

领域前沿 · 中国



钟劲, 中国科学院上海巴斯德研究所研究员、博士生导师, 中国科学院特聘研究员, 中国科学院“百人计划”, 上海科技大学特聘教授。国家973项目首席科学家。1994年获四川大学学士学位, 1997年获北京大学硕士学位, 2003年获美国德克萨斯大学博士学位, 美国Scripps研究所博士后。2006年12月加入中国科学院上海巴斯德研究所, 任病毒性肝炎研究组组长(PI)。共发表SCI论文70余篇。获得国务院政府特殊津贴专家、中国科学院“优秀研究生指导教师”奖、中国科学院“朱李月华”优秀教师奖、法国驻沪领馆法国创新人才奖等。钟劲研究员主要从事丙型肝炎病毒(HCV)和RNA病毒的研究, 围绕HCV新型细胞感染模型的建立、HCV诱导调控宿主固有免疫应答的机制研究以及HCV复制和组装上的机制研究、HCV疫苗研发等方面取得了重要进展。建立了世界上第一个HCV的细胞感染模型, 为HCV研究领域的发展做出了重要贡献, 该项工作被Faculty of 1000给予最高等级的评价, 发表以来被引用次数超过千次。



黄忠, 中国科学院上海巴斯德研究所研究员。1997年毕业于中国农业大学, 获博士学位。1998–2002年, 在美国Boyce Thompson研究所做博士后研究。2002–2008年, 在美国亚利桑那州立大学先后任职高级研究助理、研究助理教授。2009年1月加入中国科学院上海巴斯德研究所, 建立疫苗学与抗病毒策略课题组, 任课题组长、研究员。2010年入选中国科学院“百人计划”。黄忠研究员主要从事抗病毒基因工程疫苗及抗体的应用基础研究。黄忠研究组现已建立多种基因工程疫苗及抗体研发平台, 开展基于结构的疫苗理性设计及抗体优化, 在*PLoS Pathogens*、*J Virol*、*Vaccine*等刊物发表研究论文40余篇, 获得相关发明专利授权4项, 有多项科研成果实现转移转化。

丙型肝炎预防性疫苗开发的需求、挑战和进展

颜雨 王雪松 黄忠* 钟劲*

(中国科学院上海巴斯德研究所, 中国科学院分子病毒与免疫重点实验室, 上海 200031)

摘要 丙型肝炎病毒感染全球约7 000万人, 是危害公共健康的重要问题。近年来, 上市的直接抗病毒药物弥补了传统丙肝干扰素疗法的不足, 提高了病毒学应答水平, 但存在着治疗费用高、病毒耐药突变等问题。丙肝病毒感染慢性化率高且隐匿性强, 高危人群有着较高的新发和重复感染率, 因此预防性疫苗的研发对于彻底控制丙肝传播非常重要。然而, 由于病毒的高变异性等多种因素, 目前仍缺乏有效的丙肝病毒疫苗。该文介绍了丙肝病毒疫苗开发的需求、难点、最新进展和未来方向。

关键词 丙型肝炎病毒; 疫苗; 预防性疫苗

*通讯作者。Tel: 021-54923067, E-mail: huangzhong@ips.ac.cn; Tel: 021-54923143, E-mail: jzhong@ips.ac.cn

*Corresponding authors. Tel: +86-21-54923067, E-mail: huangzhong@ips.ac.cn; Tel: +86-21-54923143, E-mail: jzhong@ips.ac.cn

网络出版时间: 2018-03-08 16:51:41

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180308.1651.008.html>

Demands, Challenges and Progresses of Prophylactic Hepatitis C Virus Vaccine Development

Yan Yu, Wang Xuesong, Huang Zhong*, Zhong Jin*

(Key Laboratory of Molecular Virology and Immunology, Institut Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Hepatitis C virus (HCV) infects about 70 million people in the world, imposing a major threat to public health. The recently developed direct antiviral drugs overcame the shortcomings of the traditional interferon-based hepatitis C therapy and improved the virological response. However, challenges remain including high therapeutic costs and drug-resistant viral mutations. HCV infections are often persistent and subclinical, and the frequencies of new and re-occurring infection are high in the high-risk groups. Therefore, development of a prophylactic vaccine is imperative to control of HCV transmission. However, no HCV vaccine is available at the present due to the high viral genome variability and other factors. This article summarizes the demand, challenges, recent progress and future direction in prophylactic HCV vaccine development.

Keywords hepatitis C virus; vaccine; prophylactic vaccine

1 开发丙肝病毒预防性疫苗的迫切需求

丙型肝炎由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染引发,是危害公共健康的重大传染性疾病。约70%的患者感染HCV后不能自发清除,导致持续终身的慢性化感染^[1-2]。据世界卫生组织最新统计,截至2017年全球约有7 100万HCV慢性感染者。我国缺乏可靠的丙肝流调数据,保守估计至少有1 000万丙肝患者。HCV是黄病毒科丙型肝炎病毒属的正链RNA病毒,基因组含一个开放阅读框,全长9.6 Kb。该阅读框编码病毒多聚蛋白体,切割后产生core、E1、E2三个结构蛋白和p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B七个非结构蛋白。干扰素加利巴韦林是丙肝的传统疗法,但疗效有限,对不同病毒基因型的效果差异很大,且治疗时间长、副作用较大。2011年后,丙肝治疗进入直接抗病毒药物(direct-acting antiviral agents, DAA)时代。这类DAA药物的作用靶点是病毒蛋白NS3/4A、NS5A以及NS5B,治愈率达90%以上,而且副作用小,对多种病毒基因型有效^[3]。但DAA的治疗成本高,一个12周的标准疗程在美国费用为7~15万美元,即使在中国也超过5万人民币。DAA药物的价格因素极大限制了其在全球范围内尤其是低收入国家和地区丙肝治疗中的应用,而这些国家和地区往往是全球丙肝流行高发区域。

HCV主要的传播方式包括血液传播、性接触

传播、注射吸毒传播和母婴传播等。尽管DAA药物能够治愈丙肝,各种旨在阻断丙肝传播的预防措施也逐渐完善,但近年来新发HCV感染病例仍在增加。据估计,从2010到2015年美国HCV发病率增加了294%^[4-5]。目前注射毒品是HCV新发感染最主要的危险因素。来自不同地区的报告显示,在过去10年中,由于注射吸毒和针头共享的不断升级,美国年轻群体中的HCV感染病例增加了一倍左右^[6-8]。在中国,有48%~95%的注射吸毒者被查出感染HCV^[9-10]。注射吸毒者等高危群体存在极高的反复感染风险。即使所有感染者都能在首次感染之后得到即时的发现和治愈,也并不能减小他们在治愈之后被再次感染的几率。这些反复再感染患者的DAA治疗将增加病毒产生抗药突变的概率,最终有可能促成耐药株的出现。

另一个问题是, HCV感染后症状极其轻微、缺乏有效的HCV筛查机制,导致HCV感染者中极低的知情率和治疗率。据报道,高危人群中存在大量的无症状HCV感染者^[11]。保守估计,在慢性丙型肝炎患者中,只有不到30%的人最终意识到自己被感染,而只有大约10%的患者能够最终接受治疗^[12-14]。因此,即使新的抗病毒药物治愈率极高,每年仍会有大量的感染者被排除在治疗之外,在高危人群中尤其如此。大量患者很可能在不知情的情况下发展成为肝纤维化、肝硬化甚至肝癌。此时,即使能够通过DAA药物治疗清除病毒,但已经造成的肝脏损伤往

往难以挽回。因此通过预防性疫苗接种高危人群来控制新发或反复感染将是成本最低、效果最好的解决方法。

此外,不少国家还存在经由不安全的医疗手段感染HCV的情况,例如外科手术、透析和内窥镜等介入式的治疗。因此对经常接触HCV样品和相关患者的医护人员的保护也是一个值得关注的问题。

总之,沉重的治疗成本负担、高危人群反复感染的存在、耐药突变的可能性、病毒感染筛查率低等因素都预示着仅靠DAA药物治疗仍难以消除HCV对人类健康威胁。而一种高效的针对HCV的预防性疫苗不论从经济性还是可操作性上来讲,无疑都是完成这一目标最好的选择。

2 开发丙肝病毒预防性疫苗的可行性

大约30%的HCV感染者能够在急性感染期依靠自身免疫系统的作用自发清除病毒,产生的免疫记忆还能在一定程度上保护机体免受二次感染。有报道显示,与初次感染相比,被HCV再次感染的黑猩猩虽然仍会出现病毒血症,但其持续时间和峰值强度均远小于初次感染,这种情况即便在两次感染相隔数年仍然存在^[15]。在注射吸毒者中进行的调查研究也显示,80%的HCV初次感染者将会发展为持续感染,而在自发清除后再次感染的人群中,只有20%会发展为慢性感染^[16-17]。研究表明,针对HCV包膜蛋白的广谱中和抗体的迅速诱导与病毒在急性期的清除和对再感染的保护有关^[17-20]。同时,HCV特异性CD4⁺辅助性T细胞或CD8⁺细胞毒性T细胞反应的激活也与HCV的自发清除有关^[21-26]。对于体液免疫和细胞免疫在抵抗HCV感染中的作用,有报道认为,体液免疫主要影响急性期HCV的清除,如果机体不能在感染早期产生高滴度的广谱中和抗体清除病毒,一旦进入感染后期,中和抗体的作用就会非常有限^[27]。而这个阶段HCV的清除则主要由T细胞免疫完成,尤其是CD8⁺T细胞免疫。病毒感染的慢性期往往伴随HCV特异性T细胞的耗竭(T cell exhaustion),导致病毒清除失败^[27-28]。

这些研究结果表明,HCV感染过程中存在自然免疫,这意味着通过疫苗接种保护机体对抗HCV感染是可能实现的,并且这种保护效果可能在机体中长期持续存在。如果能够通过特定方式诱导机体产生出比自然感染中更强有效的免疫反应,则很有可

能达到预防HCV感染的效果。

3 HCV预防性疫苗开发的主要难点

目前已有针对甲肝病毒(hepatitis A virus, HAV)、乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)和戊肝病毒(hepatitis E virus, HEV)的预防性疫苗。甲肝疫苗为灭活病毒疫苗,乙肝疫苗抗原为病毒表面蛋白,分别于1986年和1995年在美国获得上市许可。戊肝疫苗抗原为病毒衣壳蛋白,于2012年在中国获得上市许可^[29]。与此相对,HCV的预防性疫苗迟迟没有出现。

其中一个重要原因是,HCV基因组的多变性。HCV编码的RNA依赖性RNA聚合酶缺乏校正功能、错配率高,因此,HCV表现出极高的遗传多样性,存在7种不同的基因型和多达67种亚型,基因型之间的核苷酸差异度高为30%~35%^[30]。与此相比,HBV不同基因型之间的差异在8%左右^[31]。已上市的HAV、HBV、HEV预防性疫苗均为单价疫苗,能有效预防病毒所有基因型的感染。考虑到HCV基因组的多变性,一方面要寻找保守的病毒表位作为疫苗靶点,另一方面需要发展多价的HCV疫苗,以期覆盖差异极大的不同基因型。

长久以来,有效的体内和体外评价模型的缺乏也制约着HCV疫苗的研发。2003年,HCV假病毒模型(HCV pseudoparticles, HCVpp)建立才使得体外中和实验成为可能^[32-33]。与HCV真病毒不同的是,HCVpp病毒颗粒表面不结合脂蛋白,更容易被抗体中和,因此不能完全模拟HCV真病毒进入细胞的真实情况。2005年,研究者利用一株高效复制的2a基因型病毒株JFH1建立了HCV细胞感染模型(HCV produced from cell culture, HCVcc)^[34-36]。HCVcc病毒颗粒表面结合有脂蛋白,用其来评价疫苗免疫后的中和抗体反应更为真实。研究者利用JFH1的非结构蛋白区,嵌合其他基因型病毒的结构蛋白区,陆续建立了1-7型的HCV感染细胞模型^[37],为广谱中和抗体的评价提供了重要工具。

长久以来,黑猩猩是人以外唯一的HCV感染模型^[38-39]。然而由于动物伦理的争议,2013年美国国立卫生院宣布停止使用黑猩猩作为实验动物^[40]。人肝细胞的嵌合小鼠模型^[41-42],由于其免疫系统的缺陷,不能产生正常的体液免疫反应,因此也无法作为疫苗评价的有效体内模型。目前,唯一可用做主动免疫保护实验的HCV动物模型是含有人源HCV受

体的转基因小鼠模型^[41-43]。然而,该小鼠HCV感染能力仍然有限,即使通过含有Cre-LoxP系统放大感染检测指标信号,作为评价多价疫苗诱导的广谱中和反应的动物模型仍不够稳定。有效动物攻毒模型的限制很大程度上制约了HCV疫苗的评价和发展。

4 现有HCV预防性疫苗开发的主要策略

HCV疫苗研发主要有两类策略:一是侧重于体液免疫,主要致力于诱导广谱中和抗体,保护机体免受HCV感染;二是侧重于细胞免疫,主要致力于诱导T细胞反应,用于清除已感染成功的病毒。下面就这些疫苗研发策略进行阐述。

灭活及减毒疫苗由于其免疫原性强、设计简单,在许多病毒感染疾病的预防中都达到了很好的效果,例如流感、乙型肝炎等。但过去二十余年,针对HCV的灭活或减毒疫苗开发却一直没有成功的先例。即使在2005年HCV细胞培养模型建立之后^[34-36],灭活和减毒疫苗研发进展仍然不大,这主要是由于细胞培养获取的病毒颗粒产量很低。最近,来自日本的研究团队尝试开发了HCV的灭活疫苗^[44-45],利用细胞培养系统生产2a基因型病毒颗粒,纯化灭活后用于免疫动物,发现能够诱导体液免疫,可中和1、2、3基因型病毒,也能诱导一定的T细胞应答。但是鉴于病毒产量低、浓缩纯化程序复杂、生产成本高,难以扩大到商业生产的规模。

要阻止病毒感染细胞,一个比较理想的选择就是刺激宿主免疫系统产生针对病毒包膜蛋白的抗体,在病毒进入细胞之前捕获病毒颗粒,阻止其与受体的结合。许多旨在预防HCV感染的B细胞疫苗多是基于这一思路,选择能够有效诱导广谱中和抗体的免疫原进行疫苗设计。例如,原美国Chiron公司(后被诺华公司收购)开发的来源于1a基因型的重组E1/E2包膜蛋白疫苗,与MF59佐剂结合免疫后能在豚鼠和黑猩猩中引起较强的体液免疫反应^[46-47]。该疫苗免疫豚鼠后的血清具有对1a、1b和2a基因型的HCV假病毒颗粒(HCVpp)的中和作用,其中对1a、1b型的中和作用效果要好于2a型^[46]。此外,该疫苗免疫黑猩猩后能诱导出针对1a、4a、5a、6a基因型HCVpp/HCVcc的中和抗体,但对2a、3a型的中和效果较差^[48]。该疫苗于2005年完成一期临床试验(NCT00500747)^[49],但没有进入二期临床。此外,2017年来自澳大利亚的研究团队研发了删除了高变

区的E2蛋白疫苗,发现该E2抗原的多聚体形式能够在豚鼠体内产生广谱中和抗体^[50]。

进入临床阶段的另外两种HCV预防性疫苗Ad6-Nsmut/AdCh3-Nsmut和MVA-NSmut/AdCh3-NSmut是基于细胞免疫反应策略。这两种疫苗均表达相对保守的HCV非结构蛋白NS3-NS5B,不同之处是使用了不同的疫苗表达病毒载体。前者三次免疫分别使用人类腺病毒Ad6或黑猩猩腺病毒AdCh3作为载体,后者两次免疫则分别使用修饰后的痘病毒安卡拉株MVA及黑猩猩腺病毒AdCh3作为载体。这两种疫苗能够在黑猩猩和人体内诱导出较强的CD8⁺T细胞反应,也能促进多功能T细胞和长期记忆T细胞的产生^[51-53]。前者已于2011年2月完成一期临床试验,但目前没有进入二期试验。后者正在进行I/II期临床试验,预计在2018年完成。

5 基于昆虫表达系统的多价亚单位疫苗开发

HCV包膜糖蛋白E1和E2形成二聚体,其中E2与HCV受体分子直接结合,而且病毒的中和表位大部分均位于E2上,因此E2是疫苗抗原设计的重要靶点。我们将1b基因型Con1毒株的E2羧基端跨膜区域删除,产生一个易表达、可溶性E2蛋白(sE2)^[54-55]。考虑到E2上高度糖基化对于中和表位的遮盖作用,我们采用果蝇S2系统表达sE2。得益于昆虫细胞相对独特的糖基化方式,S2系统表达后纯化的Con1-sE2蛋白在免疫小鼠后,能产生比哺乳动物细胞表达的sE2更强的中和抗体反应^[54-55]。同时,Con1-sE2蛋白在恒河猴中也能诱导出针对多种HCV基因型的中和抗体^[54-55]。通过分析病毒基因型中和谱,我们发现,Con1-sE2疫苗诱导的抗体对于1a、3a等株型的中和作用仍存在提升的空间。考虑到HCV基因型在世界范围内的分布情况,我们在最新的研究中补充了来自1a型H77株和3a型S52株的sE2蛋白,与来自1b型Con1株的sE2一起组合成三价亚单位疫苗^[56]。该三价疫苗所包含的抗原基因型涵盖了世界上近70%的主要HCV流行株型。

研究发现,与三个单价sE2苗相比,三价苗显著提升了小鼠免疫血清对于囊括世界上最为流行的1a型(H77)、1b型(Con1)、2a型(JFH-1)和3a型(S52)病毒的中和效价,同时对其他亚型毒株也有较好的中和效果。进一步研究发现,三价疫苗中的每个sE2抗原可诱导出独特的多克隆中和抗体谱,这些抗体的

集合对部分病毒株的中和产生明显的协同作用。此外, 该三价苗在恒河猴中诱导出的中和抗体的效价和广谱性不但优于单价苗, 而且在遗传背景差异较大的恒河猴个体间的均一性更好。同时, 三价苗还在恒河猴体内诱导出HCV特异性T细胞免疫反应。这些研究结果表明, 我们研发的sE2三价亚单位疫苗具有产量高、单体组分间无优势表位竞争干扰、能诱导协同效应的广谱性中和抗体等优势。这些结果为未来多价苗的研发及疫苗产业化奠定了重要基础。

6 展望

我们的研究表明, 昆虫细胞表达的sE2抗原的免疫原性强, 是一个理想的HCV候选疫苗, 其产量高、易纯化等在制备环节上的优势克服了研发多价sE2抗原疫苗的技术屏障。包含1a型、1b型和3a型sE2抗原的三价苗诱导出更加广谱、更加均一的中和抗体, 展现了较好的商业开发前景。在此三价苗基础上, 还可以进行其他基因型sE2的添加或置换, 以获得中和活性覆盖范围更广的多价HCV疫苗。此外, 最理想的HCV疫苗是同时诱导强有效的广谱中和抗体和T细胞免疫反应, 这也将是未来的发展方向之一。

参考文献 (References)

- Lavanchy D. The global burden of hepatitis c. *Liver Int* 2009; 29 Suppl: 174-81.
- WHO. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis c infection. Geneva 2014.
- Chung RT, Baumert TF. Curing chronic hepatitis c—the arc of a medical triumph. *N Engl J Med* 2014; 370(17): 1576-8.
- Campbell CA, Canary L, Smith N, Teshale E, Ryerson AB, Ward JW. State hcv incidence and policies related to hcv preventive and treatment services for persons who inject drugs—united states, 2015-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017; 66(18): 465-9.
- Suryaprasad AG, White JZ, Xu F, Eichler BA, Hamilton J, Patel A, *et al.* Emerging epidemic of hepatitis c virus infections among young nonurban persons who inject drugs in the united states, 2006-2012. *Clin Infect Dis* 2014; 59(10): 1411-9.
- Onofrey S, Church D, Kludt P, DeMaria A, Cranston K, Beckett GA, *et al.* Hepatitis c virus infection among adolescents and young adults—massachusetts, 2002-2009 (reprinted from *mmwr*, vol 60, pg 537-541, 2011). *Jama-J Am Med Assoc* 2011; 305(24): 2511-3.
- McNamara BC, Losikoff PT, Huguenin L, Macalino GE, Rich JD, Gregory SH. Increasing hepatitis c prevalence and associated risk behaviors among incarcerated young adults. *J Urban Health* 2014; 91(2): 376-82.
- Church D, Barton K, Elson F, DeMaria A, Cranston K, Harris N, *et al.* Notes from the field: Risk factors for hepatitis c virus infections among young adults—massachusetts, 2010 (reprinted from *mmwr*, vol 60, pg 1457-1458, 2011). *Jama-J Am Med Assoc* 2011; 306(22): 2448.
- Qin QQ, Smith MK, Wang L, Su YY, Wang LY, Guo W, *et al.* Hepatitis c virus infection in china: An emerging public health issue. *J Viral Hepatitis* 2015; 22(3): 238-44.
- Bennett H, Waser N, Johnston K, Kao JH, Lim YS, Duan ZP, *et al.* A review of the burden of hepatitis c virus infection in china, japan, south korea and taiwan. *Hepatology Int* 2015; 9(3): 378-90.
- Hagan LM, Wolpe PR, Schinazi RF. Treatment as prevention and cure towards global eradication of hepatitis c virus. *Trends Microbiol* 2013; 21(12): 625-33.
- Irving WL. Acute hepatitis c virus infection: A neglected disease? *Gut* 2006; 55(8): 1075-7.
- Russmann S, Dowlatshahi EA, Printzen G, Habicht S, Reichen J, Zimmermann H. Prevalence and associated factors of viral hepatitis and transferrin elevations in 5036 patients admitted to the emergency room of a swiss university hospital: Cross-sectional study. *Bmc Gastroenterol* 2007; 7: 5.
- Morrill JA, Shrestha M, Grant RW. Barriers to the treatment of hepatitis c infection: Patient, provider, and system factors. *J Gen Intern Med* 2005; doi: org/10.1111/j.1525-1497.2005.0161.x.
- Dahari H, Feinstone SM, Major ME. Meta-analysis of hepatitis c virus vaccine efficacy in chimpanzees indicates an importance for structural proteins. *Gastroenterology* 2010; 139(3): 965-74.
- Grebely J, Prins M, Hellard M, Cox AL, Osburn WO, Lauer G, *et al.* Hepatitis c virus clearance, reinfection, and persistence, with insights from studies of injecting drug users: Towards a vaccine. *Lancet Infect Dis* 2012; 12(5): 408-14.
- Osburn WO, Fisher BE, Dowd KA, Urban G, Liu L, Ray SC, *et al.* Spontaneous control of primary hepatitis c virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology* 2010; 138(1): 315-24.
- Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E, Schurmann P, Bartosch B, Cosset FL, *et al.* Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis c. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(14): 6025-30.
- Raghuraman S, Park H, Osburn WO, Winkelstein E, Edlin BR, Rehermann B. Spontaneous clearance of chronic hepatitis c virus infection is associated with appearance of neutralizing antibodies and reversal of t-cell exhaustion. *J Infect Dis* 2012; 205(5): 763-71.
- Fafi-Kremer S, Fauvelle C, Felmlee DJ, Zeisel MB, Lepiller Q, Fofana I, *et al.* Neutralizing antibodies and pathogenesis of hepatitis c virus infection. *Viruses-Basel* 2012; 4(10): 2016-30.
- Rosen HR, Miner C, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Conrad AJ, Bakke A, *et al.* Frequencies of hcv-specific effector cd4⁺ t cells by flow cytometry: Correlation with clinical disease stages. *Hepatology* 2002; 35(1): 190-8.
- Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis c virus infection. *J Exp Med* 2001; 194(10): 1395-406.
- Lechner F, Wong DKH, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, *et al.* Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis c virus. *J Exp Med* 2000; 191(9): 1499-512.
- Gruner NH, Gerlach TJ, Jung MC, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW, *et al.* Association of hepatitis c virus-specific cd8(+)

- t cells with viral clearance in acute hepatitis c. *J Infect Dis* 2000; 181(5): 1528-36.
- 25 Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like t-helper cells in hepatitis c virus infection: Implications for hepatitis c virus chronicity. *Hepatology* 1997; 25(2): 449-58.
- 26 Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, *et al.* Different clinical behaviors of acute hepatitis c virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98(3): 706-14.
- 27 Lavillette D, Morice Y, Germanidis G, Donot P, Soulier A, Pagkalos E, *et al.* Human serum facilitates hepatitis c virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis c virus infection. *J Virol* 2005; 79(10): 6023-34.
- 28 Watanabe H, Wells F, Major ME. Clearance of hepatitis c in chimpanzees is associated with intrahepatic t-cell perforin expression during the late acute phase. *J Viral Hepat* 2010; 17(4): 245-53.
- 29 Proffitt A. First hev vaccine approved. *Nat Biotechnol* 2012; 30(4): 300.
- 30 Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, *et al.* Expanded classification of hepatitis c virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 2014; 59(1): 318-27.
- 31 Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis b viruses. *J Gen Virol* 2002; 83: 1267-80.
- 32 Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis c virus pseudo-particles containing functional e1-e2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003; 197(5): 633-42.
- 33 Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, *et al.* Hepatitis c virus glycoproteins mediate ph-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(12): 7271-6.
- 34 Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, *et al.* Complete replication of hepatitis c virus in cell culture. *Science* 2005; 309(5734): 623-6.
- 35 Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, *et al.* Production of infectious hepatitis c virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11(7): 791-6.
- 36 Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, *et al.* Robust hepatitis c virus infection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(26): 9294-9.
- 37 Steinmann E, Pietschmann T. Cell culture systems for hepatitis c virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 36: 917-48.
- 38 Bukh J. Animal models for the study of hepatitis c virus infection and related liver disease. *Gastroenterology* 2012; 142(6): 1279-87 e3.
- 39 Elmowalid GA, Qiao M, Jeong SH, Borg BB, Baumert TF, Sapp RK, *et al.* Immunization with hepatitis c virus-like particles results in control of hepatitis c virus infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(20): 8427-32.
- 40 Reardon S. Nih to retire all research chimpanzees. *Nature* 2015.
- 41 Dorner M, Horwitz JA, Donovan BM, Labitt RN, Budell WC, Friling T, *et al.* Completion of the entire hepatitis c virus life cycle in genetically humanized mice. *Nature* 2013; 501(7466): 237-41.
- 42 Washburn ML, Bility MT, Zhang L, Kovalev GI, Buntzman A, Frelinger JA, *et al.* A humanized mouse model to study hepatitis c virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* 2011; 140(4): 1334-44.
- 43 Dorner M, Horwitz JA, Robbins JB, Barry WT, Feng Q, Mu K, *et al.* A genetically humanized mouse model for hepatitis c virus infection. *Nature* 2011; 474(7350): 208-11.
- 44 Yokokawa H, Higashino A, Suzuki S, Moriyama M, Nakamura N, Suzuki T, *et al.* Induction of humoral and cellular immunity by immunisation with hcv particle vaccine in a non-human primate model. *Gut* 2016; 67(2): 372-9.
- 45 Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, *et al.* Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis c virus protect against infection in mice. *Gastroenterology* 2013; 145(2): 447-55 e1-4.
- 46 Stamataki Z, Coates S, Evans MJ, Wininger M, Crawford K, Dong C, *et al.* Hepatitis c virus envelope glycoprotein immunization of rodents elicits cross-reactive neutralizing antibodies. *Vaccine* 2007; 25(45): 7773-84.
- 47 Puig M, Major ME, Mihalik K, Feinstone SM. Immunization of chimpanzees with an envelope protein-based vaccine enhances specific humoral and cellular immune responses that delay hepatitis c virus infection. *Vaccine* 2004; 22(8): 991-1000.
- 48 Meunier JC, Gottwein JM, Houghton M, Russell RS, Emerson SU, Bukh J, *et al.* Vaccine-induced cross-genotype reactive neutralizing antibodies against hepatitis c virus. *J Infect Dis* 2011; 204(8): 1186-90.
- 49 Frey SE, Houghton M, Coates S, Abrignani S, Chien D, Rosa D, *et al.* Safety and immunogenicity of hcv e1e2 vaccine adjuvanted with mf59 administered to healthy adults. *Vaccine* 2010; 28(38): 6367-73.
- 50 Viether P, Boo I, Gu J, McCaffrey K, Edwards S, Owczarek C, *et al.* The core domain of hepatitis c virus glycoprotein e2 generates potent cross-neutralizing antibodies. *Hepatology* 2017; 65(4): 1117-31.
- 51 Folgori A, Capone S, Ruggeri L, Meola A, Sporeno E, Ercole BB, *et al.* A t-cell hcv vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med* 2006; 12(2): 190-7.
- 52 Barnes E, Folgori A, Capone S, Swadling L, Aston S, Kurioka A, *et al.* Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained t cell responses to hcv in man. *Sci Transl Med* 2012; 4(115): 115ra1.
- 53 Swadling L, Capone S, Antrobus RD, Brown A, Richardson R, Newell EW, *et al.* A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and mva vectors that primes, boosts, and sustains functional hcv-specific t cell memory. *Sci Transl Med* 2014; 6(261): 261.
- 54 Li D, von Schaewen M, Wang X, Tao W, Zhang Y, Li L, *et al.* Altered glycosylation patterns increase immunogenicity of a subunit hepatitis c virus vaccine, inducing neutralizing antibodies which confer protection in mice. *J Virol* 2016; 90(23): 10486-98.
- 55 Li D, Wang X, von Schaewen M, Tao W, Zhang Y, Heller B, *et al.* Immunization with a subunit hepatitis c virus vaccine elicits pan-genotypic neutralizing antibodies and intrahepatic t-cell responses in nonhuman primates. *J Infect Dis* 2017; 215(12): 1824-31.
- 56 Wang X, Yan Y, Gan T, Yang X, Li D, Zhou D, *et al.* A trivalent hcv vaccine elicits broad and synergistic polyclonal antibody response in mice and rhesus monkey. *Gut* 2017gutjnl-2017-314870.