

DOI: 10.13376/j.cbls/2016042

文章编号: 1004-0374(2016)03-0337-07



戚中田, 第二军医大学微生物学教研室教授、博士生导师, 全军生物侦检与防护重点实验室主任, 国家杰出青年基金、国家级突出贡献中青年专家、求是杰出青年奖和军队杰出专业技术人员奖获得者。他长期从事病原微生物教学与医学病毒病原学研究, 曾从自建的 HCV cDNA 文库中筛选出 Q379 抗原表位, 由此研制出丙肝诊断试剂, 获国家批号和生产批文, 至今仍在临床上广泛使用。发表 SCI 论文近百篇, 先后获国家科技进步奖二等奖 2 项、军队科技进步奖一等奖 2 项。第二军医大学微生物学教研室是病原生物学博士点、国家“211 工程”重点学科, 主要致力于热区病毒致病、免疫与生物突发事件病原体鉴定及防治研究。

## 丙肝病毒药物选择压与基因遗传突变

钱汐晶, 戚中田\*

(第二军医大学微生物学教研室, 上海市医学生物防护重点实验室, 上海 200433)

**摘要:** 丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 是单股 RNA 病毒, 在药物压力下极易变异。近年来, 随着直接作用的抗病毒药物 (direct-acting antiviral agents, DAA) 的临床应用和更新换代, 丙肝患者的持续病毒应答率 (sustained virological response, SVR) 大大提高。然而, DAA 压力下产生的耐药相关变异株 (resistance associated variants, RAV) 也不断出现并被选择出来, 严重影响 DAA 治疗效果或致治疗失败及耐药株流行。介绍了 DAA 相关耐药基因产生的来源与分类, 并总结了近年来相关耐药突变的数据。

**关键词:** 丙型肝炎病毒; 直接作用的抗病毒药物; 耐药相关变异株

中图分类号: Q939.47; R373.2 文献标志码: A

## Selective pressure of DAA against HCV and relevant resistance variants

QIAN Xi-Jing, QI Zhong-Tian\*

(Department of Microbiology, Shanghai Key Laboratory of Medical Biodefense,  
Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**Abstract:** Hepatitis C virus (HCV) is a single-strand RNA virus which is easy to produce variants under pressure of antiviral drug. Recently, sustained virological response (SVR) rate in HCV patients has been increased largely thanks to the rapid development of direct-acting antiviral agents (DAA). However, resistance associated variants (RAV) have been selected under the pressure of DAA, which reduce the antiviral efficiency or causes treatment failure of DAA-based therapies. In this article, we introduce the origin and prevalence of RAV, and summarize relevant data of the variants according to their classification.

**Key words:** hepatitis C virus; direct-acting antiviral agents; resistance associated variants

收稿日期: 2016-03-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81273557)

\*通信作者: E-mail: qizt@smmu.edu.cn

丙型肝炎 (hepatitis C, HC) 是由丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 引起的感染性疾病, 目前每年新发病例约 300 万, 全球感染人数约 1.7 亿<sup>[1]</sup>。HCV 属于黄病毒科 (Flaviviridae) 单正链 RNA 病毒, 基因组全长约 9.6 kb, 编码一条多蛋白前体, 随后经过蛋白酶剪切, 产生 10 条多肽蛋白, 构成具有不同功能的病毒蛋白。病毒蛋白包括结构蛋白 Core、E1、E2、p7 及非结构蛋白 NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B (图 1)。其中, 结构蛋白参与组成病毒颗粒, 而非结构蛋白 NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B 在病毒蛋白成熟及病毒基因组复制过程中发挥关键作用, 成为抗病毒治疗的潜在作用靶点<sup>[2]</sup>。因此, HCV 耐药株的突变位点主要位于编码非结构蛋白的基因部位。

HCV 有 7 个基因型和 50 多个基因亚型。早期治疗 HCV 使用聚乙二醇化干扰素加利巴韦林标准疗法 (standard of care, SOC)。近年来, 针对 HCV 生

命周期中特定病毒蛋白的靶向性药物得到了飞速的发展, 称为直接作用的抗病毒药物 (direct-acting antiviral agents, DAAs)。目前上市及进入后期临床试验的 DAA 主要分为以下几类: NS3/4A 丝氨酸蛋白酶抑制剂、NS5A 抑制剂、NS5B RNA 依赖的 RNA 聚合酶抑制剂 (图 1)。DAA 主要运用于抗 HCV 的联合疗法中, 根据感染病毒的基因型及患者的病情制定 8~24 周的治疗方案, 显著提高了治疗患者的持续病毒应答率 (sustained virological response, SVR)。

然而, DAA 应用的最大问题是耐药突变株的产生。一些患者在使用 DAA 治疗后出现病毒反弹现象, 正是因为与药物相关的耐药突变体存在导致。HCV 很好地诠释了病毒如何通过其本身的快速进化及基因的多样性引起病毒基因组的变化, 进而耐受抗病毒药物<sup>[3]</sup>。由于 HCV RNA 聚合酶的低保真性, 病毒基因组的错配率非常高, 加上病毒复制生

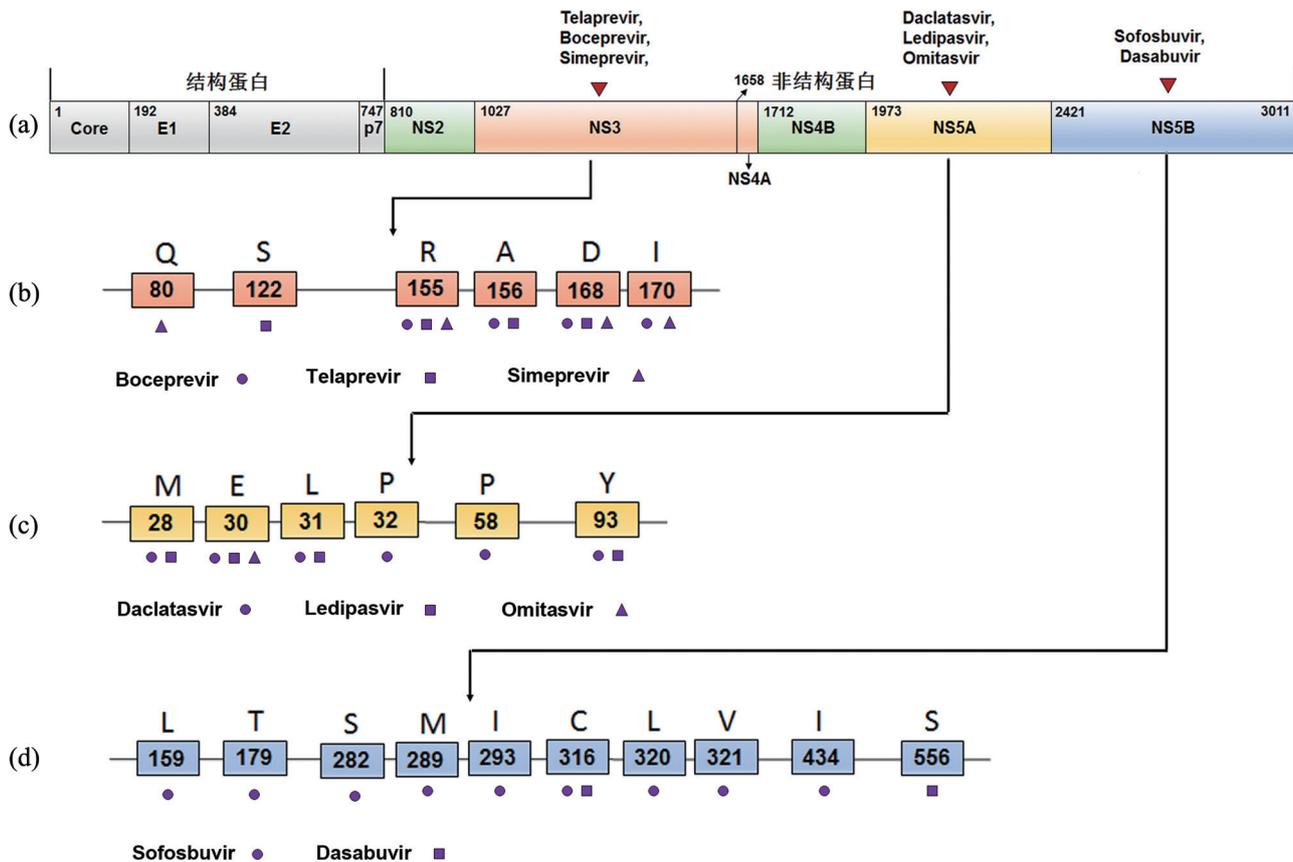


图 1 HCV 多蛋白前体及 DAA 相关耐药变异位点

成的速率较快, 导致 HCV 的基础耐药多态性及用药后短期耐药的产生高于其他病毒<sup>[4-5]</sup>。许多 HCV 感染患者接受治疗前, 其体内就已经存在大量的 HCV 准种 (quasispecies)。这些准种当中就可能携带针对某一 DAA 药物的耐药基因<sup>[6]</sup>。此外, 接受治疗的患者体内也可促使病毒进化, 衍生出对抗治疗药物的耐药基因<sup>[7]</sup>。目前, 耐药相关的突变体 (resistance associated variants, RAVs) 既出现在体外实验中, 也能在临床试验中观察到<sup>[8-9]</sup>。本文针对 HCV 不同基因区域 DAA 的耐药突变及突变体在不同基因型中的分布, 以及对这些耐药突变产生和在临床抗病毒治疗中的影响进行了阐述。

## 1 NS3/4A基因区耐药突变

NS3 具有丝氨酸蛋白酶活性, 在 NS4A 的辅助下, 通过水解多肽链上的蛋白位点, 剪切出具有功能的成熟病毒蛋白, 后者组成复合体参与病毒基因的复制 (图 2<sup>[10]</sup>)。蛋白酶抑制剂通过与 NS3 相互作用, 干扰蛋白酶活性, 起到抑制病毒复制的作用<sup>[11]</sup>。代表药物有第一代蛋白酶抑制剂 Telaprevir、Boceprevir, 第二代蛋白酶抑制剂 Simeprevir 和 Paritaprevir。自 2011 年第一代蛋白酶抑制剂上市以来, HCV 患者的 SVR 率明显提高。然而, 随着时间的推移, 包含蛋白酶抑制剂的三联疗法的治疗效

果却下降。在治疗失败的病例当中, 有 71% 的患者是由于产生了病毒基因的突变, 导致对蛋白酶抑制剂发生了耐药。由于 NS3 蛋白酶本身的特性, 使蛋白酶抑制剂的结合并不紧密。因此, NS3/4A 蛋白酶抑制剂的耐药屏障较低, 酶上几个关键位点单氨基酸的突变就能导致病毒的抗药性, 造成药物敏感性下降 (图 2)。这些 NS3 区域氨基酸位点 (R155、A156 和 D168) 的突变可以引起针对几乎所有蛋白酶抑制剂耐药及交叉耐药的发生<sup>[12-13]</sup>。在 HCV NS3 区域, Q80K 变异株在基因 1a 型的序列中是最常见的一种, 发生率高达 37.6%, 主要与第二代蛋白酶抑制剂 Simeprevir 的耐药性相关, 是导致 1a 型患者治疗失败的一个常见原因<sup>[14]</sup>。另一个与 Simeprevir 的耐药性相关的 HCV 基因变异株为 S122T, 在基因 1b 型中最常出现, 发生率为 5.5%<sup>[14]</sup>。在其他基因型的 HCV 序列中, 与 Simeprevir 相关的位于 NS3 区域的 S122R 变异株在基因 2 型的序列中比较常见, 发生率超过 45%。此外, 与 Boceprevir 耐药相关的 I170V 变异株在基因 6 型序列中也很常见<sup>[14]</sup>。针对 NS3 蛋白酶抑制剂的耐药株的发生率最高, 而在 NS3 蛋白酶抑制剂中又以 Simeprevir 及 Boceprevir 的发生频次最多。低耐药屏障和交叉耐药的发生是一代蛋白酶抑制剂的关键问题<sup>[15]</sup>。二代蛋白酶抑制剂, 如 MK-5172 耐药屏障更高、疗效更好<sup>[16]</sup>。

## 2 NS5A基因区耐药突变

NS5A 蛋白作为病毒复制复合体中的一部分, 在 HCV 的复制、组装、释放及与宿主细胞相互作用中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。它由三个结构域组成, 其中结构域 I 和 II 与 HCV 复制密切相关, 而结构域 III 则在病毒组装过程中必不可少<sup>[18]</sup> (图 3<sup>[19]</sup>)。NS5A 抑制剂能显著阻断病毒复制及组装, 代表药物有 Daclatasvir、Ledipasvir 和 Omitasvir。尽管 NS5A 抑制剂疗效显著, 基因覆盖面广, 但它们的耐药屏障较低, 并且相关的耐药突变可以在宿主体内维持较长的时间<sup>[6]</sup>。耐药突变株 L31M、P58S 和 Y93H 都位于 HCV NS5A 基因区域, 它们在基因 1b 型的序列中比较常见 (图 3)。NS5A 抑制剂常会引起 HCV 基因相关区域 M28、E30、L31、P32 和 Y93 的突变, 进而导致病毒耐药的发生<sup>[20-21]</sup> (图 3)。与 Daclatasvir 相关的位于 NS5A 区域的 H58P 变异株在基因 2 型的序列中比较常见, 发生率超过 45%<sup>[14]</sup>。而在基因 3 型的序列中, 针对 Daclatasvir 和 Ledipasvir

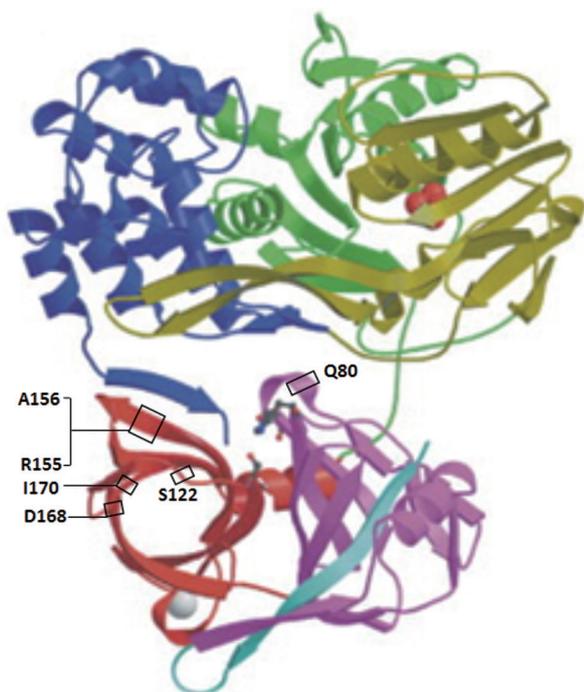


图2 NS3/4A蛋白晶体结构及耐药突变位点<sup>[10]</sup>

的变异株 Q30A 发生率较高<sup>[22]</sup>。Q30R 变异株可以抵抗现有的三种 NS5A 抑制剂，主要在基因 4 型和 6 型序列中多见。此外，与目前至少两种 NS5A 抑制剂相关的变异株 M28V 及 Y93S 在基因 6 型序列中也很常见。然而，天然存在的抵抗 NS5A 抑制剂的病毒耐药株仅在 1b 型和 4 型患者中多见。NS5A 抑制剂的耐药株的发生率仅次于 NS3 蛋白酶抑制剂，其中以 Daclatasvir 的耐药株的发生率居于首位。

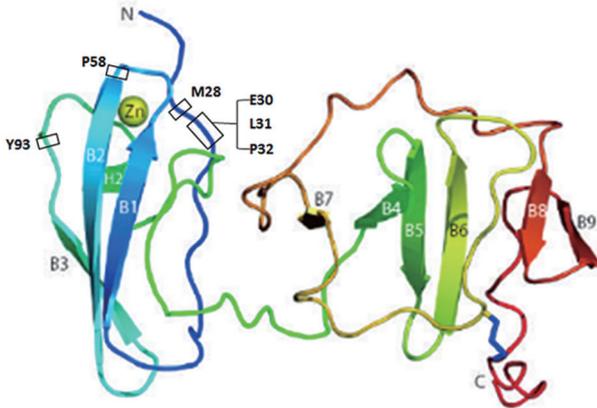


图3 NS5A 蛋白结构域I晶体结构及耐药突变位点<sup>[19]</sup>

### 3 NS5B基因区耐药突变

NS5B 区编码的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶，是 HCV 复制过程中的关键酶<sup>[23]</sup> (图 4<sup>[24]</sup>)。NS5B 抑制

剂主要分为核苷类抑制剂和非核苷类抑制剂。核苷类抑制剂通过与酶的催化位点结合，竞争性抑制 HCV RNA 的合成，代表药物是 Sofosbuvir。非核苷类抑制剂与酶的异构位点结合，通过破坏酶的构象变化抑制酶的活性，代表药物是 Dasabuvir。由于 NS5B 的结构是高度保守的，NS5B 抑制剂在各个基因型的 HCV 患者中都十分有效<sup>[25]</sup>。NS5B 核苷类似物 Sofosbuvir 的耐药屏障比 NS3/4A 蛋白酶抑制剂和 NS5A 抑制剂都要高，因为它模拟的聚合酶底物结合酶的活性部位是酶高度保守的区域。而非核苷类似物抑制剂的耐药屏障在所有 DAA 中是最低的，它们常用于与其他 DAA 的联合运用的研究中<sup>[26]</sup>。NS5B 区域的耐药株主要包括针对 Sofosbuvir 的 L159F 和针对 Dasabuvir 的 S556G (图 4)，它们在基因 1b 型中较为常见<sup>[27]</sup>。Sofosbuvir 的耐药性相关突变还包括 L320F、T179A、S282T/G/C/R、M289L、I293L、C316N、V321A 及 I434M<sup>[28-30]</sup> (图 4)。其中 S282T 最初是从患者体内发现的，在接受了含有 Sofosbuvir 的不同抗 HCV 疗法后，少数治疗失败患者的体内可以检测到 S282T 的表达<sup>[31]</sup>。尽管体外实验显示，S282T 可从各种基因型的病毒中筛选出来，但这个耐药突变仅在 1a 和 1b 型 HCV 感染中显示出对 Sofosbuvir 的抵抗性<sup>[26,28]</sup>。而 C316Y 和 Y448C/H 是 Dasabuvir 相关的最常见的耐药突变株，主要拮抗非核苷类似物在 NS5B 蛋白三区与四

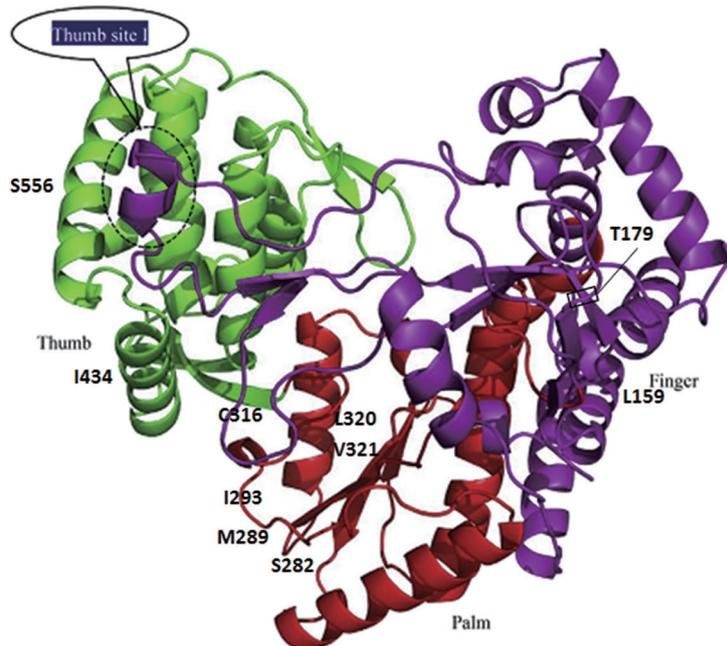


图4 NS5B蛋白晶体结构及耐药突变位点<sup>[24]</sup>

区的结合<sup>[32]</sup>。

总的来说, 针对 NS3 蛋白酶抑制剂的耐药株的发生率最高, 其次是 NS5A 抑制剂。而在 NS3 蛋白酶抑制剂中又以 Simeprevir 及 Boceprevir 的发生频次最高。在 NS5A 抑制剂中, Daclatasvir 的耐药株的发生率居于首位。值得注意的是, 针对 NS5B 核苷类抑制剂 Sofosbuvir 和非核苷类抑制剂 Dasabuvir 的耐药株非常少见。此外, 发生在同一序列上的多个变异株同时存在的现象也比较少见, 唯一例外的就是 NS3 和 NS5A 区域多个变异株共存的现象, 发生率约为 15.6%。

#### 4 不同基因型间的DAA耐药突变

临床试验的结果显示, DAA 的治疗效果在基因 1b 型中比基因 1a 型中更佳。相应地, 基因 1b 型的病毒对蛋白酶抑制剂、NS5A 抑制剂及非核苷类似物抑制剂的耐药屏障也比基因 1a 型高。基因 1a 型的变异株发生率为 56%, 其中最常见的是针对 Simeprevir 的位于 NS3 区域的变异株, 如 Q80K。基因 1b 型的变异株发生率为 34.3%, 变异株主要位于 NS5A 的区域, 发生的变异主要与 Daclatasvir 耐药相关。基因 1a、1b 型中与 NS5B 相关的基因变异株非常少见。基因 2 型序列中变异株主要位于 NS3 区域, 并多针对 Simeprevir。基因 3、4 型的序列的变异株则多位于 NS5A 区域。基因 6 型的序列变异株也主要发生在 NS3 区域, 并多针对 Boceprevir 和 Simeprevir。NS5B 区域的针对核苷类似物 Sofosbuvir 的变异株在基因 2 型和 6 型中较为常见, 在其他基因型中则比较少见。

#### 5 病毒自身的耐药相关基因及药物筛选的耐药突变株

针对 DAA 的耐药基因通常发生在抑制剂靶向蛋白的编码区域的基因, 并常引起一个或几个氨基酸位点的改变<sup>[33]</sup>。根据耐药基因产生的方式, 可以分为由于病毒基因天然多态性引起的 DAA 耐药(主要影响初治患者的治疗效果), 及在药物选择压下筛选出的耐药突变(可能影响治疗失败或复发患者将来的治疗效果)<sup>[34]</sup>。在一个患者体内, HCV 可存在一系列的遗传变异株, 这是由 HCV 聚合酶的低保真性引起的, 平均 HCV 复制一次便能产生一个突变基因<sup>[35]</sup>。天然存在的耐药突变正是基于 HCV 的高基础变异率的特性。目前, 权威 HCV 治疗指南中仅推荐在初治患者中检测位于 NS3/4A 基因位

置的 Q80K 突变, 因为这个天然存在的变异株在 1a 型患者中十分常见<sup>[36]</sup>。这类患者在接受 Simeprevir 基础上的三联疗法后, SVR 率很低, 难以达到原先的治疗效果<sup>[37-38]</sup>。此外, 体外研究发现, 大部分的蛋白酶抑制剂对基因 3 型病毒的疗效欠佳。这主要是由于 3 型蛋白酶序列上的多态性耐药基因突变 D168Q 的存在。临床用药导致的耐药突变主要通过 HCV 的记忆基因组发挥作用, 这个功能即使在病毒缺乏宿主的情况下仍旧保留<sup>[39]</sup>。这种记忆功能是 HCV 准种的一种复杂的适应性系统。在使用抗 HCV 药物的情况下, 当病毒的一个天然存在的抗药突变体从一系列的 HCV 基因组群中被筛选出来后, 它在整体基因群组中的表达就会明显上升。当选择性压力消失(停止使用药物), 筛选出的耐药株尽管表达会有所下降, 但由于病毒的记忆功能, 它的水平仍旧高于最初筛选前的水平, 导致治疗失败<sup>[40]</sup>。而携带这个耐药株的患者将来再次接受治疗的疗效也会受其影响。DAA 药物相关的耐药突变在亚洲与非洲的发生率最高, 而临床使用 DAA 导致的耐药变异株则在美洲最为常见, 可能与美洲广泛使用 DAA 相关。临床用药相关的耐药株主要也发生在 NS3 区域, 并且大多与 Simeprevir 耐药相关。

近期, 多个研究机构推荐使用非干扰素 HCV 治疗方案以规避干扰素带来的不良反应及低耐受性。在推荐的非干扰素的治疗方案中, 发生在 HCV NS3 及 NS5A 区域的耐药相关变异株最为常见, 但 NS5B 区域很少产生耐药突变。然而, 由于研究的人群太小, 对非干扰素 DAA 疗法相关可能存在的耐药突变及对药物作用的影响程度仍旧需要进一步的探索。此外, 对现存的某些耐药基因的检测也能帮助优化最佳治疗方案。

#### 6 小结与展望

DAA 的快速发展使 HCV 的治疗效果达到了前所未有的高度。然而, HCV 能够在药物选择压下迅速进化, 利用病毒自身的耐药相关基因的多态性与遗传突变, 干扰药物靶向病毒蛋白的过程, 极大限制了 DAA 的使用效果, 并常导致治疗的失败。因此, 需要对 HCV 的各种基因准种, 尤其是耐药基因的表达进行监控, 做好面临不同干预下导致新发或再发感染的可能。同时, 开发靶向病毒感染不同阶段如入侵过程的多种类型病毒抑制剂, 争取提高抗病毒疗法的耐药屏障。

早期 NS3 抑制剂单独疗法的运用曾导致严重

的药物相关变异株的发生<sup>[41]</sup>。因此,通过联合不同作用靶点的抗 HCV 药物,将降低耐药相关变异体的发生。因此,基于核苷类聚合酶抑制剂的非干扰素联合疗法耐药发生率低,成为目前临床抗 HCV 治疗的首选。此外,针对 HCV 生命周期不同阶段靶向药物的联合运用能有效提高抗病毒疗法的耐药屏障<sup>[42]</sup>。本课题组通过筛选天然化合物单体库,发现了具有抑制 HCV 入侵活性的系列化合物,它们的作用方式各不相同。其中来源于五味子的甘五酸能抑制病毒与宿主细胞膜融合的过程,提取自络石藤的络石藤昔元通过干扰病毒 E2 蛋白与入侵受体 CD81 的相互作用阻断病毒入侵<sup>[43]</sup>。这些化合物靶点各不相同,都干扰了病毒入侵的关键步骤,与目前临床上抗病毒药物联合运用具有协同抑制各基因型病毒感染的效果,是未来抗 HCV 治疗的研究方向。

#### [参 考 文 献]

- [1] Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 2015, 61: 77-87
- [2] Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, et al. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology*, 2011, 8: 161
- [3] Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*, 2014, 59: 318-27
- [4] Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon- $\alpha$  therapy. *Science*, 1998, 282: 103-7
- [5] Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1631-48
- [6] Ahmed A, Felmlee DJ. Mechanisms of hepatitis C viral resistance to direct acting antivirals. *Viruses*, 2015, 7: 6716-29
- [7] Kieffer TL, Kwong AD, Picchio GR. Viral resistance to specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C (STAT-Cs). *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65: 202-12
- [8] Dahl G, Sandstrom A, Akerblom E, et al. Resistance profiling of hepatitis C virus protease inhibitors using full-length NS3. *Antivir Ther*, 2007, 12: 733-40
- [9] Flint M, Mullen S, Deatly AM, et al. Selection and characterization of hepatitis C virus replicons dually resistant to the polymerase and protease inhibitors HCV-796 and boceprevir (SCH 503034). *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 401-11
- [10] Yao N, Reichert P, Taremi SS, et al. Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase. *Structure*, 1999, 7: 1353-63
- [11] Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, 2010, 138: 447-62
- [12] Thompson AJ, Locarnini SA, Beard MR. Resistance to anti-HCV protease inhibitors. *Curr Opin Virol*, 2011, 1: 599-606
- [13] Wyles DL. Antiviral resistance and the future landscape of hepatitis C virus infection therapy. *J Infect Dis*, 2013, 207: S33-9
- [14] Chen ZW, Li H, Ren H, et al. Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): mining the GenBank HCV genome data. *Sci Rep*, 2016, 6: 20310
- [15] Poveda E, Garcia F. Telaprevir resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2013, 31: 26-32
- [16] De Nicola S, Aghemo A. Second wave anti-HCV protease inhibitors: too little too late? *Liver Int*, 2014, 34: e168-70
- [17] Pawlotsky JM. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol*, 2013, 59: 375-82
- [18] Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, et al. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem*, 2004, 279: 48576-87
- [19] Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature*, 2005, 435: 374-9
- [20] Fridell RA, Wang C, Sun JH, et al. Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor BMS-790052 in humans: *in vitro* and *in vivo* correlations. *Hepatology*, 2011, 54: 1924-35
- [21] Gao M. Antiviral activity and resistance of HCV NS5A replication complex inhibitors. *Curr Opin Virol*, 2013, 3: 514-20
- [22] Plaza Z, Soriano V, Vispo E, et al. Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitor. *Antivir Ther*, 2012, 17: 921-6
- [23] Ranjith-Kumar CT, Kao CC. Biochemical activities of the HCV NSSB RNA-dependent RNA polymerase. [M]// Tan SL, Ed. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK), 2006
- [24] Zhao F, Liu N, Zhan P, et al. Discovery of HCV NS5B thumb site I inhibitors: core-refining from benzimidazole to indole scaffold. *Eur J Med Chem*, 2015, 94: 218-28
- [25] Pockros PJ. New direct-acting antivirals in the development for hepatitis C virus infection. *Therap Adv Gastroenterol*, 2010, 3: 191-202
- [26] Poveda E, Wyles DL, Mena A, et al. Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents. *Antivir Res*, 2014, 108: 181-91
- [27] Kieffer TL, De Meyer S, Bartels DJ, et al. Hepatitis C viral evolution in genotype 1 treatment-naive and treatment-experienced patients receiving telaprevir-based therapy in clinical trials. *PLoS One*, 2012, 7: e34372
- [28] Lam AM, Espiritu C, Bansal S, et al. Genotype and subtype profiling of PSI-7977 as a nucleotide inhibitor of hepatitis C virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56: 3359-68

- [29] Donaldson EF, Harrington PR, O'Rear JJ, et al. Clinical evidence and bioinformatics characterization of potential hepatitis C virus resistance pathways for sofosbuvir. *Hepatology*, 2015, 61: 56-65
- [30] Tong X, Le Pogam S, Li L, et al. *In vivo* emergence of a novel mutant L159F/L320F in the NS5B polymerase confers low-level resistance to the HCV polymerase inhibitors mericitabine and sofosbuvir. *J Infect Dis*, 2014, 209: 668-75
- [31] Svarovskaia ES, Dvory-Sobol H, Parkin N, et al. Infrequent development of resistance in genotype 1-6 hepatitis C virus-infected subjects treated with sofosbuvir in phase 2 and 3 clinical trials. *Clin Infect Dis*, 2014, 59: 1666-74
- [32] Kati W, Koev G, Irvin M, et al. *In vitro* activity and resistance profile of dasabuvir, a nonnucleoside hepatitis C virus polymerase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59: 1505-11
- [33] Perales C, Beach NM, Sheldon J, et al. Molecular basis of interferon resistance in hepatitis C virus. *Curr Opin Virol*, 2014, 8: 38-44
- [34] Vermehren J, Sarrazin C. The role of resistance in HCV treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2012, 26: 487-503
- [35] Ogata N, Alter HJ, Miller RH, et al. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 3392-6
- [36] Lenz O, Vijgen L, Berke JM, et al. Virologic response and characterisation of HCV genotype 2-6 in patients receiving TMC435 monotherapy (study TMC435-C202). *J Hepatol*, 2013, 58: 445-51
- [37] Ruggiero T, Proietti A, Boglione L, et al. Predominance of hepatitis C virus Q80K among NS3 baseline-resistance-associated amino acid variants in direct-antiviral-agent-naive patients with chronic hepatitis: single-centre experience. *Arch Virol*, 2015, 160: 2881-5
- [38] McCloskey RM, Liang RH, Joy JB, et al. Global origin and transmission of hepatitis C virus nonstructural protein 3 Q80K polymorphism. *J Infect Dis*, 2015, 211: 1288-95
- [39] Ruiz-Jarabo CM, Arias A, Baranowski E, et al. Memory in viral quasispecies. *J Virol*, 2000, 74: 3543-7
- [40] Perales C, Quer J, Gregori J, et al. Resistance of hepatitis C virus to inhibitors: complexity and clinical implications. *Viruses*, 2015, 7: 5746-66
- [41] Manns MP, Cornberg M. Sofosbuvir: the final nail in the coffin for hepatitis C? *Lancet Infect Dis*, 2013, 13: 378-9
- [42] Qian XJ, Zhu YZ, Zhao P, et al. Entry inhibitors: New advances in HCV treatment. *Emerg Microbes Infect*, 2016, 5: e3.
- [43] Qian XJ, Jin YS, Chen HS, et al. Trachelogenin, a novel inhibitor of hepatitis C virus entry through CD81. *J Gen Virol*, 2016, doi: 10.1099/jgv.0.000432 [Epub ahead of print]