $1 \mu\text{M}$ kunne utsette denne effekten ytterligere. Ved behandling med $20 \mu\text{M}$ var det derimot ingen reduksjon av cell index sammenlignet med uinfiserte celler, selv om behandling kun ble gitt én gang.



Figur 10: xCELLigence-måling av cell index fra 12 timer før til 138 timer etter infeksjon av A549-celler med HSV-1 isolat 1 i konsentrasjon på 10^4 kopier/mL. Hver kurve viser gjennomsnitt av to ($1 \mu\text{M}$) eller tre paralleller. Den grønne kurven viser celler som fikk supernatant fra uinfiserte celler. Samtidig med infeksjon fikk cellene enten amenamevir $1 \mu\text{M}$ (rød), $20 \mu\text{M}$

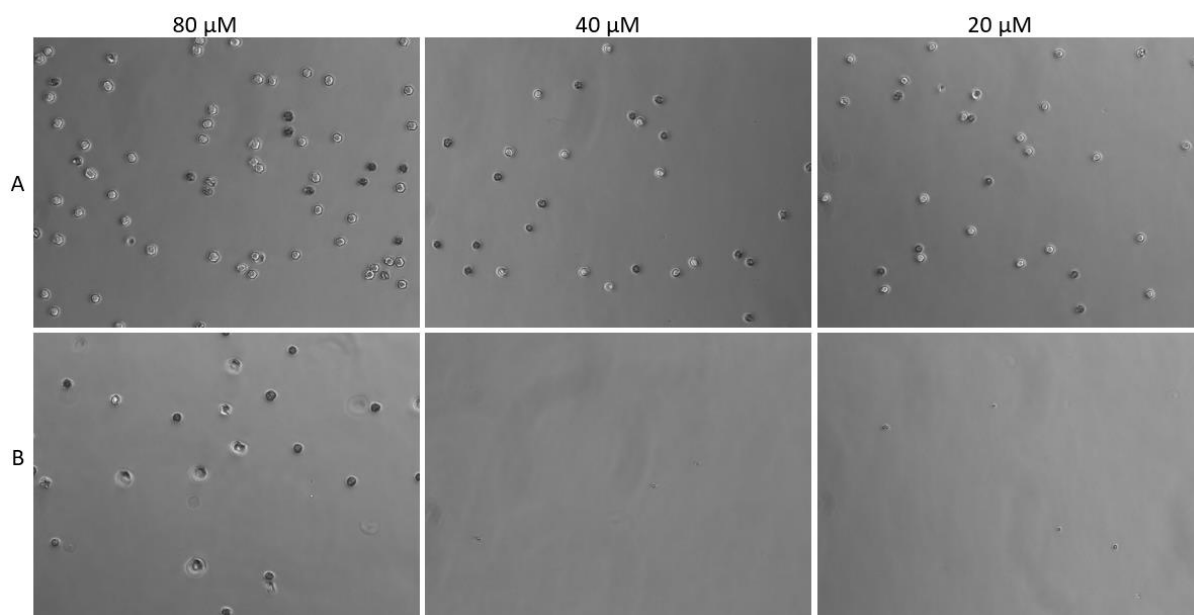
(blå) eller medium med DMSO i samme konsentrasjon (lilla). 72 timer etter infeksjon fikk én brønn ny behandling med 1 µM (oransje), mens én fikk nytt medium med DMSO i samme konsentrasjon (rød). Standardavvik mellom to [1 µM] eller tre paralleller vises som vertikale striper på grafene.

For å undersøke effekten av amenamevir på uttrykk av virale proteiner, ble celler som var metanolfiksert to og seks dager etter infeksjon og behandling farget med primærantistoff mot HSV-1 og HSV-2 cytoplasmatiske proteiner. Ingen celler uttrykte proteinet fra HSV-2. Proteinene fra HSV-1 var uttrykt i tilnærmet alle ubehandlede celler, og ikke i uinfiserte celler. To dager etter infeksjon uttrykte noen få celler behandlet med 1 µM proteinet fra HSV-1 (resultater ikke vist), mens flesteparten av cellene ble farget seks dager etter infeksjon uttrykte proteinet (Figur 11). For cellene behandlet med 20 µM var det kun én celle som ble farget for HSV-1 i to brønner seks dager etter infeksjon. Samtidig viste xCELLigence at cell index for uinfiserte celler var behandlet med 20 µM amenamevir, var identisk med cell index for DMSO behandlede celler (resultatet er ikke vist).



Figur 11: Fasekontrastmikroskopi (A) og immunfluorescensmikroskopi (B) av A549-celler seks dager etter infeksjon med HSV-1 10^4 kopier/mL. Cellene ble samtidig med infeksjon behandlet med amenamevir i konsentrasjon 1 eller 20 μM , eller fikk medium med DMSO i samme konsentrasjon som i amenamevir. Til immunfluorescensfaringen er det brukt primærantistoff mot et HSV-1 cytoplasmatisk protein.

Ved fasekontrastmikroskopi så vi også at amenamevir felte ut og dannet to typer krystaller. Ved forsøk på å fortynne amenamevir i begge typene medium som ble brukt, MEM og REGM, felte det ut i omtrent samme mengde. Det ble mer utfelling om amenamevir først ble fortynnet til en høy konsentrasjon i medium som ble videre fortynnet til lavere konsentrasjoner, enn om det ble fortynnet direkte fra 20 mM i DMSO til en lav konsentrasjon i medium (Figur 12).



Figur 12: Bildene viser utfelling av amenamevir ved ulike konsentrasjoner i medium (MEM), enten fortynnet via amenamevir 160 μM i medium (A), eller direkte fra amenamevir 20 mM i DMSO (B).

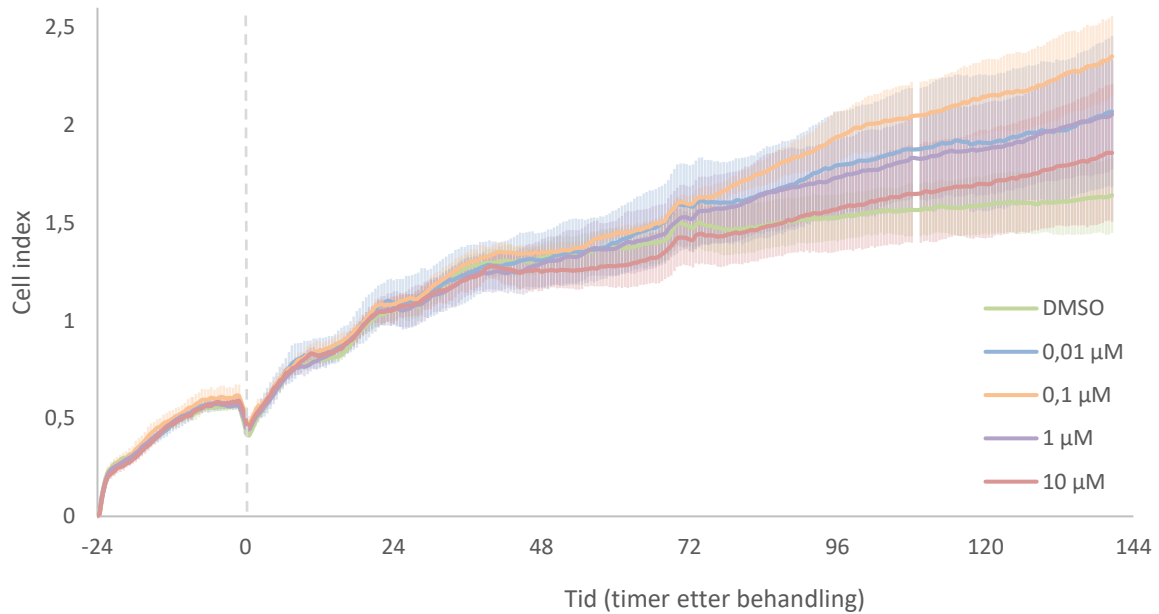
Vi konkluderte med at medikamentet amenamevir reduserte CPE i HSV-1 infiserte A549-celler ved konsentrasjon på 1 μM , og nærmest fullstendig hemmet CPE ved konsentrasjon på 20 μM når cellene ble infisert med maksimalt 10^4 kopier/ml. Amenamevir er dermed bekreftet å fungere. Som et viktig bifunn fant vi at amenamevir hadde begrenset løselighet i medium, noe som førte til utfelling av krystaller. Dette betyr sannsynligvis at mediet i forsøkene inneholdt en lavere konsentrasjon av oppløst og tilgjengelig amenamevir enn planlagt.

3.2 Effekt av amenamevir på celleviabilitet av RPTECs

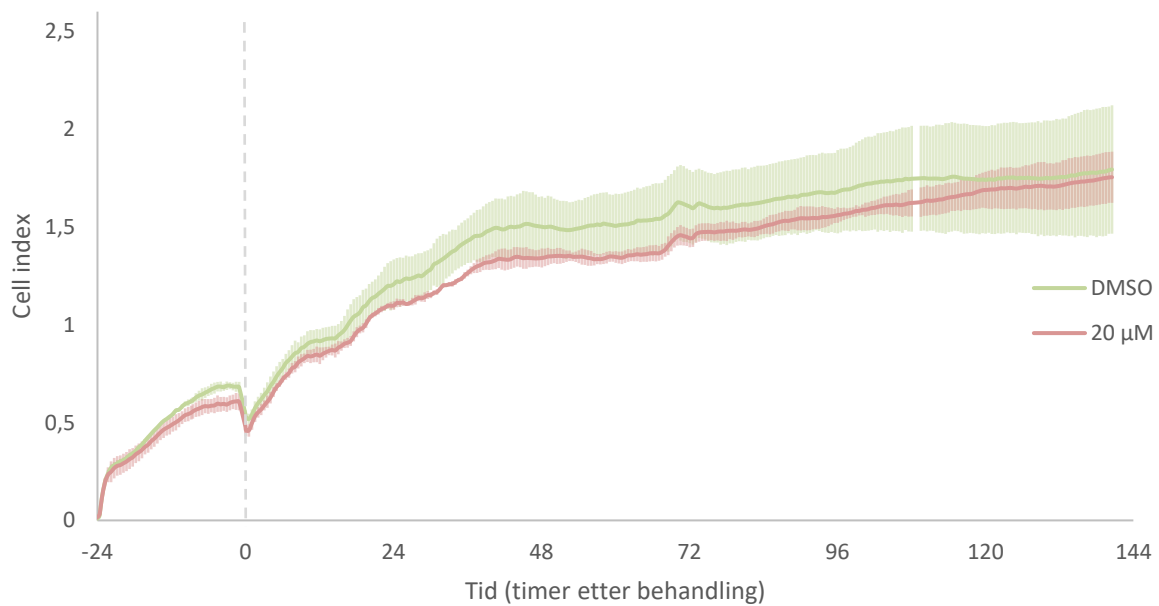
For å undersøke amenamevir sin kontinuerlige påvirkning på celleviabilitet av RPTECs, ble xCELLigence-maskinen benyttet. Ved 3000 celler per brønn nådde cell index et platå i løpet av forsøket som gikk over 6 dager, mens cell index var stigende under hele forsøket ved konsentrasjoner på 1500 og 2000 celler per brønn. Spredningen mellom brønner ble større med tiden. Ingen av forsøkene viste noen reduksjon av cell index hos celler som fikk amenamevir og celler som kun fikk medium med samme konsentrasjon av DMSO som i amenamevir. Vi så derimot en trend der amenamevir behandlede celler hadde litt høyere cell index enn DMSO-behandlede celler. Forsøket med 2000 celler per brønn er vist i Figur 13. Hos cellene behandlet med 40 μM amenamevir observerte vi en saktere økning i cell index etter rundt 48 timer, sammenlignet med lavere konsentrasjoner av amenamevir. Den

samme trenden så vi imidlertid hos cellene som kun fikk DMSO i samme konsentrasjon. Amenamevir i konsentrasjon 40 μM hadde mer DMSO enn de andre amenamevir-konsentrasjonene, som indikerte at den reduserte viabiliteten skyldtes DMSO, og ikke amenamevir.

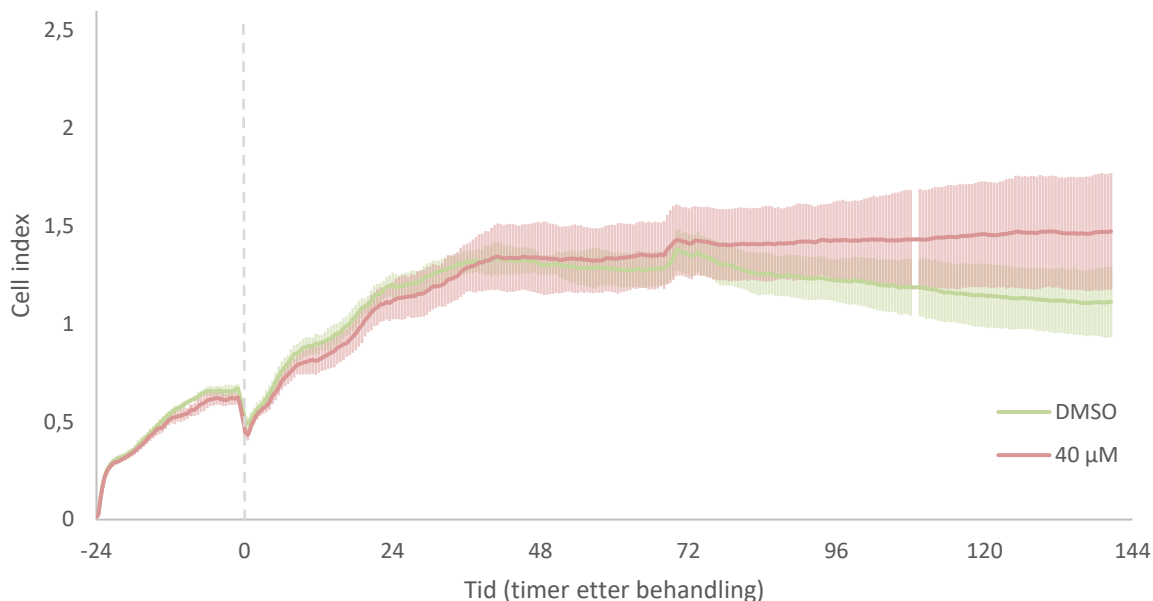
A: 0,01-10 μM



B: 20 μM

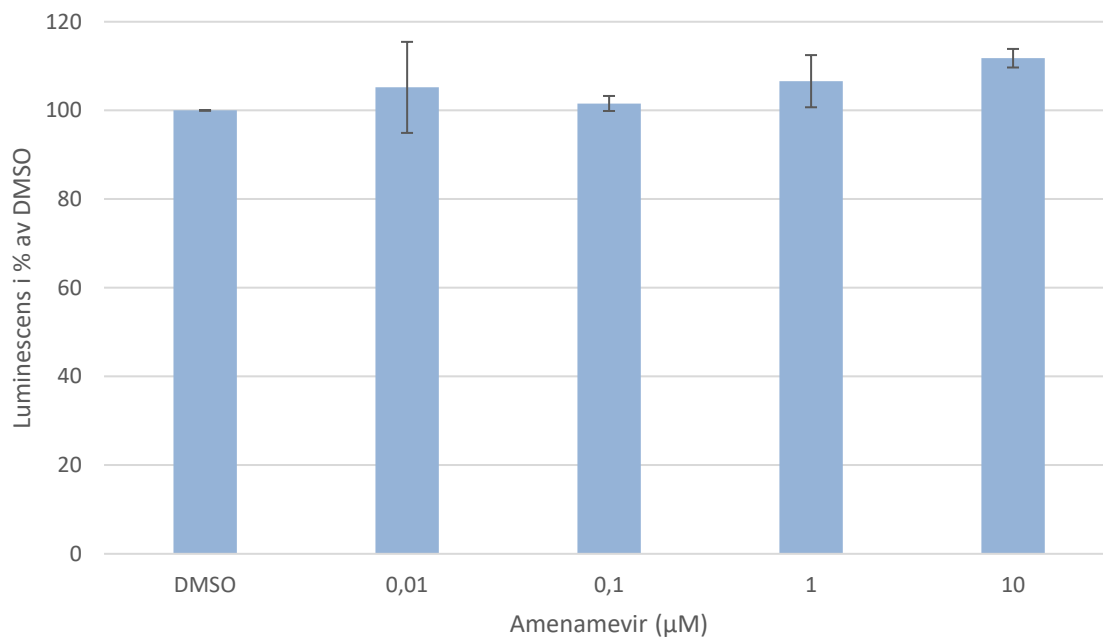


C: 40 μ M

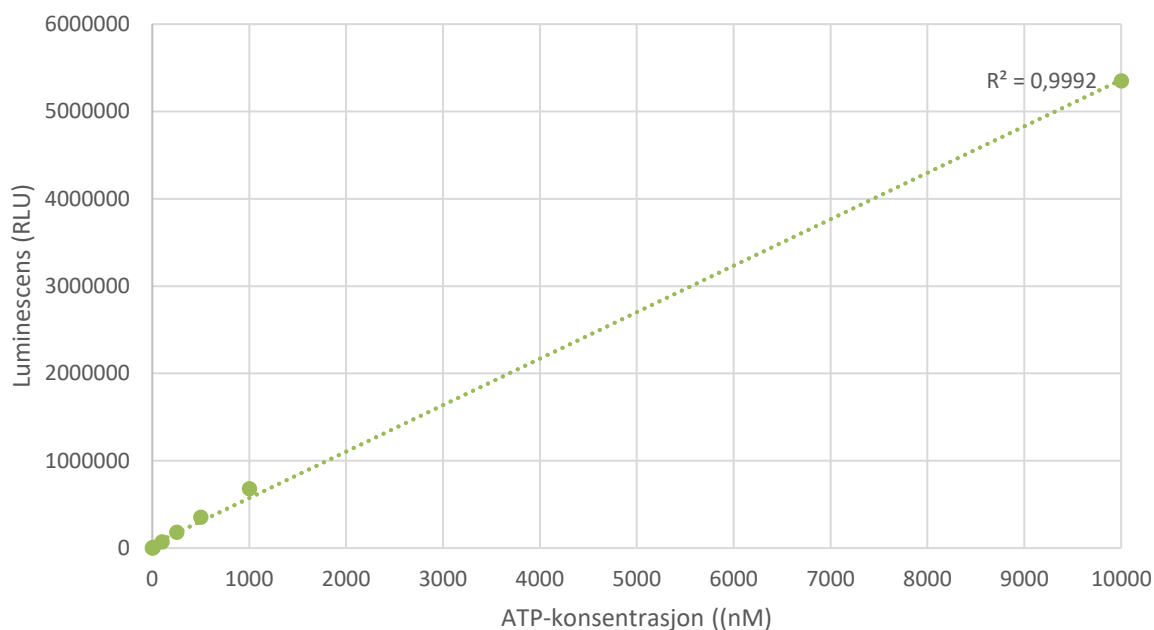


Figur 13: Ett av fire forsøk med xCELLigence-måling av RPTECs. Cell index ble målt fra utsåing av 2000 celler per brønn og i totalt 140 timer. Amenamevir ble tilsatt 24 timer etter utsåing. Grafene viser celler behandlet med ulike konsentrasjoner amenamevir, eller DMSO i samme konsentrasjon, som er ulik for 0,01-10 μ M (A), 20 μ M (B) og 40 μ M (C). Standardavviket mellom tre (amenamevir) eller fire (DMSO) paralleller vises som vertikale striper på grafene.

For å undersøke ATP-innhold i cellene tre dager etter behandling (tilsvarer 72 timer i Figur 13) benyttet vi assayet CellTiter-Glo. Resultatene viste at amenamevir ikke reduserte ATP-konsentrasjonen i forhold til ubehandlede celler, men muligens førte til en lett økning (Figur 14). For at luminescensen skal representere ATP-mengden i cellene, må den ligge innenfor det lineære området. Lineær regresjon av resultatene fra standardrekken med kjente ATP-konsentrasjoner resulterte først i en kurve som ikke dekket hele området for luminescensen i prøvene, og vi utvidet derfor de neste standardrekkene med en 10 ganger høyere ATP-konsentrasjon. Figur 15 viser en av disse kurvene. De var nærmest perfekt lineære ($r^2 = 0,9996, 0,9994$ og $0,9992$), og de to siste dekket de målte luminescensverdiene, som var på opptil 5 011 200 RLU. Vi kunne dermed konkludere med at luminescens representerte ATP-konsentrasjon i cellene.



Figur 14: ATP-måling tre dager etter behandling med amenamevir. Dette tilsvarer ca. 72 timer etter utsåing i Figur 13. Gjennomsnittlig luminescens og standardavvik for tre forsøk er vist som prosent av luminescens fra DMSO-behandlede brønner, satt som 100%.

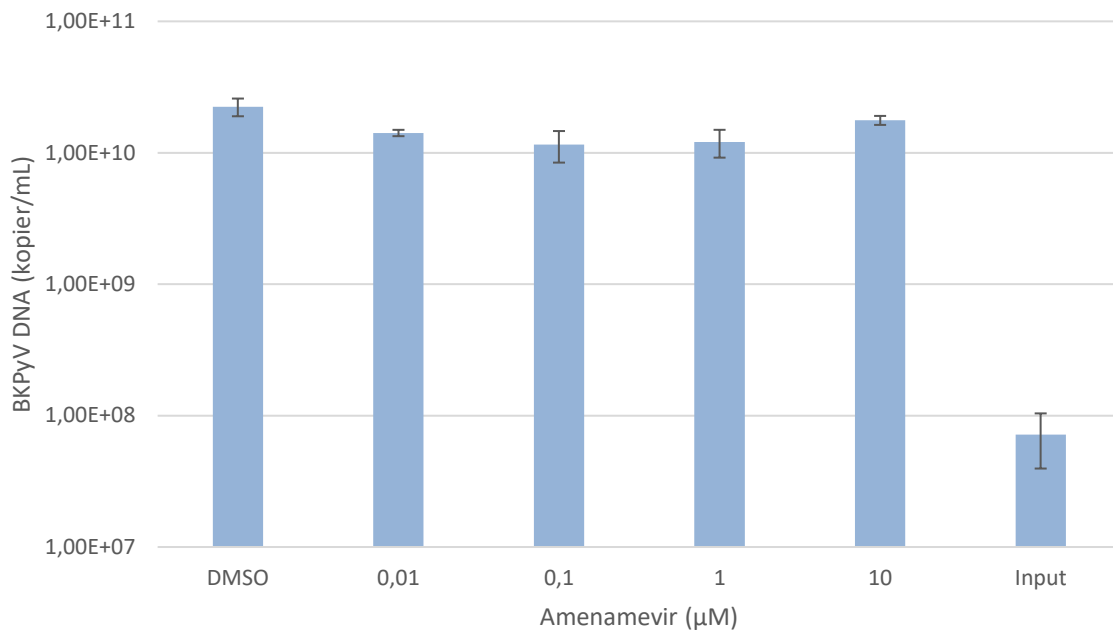


Figur 15: Luminescens som en lineær funksjon av ATP-konsentrasjon i en standardrekke med kjente ATP-konsentrasjoner: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 µM og 10 µM.

Vi konkluderte med at amenamevir i konsentrasjoner på opptil 40 µM ikke påvirket viabilitet av RPTECs.

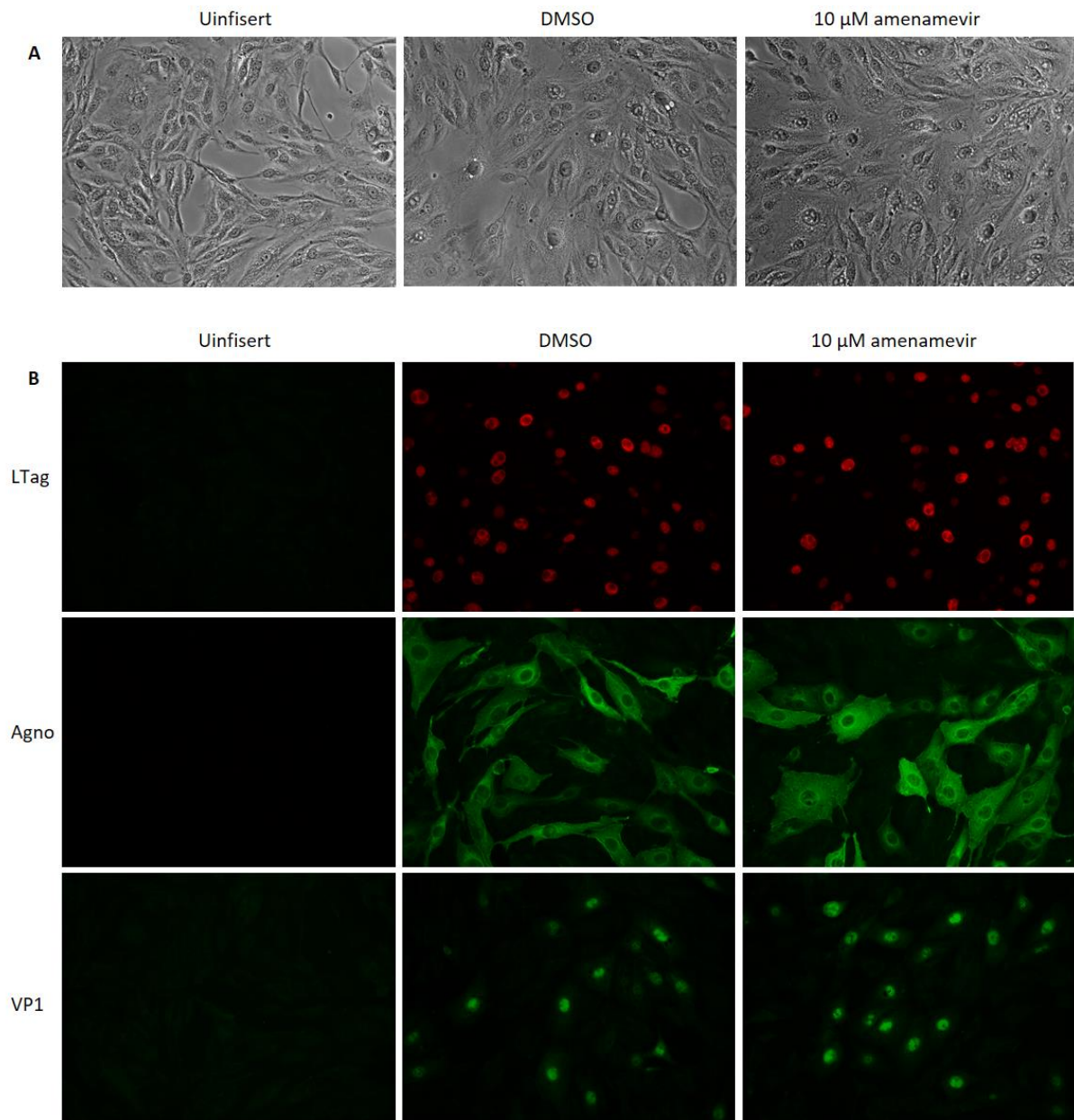
3.3 Antiviral effekt av amenamevir mot BKPyV

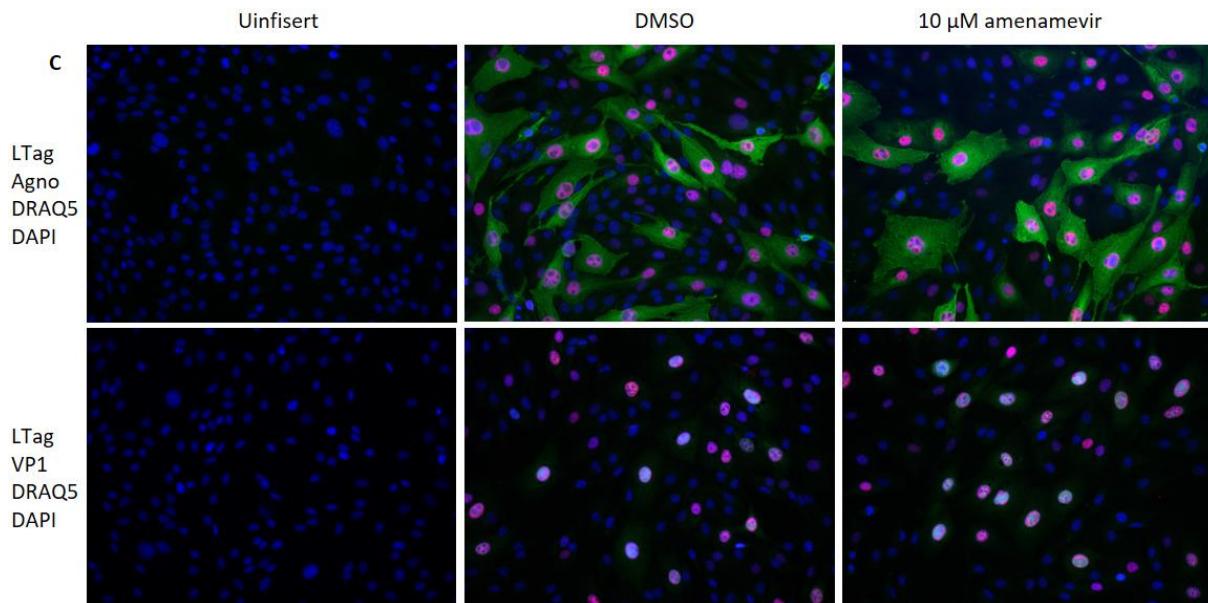
For å undersøke effekten av amenamevir på replikasjon av BKPyV, valgte vi først å undersøke frigjøring av nye viruspartikler ved å måle viralt DNA i cellekulturmedium med kvantitativ PCR, tre dager etter infeksjon og behandling. Vi fikk oppgitt resultatene fra PCR som antall DNA-kopier per 5 μL prøve ved start, fordi vi hadde med standarder med kjent konsentrasjon viralt DNA. Ut fra resultatene ble konsentrasjonen i cellemediet i kopier/mL beregnet. Som fremstilt i Figur 16 hadde amenamevir i konsentrasjoner på opptil 10 μM ingen påvirkning på ekstracellulær konsentrasjon av BKPyV tre dager etter behandling. Konsentrasjonen av ekstracellulært BKPyV DNA varierte fra $1,15 \times 10^{10}$ kopier/mL for 0,1 μM amenamevir til $2,24 \times 10^{10}$ kopier/mL for celler som fikk medium med bare DMSO. Av cellene som ble behandlet, var det de som fikk 10 μM amenamevir som hadde høyest konsentrasjon ekstracellulært BKPyV DNA, $1,77 \times 10^{10}$ kopier/mL. Variasjonen mellom ulik behandling var altså liten, og viste ingen sammenheng med konsentrasjonen av amenamevir. Standardavvik mellom tre forsøk var på opptil $3,45 \times 10^9$. Vi så en økning på minst 2 log fra input i alle prøvene, noe som viser at vi måler mengde nyreplikert virus og ikke bare det viruset vi infiserte cellene med. Det ble også gjort PCR av medium fra uinfiserte brønner, og i to av tre forsøk ble det påvist en liten mengde BKPyV DNA i dette mediet, opptil $7,4 \times 10^5$. Alle de negative kontrollene med destillert vann var negative.



Figur 16: Måling av ekstracellulær konsentrasjon av BKPyV-DNA tre dager etter behandling og infeksjon. Dette tilsvarer ca. 72 timer etter behandling i Figur 13. Virusmengden er vist som gjennomsnitt av tre forsøk i kopier/mL. Inputprøven viser hvor mye av virusmengden som skyldes ekstracellulære rester som fremdeles var igjen etter infeksjon og skiftning av medium.

For å undersøke effekten av amenamevir på uttrykk av virale proteiner, ble celler som var metanolfiksert tre dager etter infeksjon og behandling farget med primærantistoff mot LTag, VP1 og agnoprotein, og dessuten ble DNA farget med DRAQ5 eller DAPI. Cellene ble så mikroskopert med fasekontrast- og immunfluorescensmikroskopi. Som synlig på fasekontrastbildene (Figur 17A) hadde enkelte infiserte celler forstørrede kjerner og synlige virusinkludjoner. Immunfluorescensmikroskopi viste at amenamevir ikke påvirket uttrykk av BKPyVs proteiner (Figur 17B og C). Fargingen av virale proteiner viste at LTag var lokalisert til kjernen i de infiserte cellene, mens agnoprotein fantes i cytoplasma og da spesielt i området rundt kjernen. Fargingen for VP1 var sterkest i kjernen. Cellekjernene hos både infiserte og uinfiserte celler vises som runde og blå grunnet DNA-farget med DRAQ5 eller DAPI. En stor andel av de infiserte cellene uttrykte alle de tre virale proteinene, og behandlingen reduserte ikke synlig mengden proteiner som ble uttrykt. Vi så dessuten at noen celler uttrykte kun det tidlige proteinet LTag, og ikke de sene proteinene agnoprotein og VP1. Ingen uinfiserte celler uttrykte BKPyV proteiner.





Figur 17: Fasekontrastmikroskopi (A) og immunfluorescensmikroskopi (B og C) av RPTECs som ble metanolfiksert tre dager etter behandling og infeksjon. Bildene viser uinfiserte celler, celler som fikk medium med bare DMSO og celler som fikk 10 μ M amenamevir. B viser hver for seg farging for LTag (rød), agnoprotein (grønn) og VP1 (grønn). C viser celler farget med DNA-farge (DRAQ5 eller DAPI, blå) og primærantistoff mot LTag (rød) samt enten agnoprotein eller VP1 (grønn).

Vi konkluderte med at amenamevir i konsentrasjoner opptil 10 μ M ikke påvirket replikasjon eller proteinuttrykk av BKPyV i RPTECs.

4 Diskusjon

Det er stort behov for en effektiv behandling av sykdom forårsaket av BKPyV. Vi har for første gang testet om en ny helikase- og primasehemmer, amenamevir, kan påvirke BKPyV-replikasjon i RPTECs. Som vi så fra PCR- og immunfluorescensresultatene, påvirket behandlingen hverken mengden ekstracellulært virus-DNA eller mengden virusproteiner intracellulært. Resultatene fra xCELLigence og ATP-måling viste at amenamevir heller ikke reduserte celleviabiliteten av RPTECs.

4.1 Tolkning av funn

Amenamevir har fra før kjent effekt mot herpesvirusene HSV-1, HSV-2 og VZV, med EC_{50} på henholdsvis 0,036, 0,028 og 0,038-0,10 μM , og EC_{90} på 0,46, 0,23 og 0,46 μM (7). For å undersøke om medikamentet vi hadde fått tilsendt hadde forventet effekt, ble det testet mot HSV-1. Vi brukte supernatant og lysat fra celler infisert med to kliniske isolater. Ifølge semi-kvantitativ PCR var det mest virus i lysat med klinisk isolat 2, etterfulgt av lysat med klinisk isolat 1, supernatant med klinisk isolat 1 og supernatant med klinisk isolat 2. Dette skyldes trolig at cellene i flasken med isolat 1 allerede hadde løsnet og at intracellulært virus var frigjort til supernatant, mens flere celler infisert med isolat 2 fremdeles satt fast i flasken og inneholdt intracellulært virus.

I forsøkene med HSV-1 så vi ved fasekontrastmikroskopi tydelig CPE, som samsvarte godt med xCELLigence. Overraskende førte ikke HSV-1 til flere døde celler to dager etter infeksjon, til tross for sterkt fall i cell index (Figur 6 og Figur 7). HSV-1 frigjøres ved eksocytose, og trenger altså ikke å drepe cellene for å frigjøres (85). Sannsynligvis vil cellene dø etter lengre tid med svært høy virusreplikasjon. Ut fra mikroskopering hvor cellene fikk en rundere form, kan det slutes at fallet i cell index skyldes at cellene fikk mindre overflate og svakere adhesjon til underlaget (Figur 9). Den samme effekten av HSV-1 er tidligere rapportert for flere celletyper (106, 107), og skyldes tap av fibronektin på overflaten av cellene (108). CPE inntrådte for oss overraskende raskt med CIT_{50} på bare 3 timer ved den høyeste viruskonsentrasjonen (Figur 6), men lignende resultater er rapportert tidligere hvor celle og cellekjerne dobles i størrelse 4 timer etter infeksjon med HSV-1 (98). HSV kan i tillegg gi fusjon av celler til multinukleære kjempeceller (107), men det observerte vi ikke i disse forsøkene. Hemming av celleproliferasjon er en annen faktor som kan ha bidratt til fall i

cell index. Fasekontrastmikroskopi viste at det var færre celler i infiserte brønner (Figur 9), og det er kjent at HSV hemmer vertscellens replikasjon (85).

Den antivirale effekten mot HSV-1 av både 1 og 20 μM amenamevir var tydelig ved konsentrasjoner av HSV-1 DNA på 10^4 , 10^5 og 10^6 kopier/mL. Dette tilsvarer MOI på opptil 200 for 10^6 kopier/mL og opptil 2 for 10^4 kopier/mL, men sannsynligvis lavere da dette inkluderte fritt DNA, og noen av cellene nok hadde delt seg etter utsåing. 20 μM amenamevir hemmet fullstendig CPE i celler infisert med 10^4 kopier/mL HSV-1. Imidlertid hadde vi forventet en enda mer uttalt effekt allerede ved 1 μM amenamevir, da EC_{90} -verdien fra Chono et al. var 0,23 μM , over fire ganger lavere (7). Dette kan trolig forklares av at konsentrasjonen av amenamevir vi brukte var lavere enn tilsiktet på grunn av utfelling. At kun én behandling med høy konsentrasjon amenamevir fullstendig hemmet CPE, passer godt med funn fra tidligere studier. I en klinisk studie på genital herpes viste én høy dose amenamevir seg å være bedre, om enn ikke signifikant, enn standardbehandling med valaciklovir to ganger daglig i tre dager eller gjentatt administrasjon av lavere doser amenamevir (70).

Et viktig bifunn som ble gjort var at amenamevir feller ut og danner krystaller ved forsøk på å løse det i medium. Det ble dannet mer enn proporsjonalt flere krystaller ved økende konsentrasjon amenamevir. Krystallene løste seg tydeligvis ikke opp ved videre fortykning når de først var dannet, men ved å løse amenamevir direkte fra 20 mM i DMSO til en lavere konsentrasjon i medium, kunne mindre utfelling oppnås (Figur 12). Slike krystaller ble kun observert ved noen av HSV-1-forsøkene. I forsøkene med BKPyV og RPTECs observert vi ingen utfelling, men vi kan ikke utelukke at det ble oversett (Figur 17). Årsaken til denne forskjellen var ikke ulik type medium, da det også ble dannet krystaller ved forsøk på å løse i amenamevir i REGM etter endte forsøk. Mest sannsynlig virker årsaken til utfelling å være at amenamevir hadde kortere holdbarhet i $-80\text{ }^\circ\text{C}$ enn antatt, som førte til at løseligheten i medium avtok med tiden. Dette kan ha påvirket resultatene, men trolig var resultatene for RPTECs og BKPyV, hvor utfelling ikke ble observert, mindre påvirket enn resultatene for HSV-1. Dessuten ble amenamevir i det første forsøket på BKPyV og RPTECs løst direkte til 20 μM , og ikke via 93 eller 80 μM som i resten av forsøkene. Ved 20 μM var det svært lite utfelling (Figur 12), og at disse resultatene var like resultatene fra de neste forsøkene, tyder på at

utfellingen i svært liten grad påvirket resultatene for BKPyV og RPTECs, men muligens hadde større påvirkning på resultatene for HSV-1.

Ifølge leverandøren skulle amenamevir, som til alle forsøkene ble brukt innen to måneder, ha en holdbarhet på seks måneder ved -80 °C. Leverandøren anbefalte å løse amenamevir til 10 mM i DMSO. Vi valgte i stedet å løse til 20 mM for å få lavere DMSO-konsentrasjon, og pulveret løste seg tilsynelatende godt. Ved ultrasonisering og varming, som vi ikke brukte, skal løseligheten være minst 332 mM i DMSO. Løselighet i medium var ikke spesifisert. Vi finner ikke at utfelling av amenamevir er beskrevet i litteraturen, men heller ikke beskrivelser av at man har sett etter det, bortsett fra i en avhandling hvor det ikke er nevnt om man fant utfelling eller ikke (109). Observasjonene våre av utfelling i medium sår tvil om validiteten av andre *in vitro*-studiers konklusjoner om effekten av amenamevir på virus og celler, spesielt studier på celleviabilitet ved høye konsentrasjoner av amenamevir. Likevel kan amenamevir trolig anses som trygt, da kliniske studier viser lite bivirkninger (68, 70, 81).

Uttesting av amenamevir mot BKPyV i RPTECs viste at amenamevir ikke hadde effekt i konsentrasjonene som ble testet (opptil 10 µM), hverken ved qPCR (Figur 16) eller immunfluorescensmikroskopi (Figur 17). Amenamevir påvirker altså sannsynligvis ikke LTags helikaseaktivitet, i motsetning til for alfaherpesvirusene HSV-1, HSV-2 og VZV. Dette kan forklares av at herpesvirusenes helikaser og polyomavirusenes LTag tilhører ulike superfamilier, henholdsvis 1B og 3A. LTag er i motsetning herpesvirusenes helikase ringformet og beveger seg i 3'-5' retning (27). Amenamevir fremstår som svært selektivt for alfaherpesvirus, da det heller ikke har effekt mot betaherpesviruset CMV eller andre virus det har blitt testet mot (7).

Under undersøkelsene av antiviral aktivitet mot BKPyV fikk vi noen uventede funn. Ved qPCR av medium fra uinfiserte RPTECs, ble det påvist en liten mengde BKPyV DNA, som var over 15 000 ganger lavere enn hos infiserte celler og 97 ganger lavere enn input. Hva dette skyldes er usikkert. En mulighet er at brønnene i 48-brønnersplaten eller PCR-platen kan ha blitt kontaminert med en liten mengde virus under arbeidet. En annen mulighet kan være at cellene som ble brukt allerede hadde en latent infeksjon med BKPyV, noe de ikke hadde blitt testet for på forhånd. Uansett årsak var imidlertid mengden så liten i forhold til infiserte brønner at den ikke påvirket resultatene. En annen interessant observasjon vi gjorde, var at noen celler ble farget for det tidlige proteinet LTag, men ikke de sene proteinene

agnoprotein og VP1. Dette tror vi kan skyldes at det var blitt frigjort nye virus som tre dager etter infeksjon allerede hadde infisert nye celler, men ikke rukket å uttrykke de sene proteinene enda. Teorien stemmer med lengden på BKPyVs replikasjonsyklus, som er på ca. 48-72 timer (32)

Ved undersøkelse av effekt på celleviabilitet av RPTECs med xCELLigence og ATP-assay, førte konsentrasjoner av amenamevir på opptil 40 μM ikke til noen reduksjon av viabilitet (Figur 13 og Figur 14). Disse resultatene samsvarer med funn fra Chono et al., som testet ut amenamevir *in vitro*, hvor de fant CC_{50} på minst 30 μM ved to andre metoder enn de vi brukte, og *in vivo* på mus (7). Også kliniske studier tyder på at amenamevir er trygt å bruke (68, 70, 81). Farmakokinetiske studier viser at amenamevir oppnår en åtte ganger høyere konsentrasjon i nyre enn i hud, som i de fleste tilfeller av behandling mot HSV-1, HSV-2 og VZV er målorganet (76). Effekten på nyreceller er oss kjent ikke tidligere undersøkt. Overraskende nok virket det som om amenamevir til en viss grad stimulerte cellene, da både cell index og ATP-konsentrasjon i flere forsøk var noe høyere enn for DMSO-behandlede celler. I xCELLigence-forsøket for effekt av amenamevir mot HSV-1, ga 20 μM amenamevir en noe forsinket økning i cell index både hos uinfiserte celler (resultater ikke vist) og celler infisert med 10^4 kopier/mL, sammenlignet med lavere konsentrasjoner av amenamevir (Figur 10). Imidlertid tror vi at dette kan være forårsaket av utfelling av krystaller, fordi en slik forsinkelse ikke oppsto i forsøk på RPTECs, hvor utfellingen var mindre.

4.2 Sterke og svake sider

I denne studien er det gjort flere tiltak for at resultatene skal kunne anses som sikre. Amenamevir ble først testet ut på et virus det har kjent effekt mot. Uten å ha gjort dette kunne vi ikke konkludert med manglende effekt mot BKPyV, da det ville vært en liten risiko for at medikamentet vi hadde fått tilsendt ikke var aktivt eller var for lite løselig til å gi effekt. For å minimere påvirkning av resultatene fra tilfeldige feil, ble de fleste forsøkene gjentatt minst tre ganger, og det var to til fire paralleller per forsøk. Vi var dessuten nøye med å behandle alle cellene på samme måte, med unntak av konsentrasjon av amenamevir og virus, for å unngå at andre faktorer som for eksempel DMSO og nytt medium kunne spille inn. Resultatene ved gjentatte forsøk var omtrent like, som tydet på at de var til å stole på. Det var dessuten godt samsvar mellom resultatene ved bruk av ulike metoder, hvor xCELLigence og ATP-måling begge indikerte manglende effekt på celleviabilitet av RPTECs,

mens PCR og immunfluorescensmikroskopi ikke viste noen antiviral effekt mot BKPyV. For å undersøke effekt på celleviabilitet ble cell index kontinuerlig målt i seks døgn, og konsentrasjoner opptil 40 μM brukt. Effekten ble dessuten undersøkt både på prolifererende og ikke-prolifererende celler. Trolig ville en eventuell cytostatisk eller cytotoxisk effekt, uansett når den hadde inntruffet, kommet tydelig fram med denne metoden.

Det er likevel flere ting vi kunne ha gjort for å ytterligere styrke resultatene. Forsøkene med HSV-1 viste at konsentrasjon av celler og virus og tid for målinger har mye å si for hvor stor antiviral effekt som observeres. Ved de høyeste viruskonsentrasjonene (fra 10^7 kopier/mL) var effekten av amenamevir svært liten, og ved den laveste konsentrasjonen (10^4 kopier/mL) tok det relativt lang tid før ubehandlede celler skilte seg fra de som fikk behandling (Figur 10). Ved undersøkelse av antiviral effekt mot BKPyV brukte vi kun én konsentrasjon av celler, én konsentrasjon av virus og undersøkte resultatene kun på ett tidspunkt tre dager etter infeksjon. For å få enda sikrere resultater kunne flere konsentrasjoner av celler og virus vært brukt, og målinger gjort ved flere tidspunkter. Dessuten kunne vi ha prøvd høyere konsentrasjoner av amenamevir enn 10 μM mot BKPyV, spesielt fordi det felte ut ved høye konsentrasjoner slik at den reelle konsentrasjonen var lavere enn tilsiktet. Likevel burde nok de sensitive metodene som ble brukt ha vist i hvert fall en liten reduksjon av replikasjon eller proteinuttrykk om amenamevir hadde effekt mot BKPyV, da effekten mot HSV-1 var svært tydelig allerede ved 1 μM . Tvert imot var det slik at den høyeste konsentrasjonen amenamevir ga en litt høyere mengde BKPyV DNA enn lavere konsentrasjoner (Figur 16). I tidligere studier på BKPyV er det dessuten god erfaring med bruk av MOI 1 og målinger tre dager etter infeksjon (32, 103). Vi kan altså alt i alt være ganske sikre på at konklusjonen er riktig.

4.3 Implikasjoner

Selv om amenamevir sannsynligvis ikke har effekt mot BKPyV, er funnene i denne studien likevel relevante fordi de underbygger tidligere resultater om amenamevir sin gode effekt mot herpesvirus og manglende påvirkning av celleviabilitet. Amenamevir er ikke tidligere testet ut på nyreepitelceller, hvor medikamentet oppnår en høy konsentrasjon ved behandling av mus og trolig også mennesker (76). Funnene våre tyder på at amenamevir er trygt for nyrene, noe som er viktig med tanke på behandling mot herpesvirus. En alvorlig bivirkning som kan forekomme ved intravenøs administrasjon av det vanligst brukte

medikamentet mot herpesvirus, aciklovir, er akutt nyresvikt som følge av krystallisering av medikamentet i nyrene (110). Amenamevir kan dermed være et tryggere alternativ.

Imidlertid er erfaringen med amenamevir for kort til å vite om også det kan krystallisere i nyrene, noe utfellingen i våre forsøk muligens kan tyde på.

Resultatene tydeliggjør dessuten det store potensialet av målrettet antiviral behandling.

LTag, som er nødvendig for replikasjon av viruset (6), er fremdeles et svært lovende mål for spesifikk behandling mot BKPyV. Et medikament selektivt rettet mot LTags helikase- eller ATPaseaktivitet vil trolig, som helikase- og primasehemmere mot herpesvirus, være effektivt og gi lite bivirkninger. Leting etter spesifikke midler mot LTag er imidlertid utfordrende og ressurskrevende. Fluorokinoloner er tidligere funnet å hemme BKPyVs LTag in vitro, men er cytostatisk (111), og randomiserte, kontrollerte studier tyder ikke på at fluorokinoloner kan forebygge eller behandle PyVAN (112, 113). LTag tilhører samme superfamilie som papillomavirusenes helikaser (27). Mot disse er det påvist flere potente hemmere, blant annet derivater av bifenylacetylsulfat (114). Disse kan være aktuelle kandidater for uttesting mot BKPyVs LTag.

5 Konklusjon

Resultatene viser at den nye helikase- og primasehemmeren amenamevir ikke hemmer BKPyVs replikasjon *in vitro* ved konsentrasjoner opptil 10 μM . Amenamevir reduserer heller ikke viabiliteten av nyreepitelceller ved konsentrasjoner opptil 40 μM , noe som tyder på at medikamentet er trygt og gir lite bivirkninger. BKPyVs LTag er fremdeles et lovende mål for antivirale medikamenter, og bør forskes videre på.

6 Referanser

1. Hirsch HH, Randhawa P, Practice TIDCo. BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:179-88.
2. Statistikk: Stiftelsen Organdonasjon; 2019 [updated 05.05.2019; cited 2019 05.05]. Available from: <https://organdonasjon.no/om-oss/statistikk/>.
3. Husøy MAR, Brinch L, Tjønnfjord GE, Gedde-Dahl TDY, Heldal D, Holme PA, et al. Allogen stamcelletransplantasjon hos voksne 1985-2012. *Tidsskrift for Den norske legeforening*. 2014;134(16):1569-75.
4. Cesaro S, Dalianis T, Hanssen Rinaldo C, Koskenvuo M, Pegoraro A, Einsele H, et al. ECIL guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(1):12-21.
5. Hirsch HH, Randhawa PS. BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation - Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. 2019. p. e13528.
6. Pipas JM. Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. *J Virol*. 1992;66(7):3979-85.
7. Chono K, Katsumata K, Kontani T, Kobayashi M, Sudo K, Yokota T, et al. ASP2151, a novel helicase–primase inhibitor, possesses antiviral activity against varicella–zoster virus and herpes simplex virus types 1 and 2. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;65(8):1733-41.
8. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog*. 2009;5(3):e1000363.
9. Rinaldo CH, Hirsch HH. Antivirals for the treatment of polyomavirus BK replication. *Expert Rev Ant Infect Ther*. 2007;5(1):105-15.
10. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*. 1971;1(712):1253-7.
11. Calvignac-Spencer S, Feltkamp MCW, Daugherty MD, Moens U, Ramqvist T, Johne R, et al. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Archives of Virology*. 2016;161(6):1739-50.

12. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet*. 1971;1(7712):1257-60.
13. Imperiale MJ. The Human Polyomaviruses: An Overview. *Human Polyomaviruses*: John Wiley & Sons, Inc.; 2002. p. 53-71.
14. Takemoto KK, Mullarkey MF. Human papovavirus, BK strain: biological studies including antigenic relationship to simian virus 40. *J Virol*. 1973;12(3):625-31.
15. Chen XS, Stehle T, Harrison SC. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J*. 1998;17(12):3233-40.
16. James PG, Diana LG, Ivan R, William TM, Donald LDC. Inside polyomavirus at 25-Å resolution. *Nature*. 1992;355(6361):652.
17. Daniels R, Rusan N, Wadsworth P, Hebert D. SV40VP2 and VP3 insertion into ER membranes is controlled by the capsid protein VP1: Implications for DNA translocation out of the ER. *Mol Cell*. 2006;24(6):955-66.
18. Henriksen S, Hansen T, Bruun JA, Rinaldo CH. The Presumed Polyomavirus Viroporin VP4 of Simian Virus 40 or Human BK Polyomavirus Is Not Required for Viral Progeny Release. *J Virol*. 2016;90(22):10398-413.
19. Polyomaviridae: Swiss Institute of Bioinformatics; [updated 11.03.2019; cited 2019 04.05]. Available from: [https://viralzone.expasy.org/148?outline=all by species](https://viralzone.expasy.org/148?outline=all%20by%20species).
20. Yang RC, Wu R. BK virus DNA: complete nucleotide sequence of a human tumor virus. *Science*. 1979;206(4417):456-62.
21. Philippe N, Legendre M, Doutre G, Couté Y, Poirot O, Lescot M, et al. Pandoraviruses: Amoeba Viruses with Genomes Up to 2.5 Mb Reaching That of Parasitic Eukaryotes. *Science*. 2013;341(6143):281-6.
22. Moens U, Johansen T, Johnsen JI, Seternes OM, Traavik T. Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis. *Virus Genes*. 1995;10(3):261-75.
23. Rinaldo CH, Tylden GD, Sharma BN. The human polyomavirus BK (BKPyV): virological background and clinical implications. *APMIS*. 2013;121(8):728-45.

24. Abend JR, Joseph AE, Das D, Campbell-Cecen DB, Imperiale MJ. A truncated T antigen expressed from an alternatively spliced BK virus early mRNA. *JGenViro*. 2009;90(Pt 5):1238-45.
25. Ahuja D, Saenz-Robles MT, Pipas JM. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene*. 2005;24(52):7729-45.
26. Dawei L, Rui Z, Wayne L, Dahai G, Rongguang Z, James AD, et al. Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature*. 2003;423(6939):512.
27. Azad K, Banerjee M, Johnson JE. Enzymes and Enzyme Activity Encoded by Nonenveloped Viruses. *Annu Rev Virol*. 2017;4(1):221-40.
28. Rinaldo CH, Traavik T, Hey A. The agnogene of the human polyomavirus BK is expressed. *JVirol*. 1998;72(7):6233-6.
29. Cubitt CL. Molecular genetics of the BK virus. *AdvExpMedBiol*. 2006;577:85-95.
30. Gerits N, Johannessen M, Tümmler C, Walquist M, Kostenko S, Snapkov I, et al. Agnoprotein of polyomavirus BK interacts with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication. *Virology journal*. 2015;12:7.
31. Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, et al. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathog*. 2010;6(3):e1000801.
32. Bernhoff E, Gutteberg TJ, Sandvik K, Hirsch HH, Rinaldo CH. Cidofovir inhibits polyomavirus BK replication in human renal tubular cells downstream of viral early gene expression. *AmJTransplant*. 2008;8(7):1413-22.
33. Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. An N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus. *JVirol*. 2005;79(22):14442-5.
34. Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *JVirol*. 2006;80(3):1361-6.
35. Eash S, Querbes W, Atwood WJ. Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *JVirol*. 2004;78(21):11583-90.
36. Eash S, Atwood WJ. Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *JVirol*. 2005;79(18):11734-41.
37. Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ. Early events during BK virus entry and disassembly. *JVirol*. 2009;83(3):1350-8.

38. Nakanishi A, Li PP, Qu Q, Jafri QH, Kasamatsu H. Molecular dissection of nuclear entry-competent SV40 during infection. *Virus Res.* 2007;124(1-2):226-30.
39. Bennett SM, Zhao L, Bosard C, Imperiale MJ. Role of a nuclear localization signal on the minor capsid Proteins VP2 and VP3 in BKPyV nuclear entry. *Virology.* 2015;474:110-6.
40. White MK, Safak M, Khalili K. Regulation of gene expression in primate polyomaviruses. *JVirol.* 2009;83(21):10846-56.
41. Fattaey AR, Consigli RA. Synthesis, posttranslational modifications, and nuclear transport of polyomavirus major capsid protein VP1. *The Journal of Virology.* 1989;63(7):3168.
42. Clever J, Kasamatsu H. Simian virus 40 Vp2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal. *Virology.* 1991;181(1):78-90.
43. Erickson KD, Bouchet-Marquis C, Heiser K, Szomolanyi-Tsuda E, Mishra R, Lamothe B, et al. Virion assembly factories in the nucleus of polyomavirus-infected cells. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002630.
44. Evans GL, Caller LG, Foster V, Crump CM. Anion homeostasis is important for non-lytic release of BK polyomavirus from infected cells. *Open Biology.* 2015;5(8).
45. Viscidi RP, Rollison DE, Sondak VK, Silver B, Messina JL, Giuliano AR, et al. Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, BK virus, and JC virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(10):1737-43.
46. Stolt A, Sasnauskas K, Koskela P, Lehtinen M, Dillner J. Seroepidemiology of the human polyomaviruses. *JGenViro.* 2003;84(Pt 6):1499-504.
47. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, et al. Prevalence of Polyomavirus BK and JC Infection and Replication in 400 Healthy Blood Donors. *JInfectDis.* 2009;199:837-46.
48. Chesters PM, Heritage J, McCance DJ. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *JInfectDis.* 1983;147(4):676-84.
49. Bofill-Mas S, Formiga-Cruz M, Clemente-Casares P, Calafell F, Girones R. Potential Transmission of Human Polyomaviruses through the Gastrointestinal Tract after Exposure to Virions or Viral DNA. *JVirol.* 2001;75(21):10290-9.
50. Huang G, Zeng G, Huang Y, Ramaswami B, Randhawa P. Evaluation of the Gastrointestinal Tract as Potential Route of Primary Polyomavirus Infection in Mice. *San Francisco*2016. p. e0150786.

51. Goudsmit J, Wertheim van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *JMedVirol*. 1982;10(2):91-9.
52. Sahney S, Yorgin P, Zuppan C, Cutler D, Kambham N, Chinnock R. BK virus nephropathy in the native kidneys of a pediatric heart transplant recipient. *Pediatr Transplant*. 2010;14(3):E11-5.
53. Elidemir O, Chang IF, Schechter MG, Mallory GB. BK virus-associated hemorrhagic cystitis in a pediatric lung transplant recipient. *PediatrTransplant*. 2007;11(7):807-10.
54. Alavi S, Yazdi MK, Parvin M, Zohrehbandian F, Azma R. Haemorrhagic cystitis due to BK virus in a child with ALL on standard chemotherapy without stem cell transplant. *Ecancermedicalscience*. 2013;7:350.
55. Crum-Cianflone N, Quigley M, Utz G, Hale B. BK virus-associated renal failure among HIV patients. *AIDS*. 2007;21(11):1501-2.
56. Solis M, Velay A, Porcher R, Domingo-Calap P, Soulier E, Joly M, et al. Neutralizing Antibody-Mediated Response and Risk of BK Virus-Associated Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2018;29(1):326-34.
57. Leboeuf C, Wilk S, Achermann R, Binet I, Golshayan D, Hadaya K, et al. BK Polyomavirus-Specific 9mer CD8 T Cell Responses Correlate With Clearance of BK Viremia in Kidney Transplant Recipients: First Report From the Swiss Transplant Cohort Study. *Am J Transplant*. 2017;17(10):2591-600.
58. Schaub S, Hirsch HH, Dickenmann M, Steiger J, Mihatsch MJ, Hopfer H, et al. Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy. *Am J Transplant*. 2010;10(12):2615-23.
59. Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, Basso S, Fontana I, Cioni M, et al. Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. *AmJTransplant*. 2007;7(12):2727-35.
60. Johnston O, Jaswal D, Gill JS, Doucette S, Fergusson DA, Knoll GA. Treatment of polyomavirus infection in kidney transplant recipients: a systematic review. *Transplantation*. 2010;89(9):1057-70.
61. Leung AY, Yuen KY, Kwong YL. Polyoma BK virus and haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation: a changing paradigm. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36(11):929-37.

62. van Aalderen MC, Heutinck KM, Huisman C, ten Berge IJ. BK virus infection in transplant recipients: clinical manifestations, treatment options and the immune response. *Neth J Med.* 2012;70(4):172-83.
63. Mori Y, Miyamoto T, Kato K, Kamezaki K, Kuriyama T, Oku S, et al. Different risk factors related to adenovirus- or BK virus-associated hemorrhagic cystitis following allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(3):458-65.
64. Harkensee C, Vasdev N, Gennery AR, Willetts IE, Taylor C. Prevention and management of BK-virus associated haemorrhagic cystitis in children following haematopoietic stem cell transplantation--a systematic review and evidence-based guidance for clinical management. *BrJHaematol.* 2008;142(5):717-31.
65. Levican J, Acevedo M, León O, Gaggero A, Aguayo F, Levican J. Role of BK human polyomavirus in cancer. 2018. p. 12-.
66. Papadimitriou JC, Randhawa P, Rinaldo CH, Drachenberg CB, Alexiev B, Hirsch HH. BK Polyomavirus Infection and Renourinary Tumorigenesis. *American Journal of Transplantation.* 2016;16(2):398-406.
67. Maruho Launches Anti-Herpes Virus Agent“Amenamevir® Tab. 200mg” in Japan [press release]. Osaka: Maruho Co., Ltd., 7. september 2017.
68. Kawashima M, Nemoto O, Honda M, Watanabe D, Nakayama J, Imafuku S, et al. Amenamevir, a novel helicase-primase inhibitor, for treatment of herpes zoster: A randomized, double-blind, valaciclovir-controlled phase 3 study. [Tokyo] :2017. p. 1219-27.
69. Wood M, Shukla S, Fiddian AP, Crooks R. Treatment of acute herpes zoster: Effect of early (< 48 h) versus late (48-72 h) therapy with acyclovir and valaciclovir on prolonged pain. *J Infect Dis.* 1998;178(s1):S81-S4.
70. Tying S, Wald A, Zadeikis N, Dhadda S, Takenouchi K, Rorig R. ASP2151 for the treatment of genital herpes: a randomized, double-blind, placebo- and valacyclovir-controlled, dose-finding study. Chicago2012. p. 1100-10.
71. Wald A, Timmler B, Magaret A, Warren T, Tying S, Johnston C, et al. Effect of Pritelivir Compared With Valacyclovir on Genital HSV-2 Shedding in Patients With Frequent Recurrences: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2016;316(23):2495-503.
72. Sasaki S-i, Miyazaki D, Haruki T, Yamamoto Y, Kandori M, Yakura K, et al. Efficacy of herpes virus helicase-primase inhibitor, ASP2151, for treating herpes simplex keratitis in mouse model. [London] :2013. p. 498-503.

73. Chono K, Katsumata K, Suzuki H, Shiraki K. Synergistic activity of amenamevir (ASP2151) with nucleoside analogs against herpes simplex virus types 1 and 2 and varicella-zoster virus. [Amsterdam] :2013. p. 154-60.
74. Shiraki K. Antiviral drugs against alphaherpesvirus2018. 103-22 p.
75. Raney KD, Byrd AK, Aarattuthodiyil S. Structure and mechanisms of SF1 DNA helicases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013;767:17-46.
76. Ohtsu Y, Susaki Y, Noguchi K. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of the Novel Helicase-Primase Inhibitor, Amenamevir (ASP2151), in Rodents. [Paris] :2018. p. 693-706.
77. Kato K, den Adel M, Groenendaal-van de Meent D, Ohtsu Y, Takada A, Katashima M. An Open-Label, Single-Dose, Human Mass Balance Study of Amenamevir in Healthy Male Adults. 2018.
78. Soul-Lawton J, Seaber E, On N, Wootton R, Rolan P, Posner J, et al. Absolute bioavailability and metabolic disposition of valaciclovir, the L-valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995;39(12):2759-64.
79. Dennison J, Puri A, Warrington S, Endo T, Adeloye T, Johnston A. Amenamevir: Studies of Potential CYP2C8- and CYP2B6-Mediated Pharmacokinetic Interactions With Montelukast and Bupropion in Healthy Volunteers. 2018. p. 860-70.
80. Adeloye T, Sahgal O, Puri A, Warrington S, Endo T, Dennison J, et al. Amenamevir: Studies of Potential CYP3A-Mediated Pharmacokinetic Interactions With Midazolam, Cyclosporine, and Ritonavir in Healthy Volunteers. 2018. p. 844-59.
81. Kusawake T, Keirns JJ, Kowalski D, den Adel M, Groenendaal-van de Meent D, Takada A, et al. Pharmacokinetics and Safety of Amenamevir in Healthy Subjects: Analysis of Four Randomized Phase 1 Studies. Metuchen, N.J. :2017. p. 2625-37.
82. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge : Cambridge University Press; 2007.
83. Gibson W. Structure and Assembly of the Virion. *Intervirology*. 1996;39(5-6):389-400.
84. Brown JC, Newcomb WW. Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. *Current Opinion in Virology*. 2011;1(2):142-9.

85. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al. Basic virology and viral gene effects on host cell functions: alphaherpesviruses. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. 59-60 p.
86. Alphaherpesvirinae: Swiss Institute of Bioinformatics; [updated 11.03.2019; cited 2019 10.05]. Available from: https://viralzone.expasy.org/15?outline=all_by_species.
87. Khadivjam B, Stegen C, Hogue-Racine M-A, El Bilali N, Döhner K, Sodeik B, et al. The ATP-Dependent RNA Helicase DDX3X Modulates Herpes Simplex Virus 1 Gene Expression. *Journal of virology*. 2017;91(8).
88. Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Douglas MW, Cunningham AL. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. Chichester, UK2008. p. 35-51.
89. Sara AJ, Neal AD. Relationship of herpes simplex virus genome configuration to productive and persistent infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(13):7871.
90. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al. Pathogenesis, clinical disease, host response, and epidemiology: HSV-1 and HSV-2. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. 587-8 p.
91. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al. Pathogenesis, clinical disease, host response, and epidemiology: VZV. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. 673-4 p.
92. Yajima M, Yamada H, Takemoto M, Daikoku T, Yoshida Y, Long T, et al. Profile of anti-herpetic action of ASP2151 (amenamevir) as a helicase-primase inhibitor. *Antiviral Research*. 2017;139:95-101.
93. Katsumata K, Chono K, Suzuki H. Antiviral efficacy of the helicase-primase inhibitor amenamevir in murine models of severe herpesvirus infection. *Biochemical Pharmacology*2018. p. 201-6.
94. Morfin F, Thouvenot D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *Journal of Clinical Virology*. 2002;26(1):29-37.
95. Chono K, Katsumata K, Kontani T, Shiraki K, Suzuki H. Characterization of virus strains resistant to the herpes virus helicase-primase inhibitor ASP2151 (Amenamevir). *Biochemical Pharmacology*. 2012;84(4):459-67.
96. Meehan SM, Kraus MD, Kadambi PV, Chang A. Nephron segment localization of polyoma virus large T antigen in renal allografts. *Hum Pathol*. 2006;37(11):1400-6.

97. de Oliveira A, Prince D, Lo C-Y, Lee LH, Chu T-C. Antiviral activity of theaflavin digallate against herpes simplex virus type 1. *Antiviral Research*. 2015;118:56-67.
98. Motamedifar M, Noorafshan A. Cytopathic effect of the herpes simplex virus type 1 appears stereologically as early as 4 h after infection of Vero cells. *Micron*. 2008;39(8):1331-4.
99. Fang Y, Ye P, Wang X, Xu X, Reisen W. Real-time monitoring of flavivirus induced cytopathogenesis using cell electric impedance technology. *Journal of Virological Methods*. 2011;173(2):251-8.
100. Tian D, Zhang W, He J, Liu Y, Song Z, Zhou Z, et al. Novel, Real-Time Cell Analysis for Measuring Viral Cytopathogenesis and the Efficacy of Neutralizing Antibodies to the 2009 Influenza A (H1N1) Virus (Real-Time Cell Analysis for H1N1 Cytopathogenesis). *PLoS ONE*. 2012;7(2):e31965.
101. Tylden GD, Hirsch HH, Rinaldo CH. Brincidofovir (CMX001) Inhibits BK Polyomavirus Replication in Primary Human Urothelial Cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015.
102. Rinaldo CH, Gosert R, Bernhoff E, Finstad S, Hirsch HH. 1-O-hexadecyloxypropyl cidofovir (CMX001) effectively inhibits polyomavirus BK replication in primary human renal tubular epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):4714-22.
103. Bernhoff E, Tylden GD, Kjerpeseth LJ, Gutteberg TJ, Hirsch HH, Rinaldo CH. Leflunomide inhibition of BK virus replication in renal tubular epithelial cells. *J Virol*. 2010;84(4):2150-6.
104. Dumoulin A, Hirsch HH. Reevaluating and Optimizing Polyomavirus BK and JC Real-Time PCR Assays To Detect Rare Sequence Polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(4):1382.
105. Rinaldo CH, Myhre MR, Alstad H, Nilssen O, Traavik T. Human polyomavirus BK (BKV) transiently transforms and persistently infects cultured osteosarcoma cells. *Virus Res*. 2003;93(2):181-7.
106. Salman A, Shufan E, Zeiri L, Huleihel M. Characterization and detection of Vero cells infected with Herpes Simplex Virus type 1 using Raman spectroscopy and advanced statistical methods. *Methods*. 2014;68(2):364-70.
107. Schlehofer JR, Hampl H, Habermehl KO, Schlehofer JR. Differences in the morphology of herpes simplex virus infected cells: I. Comparative scanning and transmission electron

microscopic studies on HSV-1 infected HEp-2 and chick embryo fibroblast cells. *The Journal of general virology*. 1979;44(2):433-42.

108. Dienes H, Knoblich A, Falke D. Loss of surface fibronectin after infection of cultured cells by HSV-1 and 2. *Archives of Virology*. 1985;86(3):223-37.

109. Chono K. Pharmacological Study of ASP2151 (Amenamevir), Helicase-primase Inhibitor Possessing Antiviral Activity against Varicella-zoster Virus and Herpes Simplex Virus Type 1 and 2. Toyama: University of Toyama; 2013.

110. Lee EJ, Jang HN, Cho HS, Bae E, Lee TW, Chang S-H, et al. The incidence, risk factors, and clinical outcomes of acute kidney injury (staged using the RIFLE classification) associated with intravenous acyclovir administration. 2018. p. 687.

111. Sharma BN, Li R, Bernhoff E, Gutteberg TJ, Rinaldo CH. Fluoroquinolones inhibit human polyomavirus BK (BKV) replication in primary human kidney cells. *Antiviral Res*. 2011;92(1):115-23.

112. Knoll GA, Humar A, Fergusson D, Johnston O, House AA, Kim SJ, et al. Levofloxacin for BK virus prophylaxis following kidney transplantation: a randomized clinical trial. *JAMA, The Journal of the American Medical Association*. 2014;312(20):2106.

113. Lee BT, Gabardi S, Grafals M, Hofmann RM, Akalin E, Aljanabi A, et al. Efficacy of levofloxacin in the treatment of BK viremia: a multicenter, double-blinded, randomized, placebo-controlled trial. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2014;9(3):583-9.

114. White PW, Faucher A-M, Massariol M-J, Welchner E, Rancourt J, Cartier M, et al. Biphenylsulfonacetic Acid Inhibitors of the Human Papillomavirus Type 6 E1 Helicase Inhibit ATP Hydrolysis by an Allosteric Mechanism Involving Tyrosine 486. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(12):4834.

115. Thakkar BS. A Biofocussed Chemoprospecting Approach to Drug Discovery: Design, Synthesis and Bioactivity Screening of Diverse Biofocussed Chemical Libraries [Doktorgradsavhandling]. Tromsø: Universitetet i Tromsø; 2017.

7 Figurliste

Figur 1: Illustrasjon av en polyomaviruspartikkel	2
Figur 2: Illustrasjon av BKPyVs sirkulære DNA	3
Figur 3: Strukturformel for amenamevir	7
Figur 4: Illustrasjon av en herpesviruspartikkel	11
Figur 5: xCELLigence-måling ulike konsentrasjoner A549-celler.....	25
Figur 6: xCELLigence-måling av A549-celler infisert med ulike konsentrasjoner av HSV-1 klinisk isolat 1 (A) eller 2 (B)	26
Figur 7: Immunfluorescensmikroskopi hvor døde celler er farget blå med DNA-fargen DRAQ7 to dager etter infeksjon.....	27
Figur 8: Resultater fra PCR for kvantifisering av HSV-1 DNA i ufortynnet supernatant og lysat fra infiserte A549-celler.....	28
Figur 9: Fasekontrastmikroskopi som viser cytopatogen effekt av HSV-1 to dager etter infeksjon	29
Figur 10: xCELLigence-måling av A549-celler infisert med 10^4 kopier/mL HSV-1 og behandlet med ulike konsentrasjoner amenamevir	29
Figur 11: Fasekontrastmikroskopi (A) og immnfluorescensmikroskopi (B) av A549-celler seks dager etter infeksjon med HSV-1 10^4 kopier/mL.....	31
Figur 12: Utfelling av amenamevir ved ulike konsentrasjoner i medium (MEM)	32
Figur 13: Ett av fire forsøk med xCELLigence-måling av RPTECs behandlet med ulike konsentrasjoner amenamevir.	34
Figur 14: ATP-måling av RPTECs tre dager etter behandling med amenamevir.....	35
Figur 15: Luminescens som en lineær funksjon av ATP-konsentrasjon.....	35
Figur 16: Måling av ekstracellulær konsentrasjon av BKPyV-DNA tre dager etter behandling og infeksjon	37
Figur 17: Fasekontrastmikroskopi (A) og immunfluorescensmikroskopi (B og C) av RPTECs som ble metanolfiksert tre dager etter behandling og infeksjon	39
Figur 18: xCELLigence-måling av RPTECs behandlet med nukleotidlignende stoffer utviklet ved UiT.....	ii
Figur 19: Måling av ekstracellulær konsentrasjon av BKPyV-DNA tre dager etter infeksjon med BKPyV og behandling med nye nukleotidlignende stoffer utviklet ved UiT	iii

Vedlegg 1: Pilotforsøk

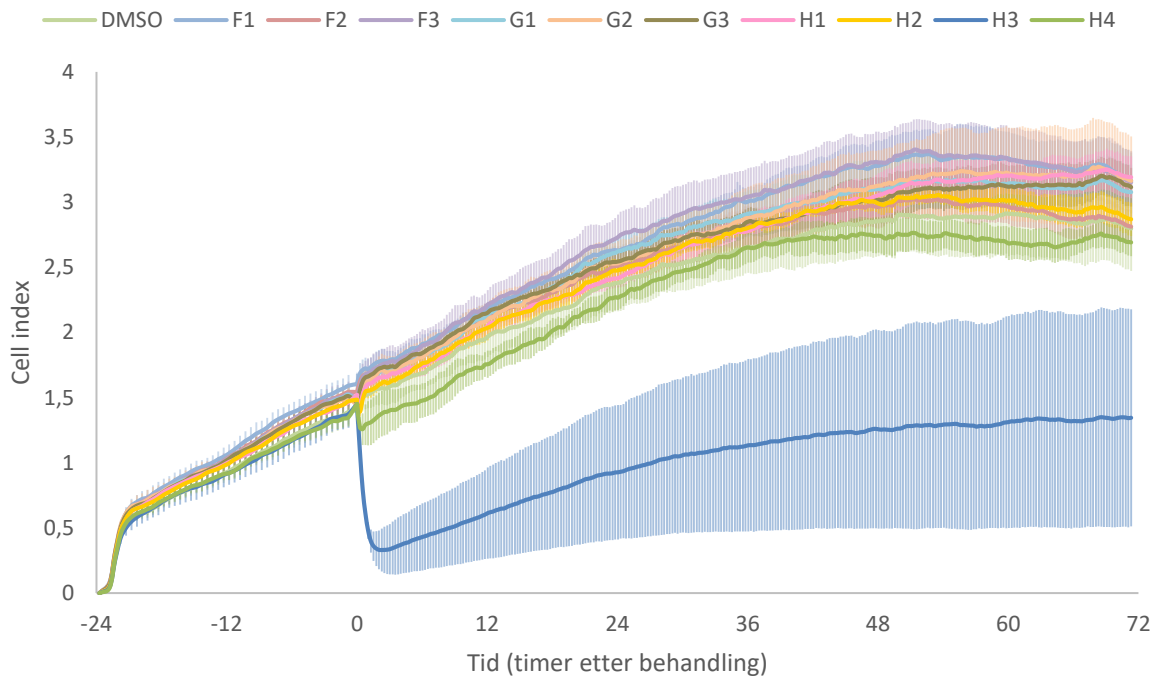
I august 2018 utførte vi et mindre forsøk med ti nukleotidlignende stoffer utviklet ved UiT, for å undersøke om disse kunne være aktuelle for videre uttesting og for introduksjon til metodene som skulle benyttes.

Bakgrunn. Balmukund Thakkars doktorgradsavhandling (115) fra UiT fra 2017 omhandler syntese og screening av en rekke stoffer laget ved modifikasjon av kjente bioaktive molekyler. Blant stoffene de arbeidet med var vinsyre (tartaric acid). Molekylet har en viss likhet med ribose, som inngår i nukleotider. Ved substitusjon av OH-gruppen i de to karboksylgruppene ble det fremstilt ulike nukleotidlignende molekyler. Ti av stoffene; fem bisamider, tre monoamider og ett syklisk tartrimid, ble undersøkt for biologiske effekter (115). Derivatene av vinsyre kan på grunn av sin likhet med ATP eller andre nukleotider tenkes å virke inhiberende på DNA- og RNA-syntese, samt cellulære protein kinaser. I avhandlingen ble de undersøkt for antibakteriell effekt og effekt på viabilitet av kreftceller, men antiviral effekt ble ikke undersøkt. Stoffene hadde ikke signifikant påvirkning på kreftcellers viabilitet i kolorimetrisk MTS-assay, og viste heller ingen antibakteriell effekt.

Materiale og metode. 3000 RPTECs per brønn ble sådd ut med fire paralleller i en 16-brønners E-plate, og 12 500 RPTECs per brønn med to paralleller i en 48-brønnersplate. E-platen ble behandlet med de ti nukleotidanalogene 24 timer etter utsåing i konsentrasjon 100 µM, og celleviabilitet målt kontinuerlig med xCELLigence. 48-brønnersplaten ble 24 timer etter utsåing inkubert med BKPyV i to timer og deretter tilsatt behandling. Disse cellene ble undersøkt med fasekontrastmikroskopi for effekt på celleviabilitet, og tre dager etter infeksjon og behandling ble det gjort kvantitativ real time-PCR og immunfluorescensmikroskopi for å vurdere henholdsvis ekstracellulær konsentrasjon av BKPyV DNA og uttrykk av virale proteiner.

Resultater. For kontinuerlig å undersøke påvirkning på celleviabilitet av RPTECs, ble metoden xCELLigence benyttet. Vi utelot resultatene fra tre brønner som viste ekstreme avvik i cell index. Resultatene for de gjenværende brønnene er vist i Figur 18. Flertallet av stoffene viste ingen påvirkning på cell index sammenlignet med ubehandlede celler. H3 medførte derimot et umiddelbart fall i cell index. Standardavviket mellom de tre brønnene

med H3 var svært høyt; en av brønnene hadde en liten økning i cell index etter fallet, en kom nesten opp på nivå med ubehandlede celler, og en holdt seg stabilt lav.

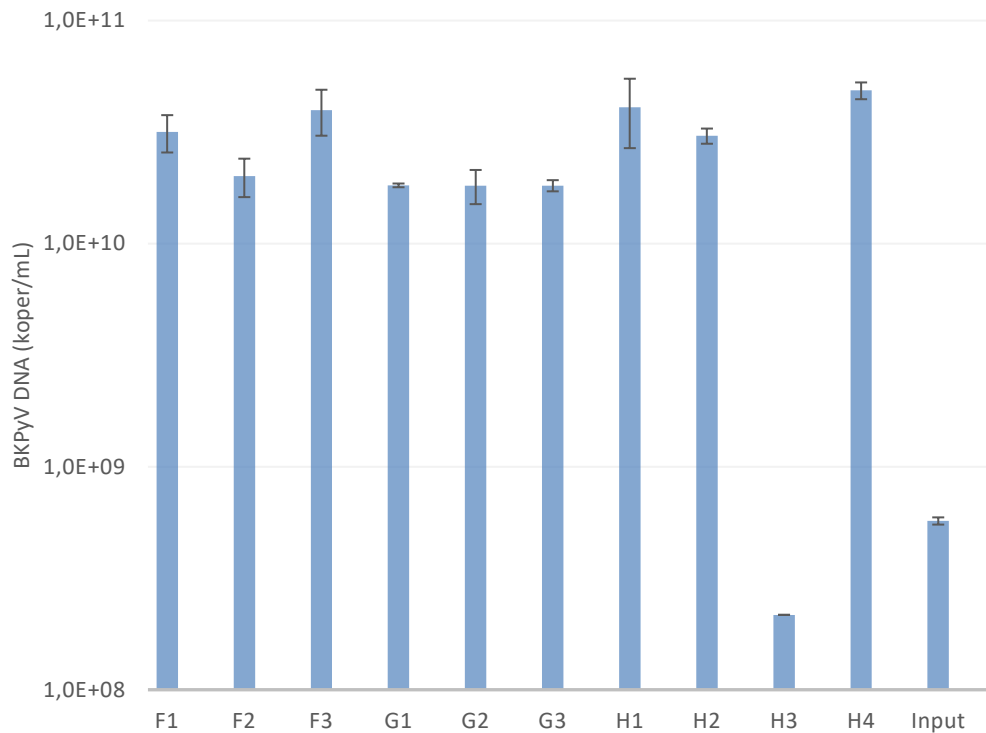


Figur 18: xCELLigence-måling av RPTECs. Cell index ble målt fra utsåing av 3000 celler per brønn og i totalt 95 timer. Medium med 100 μ M av ti ulike nukleotidanaloger ble tilsatt 24 timer etter utsåing. Grafene viser celler behandlet med F1 (blå), F2 (rød), F3 (lilla) G1 (akvamarin), G2 (oransje), G3 (brun), H1 (rosa), H2 (gull) H3 (mørk blå), H4 (mørk grønn) eller DMSO i samme konsentrasjon (lys grønn). Standardavviket mellom tre eller fire paralleller vises som vertikale striper på grafene.

For å undersøke effekten på uttrykk av virale proteiner, ble celler som var metanolfiksert tre dager etter infeksjon og behandling farget med primærantistoff mot LTag, VP1 og agnoprotein, og dessuten ble DNA farget med DRAQ5. Mikroskoperingen viste ingen synlig effekt av behandlingen, bortsett fra hos cellene som hadde fått H3, der mange av cellene var døde og ikke uttrykte virale proteiner (resultater ikke vist).

For å undersøke effekten på replikasjon av BKPyV, målte vi ekstracellulært BKPyV DNA i cellekulturmedium med kvantitativ PCR, tre dager etter infeksjon og behandling. Vi hadde dessverre ikke med ubehandlede celler som kontroll, men bortsett fra for H3 var det ingen forskjeller mellom stoffene (Figur 19). Vi kunne dermed konkludere med at de sannsynligvis ikke hadde effekt på replikasjon av BKPyV. Økningen fra input var på i underkant av 2 log. Medium fra celler behandlet med H3 hadde like lite virus som inputprøven, noe som indikerer at cellene behandlet med H3 hadde produsert få eller ingen nye viruspartikler.

Sammenholdt med resultatene fra xCELLigence og immunfluorescensmikroskopi virket det som om denne effekten skyldtes en umiddelbar cytotoxisk effekt der det ikke kunne dannes nye virus fordi mange av cellene var døde.



Figur 19: Måling av ekstracellulær konsentrasjon av BKPyV-DNA tre dager etter infeksjon og behandling med nukleotidlignende stoffer utviklet ved UiT. Dette tilsvarer ca. 72 timer etter behandling i Figur 18. Virusmengden er vist som gjennomsnitt av to paralleller i kopier/mL, og standardavvik mellom to paralleller er vist som vertikale streker. Inputprøven viser hvor mye av virusmengden som skyldes ekstracellulære rester som fremdeles var igjen etter infeksjon og skiftning av medium.

Flere av stoffene var lite løselige og hadde utfelling av makroskopisk synlige partikler, noe som kan ha påvirket resultatene. Utfellingen var spesielt uttalt for H3 og H4.

Konklusjon. Ut fra resultatene hadde de fleste nukleotidanalogene ingen effekt på replikasjon av BKPyV eller viabilitet av nyreepitelceller. Ett av stoffene, H3, reduserte virusreplikasjon betydelig, men trolig via direkte cytotoxisk effekt på cellene. Vi valgte derfor å ikke gå videre med flere forsøk med disse stoffene.

Vedlegg 2: Sammendrag av kunnskapsevalueringer av nøkkel-/hovedartikler på referanselisten

Referanse: Chono et al. 2010. ASP2151, a novel helicase–primase inhibitor, possesses antiviral activity against varicella–zoster virus and herpes simplex virus types 1 and 2.

Studiedesign: Kasus-kontroll

Grade - kvalitet II

Diskusjon/kommentarer/sjekkliste

Formål

Å undersøke og beskrive anti-herpeseffekten av amenamevir.

Materiale og metode

Enzymaktivitet: ATPase-, primase- og helikaseassay.

In vitro antiviral effekt: HEF-celler (VZV og HSV) og MRC-5-celler (CMV) sådd ut i MEM.

- Plaque reduction assay: Monolayer inkubert med 40 PFU/brønn i 1 time. Vasket x 2, deretter tilsatt behandling.
- PAGE: Sammenlignet mengde virus-DNA ved ulike konsentrasjoner av amenamevir.

- Real-time PCR: Kun for VZV

In vivo antiviral effekt: Infiserte hud hos mus med VZV og behandlet peroralt med placebo, amenamevir eller valaciklovir i ulike doser to ganger daglig i 5 dager fra 3 timer etter infeksjon. Sykdomsforløp scoret daglig fra 0 til 7 i 17 dager.

Land

Japan

År publisert

Viabilitet av HEF-celler:

Resultater

Hemmet helikase ved > 0,1 µM og primase < 0,03 µM. (Ingen helikaseaktivitet ved 10 µM og primase ved 0,3). ATPase IC50 0.078 µM (std tre forsøk 0.016 µM).

PRA (gj. snitt og std for 3 forsøk):

Table 1. Antiviral activities of herpes HPIs

Virus (strain)	EC ₅₀ ± SE (µM)/EC ₉₀ ± SE (µM) ^a		
	ASP2151	BILS 179 BS	BAY 57-1293
VZV (Ellen)	0.047 ± 0.013/0.46 ± 0.11	4.1 ± 0.56/23 ± 7.2	11 ± 0.92/>100
HSV-1 (KOS)	0.036 ± 0.0047/0.23 ± 0.037	0.060 ± 0.016/0.63 ± 0.13	0.014 ± 0.0018/0.082 ± 0.013
HSV-2 (G)	0.028 ± 0.0013/0.46 ± 0.30	0.046 ± 0.016/2.4 ± 0.99	0.023 ± 0.0018/0.91 ± 0.71
CC ₅₀ (µM) ^b	>30	>30	>30
SI, CC ₅₀ /EC ₅₀ ^c	>638	>7.3	>2.7

^aData represent the mean EC₅₀ and EC₉₀ and SE of three independent experiments.

^bValues for CC₅₀ were determined using an MTT assay and a confluent monolayer culture of HEF cells.

^cSI represents the smallest value among viruses tested.

PRA ASP2151 vs aciclovir mot VZV (gjentatt 4 ganger per strain): EC50 0,038-0,1 µM ASP2151 og 1,3-5,9 aciclovir. Aciclovir 27 ved resistant mutant, ASP2151 0,082.

PRA HCMV, respiratory syncytial virus, influenza virus or HIV-1: Ingen antiviral effekt av amenamevir opptil 25 µM.

PAGE: > 0,03 µM for HSV og VZV, hemmet ikke CMV. Ingen dna ved 0,3 (HSV-1) og 1 (2 og VZV) PCR: Hemmet replikasjon helt av VZV ved 1 µM (10 µM for aciclovir). 0.057 for ASP2151 and 0.44 µM for aciclovir

Hva diskuterer forfatterne: Sammenheng mellom effekt på enzymaktivitet og antiviral effekt målt ved PRA og PCR indikerer at virkningsmekanismen er hemming av helikase-primasekomplekset. Også lokalisasjon av mutasjoner hos resistant virus støttet dette. Hemmer potent også VZV og ikke bare HSV, som andre helikase-primasehemmere. Mer potent mot VZV enn aciclovir. Stort potensiale for behandling av VZV og HSV.

Styrker: Flere metoder for både antiviral aktivitet og celleviabilitet, samsvar mellom resultatene. Gjentok forsøk flere ganger, små standardavvik. Sammenlignet antiviral effekt med (val)aciclovir. Testet konsentrasjoner opptil 25 µM med PRA for alle virusene.

Svakheter: Viabilitetsassay er dårlig beskrevet - uklart hvilke konsentrasjoner som ble brukt, og på hvilket tidspunkt

2010	<p>MTT assay: Metabolisk aktivitet Neutral red assay: antall levende og uskadede celler</p> <p>Langvarig behandling av VZV med høy konsentrasjon amenamevir for å fremprovosere resistent mutant. Sekvensering av helikase og primasegen.</p> <p>Statiske metoder: IC50 for ATPase assay, EC50 for PCR, og EC50 og 90 for PRA, ble beregnet med ikke-lineær regresjonsanalyse med sigmoid-Emax modell. ED50 in vivo beregnet med lineær regresjon.</p>	<p>Viabilitet: MTT assay: Ingen cytotoxisk effekt ved høy konsentrasjon. CC50 > 30 µM. Neutral red assay: CC50 > 200. Gjentatt 3 ganger.</p> <p>Resistens: Tre aminosyreendringer. To mutasjoner i helikasegen og en i primasegen. Sterkt redusert replikasjonshastighet av resistent virus.</p> <p>In vivo: Reduserte dødelighet hos mus dag 17 ved 14 ganger lavere dose enn valaciklovir.</p>	<p>etter behandling målinger ble utført. Står ingenting om løselighet. Ved dårlig løselighet i medium er resultatene usikre, sier ikke om de har mikroskopert.</p> <p>Litteratur som støtter resultatene: God effekt i dyrestudier og kliniske studier. F eks. Makoto et al. 2017.</p>
------	--	--	--

Referanse: Kawashima et al. 2017. Amenamevir, a novel helicase-primase inhibitor, for treatment of herpes zoster: A randomized, double-blind, valaciclovir-controlled phase 3 study.

Studiedesign: RCT	
Grade - kvalitet	II

Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
Undersøke effekt og sikkerhet ved behandling av japanske pasienter med herpes zoster med amenamevir.	751 pasienter rekruttert. Inklusjonskriterier: 20-80 år, klinisk diagnostisert med herpes zoster innen 72 timer etter utslett oppsto. Eksklusjonskriterier: Pasienter som ikke forventes full effekt av orale antivirale midler, autoimmun sykdom, graviditet, nedsatt immunforsvar, maligne tumorer siste 5 år, bruk av andre antivirale midler eller immunoglobulin siste 14 dager, skorper	Dag 4 cessation proporsjoner i amenamevir 400, 200 mg og valaciclovir-gruppene var 81.1%, 69.6% og 75.1%.	Dobbelblindet, randomisert studie. Randomiseringsprosedyre: Randomisert 1:1:1 i tre grupper med dataprogram. Stratifisert for alder over eller under 65 år. Gruppene var like ved starten. 608 gjennomførte.
Konklusjon		Amenamevir 400 mg,	

<p>Amenamevir 400 mg er effektivt og godt tolerert for behandling av herpes zoster hos immunkompetente japanske pasienter.</p>	<p>på sårene, andre hudlesjoner på samme sted, tidligere herpes zoster, varicellavaksine siste 20 år, deltakelse i studie på herpes zostervaksine.</p> <p>Intervensjon og oppfølging: Randomisert til 200 mg eller 400 mg amenamevir en gang daglig i 7 dager eller valaciklovir 1000 mg tre ganger daglig i 7 dager. Fulgt i 92 dager. Fulgt opp av samme person hvis mulig. Klinisk diagnose for å inkluderes, diagnosen bekreftet med serologi, PCR og dyrkning. Ekskludert hvis HSV i stedet for VZV.</p>	<p>men ikke 200 mg, var non-inferior til valaciklovir. Det var signifikant forskjell mellom 200 og 400 mg amenamevir. For pas < 65 og kvinner var amenamevir dessuten signifikant bedre enn valaciklovir.</p> <p>Ingen signifikante forskjeller i sekundære endepunkter for noen av gruppene.</p> <p>Behandlingen var godt tolerert.</p> <p>Medikamentrelaterte bivirkninger var likt fordelt mellom gruppene med 10-12 %, og ingen av dem var alvorlige.</p>	<p>Hva diskuterer forfatterne: Styrker i studien er stor populasjon, primærendepunkt (skyldes i motsetning til skorpedannelse noe om når VZV replikasjon stopper) og at fase II studie ga lignende resultat. Valaciklovir er i andre RCT bedre enn aciklovir, så man kan anta at amenamevir er bedre enn aciklovir. En svakhet er at det ikke er med noen placebogruppe, slik at hvor stor effekt medikamentene faktisk har på de valgte endepunktene er usikkert.</p> <p>Kommentarer:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ut fra hvordan det beskrives ble gruppene ikke behandlet helt likt utover intervensjonen. Amenamevirgruppene fikk én tablett daglig mens valaciklovirgruppen fikk tre tabletter daglig. Dette kan ha påvirket placeboeffekt, og pasienter kan ha forstått hvilken behandling de fikk. Flere tabletter daglig kan ha gitt dårligere compliance i valaciklovirgruppen, som kan ha påvirket resultatene i favør av amenamevir. - Sammenligning av compliance mellom grupper er ikke beskrevet i artikkelen. - Litt flere i amenamevir 400 mg gruppen som ikke fullførte studien (193 sammenlignet med 209 og 206). - Årsak til det diskuteres ikke i artikkelen.
<p>Land</p>			
<p>Japan</p>			
<p>År data innsamling 2013-15</p>	<p>Primært endepunkt: Andel som hadde sluttet å få nye lesjoner dag 4. Sekundære endepunkt: Dager til nye lesjoner sluttet å oppstå, komplett skorpedannelse og opphør av utslett, opphør av smerte og virusutskillelse.</p> <p>Statistiske metoder: Forskjell mellom 4 day cessation proportion mellom amenamevir og valaciklovir ble beregnet med Farrington-Manning-test. 10 % ble satt som grense for non-inferiority. Ensidig p-verdi < 0,025 ble regnet som non-inferiority av amenamevir 400 mg til valaciklovir.</p>		

Referanse: Tyring et al. 2012. ASP2151 for the treatment of genital herpes: A randomized, double-blind, placebo- and valacyclovir-controlled, dose-finding study.

Studiedesign: RCT

Grade - kvalitet

II

Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
Undersøke effekt og sikkerhet av episodisk behandling med amenamevir ved residiverende genital herpes.	Inklusjonskriter.: > 18 år, tidligere genital HSV infeksjon bekreftet med serologi, dyrkning eller PCR, > 4 episoder siste år. Hvis langvarig suppresjonsterapi avsluttet siste 12 mnd, minst ett residiv før studiestart. Eksklusjonskriter.: Immunsuppresjon, graviditet, amming, annen infeksjon, antiviral behandling siste 7 dager, sykdom eller medisinsk tilstand som talte imot deltakelse.	695 adults inkludert, 437 fikk residiv og mottok behandling, 415 fullførte studien. Hovedfunn: Median tid til heling av lesjoner var 139.8 timer med placebo, 119.6 timer med ASP2151 (100 mg; hazard ratio [HR], 1.40; $P = .065$), 106.2 med ASP2151 (200 mg; HR, 1.40; $P = .081$), 115.9 med ASP2151 (400 mg; HR, 1.25; $P = .25$), 102.1 med ASP2151 (1200 mg; HR, 1.72; $P = .007$), og 113.9 med valacyclovir (500 mg to ganger daglig; HR, 1.42; $P = .077$). Dvs. bedring for alle unntatt ASP2151 (400 mg). Ingen forskjell i forekomst av bivirkninger mellom gruppene.	Gruppene var like ved start. Hva diskuterer forfatterne: En begrensning var at virusdyrkning ble brukt for å måle varighet av virusutskillelse, PCR er mer sensitivt og ville kanskje vist større forskjeller. Denne studien demonstrerte for de fleste funn bare signifikans ved $p < 0,1$. Kommentarer: - En viktig styrke med denne studien er at alle pasientene fikk likt antall tabletter, slik at de ikke kunne gjette seg til hvilken behandling de fikk eller at antall tabletter kunne påvirke compliance eller placeboeffekt mellom grupper. - Med så få pasienter totalt og mange ulike behandlingsgrupper, ble det få pasienter per gruppe og flere resultater, f. eks. tid til lesjonstilheling ved 400 mg
Konklusjon	Intervensjon: Randomisert til seks grupper med like mange i hver: ASP2151 (100, 200, eller 400 mg daglig i 3 dager), ASP2151 (en dose 1200 mg), placebo 3 dager, eller valacyclovir (500 mg to ganger daglig i tre dager). Amenamevirgruppene fikk ekstra placebo for at dosering skulle bli lik valacyclovir. Pasientene startet selv behandling ved begynnende symptomer. Primærendepunkt: Timer til tilheling av lesjoner. Sekundærendepunkt: (1) timer til komplett opphør av smerte, (2) varighet av symptomer (3) timer til første negative dyrkningsresultat, (4) varighet av episode (det som varte lengst av lesjoner og symptomer) (5) andel i hver gruppe hvor episoder ble avbrutt.		
Land			
USA			
År data innsamling			

2007-2008

Statistiske metoder: For primærendepunktet ble det beregnet hazard ratio for forskjell mellom hver dose amenamevir og placebo/valaciklovir. $P < 0,01$ ble regnet som signifikant.

Bifunn: Signifikant reduksjon av symptomvarighet av 100 og 400 mg amenamevir og valaciklovir.

amenamevir ble ikke signifikant. Få pas per grunne, 400 mg ble ikke signifikant noe det trolig ville vært med flere pasienter.