

Statusartikel

Ugeskr Læger 2021;183:V08210635

Det historiske perspektiv fra opdagelsen af hepatitis C-virus til kurativ terapi og vaccinedrømme

Jens Bukh

Copenhagen Hepatitis C Program (CO-HEP), Infektionsmedicinsk Afdeling, Københavns Universitetshospital – Hvidovre Hospital, og Institut for Immunologi og Mikrobiologi, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

Ugeskr Læger 2021;183:V08210635

HOVEDBUDSKABER

- I 1989 blev hepatitis C-virus (HCV) opdaget ved brugen af nye molekylære metoder.
- Opdagelsen af HCV har ført til udvikling af diagnostiske test, der har elimineret overførsel af HCV ved blodtransfusioner, og kurative lægemidler.
- Globalt er udvikling af en vaccine dog afgørende for at begrænse hepatitis C-epidemien.

Viral hepatitis og associeret kronisk leversygdom, inklusive skrumpeliver og leverkræft, er på verdensplan årsag til over 1,1 mio. dødsfald om året. Kronisk hepatitis C-virus (HCV)-infektion, der oftest ikke bliver diagnosticeret før sent i det kliniske forløb, bidrager med over 400.000 årlige dødsfald, på trods af at der er udviklet specifikke og følsomme diagnostiske test til at forhindre overførsel via blodtransfusioner og effektive terapier til at kurere patienter, der er diagnosticeret med kronisk hepatitis C [1]. Derfor er det sandsynligt, at global kontrol med HCV-epidemien også vil kræve udvikling af en vaccine, der kan forhindre de mere end 1 mio. nye kroniske infektioner, der opstår årligt [2, 3]. Selv i lande som Danmark, hvor alle de diagnosticerede tilbydes kurativ behandling for kronisk hepatitis C, vil en vaccine være væsentlig for at forhindre reinfektion i højrisikogrupper. Opdagelsen af HCV og karakteriseringen af dets positivstrengede RNA-genom for 25-35 år siden muliggjorde de store medicinske gennembrud i diagnose og behandling samt drømmen om at kunne vaccinere mod denne dødelige sygdom [1, 4].

Kimen til opdagelsen af HCV i 1989 var erkendelsen af hepatitis B-virus (HBV) i 1965 og hepatitis A-virus (HAV) i 1973 samt efterfølgende udvikling af diagnostiske test for disse virus [4]. Undersøgelse af prøver fra patienter med transfusionsassocieret hepatitis førte i 1975 til den erkendelse, at de fleste tilfælde ikke var forårsaget af HAV eller HBV [5], men sandsynligvis af en andet ukendt smitsom agens. Hermed blev sygdommen non-A-, non-B-hepatitis etableret som en eksklusionsdiagnose, og en række studier i chimpanseedyremodellen viste efterfølgende, at den ætiologiske agens mest sandsynligt var et lille kappebærende virus [4, 6]. Det var dog ikke muligt med traditionelle metoder at påvise eksistensen af et specifikt virus, og derfor var det nødvendigt for forskere at anvende helt nye molekylære metoder til at identificere HCV [6], hvorefter der udvikledes diagnostiske test, hvormed man akkurat kunne identificere et

panel af prøver fra patienter med kendt non-A-, non-B-hepatitis og påvise, at HCV forårsager akut og kronisk hepatitis [7]. Det er kun hos ca. 25% af de akut inficerede personer, at man kan udrydde virus, mens de resterende bliver permanent inficeret, og der er over 50 mio. kroniske bærere på verdensplan.

Den kroniske infektion fører i ca. 20% af tilfældene, typisk efter 10-30 års infektion, til udviklingen af leverfibrose eller cirrose med risiko for leversvigt. Derudover vil 2-4% af patienterne med skrumpeliver årligt udvikle leverkræft. Forbedrede diagnostiske test gjorde det muligt at indføre screening af blodprodukter, hvilket gav muligheden for at eliminere blodtransfusioner som smitekilde til hepatitis C. Endelig kunne det påvises, at de fleste nye hepatitis C-infektioner er blodoverførte, hyppigt sket ved intravenøs anvendelse af stoffer med brug af viruseksponerede nåle, mens seksuel smitte og smitte fra mor til barn spiller en mindre rolle for den overordnede spredning af HCV [1-3].

Efter opdagelsen af HCV i 1989 begyndte et vigtigt arbejde i 1990-1993 med at karakterisere virusgenomet og de proteiner, som det udtrykker [8, 9]. Det fulde genom blev imidlertid først identificeret i 1995 med opdagelsen af en manglende sekvens ved 3'-enden af genomet [10]. Det førte til, at to forskningsgrupper i 1997 lykkedes med at udvikle såkaldte infektiøse cDNA-kloner af et patientvirus, hvorfra der i laboratoriet kunne genereres HCV-RNA-genomer, der kunne initiere infektion med HCV i chimpanseer efter injektion direkte i leveren; dette er muligt, da HCV er et positivstrenget RNA, hvor genomet således fungerer som et messenger-RNA til direkte at udtrykke de virale proteiner i værtscellen [11, 12]. Da det eneste, der blev sprøjtet ind i levercellerne in vivo, var det nøgne HCV-RNA, gav disse forsøg det endelige bevis på, at HCV-genomet kan føre til en infektion, der giver viral hepatitis med forhøjede leverenzymmer og inflammatoriske forandringer i leverbiopsier [11] (**Figur 1**).

FIGUR 1 Infektion med hepatitis C-virus (HCV) i en chimpanse, som blev injiceret intra-hepatisk med RNA-transkripter fra en cDNA-klon af HCV (pCV-H77C fra [12]). Data påviser akut hepatitis i forsøgsdyr, der er inficeret fra det nøgne HCV-RNA-genom, med forhøjede leverenzymmer og inflammatoriske forandringer i leverbiopsier. Derudover ses akut infektion, der persisterer (her ses 104 ugers opfølgning) fra et klonet genom uden prækksisterende genetisk variabilitet. Se [1] for relevante studier.

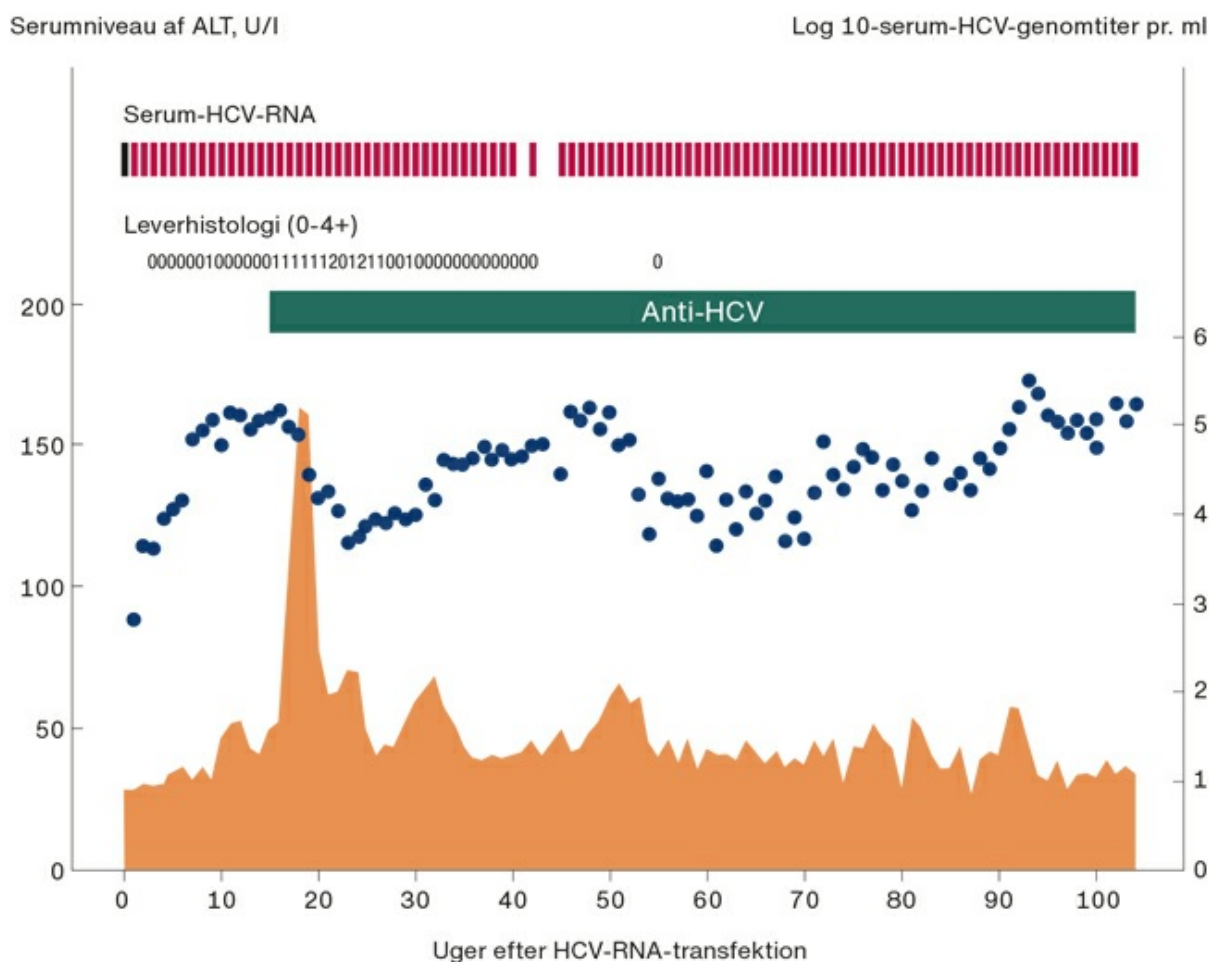
Serum HCV-RNA-test: sort boks, negativ; rød boks, positiv.

Leverhistologi: nekroinflammatoriske forandringer klassificeret som 0 (ingen ændring i forhold til normal), 1+, 2+, 3+, 4+

Grøn bar: serum-anti-HCV-positiv

Orange område: serumniveauer af alaninaminotransferase (ALT)

Blå cirkler: log 10-serum-HCV-genomtiter, monitortest



Da virus, som var isoleret fra patienter, ikke kunne dyrkes i cellekulturer, blev de første såkaldte reverse genetiske studier af genomer med laboratorieinducerede mutationer i 1999 udført i chimpanser, hvilket bidrog til forståelsen af, hvilke virusgenomelementer der er kritiske for HCV-infektivitet [13].

Identificeringen af det infektiøse RNA-genom førte fra 1999 til udviklingen af HCV-cellekultursystemer, der har været af afgørende betydning for udviklingen af lægemidler mod hepatitis C [1]. Udforskning og strukturbestemmelse af de HCV-proteiner, der hæmmes af disse lægemidler, var også af stor betydning for dette medicinske gennembrud, der førte til, at kronisk HCV-infektion fra 2014 kunne kureres med 2-3

såkaldte direct acting antivirals (DAA) i pilleform givet dagligt i 8-12 uger [1].

Sekvensanalyse af virusgenomer fra patienter med HCV gjorde det hurtigt klart, at dette virus har en meget høj genetisk variabilitet med stor mulighed for at undvige værtens immunsvær og dermed etablere kroniske infektioner [1, 2]. Endvidere blev eksistensen af seks hovedgenotyper af HCV erkendt i 1993 [14], hvor genotype 1-3 findes globalt, hvorimod genotype 4 primært findes i Mellemøsten og nordlige og centrale lande i Afrika, genotype 5 primært i Sydafrika og genotype 6 primært i Sydøstasien [1]. Det viste sig, at disse genotyper har stor klinisk relevans, da de tidligt udviklede diagnostiske test ikke var pangentypiske, og de tidligere interferonbaserede behandlingsformer havde forskelligt udkomme ved forskellige genotyper [1]. Dette var også tilfældet med de oprindelige DAA, men der er imidlertid efterfølgende blevet udviklet pangentypiske DAA-kombinationer. Det er dog blevet klart, at bestemte varianter af HCV har præeksisterende resistens mod de anvendte DAA-kombinationer, inklusive de pangentypiske [3]. Erkendelsen af den betydelige genetiske variabilitet har således haft stor betydning for udviklingen af optimale diagnostiske test og DAA-kombinationer og er derudover en betydelig udfordring for den fremtidige succes med at udvikle en vaccine mod HCV.

OPDAGELSE AF HEPATITIS C-VIRUS

Studier i chimpansemodeller var de første, hvor man påviste, at non-A-, non-B-hepatitis var smitsomt, da prøver fra patienter givet intravenøst i aberne førte til udvikling af akut og kronisk hepatitis [4]. Herefter kunne størrelsen af den smitsomme agens kortlægges i filtreringsforsøg, og inaktivering ved behandling med kloroform indikerede, at agens havde en lipidkappe. Der opstod derfor en formodning om, at non-A-, non-B-hepatitis blev forårsaget af et virus med en størrelse på < 80 nm i diameter [6].

I tiden før udviklingen af dybdesequentering, hvormed man direkte kan sekvensbestemme virusgenomer fra patientprøver, var det imidlertid en kompliceret opgave at finde det ætiologiske agens til en virusinduceret sygdom. Udfordringen for HCV var set i bagespejlet kompliceret af, at virus findes i lave mængder i inficerede personer, og at antistoffer udvikles forholdsvis sent efter en infektion, ofte efter akut sygdom, hvilket vanskeliggjorde identificering ved elektronmikroskopiundersøgelser [4]. Endvidere har det vist sig, at HCV fra patienter ikke kan dyrkes direkte i cellekultur, så virus kunne ikke opformerer og identificeres i celler i laboratoriet [1, 3]. Men efter utallige tiltag, der strakte sig over mere end 15 år, lykkedes det i 1989 at klonere HCV fra prøver fra eksperimentelt inficerede chimpanser med høje infektiøse titre af non-A-, non-B-hepatitis. Chimpansemodellen var således af afgørende betydning for opformering af virus fra en patient med non-A-, non-B-hepatitis.

Det var muligt at indsamle store mængder plasma, hvorfra potentielle viruspartikler af den forventede størrelse kunne opkoncentreres ved ultracentrifugering, hvorefter total-RNA kunne ekstraheres, denatureres og omdannes til cDNA med reverse transkriptase. Millioner af kloner fra ekspresion af dette cDNA blev herefter screenet med patientserum, som man formodede indeholdt specifikke non-A-, non-B-antistoffer, og det lykkedes at identificere en enkelt positiv klon, der viste sig at være fra HCV-genomet (isolat HCV1 af genotype 1a) [6]. Et delsegment af HCV-genomet blev således initialt sekvenseret, og der kunne herefter udvikles specifikke test til detektion af HCV-RNA og antistoffer mod HCV, som efterfølgende blev anvendt til at påvise, at transfusionsassocieret og sporadisk non-A-, non-B-hepatitis var forårsaget af HCV [4, 7].

KARAKTERISERING AF HEPATITIS C-GENOMET

Efter opdagelsen af HCV blev det hurtigt klart, at baseret på analyse af genomsekvenser skulle dette nye virus klassificeres som medlem af *Flaviviridae*-familien [1, 8], der også omfatter mange andre væsentlige humanpatogener, såsom gul feber-, zika-, West Nile- og denguevirus. Efterfølgende blev HCV klassificeret som prototypevirus for et nyt genus i denne familie, Hepacivirus [1], der inden for de senere år har fået en række nye medlemmer fra dyreverdenen, inklusive virus der forårsager hepatitis i gnavere, som nu anvendes som surrogatdyremodel for HCV [15]. HCV-genomet består af ca. 9.600 nukleotider med strukturerede nonkodende sekvenser ved enderne (5' og 3' UTR), som er af afgørende betydning for virusreplikation. Genomet udtrykker et polyprotein på ca. 3.000 aminosyrer, som efterfølgende kløves til dannelsen af ti funktionelle virale proteiner. Disse består af strukturelle proteiner, der indgår i viruspartiklen: Core, der omgiver virus-RNA-genomet, og to kappebundne proteiner E1 og E2, der er af stor betydning for indgang ind i værtscellen via en serie af receptormolekyler på levercellerne, samt for dannelsen af neutraliserende antistoffer ved hepatitis C-infektion.

Det var et banebrydende fund da CD81 blev identificeret som den første erkendte receptor i 1998 [16], hvilket har fremmet forståelsen af, hvordan HCV kommer ind i værtscellen, og hvordan det kan forhindres med neutraliserende antistoffer. Der dannes derudover en række nonstrukturelle (NS) proteiner, som er af essentiel betydning for kløvning af viruspolyproteinet [9] og for virusreplikation. Krystalstrukturen af flere af disse proteiner blev bestemt i studier, der efterfølgende var af stor betydning for design af DAA. NS3-proteasen, NS5A-proteinet og NS5B-polymerasen er targets for de nuværende lægemidler mod hepatitis C [1].

En række værtsfaktorer i leverceller, inklusive lipidmetabolisme, er efterfølgende fundet at have stor betydning for HCV's livscyklus [1, 3]. Et par af disse, der er afgørende for virusreplikation, har været realistiske mål for udviklingen af host targeting antivirals. Det gælder det leverspecifikke microRNA-122, som binder sig til to sites i 5' UTR, og HCV blev det første virus, der blev påvist at være fuldstændig afhængigt af et microRNA [17]. Et andet eksempel er cyclophiliner, der påvirker HCV-replikation ved binding til det nonstrukturelle protein NS5A [1]. HCV har således været et eksempel på, hvordan basal og translationel forskning kan føre til identificering af helt nye mål for antiviral behandling.

UDVIKLING AF EKSPERIMENTELLE SYSTEMER TIL STUDIER AF REPLIKATION AF HEPATITIS C-VIRUS

In vitro-genererede RNA-transkripter fra in vivo-infektiose kloner af HCV viste sig ikke at være infektiøse i leverderiverede celler [1]. Det var ikke overraskende, da virus fra patienter med akut HCV var noninfektiose i celler. I 1999 lykkedes det imidlertid at udvikle såkaldte replikoner af HCV [18], hvilket har været af stor betydning for basale in vitro-studier af HCV-replikation og for screening af antivirale midler [1]. Det er subgenomer af HCV, der indeholder 5' og 3' UTRs og NS3-NS5B og under det rette selektive pres kan undergå autonom RNA-replikation i leverderiverede celler. Robust replikation krævede imidlertid tilstedeværelsen af adaptive mutationer [19], og det viste sig efterfølgende, at sådanne mutationer forhindrede infektion af fuldlængdegenomer i chimpansemodellen [20]. Det oprindelige replikon var af HCV-genotype 1b, men det er siden lykkedes at udvikle lignende replikoner af isolater af de seks hovedgenotyper af HCV [3].

I 2003 blev et genotype 2a-isolat fra Japan (JFH1), der kunne etablere RNA-replikation som replikon uden adaptive mutationer, opdaget, og det viste sig, at RNA-transkripter fra et fuldlængde-JFH1-genom eller et JFH1-genom med core, E1, E2, p7 og NS2 fra andre HCV-isolater kunne dyrkes i leverderiverede celler [21,

22]. Effektiv infektion krævede imidlertid introduktion af adaptive mutationer [1]. Dette gjorde det for første gang muligt at studere hele livscyklus af HCV i cellekultur. I 2012 lykkedes det endelig at generere adapterede genomer af andre HCV-isolater, der kan dyrkes i cellekultur, inklusive et isolat af genotype 1a [23], og der er nu robuste cellekultursystemer af isolater af alle seks hovedgenotyper [1, 24]. Disse systemer har haft stor betydning for studier af antiviral resistens og vil være et væsentligt redskab til at karakterisere neutraliserende antistoffer, der er induceret af vaccinekandidater.

UDVIKLING AF EN VACCINE MOD HEPATITIS C-VIRUS

Der skal findes løsninger på en del udfordringer i arbejdet henimod at udvikle en vaccine mod HCV [1-3]. Den genetiske variabilitet betyder, at der i hver enkelt inficeret person findes en såkaldt quasispecies af virusvarianter – en sværm af virus med variation på op til 1-3% af genomet, hvilket koblet med en høj mutationsrate betyder, at virus har gode muligheder for at undvige vaccineinducerede immunsvær. Eksistensen af genotyper med over 30% variation i deres genomsekvenser betyder, at vaccineinducerede immunsvær skal være bredspektrede. Alternativt skal der udvikles en multivalent vaccine. Derudover har HCV flere egenskaber, der gør, at den er beskyttet mod effekten af neutraliserende antistoffer, inklusive en hypervariabel region i kappeproteinet E2, der holder partiklen i en lukket form, der er mere neutralisationsresistent [25]. Endelig beskytter tidligere akut HCV-infektion ikke nødvendigvis mod reinfektion eller udvikling af kronisk hepatitis [26], da virus har udviklet forskellige mekanismer til at undvige det adaptive immunsvær [2, 3].

Med henblik på vaccineplatformen er der gennem de seneste 30 år blevet udviklet og testet mange forskellige strategier, inklusive rekombinante HCV-envelopeproteiner, inaktiverede HCV-helviruspartikler samt viruslignende partikler eller virale vektorer, der udtrykker HCV-antigener [1-3]. Da HCV oftest ikke giver alvorlig sygdom i den akutte fase, anses det for at være målet med vaccinen at sænke raten af udviklede kroniske infektioner [2, 3]. Den eneste vaccine, der har vist beskyttelse mod kronisk infektion i studier med chimpanser, er rekombinant E1-E2 udtrykt og oprenset fra Chinese hamster ovary-celler, men dens beskyttende effekt mangler at blive testet hos mennesker [27]. En viral vektorvaccine, hvor de nonstrukturelle HCV-proteiner udtrykkes, var på trods af dannelsen af specifikke cellulære immunresponser ikke i stand til at beskytte mod kronisk HCV-infektion i et klinisk fase I/II-studie med højrisikogrupper [28]. Derfor er det nu den overvejende tanke, at en effektiv vaccine skal kunne inducere bredspektrede neutraliserende antistoffer [29]. Dette kunne kræve, at der anvendes designervacciner, hvor overfladeproteinerne E1-E2 eller E2 bliver modificeret til bedre at eksponere konserverede epitoper [3, 25, 29].

På trods af den afgørende betydning, som studier med chimpanser havde for opdagelsen og kloningen af HCV, har det siden 2011 ikke været muligt at anvende denne dyremodel til studier af HCV [3]. Derfor findes der i realiteten ikke nogen dyremodel til testning af den beskyttende effekt af HCV-vacciner; de beskyttende effekter af inducerede neutraliserende antistoffer kan dog testes i immuninkompetente mus med transplanteret human lever [3]. Til gengæld er der pga. den kurative DAA-behandling af hepatitis C i øjeblikket initiativer med henblik på at anvende frivillige forsøgspersoner til at vise, om vaccinekandidater kan inducere de nødvendige immunsvær og beskyttelse mod infektion [30]. Derudover vil det være vigtigt, at der, som det er set det seneste år for SARS-CoV-2, bliver langt bedre muligheder for at gennemføre klassiske kliniske forsøg af lovende vaccinekandidater, hvilket også vil kræve en øget interesse fra funderere og industrien [3, 29].

KONKLUSION

Opdagelsen af HCV har ført til udvikling af optimale diagnostiske test og behandlinger. Dette har været muligt pga. stor succes og interaktion af basal, translationel og klinisk forskning i et produktivt samspil med industrien. Forskning i HCV har ført til erkendelsen af helt nye principper i virologi og immunologi, og har vist, at det er muligt med antivirale midler at kurere en kronisk virussygdom. Udvikling af en vaccine er sandsynligvis nødvendig for at kunne kontrollere HCV på verdensplan, og der er genereret stor viden om virus' heterogenitet, patogenese og neutralisering, hvilket kan udnyttes i denne indsats. Belært af succes med udvikling af SARS-CoV-2-vacciner er der behov for en mere direkte tilgang til vaccinetesting, men det bør også anerkendes, at HCV har nogle egenskaber, der sandsynligvis gør det til en langt større udfordring at udvikle en beskyttende vaccine.

Korrespondance *Jens Bukh*. E-mail: jbukh@sund.ku.dk

Antaget 12. oktober 2021

Publiceret på ugeskriftet.dk 15. november 2021

Interessekonflikter Der er anført potentielle interessekonflikter. Forfatterens ICMJE-formular er tilgængelig sammen med artiklen på ugeskriftet.dk

Referencer findes i artiklen publiceret på ugeskriftet.dk

Artikelreference *Ugeskr Læger* 2021;183:V08210635

SUMMARY

The historic perspective from discovery of hepatitis C virus to curative therapy and vaccine dreams

Jens Bukh

Ugeskr Læger 2021;183:V08210635

The discovery of hepatitis C virus and the research that this breakthrough permitted defined viral RNA genome and proteins, existence of globally distributed genotypes and creation of in vivo and in vitro experimental systems, and thus made it possible to develop specific and sensitive diagnostic tests and curative therapies. Research led to fundamental discoveries in virology and immunology as summarized in this review, and the hope is that understanding of virus heterogeneity, pathogenesis and neutralisation will make it possible to achieve the ultimate goal of developing a vaccine to help control the epidemic worldwide.

REFERENCER

1. Bukh J. The history of hepatitis C virus (HCV): basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life-cycle with new perspectives for epidemic control. *J Hepatol* 2016;65:S2-S21.
2. Walker CM, Grakoui A. Hepatitis C virus: why do we need a vaccine to prevent a curable persistent infection? *Curr Opin Immunol* 2015;35:137-43.
3. Bartenschlager R, Baumert TF, Bukh J et al. Critical challenges and emerging opportunities in hepatitis C virus research in an era of potent antiviral therapy: considerations for scientists and funding agencies. *Virus Research* 2018;248:53-62.
4. Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 2009;51:939-48.
5. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH et al. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
6. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis

- genome. *Science* 1989;244:359-62.
7. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-500.
 8. Choo QL, Richman KH, Han JH et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:2451-5.
 9. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C et al. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 1993;67:2832-43.
 10. Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Shimotohno K. A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;215:744-9.
 11. Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ et al. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 1997;277:570-4.
 12. Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8738-43.
 13. Yanagi M, St Claire M, Emerson SU et al. In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2291-5.
 14. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8234-8.
 15. Billerbeck E, Wolfsberg R, Fahnøe U et al. Mouse models of acute and chronic hepatitis C infection. *Science* 2017;357:204-8.
 16. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-41.
 17. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* 2005;309:1577-81.
 18. Lohmann V, Korner F, Koch J et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-3.
 19. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000;290:1972-4.
 20. Bukh J, Pietschmann T, Lohmann V et al. Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14416-21.
 21. Wakita T, Pietschmann T, Kato T et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-6.
 22. Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB et al. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* 2009;49:364-77.
 23. Li YP, Ramirez S, Jensen SB et al. Highly efficient full-length hepatitis C virus genotype 1 (strain TN) infectious culture system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:19757-62.
 24. Pham LV, Pedersen MS, Fahnøe U et al. HCV genome-wide analysis for development of efficient culture systems and unravelling of antiviral resistance in genotype 4. *Gut* 2021 (online 8. apr).
 25. Prentoe J, Velázquez-Moctezuma R, Augestad E et al. Hypervariable region 1 and N-linked glycans of hepatitis C regulate virion neutralization by modulating envelope conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:10039-47.
 26. Farci P, Alter HJ, Govindarajan S et al. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 1992;258:135-40.
 27. Frey SE, Houghton M, Coates S et al. Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine* 2010;28:6367-73.
 28. Page K, Melia MT, Veenhuis RT et al. Randomized trial of a vaccine regimen to prevent chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2021;384:541-9.
 29. Bukh J. Vaccines against hepatitis C: a travel into neutralisation space. *Gut* 2021;70:1609-10.
 30. Liang TJ, Feld JJ, Cox AL, Rice CM. Controlled human infection model – fast track to HCV vaccine? *N Engl J Med* 2021;385:1235-40.