

抗HCV新型直接抗病毒药物相关耐药位点研究进展

孙丹辉 颜学兵

【摘要】近年来,新型直接抗病毒药物(DAAs)药物研发取得了突破性进展,使其在抗HCV过程中具备高SVR率、广泛基因型谱、治疗周期短以及耐药率低等优点。但随着新型抗病毒药物在临床中的广泛应用,已发现多个相关耐药位点直接影响抗HCV的疗效,本文针对新型DAAs药物(包括NS3/4A蛋白酶抑制剂、NS5A蛋白抑制剂及NS5B聚合酶抑制)及其相关耐药位点进行总结。

【关键词】肝炎病毒, 丙型; 基因型; DAAs抑制剂; 耐药位点

Research progress of the related resistance mutations of direct-acting antiviral agents for HCV infection treatment Sun Danhui, Yan Xuebing. Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China

Corresponding author: Yan Xuebing, Email: yxbxuzhou@126.com

【Abstract】 In recent years, the development of direct-acting antiviral agents (DAAs) has made a breakthrough and had a variety of advantages of a high SVR rate, a wide genotype spectrum, a short treatment cycle and a low resistance rate in the treatment for HCV infection process. With the development of new antiviral drugs in clinical application, it has been found that the efficacy of treatment for HCV infection was directly affected by some related resistance loci. In this paper, the new DAAs drugs (including NS3/4A protease inhibitors, NS5A inhibitors and NS5B polymerase inhibition) and the related drug resistance loci were summarized.

【Key words】 Hepatitis C virus; Genotype; Direct-acting antiviral agents inhibitor; Resistance mutations;

直接抗病毒药物(direct-acting antiviral agents, DAAs)又称丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)特异性靶向抗病毒治疗药物,是以HCV复制相关酶和蛋白作为靶点的一类小分子药物。主要包括NS3/4A蛋白酶抑制剂、NS5A蛋白抑制剂及NS5B聚合酶抑制。DAAs种类繁多,发展迅速,目前在研及上市已多达30余种,其中NS3/4蛋白酶抑制剂有11种,已上市有3种分别为博赛匹韦(boceprevir, BOC)、特拉匹韦(telaprevir, TVR)和西甲匹韦(simeprevir, SMV)。NS5A蛋白抑制剂有13种,第一代NS5A蛋白抑制剂达卡他韦(daclatasvir, DCV)复合制剂于2014年8月在欧盟获批,并于今年7月在日本和英国陆续上市。NS5B聚合酶抑制剂也已多达10余种,其中索非布韦(sofosbuvir, SOF)早在2013年底于北美上市,同年被FDA首次获批上市。DAAs的研发一方面为不能耐受

干扰素慢性丙型肝炎患者,提供了多种可供选择的治疗方案,另一方面能广泛覆盖于不同基因组型,显著提高持续病毒学应答(sustained viral response, SVR)率。DAAs之间的组合方案及其复合制剂的应用,可以在较高SVR基础上,有效降低耐药株形成。但随着DAAs在临床上的不断应用,已发现多个变异位点直接影响抗病毒的疗效。基于已有报道,笔者将对相关耐药位点进行详细阐述。鉴于NS5A蛋白抑制剂发展尤为迅速,将重点介绍NS5A蛋白酶的 latest 研究进展。

一、NS3/4A蛋白酶抑制剂耐药位点

NS3/4A蛋白酶抑制剂可分为两类,一类为蛋白酶共价抑制剂,又称线性/酮酰胺类衍生物,包括BOC和TVR;另一类为线性或大环类蛋白酶非共价抑制剂,主要为SMV^[1]。由于线性抑制剂和环状抑制剂都结合于NS3活性中心,加之有相同的耐药变异基础,因此,会导致两类抑制剂之间存在交叉耐药。已发现的蛋白酶抑制剂(protease inhibitor, PIs)高度耐药位点为R155和A156,基因(genotype, GT)1a型耐药位点主要为V36M、R155K/T和T54A/S, GT1b型主要为A156T、D168V和V170A。已报

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2016.05.005

基金项目:江苏省“科教兴卫”医学重点人才培养基金(No. RC2011117);江苏省“六大人才高峰”项目(No. 2011-WS-068)

作者单位:221002 徐州市,徐州医学院附属医院感染性疾病科

通讯作者:颜学兵, Email: yxbxuzhou@126.com

道TVR的耐药位点为V36、T54、R155和A156，BOC耐药位点为V36、T54、R109、R55、A156、及V170，SMV耐药位点为F43S、Q80K和D168V/E^[2-3]。

NS3/4A蛋白酶的具有基因多态性，限制了PIs在不同基因型中的应用，其中抗病毒效果最佳的是基因（GT）1型，而GT 2、3和4型疗效较差。目前已经上市NS3蛋白酶抑制剂的3种（BOC、TVR、SMV）加1种（Ritonavir）同类药物的增效剂，主要用于联合聚乙二醇化干扰素和利巴韦林的抗病毒治疗。2014年EASL指南指出针对GT 1型患者，在无其他任何治疗方案可供选择的前提下，可选用PR联合BOC、TVR^[4]，其相关耐药位点如下所示。

二、NS5A蛋白抑制剂

1. NS5A蛋白结构及功能：NS5A蛋白是一种高度磷酸化的非结构蛋白，位于多聚蛋白前体的1 973~2 419氨基酸区域，分子量为58 kDa，由447个氨基酸组成，有3个不同的结构域。结构域I（氨基酸序列：1~213）由一个高度保守的两性α-螺旋和一个疏水的侧链及带电的侧链组成，是NS5A与RNA结合的重要区域。结构域II（氨基酸序列：250~342）和结构域III（氨基酸序列：356~447）也对病毒的复制和组装有着重要作用。NS5A蛋白可以诱导白细胞介素-8（IL-8）的表达，降低干扰素的抗病毒作用。同时，NS5A蛋白上的干扰素敏感性决定位点（interferon sensitivity determining region, ISDR）可通过与依赖RNA的蛋白激酶（RNA-dependent protein kinase, PKR）结合从而抑制细胞对α-干扰素的应答^[5]。

现有研究已证实NS5A蛋白可进行多种磷酸化，并在磷

酸化水平上对HCV基因组的复制和翻译起调节作用。根据NS5A丝氨酸残基磷酸化的程度存在p56和p58两种不同成熟形式。同时有体外模型研究也发现NS5A蛋白为混杂多重蛋白，作用于多种宿主及病毒组分，据此推测与细胞膜网络结构有关。NS5A蛋白可通过调控核心蛋白以增加病毒各组分的紧密性，从而更有利于NS3、NS4和NS5B蛋白之间的磷酸化。不同形式NS5A蛋白在病毒生存周期发挥的作用也不尽相同。因其结构和功能的多样复杂性，且不具有酶活性功能，目前仍很难推测具体抗病毒机制或模式（mode of action, MOA）和预估抗病毒的效率。近期有药物实验研究，受试者为9例未经治疗HCV感染者，口服NS5A蛋白抑制剂Daclatasvir 10 mg或者100 mg，同时监测出HCV病毒载量下降幅度，在早期6 h内下降最快可达2 log₁₀，并精确计算出半衰期为48 min，表明NS5A蛋白抗病毒机制主要在阻断病毒RNA的合成和组装。

2. 各类NS5A蛋白抑制剂研究现状：目前至少有13种NS5A蛋白抑制剂处于药物临床试验评估阶段，处于III期的3种分别为Ledipasvir（GS-5885）、Daclatasvir（BMS-790052）、Ombitasvir（ABT-267），II期有7种分别为ACH-3102、Samatasvir（IDX719）、MK-8742、AZD-7295/A-831、GSK2336805、PPI-668和GS-5816，I期有3种：ACH-2928、EDP-239和PPI-461。第一代NS5A抑制剂Daclatasvir、Ledipasvir和Ombitasvir（ABT-267），已进入III期临床试验阶段。因其在抗病毒过程中易出现耐药突变，为进一步提高耐药屏障及降低GT1型耐药株发生率，在此基础上研发第二代GS-5816，ACH-3102和MK-8742。

表 1 HCV NS3/4A 蛋白酶相关耐药位点

耐药位点	HCV NS3/4A蛋白酶抑制剂					
	Boceprevir	Telaprevir	Simeprevir	Faldaprevir	ABT-450	Danoprevir
36	V36A/M	V36A/M/G/L	V36M		V36M/A/G	V36M/A/G
43			F43S			
54	T54A/S/G/C	T54A/S	T54S			
55	V55A/I				V55I	V55I
80			Q80K/R/L			
122			S122A/R			
132		I132V**				
138			S138T			
155	R155K/T	R155K/T/G/M	R155K	R155K	R155K	R155K
156	A156S/T/V	A156S/T/V	A156T/V	A156T/V	A156T/V	
158	V158I					
168		D168N**	D168A/V/E/H/T	D168A/V/E/H/Y/N/P/I	D168A/V/Y/E/K	D168E/T
170	I*V170F*A/T*T					
175	M175L					

注：经FDA认可的能够影响HCV药物敏感性的耐药突变。加黑字体代表与基因型耐药明确相关的氨基酸位点突变。“*：I170F/T突变大部分见于HCV基因1a型，V170A/T常见于基因1b型。”：这些变异几乎未经体内实验发现，临床意义尚不明确，大多被认为是与其他耐药相关位点突变同时出现，单独出现并不导致telaprevir耐药。空格：尚未发现相关耐药位点

DCV (daclatasvir, BMS-790052)是第一代NS5A蛋白抑制剂,在GT1a与1b型HCV耐药位点集中位于NS5A区氨基酸水平上的31~93位点,主要耐药位点为L31V和Y93H^[13]。当GT1b中Y93H、L31V发生变异时可分别增加其耐药率的24和28倍,若同时发生变异,则耐药率则扩大到14倍^[16]。在GT1a型HCV常见耐药位点为M28T、Q30E/H/R、L31M/V、P32L和Y93C/H/N,而GT1b为L31F/V、P32L和Y93H/N,次级耐药位点L23F、R30Q和P58S。在GT2a型HCV中发现F28S为其主要的耐药位点,当与L31M同时发生变异时,EC₅₀值远大于2nmol/L。Y93H为GT3a型HCV的主要耐药位点,其次为A30K、L31F和L31V。而在GT5a型HCV中L31F、L31V, L31F/V-K56R发生变异位点时,可使EC₅₀值由2 nmol/L升至40 nmol/L,而GT-6a型HCV出现Q24H、L31M、P32L/S和T58A/S位点变异时,EC₅₀由2 nmol/L升至250 nmol/L。DCV耐药屏障排列顺序为1b > 4a > 5a > 6a = 1a > 2a > 3a。根据International Antiviral Society USA报道,NS5A蛋白抑制剂耐药发生率与基因型及每个亚型中氨基酸的位置相关。尽管GT1b型具备有高水平耐药位点,却发现GT1a型HCV更易出现耐药,具体机制目前尚不明确。NS3/4蛋白酶抑制剂Asunaprevir和NS5A蛋白抑制剂DCV联合用于抗病毒治疗,发生病毒学突破时发现NS5A区Q30E/R、L31M/V和Y93C/N发生变异。

Daclatasvir抗病毒治疗应用范围广、不良反应少,可快速突破性降低病毒载量,并在GT1、2型HCV RNA显示出高效性,其疗效GT2、3型优于GT1、4型。GT1型HCV感染者口服30~100 mg治疗14 d后,HCV RNA载量可下降3 log₁₀,且完全可使野生株和低水平耐药株下降3~4 log₁₀。若存在高水平耐药位点疗程需延长24~48周^[14-16]。其针对GT4型HCV在联合干扰素、利巴韦林12周即可达到100% SVR。在II期药物临床试验阶段,NS5A联合NS5B聚合酶抑制剂,即DCV联合SOF复合制剂,主要用于治疗GT1、GT2和GT3 HCV感染者,经治疗4周即可获得100%SVR。对于GT1型HCV未经治疗或者口服蛋白酶抑制剂联合PR无效的患者,经治疗12周可达到100% SVR,而GT2、3型HCV感染者SVR为91%^[8-10]。

Ledipasvir (GS-5885)对GT1a、1b、4a和6a型HCV RNA具有高效的抗病毒性,对于GT2a、3a型抗病毒疗效相对较低,I期临床试验中经治疗3日后HCV RNA可下降2.3~3.3 log₁₀,但很快出现耐药。耐药位点在GT1a型为30、31,GT1b耐药位点位于93^[10]。II期临床试验针对GT1型HCV感染者的治疗采用Ledipasvir联合SOF、利巴韦林疗程12周即可达100% SVR。

Ombitasvir全基因型耐药位点为28、30、31,在GT1a相关耐药位点为M28T、M28V、Q30R和Y93C,其中M28V位点的变异可导致同剂量水平下药物疗效降低58倍。GT1b型HCV中Y93H发生变异,耐药性则增加77倍。在GT1a、

1b型HCV中与DCV和Ledipasvir具有相同耐药变异位点即L31M。欧洲丙型肝炎流行病学研究报道,在GT1a型HCV中Q30H、L31M变异率约为2.5%~6.0%,M28V的变异率约为6%,而M28T、Q30R、Y93C/H均低于1%。GT1b型HCV中Y93H的变异率为5%。III临床试验中用于联合ABT-450, Ritonavir和Dasabuvir,加用或者不加用利巴韦林,对基因1b型HCV可获得中较高水平SVR。

ACH-3102为第二代NS5A蛋白抑制剂,尚处于II期临床试验中,其具有高耐药屏障。其在GT1型HCV感染者中病毒耐药变异率处于低水平。目前在Ia临床研究中,针对GT1型HCV RNA可有效使HCV RNA下降3.6~4.6 log₁₀,单剂量联合利巴韦林II期临床研究正在进行。

Samatasvir为泛基因型NS5A蛋白抑制剂,给药后3~4 h达到血药峰浓度,血浆半衰期约为20 h。其对在GT1~4型HCV显示出高效抗病毒作用,若存在Y93H位点变异时则处于低耐药屏障。其对GT2型HCV感染者抗病毒活性可依据NS5A氨基酸位点31的单核苷酸多态性来确定。在基线时对NS5A L31显示出较高的抗病毒作用,可使HCV RNA降幅为(2.5~4.1) log₁₀,但在基线水平出现M31H时,则抗病毒活性为最弱^[6-7]。Samatasvir II期临床试验源于Janssen,为联合其他两种DAAS(包括TMC 647055属于非核苷酸NS5B聚合酶抑制剂,Simeprevir属于NS3/4蛋白酶抑制剂)^[11]。

GSK2336805正处于II期临床研究阶段,用于未经药物治疗的GT1型丙型肝炎患者,疗程为12周,其联合NS5B聚合酶抑制剂VX-135,结合或不结合RBV。对于未经治疗的CHC患者单剂量10 mg/d或者60 mg/d,可使HCV下降(0.93~3.9) log₁₀。目前研究表明其为强有效NS5A抑制剂,具有低水平EC₅₀。I期临床试验中健康人群单用或者大剂量口服(10、30、75 mg)7 d或者14周后,可出现轻微头痛(发生率为8%),为其目前观察到的唯一不良反应^[19-20]。

PPI-668处于I期临床试验阶段,用于未经药物治疗的GT1型和2、3型HCV感染者,单独服用3 d后可使GT1 HCV RNA载量下降(3.5~3.7) log₁₀,GT2、3型HCV载量下降3.0 log₁₀。IIa期其尚处于联合Faldaprevir和PI B1207127,加用或者不加用RBV阶段。

GS-5816为第二代NS5A抑制剂,对基因1~6型HCV RNA,显示出高耐药屏障。半数有效浓度(concentration for 50% of maximal effect, EC₅₀),EC₅₀ = 130 PM时可对抗L31M变异,121 PM时则可抵制Y93C变异^[18],除此之外,Gilead正在研究应用100 mg GS-5816联合Sofosbuvir、利巴韦林或单一联合口服Sofosbuvir治疗CHC^[21-22]。

ACH-2928为高效NS5A蛋白抑制剂,单药口服3 d后可快速使GT1型HCV RNA水平下降3.7 log₁₀。EDP-239主要用于基因1b型慢性丙型肝炎患者抗病毒治疗,与Aliporivir联

合应用时显示其高效抗病毒性^[17]。

PPI-461属于第一代NS5A蛋白酶抑制剂，针对基因1型HCV感染者单药口服100 mg或者200 mg，3 d后可使病毒量下降3.6 log₁₀，但很快在28、30、31和93位出现耐药^[12]。具体变异位点及EC₅₀倍数值增加，详见表2。

3. 各基因型HCV RNA在NS5A区主要耐药位点：各基因型HCV在NS5A区第一个100个氨基酸序列中相同，GT 1b型HCV RNA具有高水平耐药，GT 3a有低水平耐药。NS5A区高水平耐药位点位于Q30、L31和Y93，同时发现L31F、L31V在GT1a、1b、3a型HCV RNA均存在。GT 1a的耐药位点主要为M28A/T、Q30E/R/K、L31M/V/F、P32L、H58D/P/N、E62D和Y93C，GT1b型HCV RNA耐药位点主要为L23F、R30Q、L31M/V/F/W、P32L、P58S、Y93C/H/N和I280V。GT5a型HCV RNA耐药位点为L31F、L31V、K56R和L31F-K56。GT6a耐药位点位于Q24H、L31M、P32L、P32S、T58A、T58N和T58S^[34]。未经治疗的CHC及同时合并HIV感染者中，常见耐药位点M28T、Q30H/R、L31F/M/V、P32L和Y93C/H/N，详见图1。

4. NS5B聚合酶抑制剂：NS5B聚合酶抑制剂可分为核

6301 tgttgactga ettcaagacc tggctccagt ccaagetc **at gccg****cg****cg****cg****cg** ccggaggtcc
M28 R30 L31
6361 ccttctctct ctgccaacga ggggtacaagg gactctggcg gggagacggc atcatg**caaa**
Q54
6421 ccacctgcc atgtggagca cagatcacgc gacatgcaa aaatgggttc atgaggatcg
6481 ttgggcctaa gacctgcagc aacatgtggt gcggaacatt ccccatcaac gcata**acta**
Y93

图1 NS5A区常见耐药位点核苷序列与氨基酸对照图

苷类抑制剂和非核苷类抑制剂。核苷类抑制剂通过直接抑制聚合酶的活性部位，从而阻止HCV RNA复制。而非核苷类抑制剂主要抑制活性部位之外的位点，改变NS5B聚合酶的构象从而抑制病毒的复制。NS5B区对于HCV的存活影响较大，此区变异直接影响病毒复，因此，NS5B聚合酶被设计为广谱抗HCV DAA的作用靶点。也是SOF与其他针对HCV病毒蛋白或酶靶标的药物相比，具有较高的耐药屏障的重要原因。非核苷类抑制剂结构决定了其对机体不良反应少，但其抗病毒效能弱于核苷类，且易发生变异。目前属于NS5B聚合酶抑制剂药物约有10种，其中核苷类有：Sofosbuvir、VX-135、IDX-20963和ACH-3422；非核苷类：ABT-333、Deleobuvir、BMS-791325、PPI-383、GS-9669和TMC-647055。已上市的DAA仅有一种，即Sofosbuvir（SOF），其S282T为明确耐药变异位点。Dasabuvir（ABT-333）在GT 1a型HCV变异位点为S556G、C316Y和Y448C/H，GT 1b型HCV常见变异位点为C316和M414T。Fildabuvir相关耐药位点发生频率V494I < WT < V494A < M426A < M423T。具体变异位点及EC₅₀倍数值增加，详见表3。

三、NS5B聚合酶抑制剂耐药位点

NS5B聚合酶抑制剂主要变异位点为C316Y、M414T、Y448C/H、S556G，其中GT1b HCV RNA为C316Y和M414T，GT 1a型HCV RNA为Y448C/H。耐药位点C3WY在1a、1b型HCV RNA两种基因型均有存在，发现368、411、414、553、556和559为低水平耐药位点。在GT 1a和

表 2 NS5A 蛋白抑制剂变异位点及 EC₅₀ 增加倍数

DAAS	GT1a	EC ₅₀ 增加倍数	GT1b	EC ₅₀ 增加倍数
Daclatasvir	M28V (3.1%)	1.3	L28M/V	2.0
	Q30E/H/R/K		R30H	
	L31M (3.1%)	341	L31M (6.6%)	3
Ledipasvir	L31M (3.1%)	140	L31M	
GSK805	L31M (3.1%)		L31M	
	I280V		I280V (6.6%)	
	V298A	> 150	V298A	
	V362A		V362A	
	S364P		S364P	
	S368P		S368P	
Samatasvir	L31M		L31M (6.6%)	
	p32L		P32L	
	Y93C/H/N		Y93H (10%)	3.6
	V153M		V153M	
	R157W		R157W	
	V198V		V198A	
	M202L		M202L	93
	P223S		P223S	
Daclatasvir	Q54H/L/N		Q54H (26.6%)	1.0
	H58P (6.2%)		P58S/T/L	
Daclatasvir	N69T	1.2	N69T	
	A92V		A92V	
Daclatasvir	Y93C/H/N		Y93H (10%)	24
Ledipasvir	Y 93C/H/N		Y93H (10%)	1 319

注：空格：尚未明确发生相关耐药位点变异后 EC₅₀ 增加倍数

GT1b型HCV RNA中变异发生率> 30%的位点为C316Y、M414T、Y448H和S556G, 而在野生株中变异发生率< 20%的位点分别是368、411、445、451、553和559^[27-29]。

四、药物多种组合方案及复合制剂应用

目前直接抗病毒药物有种结合模式, 包括NS5B + NS5A、NS5B + NS3/4A、NS5B + NS3/4A + NS5A和NS3/4A + NS5A的联合, 其中含有NS5B + NS3/4A + NS5A靶点的两个治疗方案已经完成了III期临床试验, 包括Dasabuvir (ABT-333) + Ombitasvir (ABT-267) + ABT-450/r, BMS-79132 + Daclatasvir (BMS-790052) + Asunaprevir (BMS-650032) 已经提交FDA待审批, 另外一个NS3/4A联合NS5A的Daclatasvir + Asunaprevir方案也已经提交FDA待审批。

处于III期阶段的Daclatasvir + Asunaprevir组合用药方案, 抗病毒适用人群为难以耐受干扰素不良反应, 或对其无应答的慢性丙型肝炎GT 1型的患者, 包括代偿期肝硬化患者。已在日本进行研究并获批, 经治疗24周后达到持续病毒学应答 (SVR24) 率为84.7%, 不能耐受或不适用干扰素方案的丙型肝炎患者, 91.9%治疗后达到SVR24; 基线时已发生代偿性肝硬化的患者中, 总体达到SVR24比例为90.9%。美国食品和药物管理局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 于2014年2月审批通过Daclatasvir +

Asunaprevir组合方案, 并将该方案认定为突破性疗法, 指定用于治疗GT 1b型HCV感染。

目前已经上市Ledipasvir (LDV) + Sofosbuvir (SOF) (结构图见图2) 固定剂量组合片剂Harvoni (LDV/SOF, 剂量为90 mg/400 mg) 于2014年10月10日经FDA首次获批新药, 用于GT 1型CHC患者的治疗。另一种丙型肝炎鸡尾酒疗Ombitasvir + Ritonasvir + Dasabuvir, 即NS5A蛋白抑制剂联合NS5B聚合酶抑制剂, 同时加入增敏剂三联复合片剂, 也正在研究中, 有望于2015年获批。2015年欧洲肝病学会最新HCV治疗指南推荐固定剂量片剂 (75 mg Ombitasvir, 12.5 mg Paritaprevir和50 mg Ritonavir), 1片/d或者同时每2天1片NS5B 非核苷类聚合酶 (novel non-nucleoside inhibitor, NNI) dasabuvir剂量为250 mg, 用非肝硬化GT1型CHC患

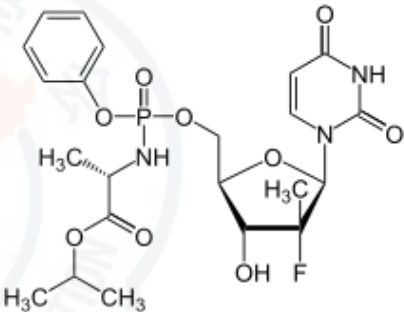


图2 上市Sofosbuvir的结构图

表 3 NS5B 聚合酶抑制剂变异位点及 EC₅₀ 增加倍数

DAAS	GT1a	EC ₅₀ 增加倍数	GT1b	EC ₅₀ 增加倍数
Sofosbuvir + Mericitabine	S96T N142T L159F C223H/Y S282T L320F		S96T N142T L159F (23.3%) C223H/Y S282T L320F	
PSI-352938	V321I (3.1%)	2.0	V321I (3.3%)	
Tegobuvir + HCV796	C316Y/N/F/S V362A S365A/T M414T L419M/S A421V R422K M423I/V/T		C316N (36.6%) V362A S365A/T M414T L419M/S A421V R422K M423I/V/T	
Filibuvir	M426L (3.1%) C445F	0.8	M426L (6.6%) C445F	0.8
Tegobuvir	Y448H (3.1%) Y452H (3.1%) R465G I482L/T A486V V494A P495A/L/S/T P496A/S	36.0 6.9	Y448H Y452H (3.3%) R465G (3.3%) I482L/T A486V V494A P495A/L/S/T P496A/S	6.9 1.1
JKI109 + Deleobuvir	A499T G554D S556G/D/N D559G/N		V499A (13.3%) G554D S556G/D/N D559G/N	3.0

注: 括号内野生株发生变异率, EC₅₀ > 4 倍为耐药位点; 空格: 尚未明确发生相关耐药位点变异后 EC₅₀ 增加倍数

者12周抗病毒治疗。

五、结语

HCV复制速度快且其RNA聚合酶复制精确度差,易发生变异。DAAs耐药株在未用药前以低浓度存在,单一口服DAAs易导致耐药株的形成,且易成为优势株。目前专家共识及指南均不建议单剂量口服直接抗病毒药物,推荐两种或两种以上联合以防止病毒学突破。参考在抗HIV联合多个靶点治疗方案,考虑可将DAAs优势作用靶点集中,用以降低耐药株的形成。经体内外药代动力学研究及多中心临床研究表明DAAs联合应用可增加多种不良反应,是否有选择性联合多种抗病毒药物的治疗仍是今后需要探讨问题。随着耐药位点检测水平进一步提高,尤其基因芯片在临床医学的广泛应用,在此基础上择优选择DAAs,可进一步提高抗病毒治疗的疗效并降低各种不良反应的发生。

参 考 文 献

- 1 Maasoumy B, Manns MP. Optimal treatment with boceprevir for chronic HCV infection[J]. *Liver International*,2013,33(S1):14-22.
- 2 McCown MF, Rajyaguru S, Kular S, et al. GT-1a or GT-1b subtype-specific resistance profiles for hepatitis C virus inhibitors telaprevir and HCV-796[J]. *Antimicrob Agents Chem*,2009,53(5):2129-2132.
- 3 Kukulj G, Benhamou Y, Manns MP, et al. 954 BI 201335, a potent HCVNS3 protease inhibitor, in treatment-naïve and-experienced chronic HCV genotype-1 infection: genotypic and phenotypic analysis of the NS3 protease domain[J]. *J Hepatol*,2009,50:S347.
- 4 European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection[J]. *J Hepatol*,2014,60(2):392-420.
- 5 Elazar M, Cheong KH, Liu P, et al. Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication[J]. *J Virol*,2003,77(10):6055-6061.
- 6 Polyak SJ, Khabar KSA, Paschal DM, et al. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response[J]. *J Virol*,2001,75(13):6095-6106.
- 7 Lee C. Discovery of hepatitis C virus NS5A inhibitors as a new class of anti-HCV therapy[J]. *Arch Pharm Res*,2011,34(9):1403-1407.
- 8 Lok AS, Gardiner DF, Lawitz E, et al. Preliminary study of two antiviral agents for hepatitis C genotype 1[J]. *N Engl J Med*,2012,366(3):216-224.
- 9 Everson GT, Sims KD, Rodriguez-Torres M, et al. Interim analysis of an interferon (INF)-and ribavirin (RBV)-free regimen of daclatasvir (DCV), asunaprevir (ASV), and BMS-791325 in treatment-naïve, hepatitis C virus genotype 1-infected patients[J]. *J Gastroenterol Hepatol*,2013,28:154.
- 10 Wong KA, Worth A, Martin R, et al. Characterization of hepatitis C virus resistance from a multiple-dose clinical trial of the novel NS5A inhibitor GS-5885[J]. *Antimicrob Agents Chem*,2013,57(12):6333-6340.
- 11 Vince B, Hill JM, Lawitz EJ, et al. A randomized, double-blind, multiple-dose study of the pan-genotypic NS5A inhibitor samatasvir in patients infected with hepatitis C virus genotype 1, 2, 3 or 4[J]. *J Hepatol*,2014,60(5):920-927.
- 12 Lalezari J, Agarwal K, Dusheiko G, et al. Dose-ranging trial of PPI-461, a potent new pan-genotypic HCV NS5A inhibitor, in patients with HCV genotype-1 infection[R]. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011.
- 13 Lalezari J, Farrell G, Shah P, et al. PPI-668, a potent new pan-genotypic HCV NS5A inhibitor: Phase 1 efficacy and safety[R]. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2012.
- 14 Targett-Adams P, Graham E JS, Middleton J, et al. Small molecules targeting hepatitis C virus-encoded NS5A cause subcellular redistribution of their target: insights into compound modes of action[J]. *J Virol*,2011,85(13):6353-6368.
- 15 Gao M, Nettles RE, Belema M, et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect[J]. *Nature*,2010,465(7294):96-100.
- 16 Fridell RA, Qiu D, Wang C, et al. Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system[J]. *Antimicrob Agents Chem*,2010,54(9):3641-3650.
- 17 Vince B, Lawitz E, Searle S, et al. Novel NS5A inhibitor ACH-2928 Phase I results in HCV GT-1 patients[J]. *J Hepatol*,2012,56(2):S480-S481.
- 18 Garcia-Rivera J, Chatterji U, Gallay P. Cyclophilin inhibitor alisporivir (ALV) combinations with direct acting antivirals reveal strong synergistic anti-HCV effects[J]. *J Hepatol*,2013,58(S1):S469.
- 19 Spreen W, Wilfret DA, Bechtel J, et al. GSK2336805 HCV NS5A inhibitor demonstrates potent antiviral activity in chronic genotype 1 infection; results from a first time in human (FTIH) single and repeat dose study[R]. 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011:400A-401A.
- 20 Bryant A, Bowman D, Olle B, et al. Vertex Enters Agreement with GlaxoSmithKline for Phase 2 All-Oral Study of VX-135 and GSK2336805 for the Treatment of Hepatitis C[R]. Jennifer Levin,2012.
- 21 Cheng G, Yu M, Peng B, et al. 1191 GS-5816, a second generation HCV NS5A inhibitor with potent antiviral activity, broad genotypic coverage and a high resistance barrier[J]. *J Hepatol*,2013, 58(S1):S484-S485.
- 22 Information T. Gilead Sciences Phase 2 Study of SOF + GS-5816 in treatment naïve subjects with chronic HCV[R]. Bone & Cancer Foundation,2013.
- 23 Sciences G. Gilead reports interim data from Phase 2 LONESTAR study[R]. Foster City, CA: Gilead Sciences, 2013.
- 24 Delang L, Neyts J, Vliegen I, et al. Hepatitis C Virus-Specific Directly Acting Antiviral Drugs[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*,2013,369:289-320.
- 25 Hanouille X, Verdegem D, Badillo A, et al. Domain 3 of non-structural protein 5A from hepatitis C virus is natively unfolded[J]. *Biochem Bioph Res Co*,2009,381(4):634-638.
- 26 Lam AM, Espiritu C, Bansal S, et al. Genotype and subtype profiling

- of PSI-7977 as a nucleotide inhibitor of hepatitis C virus[J]. *Antimicrob Agents Chem*,2012,56(6):3359-3368.
- 27 Bartels DJ, Sullivan JC, Zhang EZ, et al. Hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to direct-acting antivirals (DAAs) were rarely observed in DAA-naïve patients prior to treatment[J]. *J Virol*,2013,87(3):1544-1553.
- 28 Membreno FE, Lawitz EJ. The HCV NS5B nucleoside and non-nucleoside inhibitors[J]. *Clin Liver Dis*,2011,15(3):611-626.
- 29 Pawlotsky JM. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C[J]. *J Hepatol*,2013,59(2):375-382.
- 30 Walker J, Crosby R, Wang A, et al. Preclinical characterization of GSK2336805, a novel inhibitor of hepatitis C virus replication that selects for resistance in NS5A[J]. *Antimicrob Agents Chem*,2014,58(1):38-47.
- 31 McCarville JF, Chapron C, LaColla M, et al. Hepatitis C Virus NS5A inhibitor IDX719 demonstrates potent, pan-genotypic activity in preclinical and clinical studies[J]. *Hepatol Int*,2013,10:S330.
- 32 Gane E, Foster GR, Cianciara J, et al. 2003 antiviral activity pharmacokinetics ,and tolerability of azd7295, a novel NS5A inhibitor, in a placebo-controlled multiple ascending dose study in HCV genotype 1 and 3 patients[J]. *J Hepatol*,2010,52:S464.
- 33 Paolucci S, Fiorina L, Mariani B, et al. Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A region and NS5B polymerase in DAA treatment-naïve patients[J]. *Virol J*,2013,10:355.
- 34 Wadood A, Riaz M, Jamal S B, et al. Molecular docking study of P4-Benzoxaborolesubstituted ligands as inhibitors of HCV NS3/4A protease[J]. *Bioinformation*,2013,9(6):309.
- 35 Soriano V, Vispo E, de Mendoza C, et al. Hepatitis C therapy with HCV NS5B polymerase inhibitors[J]. *Expert Opin Pharmacother*,2013,14(9):1161-1170.
- 36 Zhou XJ, Vince B, Hill J, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of IDX719, a pan-genotypic HCV NS5A inhibitor in genotype 1, 2, 3 or 4 HCV-infected subjects[R]. *Asian Pacific Association for the Study of the Liver*,2013:6-10.
- 37 Shiffman ML. Hepatitis C virus therapy in the direct acting antiviral era[J]. *Curr Opin Gastroen*,2014,30(3):217-222.
- 38 World Health Organization. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection[R]. *World Health Organization*, 2014.

(收稿日期: 2015-06-27)

(本文编辑: 孙荣华)

孙丹辉, 颜学兵. 抗HCV新型直接抗病毒药物相关耐药位点研究进展[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*,2016,10(5):534-540.