

慢性丙型肝炎患者 NS3/4A 蛋白酶抑制剂预存耐药的临床研究

李展翼, 严 颖, 刘 莹, 蔡庆贤, 赵志新*

(中山大学附属第三医院感染科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】了解我国华南地区从未接受任何抗病毒治疗的慢性丙型肝炎(慢丙肝)患者 NS3/4A 蛋白酶抑制剂相关耐药位点的流行情况、临床特点包括其对干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗的影响。【方法】在接受抗病毒治疗前对 183 例慢丙肝患者的 NS3/4A 蛋白酶抑制剂相关的耐药位点采用自行设计型别特异性引物行巢式 PCR, PCR 产物纯化后直接测序法鉴定, 有变异的患者为变异组(125 例), 无变异的患者为野生组(37 例), 对两组患者的临床资料包括干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗后的持续病毒应答率等进行分析。【结果】183 例患者中 162 例患者样本的 NS3 区扩增成功, 其中 125 例(77.16%) 患者检出耐药相关的变异位点 266 个, 其中 HCV 1b 型 A156S 变异率为 18.33%(11/60), T54S 为 5.00%(3/60); HCV 2a 型 V36L 变异率为 100.00%(14/14), A156S 为 64.29%(9/14); HCV 6a 型 Q80K 变异率为 95.45%(84/88), V36L 为 4.55%(4/88), D168E 为 2.27%(2/88), 变异组患者经干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗后的持续病毒性应答率为 81.60%(102/125), 而野生组的为 81.03%(30/37), 两者比较无明显差异($P=0.943$)。【结论】我国不同基因型的慢丙肝患者对 NS3/4A 蛋白酶抑制剂存在不同的预存耐药, 耐药变异对慢丙肝患者疾病状态包括干扰素联合利巴韦林的疗效无影响。预存耐药的存在警示我们未来在使用此类药物时需分析病毒基因型及预存耐药变异情况, 从而为患者提供最好的病毒学监测及最优的治疗方案。

关键词: 丙型肝炎病毒; NS3/4A 蛋白酶抑制剂; 预存耐药; 基因型

中图分类号: R512.6+3

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2015)03-0437-05

Characterization of Naturally Occurring Resistant Mutations to Hepatitis C Virus NS3/4A Protein Protease in Treatment-naïve Patients in China

LI Zhan-yi, YAN Ying, LIU Ying, CAI Qing-xian, ZHAO Zhi-xin*

(Department of Infectious Diseases, The Third affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: ZHAO Zhi-xin, E-mail: zxzhao@21cn.com

Abstract: 【Objective】To assess the prevalence of hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease inhibitor (PI) resistant mutations in different HCV genotypes among 183 NS3/4A protein protease treatment-naïve patients in south China. 【Methods】The dominant regions of HCV NS3/4A were determined in 183 HCV infected patients before pegylated interferon plus ribavirin (PEG-IFN/RBV) therapy, and investigated the patients' clinical characteristics as well as treatment responses including sustained virological response (SVR) rate. 【Results】162 cases were successfully amplified in 183 samples. A total of 266 amino acid substitutions were detected in 125 (77.16%) patients. In HCV genotype 1b infected patients, we detected the resistant mutations of A156S in 11 patients (18.33%, 11/60) and we detected T54S in 3 patients (5.0%, 3/60). In HCV genotype 2a infected patients, we detected the resistant mutations of V36L in 14 patients (100%, 14/14) and In HCV genotype 6a infected patients we detected Q80K variability in 84 patients (95.45%, 84/88), V36L in 4 patients (4.55%, 4/88) and D168E in 2 patients (2.27%, 2/88). Responses to PEG-IFN/RBV therapy did not differ between patients with and without PI-resistance mutations (mutation group, SVR 81.60%; wild-type group, SVR 81.08%; $\chi^2=0.005$, $P=0.943$). 【Conclusions】Naturally occurring dominant resistance mutations to NS3/4A protein protease do pre-exist in treatment-naïve patients with various genotypes in China. Resistant variants had no effect on the status of disease,

收稿日期: 2014-12-17

基金项目: 中山大学临床医学研究 5010 计划资助(2010011); 广东省自然科学基金(S2012010009155); 广东省医学科研基金(B2012195)

作者简介: 李展翼, 硕士研究生, 研究方向: 病毒性肝炎, E-mail: lzaly@126.com; * 通信作者: 赵志新, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: zxzhao@21cn.com

including the response to PEG-interferon combined with ribavirin therapy in HCV-infected patients. While the use of PIs is established in HCV-infected patients, analyzing the evolution of the target region in the HCV genome is warranted in order to disclose the role of HCV drug resistance and provide the most convenient virological monitoring for patients who are candidates for treatment or are under treatment.

Key words: hepatitis C virus; NS3/4A protein protease; resistance mutations; genotypes

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(3): 437-441, 448]

全球有大约 1.7 亿人感染丙型肝炎 (丙肝) 病毒 (hepatitis C virus, HCV), 目前标准抗丙肝病毒治疗方案长效干扰素联合利巴韦林的治疗方案因其多发的不良反应而使其应用受限^[1], 我们需要更安全有效的方法治疗慢性丙型肝炎患者。随着对丙型肝炎病毒的认识加深, 已研制出针对丙型肝炎病毒的特异性靶向抗病毒治疗药物 (specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C, STAT-C), 其中两个 NS3/4A 蛋白酶抑制剂 (protease inhibitors, PI) Telaprevir (TVR) 和 Boceprevir (BOC) 已在美国上市。目前我国未使用 TVR 或 BOC 治疗丙肝, 由于 HCV 基因多态性及易变性, PI 单药治疗易出现 HCV 选择性耐药变异, 引起病毒量反弹, 有的变异株甚至在未接受 PI 治疗的患者中检出引起原发耐药^[2-5]。PI 尚未在我国上市应用, 我国是否存在对该类药物的预存耐药以及预存耐药的发生率情况尚无报道, 本研究旨在通过对丙肝病毒 NS3/4A 区域进行分析, 了解其原发耐药变异的存在情况及对干扰素联合利巴韦林治疗的影响从而指导未来丙型肝炎的治疗。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究从 2009 年 1 月至 2012 年 12 月在中山大学附属第三医院诊治的慢性丙型肝炎患者中随机选择 183 名既往从未行抗病毒治疗的患者, 在抗病毒治疗前留取血标本进行耐药分析, 然后对患者进行干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗并观察疗效, 患者诊断符合 2009 年《丙型肝炎防治专家共识》, 同时排除合并其它肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒感染、酒精性肝病、自身免疫性疾病、肿瘤、孕妇及严重基础病等。

1.2 主要试剂和仪器

Omega Viral RNA Kit 试剂盒购于 Omega。Toyobo ReverTra Ace-α-试剂盒购于 Toyobo。10×

PCR Buffer、dNTP mix (2.5 mmol/L each)、Primer 和 rTaq® (5 U/μL) 购于 TaKaRa。离心机 (Eppendorf centrifuge 5424), PCR 仪 (Thermal Cycler S1000), 测序仪 (ABI 3730)。

1.3 基因分型方法

采用巢式聚合酶链反应法 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增 HCV core 和 NS5B 区保守片段并基因测序, 获得的 core、NS5B 序列通过 HCV 序列数据库和已知基因型序列进行比对, 可初步确定 HCV 的基因型。再次进行验证是通过在 CLUSTAL-W 进行比对分析, 应用 MEGA4 软件的邻接法构建进化树, 把 Jukes-Cantor 作为分析的模块在 500 neighbor-joining replicates 进行验证。然后把 core 扩增阳性样本和不同基因型 HCV 的参考序列一起构建 core 序列进化树, 从而进一步确定 HCV 的基因型。与已知基因型的 HCV 序列比对, 构建进化树进行型别鉴定^[6]。

1.4 引物设计

通过对 GenBank 中收录的大量 HCV NS3 序列进行分析, 根据其序列特点设计 HCV1b、2a、6a 型别特异引物 (表 1), 用于巢式 PCR。

表 1 HCV NS3 区的扩增引物

Table 1 Primers used for HCV NS3 amplification by Nested PCR

HCV genotype	Primers	5'-3' sequences
1b/2a	up1	GCCGACGGAATGGTCTCCAA
	down1	CACATCCATCTTGGGCATCGG
	up2	GGCCTCCTAGGGTGTATAAT
	down2	GCTTATGACATAATAATTTG
6a	up1	TAGCGACGGAAGTGGCGATC
	down1	GAGTGCCACTCCACAGACCC
	up2	GCTCCCATCACCGCGTATGC
	down2	GTCAGGACTGTAACACACAGG

1.5 NS3 区基因扩增与测序

采集慢性丙肝患者外周全血 5 mL, 离心取血

浆 140 μL ,使用 Omega Viral RNA Kit 试剂盒抽提 HCV RNA;取 11 μL HCV RNA 用 Toyobo ReverTra Ace- α -试剂盒将 HCV RNA 逆转录为 cDNA;使用表 1 所列引物,进行巢式 PCR,扩增 HCV NS3 耐药变异相关片段。第一轮 PCR 反应混合物以 3 μL cDNA 为模板,10 $\times$ PCR Buffer 2 μL 、2.5 mm 每份 dNTP 2 μL 、0.2 μL rTaq[®] (5 U/ μL)聚合酶、上下游外引物各 1.5 μL ,总体积 25 μL 。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$,5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,46 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 35 个循环,最终 12 $^{\circ}\text{C}$;第二轮 PCR 以第一轮 PCR 产物 3 μL 为模板,其余反应混合物同第一轮 PCR 反应,加入上下游内引物各 1.5 μL ,反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$,5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 35 个循环,最终 12 $^{\circ}\text{C}$ 。第二轮 PCR 产物 3 μL 经 1.5%琼脂糖凝胶浓度电泳,采用凝胶成像系统拍照检测。PCR 产物纯化后送测序分析(ABI 3730xl DNA 测序仪)。

1.6 序列对比及分析

本实验对样本多次重复检测,发现相同位点发生突变后再应用 Clustal X 程序进行序列比对,在 Sequence Scanner v1.0 中,根据 ABI 3730xl DNA 测序仪测序导出的峰图对 183 例样本中 NS3 区域 PI 常见耐药突变位点进行数据分析,与文献报道已知耐药位点进行比对。

1.7 统计学分析

使用 SPSS 18.0 进行数据的统计学分析,定量资料如人口学指标、生化指标、血液学指标、病毒学指标等,参数比较采用 Student's *t* 检验或 ANOVA 方差分析,两组间非参数比较采用 Mann-Whitney *U* 检验;分类资料采用 χ^2 检验。设双尾检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

NS3 区样本扩增成功率为 88.52%(162/183),其中 1b 型 81.08%(60/74),2a 型 93.33%(14/15),6a 型 92.63%(88/95)。其中 125 例存在耐药变异(77.16%,125/162),共检出 266 个变异位点,A156S 有 20 例(12.34%,20/162),其中 1b 型 11 例(18.33%,11/60),2a 型 9 例(64.29%,9/14);T54S 有 3 例(1.85%,3/162),全部出现在 HCV-1b 型中(5.0%,3/60);Q80K 有 84 例(51.85%,84/162),全部出现在 HCV-6a 型中(95.45%,84/88);

R155Q 有 1 例,全部出现在 HCV-6a 型中(1.14%,1/88);V36L 有 18 例,其中 HCV-6a 型 4 例(4.55%,4/88),HCV-2a 型 14 例(100%,14/14);D168E 有 2 例,全部出现在 HCV-6a 型中(2.27%,2/88)。本研究尚发现 13 例患者同时存在多个耐药变异位点,其中 HCV-2a 型有 9 例 V36L+A156S 变异(64.29%,9/14),HCV-6a 型有 2 例 Q80k+D168E,1 例 Q80k+V36L,1 例 Q80k+R155Q。

此外,我们尚发现一些未被证实是否能够导致耐药的变异,G80L 在 HCV 1b 型中发现 2 例(3.33%,2/60),Q80G 在 HCV-6a 中出现 2 例(2.27%,2/88),在 HCV-2a 型中出现 13 例(92.86%,13/14);V55R 在 HCV-1b 型中出现 1 例(1.67%,1/60);本研究发现大量的 V170I 变异(67.28%,109/162),其中 HCV-1b 型 9 例(15.0%,9/60),HCV-2a 型 13 例(92.86%,13/14),HCV-6a 型 87 例(98.86%,87/88),而有关 V170I 变异是否导致耐药的报道很少,需以后的研究证实(表 2)。

发生变异及未发生变异的患者,在人口学指标(年龄、性别)及临床检测指标(如 ALT、ALB、PLT)等方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。对于干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗的反应,存在 PI 变异组与无变异组在 RVR 率、cEVR 率、SVR 率方面的差异无统计学意义(表 3)。

3 讨 论

本研究中发现,我国慢性丙型肝炎患者对 NS3/4A 蛋白酶抑制剂存在预存耐药,HCV 1b 型变异率为 38.33%(23/60),2a 型为 100%(14/14),6a 型为 100%(88/88),1b 和 2a 型,1b 和 6a 型组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。不同 HCV 基因型同一个位点的变异频率不同:V36L 变异在 HCV 2a 型较 1b 型和 6a 型高($P < 0.05$),Q80K 变异在 HCV 6a 型较 1b 型和 2a 型高($P < 0.05$),HCV 2a 型 A156S 变异率较 1b 型和 6a 型高,1b 型又较 6a 型高($P < 0.05$)。本研究出现的耐药位点以可导致低-中度耐药的变异位点为主,但仍有可导致高度耐药的变异位点 A156 及 R155 出现。

HCV 1b 型 2a 型及 6a 型的变异率不同,变异特点也不同:HCV 1b 型发生变异较少,以单个位点变异为主,相比较而言,HCV 2a、6a 型则普遍发

表 2 HCV NS3/4A 蛋白酶抑制剂耐药相关变异分析结果
Table 2 The outcome of drug-resistance mutations of HCV NS3/4A protein protease

Resistance mutations	Drugs	References	Detected resistance mutations
V36 A, M, L, G, C	Telaprevir, Boceprevir	[1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10]	V36L HCV-6a 4.55%(4/88) HCV-2a 100%(14/14)
T54 A, S	Telaprevir, Boceprevir, SCH900518	[1, 2, 3, 4, 8, 9, 11, 12]	T54S HCV-1b 5.0%(3/60)
V55 A	Boceprevir	[1]	V55R HCV-1b 1.67%(1/60)
Q80 R, K	TMC435	[13, 14]	Q80KHCV-6a 95.45%(84/88) Q80L HCV-1b 3.33%(2/60) Q80G HCV-6a 2.27%(2/88) HCV-2a 92.86%(13/14)
R155 K,T,Q,I,M,G, L,S	Telaprevir, Boceprevir, TMC435 ITMN-191, BILN2061, SCH446211	[1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 13, 14]	R155Q HCV-6a 1.14%(1/88)
A156 S, T, V, I, G	Telaprevir, Boceprevir, TMC435 ITMN-191, BILN2061, SCH446211, SCH900518	[1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 14, 15]	A156SHCV-1b 18.33%(11/60) HCV-2a 64.29%(9/14)
D168 A,V,E,N,T,H V170 A,T	TMC435, ITMN-191, BILN2061 Telaprevir, Boceprevir,	[11, 13, 14] [1, 8, 11]	D168E HCV-6a 2.27%(2/88) V170I HCV-1b 15.0%(9/60) HCV-2a 92.86%(13/14) HCV-6a 98.86%(87/88)
Q41 R	Boceprevir, ITMN-191	[8]	0
F43 S, C	Telaprevir, Boceprevir, TMC435, ITMN-191	[8, 14]	0
R109 K	SCH446211	[15]	0
I153 V	SCH446211	[15]	0
M175 L	Boceprevir	[16]	0

表 3 HCV 病毒变异与临床特征、肝功能、病毒水平相关性

Table 3 Characteristics of patients with or without HCV genomes harboring drug-resistance mutations				($\bar{x} \pm s$)
Characteristics	Mutation type	Wild type	t/χ^2	<i>P</i> value
<i>N</i>	125	37		—
Age/years	35.88 ± 11.99	37.74 ± 12.92	-0.976	0.330
Gender			0.352 ¹⁾	0.553
Male	81	22		
Female	44	15		
ALT/(U/L)	72.98 ± 22.66	67.73 ± 14.87	1.683	0.094
AST/(U/L)	60.05 ± 18.79	55.95 ± 14.84	1.613	0.109
ALB/(g/L)	43.83 ± 3.52	44.53 ± 3.58	-1.275	0.204
lg(HCV RNA)/(IU/mL)	7.10 ± 0.72	6.98 ± 0.68	-1.760	0.082
BMI/(kg/m ²)	22.00 ± 3.15	21.49 ± 3.72	0.812	0.418
RVR	95/125(76%)	28/37(75.68%)	0.002 ¹⁾	0.968
cEVR	121/125(96.80%)	36/37(97.3%)	0.024 ¹⁾	0.878
SVR	102/125(81.60%)	30/37(81.08%)	0.005 ¹⁾	0.943

ALT: Alanine aminotransferase, AST: Aspartate aminotransferase, TBIL: Total bilirubin, ALB: Albumin, BMI: Body mass index, HCV-RNA: Hepatitis C virus RNA quantification, RVR: Rapid virological response, cEVR: Early virological response, SVR: Sustained virologic response. 1) χ^2 value

生变异,且为2个或以上位点同时发生变异,提示NS3区单氨基酸变异率随HCV基因型而不同,在Vallet等的研究中^[17],通过对233(包括HCV 1、2、3、4、5型)例慢性丙肝患者HCV NS3区直接测序法得到与本研究类似的结果。提示未来这类药物可能主要在1型患者中使用,6型或2型患者应用药物前需要常规检查耐药变异。

本研究发现的耐药变异主要为导致低-中度耐药的变异^[14,18],如V36L、T54S、Q80K、V170I等,变异率随基因型不同(2.27%-100%,表2),该结果与Vallet等^[17]一致。本研究HCV 2a型患者V36L为100%,与Paolucci等^[19]研究结果一致,该变异可降低HCV对TVR敏感性^[14]。HCV 6a型Q80K耐药变异高达95.45%(84/88),该变异证实TMC435中有致耐药性^[18]。既往研究未在6a型患者中进行相关研究,有文献报道,Q80K变异与HCV 1a型^[20]及5a型^[17]密切相关,本研究发现该变异在HCV 6a型变异率高,提示可能限制TMC435在HCV 6a型患者中应用。HCV的基因多态性限制了NS3/4A类PI在非1型患者中使用。

本研究检出致高度耐药的主要变异A156S 20例及R155Q 1例,A156S变异主要对TVR、BOC、SCH 900518等PI发生高度耐药^[21],R155Q变异主要导致TVR、BOC、SCH446211发生高度耐药^[21]。TVR、BOC未在我国上市,然而,本研究结果提示未来HCV 1b型及2a型患者在使用该两种药物治疗前,有必要进行A156S变异检查;同时,TVR或BOC单药治疗易产生耐药,应与其他类型HCV靶区抑制剂或干扰素及利巴韦林联合治疗,降低耐药发生。

本研究发现在部分患者中存在2个或以上的位点同时变异,如部分2a型患者V36L+Q80G+A156S+V170I,6a型患者Q80K+V170I,值得注意2a型患者出现A156S联合其他位点变异,对评估这类患者在未来使用NS3/4A类PI很有价值。

对于临床资料方面,变异株组与野生株组患者在性别、年龄、血小板、转氨酶水平、病毒量水平等方面无明显差异,两组中已知的影响干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗疗效的宿主及病毒因素均无明显差异,经干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗后,两组的疗效无明显差异,说明PI变异对慢丙肝病情的变化无明显影响,出现PI变异的患者使用干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗仍然有

效。

总的来说,我国慢性丙型肝炎患者对NS3/4A蛋白酶抑制剂存在预存耐药,不同HCV基因型发生变异率不同,1b型发生变异少,HCV 2a型及6a型发生变异普遍。耐药变异主要为导致低-中度耐药的变异。PI耐药变异对慢丙肝患者的疾病临床变化无明显影响,存在PI耐药变异的患者使用干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗仍可获得良好的疗效。因此,使用PI治疗前检测原发耐药变异具有必要性,尤其是对于非1b型患者。

参考文献

- [1] Susser S, Welsch C, Wang Y, et al. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients [J]. *Hepatology*, 2009, 50(6): 1709-1718.
- [2] Hezode C, Forestier N, Dusheiko G, et al. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(18): 1839-1850.
- [3] Kieffer TL, Sarrazin C, Miller JS, et al. Telaprevir and pegylated interferon- α -2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 hepatitis C virus replication in patients [J]. *Hepatology*, 2007, 46(3): 631-639.
- [4] Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, et al. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(5): 1767-1777.
- [5] Kuntzen T, Timm J, Berical A, et al. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients [J]. *Hepatology*, 2008, 48(6): 1769-1778.
- [6] Cai Q, Zhao Z, Liu Y, et al. Comparison of three different HCV genotyping methods: Core, NS5B sequence analysis and line probe assay [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(2): 347-352.
- [7] McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC, et al. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(18): 1827-1838.
- [8] Tong X, Bogen S, Chase R, et al. Characterization of resistance mutations against HCV ketoamide protease inhibitors [J]. *Antiviral Res*, 2008, 77(3): 177-185.
- [9] Zhou Y, Bartels DJ, Hanzelka BL, et al. Phenotypic

Learning curve and factors influencing the feasibility of performing fetal echocardiography at the time of the first-trimester scan [J]. *J Ultrasound Med*, 2011, 30 (5): 695-700.

- [20] Votino C, Kacem Y, Dobrescu O, et al. Use of a high-frequency linear transducer and MTI filtered color flow mapping in the assessment of fetal heart anatomy at the routine 11 to 13 + 6-week scan: a randomized trial [J].

Ultrasound Obstet Gynecol, 2012, 39(2): 145-151.

- [21] Shapiro I, Degani S, Leibovitz Z, et al. Fetal cardiac measurements derived by transvaginal and transabdominal cross-sectional echocardiography from 14 weeks of gestation to term [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 1998, 12(6): 404-418.

(编辑 王晓鹰)

(上接第441页 from page 441)

characterization of resistant Val36 variants of hepatitis C virus NS3-4A serine protease [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(1): 110-120.

- [10] Barbotte L, Ahmed-Belkacem A, Chevaliez S, et al. Characterization of V36c, a novel amino acid substitution conferring hepatitis C virus (HCV) resistance to telaprevir, a potent peptidomimetic inhibitor of HCV protease [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54 (6): 2681-2683.
- [11] He Y, King MS, Kempf DJ, et al. Relative replication capacity and selective advantage profiles of protease inhibitor-resistant hepatitis C virus (HCV) NS3 protease mutants in the HCV genotype 1b replicon system [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(3): 1101-1110.
- [12] Tong X, Arasappan A, Bennett F, et al. Preclinical characterization of the antiviral activity of SCH 900518 (Narlaprevir), a novel mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(6): 2365-2370.
- [13] Reesink HW, Fanning GC, Farha KA, et al. Rapid HCV-RNA decline with once daily TMC435: a phase I study in healthy volunteers and hepatitis C patients [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(3): 913-921.
- [14] Lenz O, Verbinen T, Lin TI, et al. In vitro resistance profile of the hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor TMC435 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54 (5): 1878-1887.

- [15] Yi M, Tong X, Skelton A, et al. Mutations conferring resistance to SCH6, a novel hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor. Reduced RNA replication fitness and partial rescue by second-site mutations [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(12): 8205-8215.

- [16] Chase R, Skelton A, Xia E, et al. A novel HCV NS3 protease mutation selected by combination treatment of the protease inhibitor boceprevir and NS5B polymerase inhibitors [J]. *Antiviral Res*, 2009, 84(2): 178-184.
- [17] Vallet S, Viron F, Henquell C, et al. NS3 protease polymorphism and natural resistance to protease inhibitors in French patients infected with HCV genotypes 1-5 [J]. *Antivir Ther*, 2011, 16(7): 1093-1102.
- [18] Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors [J]. *J Hepatol*, 2011, 55(1): 192-206.
- [19] Paolucci S, Fiorina L, Piralla A, et al. Naturally occurring mutations to HCV protease inhibitors in treatment-naïve patients [J]. *Virology*, 2012, 9: 245.
- [20] Trevino A, de Mendoza C, Parra P, et al. Natural polymorphisms associated with resistance to new antivirals against HCV in newly diagnosed HIV-HCV-coinfected patients [J]. *Antivir Ther*, 2011, 16(3): 413-416.
- [21] Sarrazin C, Hezode C, Zeuzem S, et al. Antiviral strategies in hepatitis C virus infection [J]. *J Hepatol*, 2012, 56(Suppl 1): S88-S100.

(编辑 孙慧兰)