



Hepatit C Virusu: Genetik Özellikleri, Aşı Geliştirme Çalışmalarında İlerlemeler ve Güncel Zorluklar

Hepatitis C Virus: Genetic Characteristics, Advances and Current Challenges for Vaccine Development

Fatih ŞAHİNER¹ [ID], İlhan CEBECİ² [ID]

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, Gulhane Medical Faculty, University of Health Sciences, Ankara, Turkey].

²Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Internal Medicine, Gulhane Training and Research Hospital, Ankara, Turkey].

Makale geçmişi [Article Info]: Geliş Tarihi (Received): 22.12.2019. Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 31.12.2019.

İletişim [Correspondence]: Fatih Şahiner; Doç.Dr., Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. E-posta: fsvirol@gmail.com [Fatih Şahiner; Assoc.Prof., Department of Medical Microbiology, Gulhane Medical Faculty, University of Health Sciences, Ankara, Turkey. E-mail: fsvirol@gmail.com]

Özet

Hepatit C virüsü (HCV) yüksek replikasyon oranı, genetik heterojenitesi (antijenik çeşitliliği), hücreden hücreye doğrudan geçebilmesi ve lipoviropartiküler maskeleye gibi özellikleri ile immün yanıtta kaçabilmekte ve yüksek kronikleşme riski taşımaktadır. Günümüzde başarı oranları %95'leri bulan yeni nesil tedavi stratejileri ile HCV'nin eradike edilebileceği düşünülmeye başlanmıştır. Bununla beraber, enfekte olduğunun farkında olmayan veya riskli davranışlar sergileyen kişilerle enfeksiyon yayılmaya devam etmektedir. Ayrıca, tedavinin HCV ilişkili sekelleri tam olarak ortadan kaldıramaması ve enfekte kişilerin sadece %10'unun tedaviye erişebilir olması gibi faktörler tedavi stratejilerinin virüsün yayılımını önlemede tek başına yeterli olamayacağını göstermektedir. HCV'nin keşfinden günümüze 20 yıl gibi uzun bir süre geçmesine rağmen hala koruyucu bir aşı geliştirilmesinin önünde önemli engeller bulunmaktadır. Bunlar arasında virüsün yapısal ve genetik özellikleri (yüksek antijenik heterojenitesi), zarf glikoproteinlerinin yoğun posttranslasyonel modifikasyonlara uğraması, yakın zamana kadar uygun bir hücre kültürü sisteminin geliştirilememesi, immünkompetan küçük hayvan modellerinin eksikliği, aşı etkinliğinin değerlendirilmesi için deneysel modellerin ve klinik çalışmaların planlanmasındaki zorluklar, başarılı tedavi ile virüsün eradike edilebileceği şeklindeki iyimser görüş, bazı teknik güçlükler ve mali destek kısıtlılığı gibi nedenler öne çıkmaktadır. Tüm bu zorluklara rağmen, dünya genelinde HCV enfeksiyonları ile ilişkili mortalite ve morbiditeyi azaltmak için en uygun maliyetli strateji olan etkili bir koruyucu aşı geliştirilmesinde umut vadeden ilerlemeler de olmuştur. İmmün yanıt ile enfekte bireylerin bir bölümünde akut HCV enfeksiyonlarının temizlenebilmesi, yeni hücre kültürü sistemleri ve küçük hayvan modelleri, şempanzelerle yapılan aşı çalışmalarında alınan başarılı sonuçlar, bazı aşuların klinik deneme aşamalarına gelmiş olması, aşı teknolojisi ve stratejilerindeki ilerlemelerin sunduğu yeni fırsatlar bunlardan bazılarıdır. Bu derlemede geliştirilebilecek bir koruyucu aşının HCV enfeksiyonlarının yayılımını önlemedeki öneminin vurgulanması amaçlanmıştır. Ayrıca aşı geliştirme çalışmalarındaki güncel durum, karşılaşılan engeller ve bu engelleri aşmak için başvurulabilecek alternatif stratejilere değinilmiştir.

Anahtar kelimeler: Profilaktik aşı, Terapötik aşı, Rekombinan protein, Adenoviral vektör.

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) can escape immune response and has a high risk of chronicity due to its high replication rate, genetic heterogeneity (antigenic diversity), direct cell-to-cell transmission and lipoviroparticular masking. Nowadays, it is thought that HCV can be eradicated with new generation treatment strategies with success rate of 95%. However, the infection continues to spread via patients who are unaware of their illness or exhibit risky behaviors. In addition, treatment cannot completely eliminate HCV-related sequelae and only 10% of infected people have access to treatment. These realities show that treatment strategies alone will not be sufficient to prevent the spread of the virus. Although 20 years have passed since the discovery of HCV, there are still significant obstacles to the development of a protective vaccine. The leading challenges include; structural and genetic characteristics of the virus (high antigenic heterogeneity), the highly posttranslational modification of envelope glycoproteins, the inability to develop a suitable cell culture system until recently, the lack of immunocompetent small animal models, the difficulties in planning experimental models and clinical trials for the evaluation of vaccine efficacy, optimistic view that successful treatment can eradicate the virus, some technical difficulties and limited financial support. Despite all these limitations, there have also been promising improvements in the development of an effective preventive vaccine, which is the most cost-effective strategy to reduce mortality and morbidity associated with HCV infections worldwide. Some of these include; clearance of acute HCV infections in some of the infected individuals with immune response, new cell culture systems and small animal models, successful results in vaccine studies with chimpanzees, some vaccines have come to clinical trial stages, new opportunities offered by advances in vaccine technology and strategies. In this review article, it is aimed to emphasize the importance of a protective vaccine could be developed to prevent the spread of HCV infections. In addition, the current situation in vaccine development studies, the obstacles encountered and alternative strategies to overcome these obstacles are mentioned.

Keywords: Prophylactic vaccine, Therapeutic vaccine, Recombinant protein, Adenoviral vector.

Giriş

Hepatit C virusu (HCV) yüksek kronikleşme oranı (%50-85) ile siroz ve hepatosellüler karsinoma (HCC) gibi ciddi komplikasyonlara yol açabilen, transplantasyon gerektiren kronik karaciğer yetmezliğinin en yaygın endikasyonu (%40-50) olan ve henüz koruyucu bir aşısı bulunmayan bulaşıcı bir RNA virusudur [1-4]. HCV 1989 yılında Non-A, non-B post-transfüzyon hepatitinin ana nedeni olarak tanımlanmış ve hakkında çok az şey bilinen bu virusun yapısal özellikleri, enfeksiyon patogenezi, tanı ve tedavi yöntemleri ve aşı seçenekleri de dahil olmak üzere keşfedilmeyi bekleyen yeni hedefler ortaya çıkmıştır [5]. Doğrudan etkili antiviral (DAA) ilaçların geliştirilmesi ve başarılı klinik uygulamaları, kronik hepatit C'nin tedavisinde bir dönüm noktası olmuştur. Bu terapötik devrim, özellikle gelir düzeyi yüksek ülkelerde HCV tedavisi için kuralları değiştirmiş ve interferon (IFN) içermeyen yeni tedavi protokolleri ile HCV'nin ortadan kaldırılabilmesi öngörüsü ortaya çıkmıştır [6,7]. Günümüzde HCV genotiplerinden

herhangi biri ile gelişen bir enfeksiyon oral alınan ve iyi tolere edilen ilaçların kısa süreli kürleri ile enfekte kişilerin %95'inden fazlasında ortadan kaldırılabilmesi ve karaciğer transplant alıcıları da dahil olmak üzere ilerlemiş karaciğer hastalığı olan kronik enfekte kişiler bile tedavi edilebilmektedir [8-10]. DAA'lerin bu başarısı ile ortaya çıkan HCV'nin eradike edilebileceği düşüncesi, 2030 yılına kadar virusun küresel olarak ortadan kaldırılmasını hedefleyen Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) destekli sağlık stratejilerine öncülük etmiştir [10-12]. Bu gelişmeler sonrasında virusun tıbbi öneminin azalacağı ve bir HCV aşısına artık ihtiyaç duyulmayacağı düşüncesini öne sürenler olsa da, dünya genelinde HCV olgularının sadece %5'inin tanı aldığı ve tanı konmayan ve yıllar boyunca asemptomatik kalabilen bireyler ve riskli davranışlar sergileyen ve çoğunlukla HCV tarama ve tedavisine sınırlı erişimi olan marjinal gruplar (damar içi ilaç-uyuşturucu kullanan kişiler, hapisane ortamları ve erkeklerle seks yapan erkekler gibi) aracılığı ile enfeksiyonun yayılmaya devam ettiği dikkate

alındığında bu argüman aşırı iyimser kalmaktadır [7,10]. HCV enfeksiyonunun global kontrolü için, yıllık tedavi oranlarının yeni enfeksiyon olgularından belirgin bir şekilde daha yüksek olması gerekirken, DSÖ'nün belirlediği 2030 hedefi için sürveyans programına katılan ülkelerin yaklaşık %60'ında 2016 yılı için tedavi edilen hastalardan daha fazla yeni enfeksiyon gelişimi bildirilmiştir [7,13]. Dünya genelinde HCV ile enfekte viremik kişi sayısının 80 milyona ve HCV ilişkili yıllık ölüm olgusu sayısının 400.000'lere ulaştığı da göz önüne alındığında, enfekte kişilerin tespit edilmesi, tedaviye erişimin yaygınlaşması, DAA'lere direnç sorunu ve maliyetlerinin azaltılması da dahil olmak üzere çözülmeyi bekleyen önemli sorunlarla karşı karşıya olduğumuz gerçeği henüz değişmemiştir [7-9,12,14]. Dahası, HCV enfeksiyonu nadiren tam bağışıklık sağlar ve DAA ile tedavi edilenler re-enfeksiyon riski altındadır ve HCV enfeksiyonu tedavi edilse bile sirozlu kişilerde hastalık ilerleyebilmektedir [7,8]. Bir retrospektif kohort çalışmasında ise DDA ile tedavi edilen hastalarda HCC riskinin azalmadığı gösterilmiştir [15]. Bu nedenlerle, enfeksiyon yayılımının durdurulması ve HCC riski de dahil olmak üzere HCV ile ilişkili olumsuz sonuçların bir aşı olmadan global olarak ortadan kaldırılabilmesi düşük bir ihtimal olarak gözükmemektedir.

Sınıflandırma

HCV, Sarıhumma virusu ve Dengue virus gibi klasik flavivirusları da içeren, Flaviviridae ailesinin Hepacivirus cinsinde yer alan 14 türden birisidir [5,16]. Günümüzde primatlar (Colobus guereza maymunları gibi), köpekler, atlar, kemirgenler, yarasalar ve büyükbaş hayvanlarda saptanan HCV'ye benzer viruslar Hepacivirus cinsi içerisinde sınıflandırılmaktadır [3,5,17]. Bu viruslar arasında HCV'ye en yüksek benzerlik göstereni (~%50 genomik homoloji) atlarda akut-kronik hepatit etkeni olarak bulunan Hepacivirus A'dır [3]. Bugün dizi analizi sonuçlarına göre yedi majör HCV genotipi (%30-35 sekans sapması) ve birçok sub tip (%15-20 sekans sapması) filogenetik olarak ayırt edilmiştir [1]. Tanımlanan sub tip

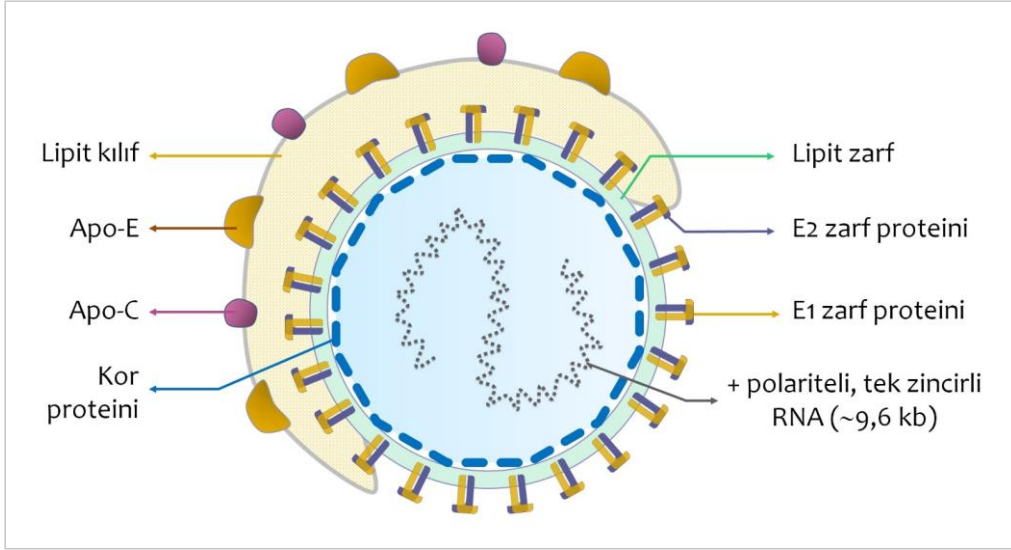
sayısı 67'yi geçici sub tip sayısı ise 20'yi bulmuştur [18]. Daha küçük dizi farklılıkları olan viruslar ise HCV türümsüleri (quasispecies) olarak adlandırılmakta ve enfekte bir bireyde farklı türümsülerin dolaşımı söz konusu olabilmektedir [19]. Dünya genelinde en sık rastlanan HCV tipi genotip 1 iken, Türkiye'de en sık genotip 1b raporlanmaktadır [20,21].

Virusun Yapısal Özellikleri

Zarflı HCV virionları kor proteini ve tek sarmallı pozitif polariteli RNA genomundan oluşan nükleokapsidi (30 nm çapında) çevreleyen lipid tabakaya gömülü E1 ve E2 glikoproteinlerinin heterodimerlerinden oluşur ve zarf ile beraber yaklaşık 50-80 nm çapındadır [5,17]. Lipoviropartiküller şeklindeki HCV virionları, ikosahedral yapıda değildir ve enfekte konakçıda düşük yoğunluklu (LDL) ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL) ile olan ilişkileri nedeniyle, replikasyon koşullarına bağlı olarak değişen heterojen ve düşük yüzey yoğunluklu pleomorfik yapıdadırlar [5]. Bu Truva atı stratejisinin virusun nötralizan antikorlardan kaçışına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Şekil 1). Apolipoprotein E (apoE) ve apoC molekülleri hem in-vivo hem de hücre kültüründen türetilen parçacıklarla ilişkili iken, apoB ile ilişkilendirme hücre kültüründe daha az belirgindir [5].

Genomik Özellikleri ve Viral Proteinler

HCV genomu yaklaşık 9600 baz uzunluğunda pozitif iplikçikli bir RNA'dan oluşmaktadır [2,5]. Viral genom 5' ve 3' uçlarında okunmayan (untranslated regions, UTR) bölgeler olarak bilinen özel nükleotit dizileri ile çevrili olan ve 3000-3030 aminoasitlik bir polipeptid kodlayan tek bir açık okuma çerçevesine (open reading frame, ORF) sahiptir (Şekil 2) [1,2,5]. Hüresel ve viral proteazlar ile bu polipeptinden üç yapısal (kor, E1 ve E2) ve yedi yapısal olmayan (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B) protein üretilir [1,5]. Konakçı miRNA'lar (mir-122) 5' UTR bölgesine bağlanarak HCV genomunu stabilize eder ve viral replikasyonu başlatmada önemli bir rol oynar [5,22].

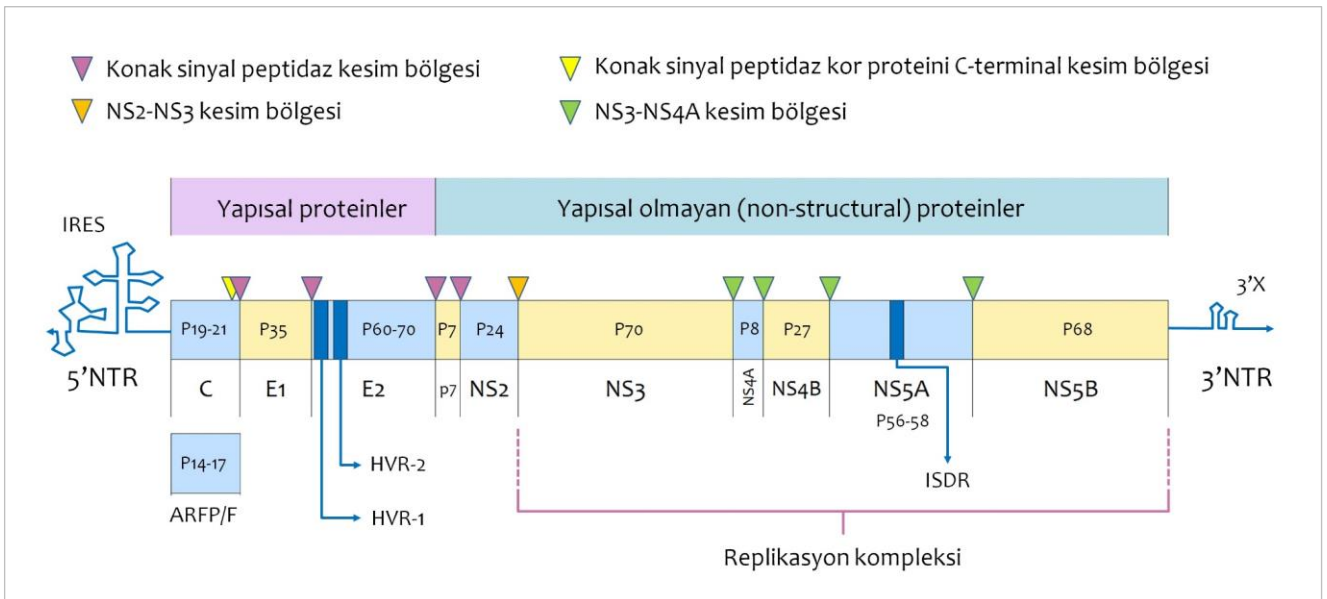


Şekil 1. Hepatit C virusu virion yapısı [22-24]

HCV için genetik heterojenite hepatit B virusu (HBV) ve HIV (Human Immunodeficiency Virus) ile karşılaştırıldığında çok büyük boyutlardadır [5]. Genomdaki yüksek heterojenitenin bir nedeni de enfekte bir kişide günde 10^{10-12} virion üretebilen viral RNA polimerazın proof-reading mekanizmasının bulunmaması nedeniyle yüksek mutasyon oranına sahip olmasıdır [1,5,19]. İmmün yanıt ve antiviral tedavinin selektif baskısı da HCV genetik çeşitliliği ile doğrudan ilişkilidir [3]. Heterojenite genomik bölgelere göre önemli düzeylerde farklılıklar gösterir. Örneğin, 5' ve 3' UTR bölgeleri ve 5' UTR'de yer alan IRES (internal ribosome entry site) gen bölgesi HCV

genomundaki en iyi korunmuş gen bölgeleridir [3,18].

E1/E2 gen bölgeleri ise birçok önemli antijenik epitop ve hiper-değişken bölge (hypervariable region; HVR) içerirler. E2 gen bölgesinde yer alan 27 aminoasitlik HVR1 bölgesi en yüksek varyasyon gösteren HCV gen bölgesidir ve enfekte kişilerde zaman içerisinde oluşan kümülatif değişikliklerin bu bölgede yoğunlaştığı görülmüştür [3]. Değişkenliğin göreceli olarak yüksek olduğu bir diğer bölge de NS5A gen bölgesidir [26]. HCV proteinlerinin temel görevleri ve immün yanıtı indüklemedeki rolleri Tablo 1'de özetlenmiştir.



Şekil 2. Hepatit C virusunun genomik yapısı [5,17,22,25]

Tablo 1. HCV gen bölgeleri ve proteinlerinin temel görevleri ile immün yanıt ve aşı çalışmalarındaki önemleri [1,3,5,7,10,17,27,28]

| Gen bölgesi | Temel özellikleri ve görevleri | Aşı geliştirme çalışmalarındaki önemi |
|-------------|--|---|
| 5'/3' UTR | Replikasyon ve translasyon. | Korunmuş bölgeler |
| Kor | Temel kapsit proteini. | Kor-NS3 füzyon aşısı tasarlanmıştır (rekombinan maya). |
| E1/E2 | Hücreye tutunma ve girişte görev alan zarf glikoproteinleri. | Sekans varyasyonları yüksek. Nötralizan antikor yanıtını uyarırlar. Antikor temelli ve T hücre temelli aşılarda hedeflenirler. |
| p7 | İyon kanalı (viroporin). Toplanma (<i>assembly</i>) ve salınmada rol alır. | |
| NS2 | Poliproteinlerin işlenmesinde görev alan bir otoproteazdır (sistein proteaz) ve toplanmada da rol alır. | |
| NS3 | Serin proteaz ve helikaz etkinlikleri ile RNA replikasyonunda görev alır. Ayrıca toplanmada rol alır. | T hücre hedefi. Rekombinan NS3 moleküllerini eksprese eden vektörel aşılarda ve rekombinan kor-NS3 füzyon aşısı tasarlanmıştır. |
| NS4A | NS3 proteaz kofaktörü. | T hücre hedefi. Aşı hedefi olarak kullanılır. |
| NS4B | Replikasyon kompleksi ve membranöz ağ (hücre içi veziküler yapı) oluşumunun organizasyonunda görev alır. | |
| NS5A | RNA replikasyonu ve toplanmada görev alan fosfoprotein. | T hücre hedefi |
| NS5B | RNA-bağımlı RNA polimeraz. | T hücre hedefi. Rekombinan NS5B moleküllerini eksprese eden vektörel aşılarda tasarlanmıştır. |

Konak-Doku Tropizmi ve Virusun Yayılması

HCV'nin tek doğal konağı insanlardır. İnsan-dışı primatların HCV'nin kaynağı olabileceği düşünülmüş; fakat farklı maymun türlerinde yapılan taramalar bu görüşü desteklememiştir [3]. Köpekler, atlar, kemirgenler, yarasalar ve büyükbaş hayvanlar gibi primat-dışı memelilerde HCV'ye benzer yeni viruslar saptanmış ve Hepacivirus cinsi üyeleri arasında türler arası bulaşın muhtemel olduğu öne sürülmüştür [3,16]. HCV bulaşı başlıca kontamine kana doğrudan parenteral maruziyet yoluyla gerçekleşirken, son yirmi yılda HCV epidemiyolojisi belirgin olarak değişmiştir. Antikor taramasına dayalı serolojik testlerin ve HCV-RNA varlığını saptayan moleküler yöntemlerin yaygınlaşmasıyla transfüzyon ilişkili bulaş neredeyse tamamen ortadan kalkmış ve günümüzde sık karşılaşılan bulaş nedenleri intravenöz ilaç enjeksiyonu öyküsü, cinsel yolla bulaş, mesleki riskler ve annelerden bebeklerine dikey geçiş olmuştur [1]. Bulaş sonrası virus temel olarak karaciğer hücrelerine tropizm gösterir, bununla beraber kan hücreleri, lenfoid doku ve merkezi sinir sistemi hücrelerini enfekte

edebildiği de gösterilmiştir [3]. HCV hepatositler ve lenfositlerden türetilen birkaç hücre dizisinde çoğaltılabilmektedir. Bununla beraber, pratikte bu sistemlerden sadece bir insan hepatoma hücre dizisi olan Huh7 hücrelerinde ve bunların türevlerinde yeterli düzeyde viral çoğalma elde edilebilmiştir [5,17,29].

HCV Aşısının Geliştirilebilirliği

HCV enfeksiyonunun doğal seyri sırasında görülebilen etkin immün yanıtın enfekte kişilerin önemli bir kısmında (%20-35) virüsü temizleyebilmesi, etkili bir koruyucu aşının geliştirilebileceği düşüncesini desteklemektedir [1,10]. Genellikle HCV enfeksiyonlarının ilk 6-9 ayında görülebilen bu koruyucu yanıt etkene tekrar maruz kalınması durumunda kesin bir koruma sağlamasa da, güçlü sekonder immün yanıt ile viral klirensin daha hızlı geliştiği ve re-enfeksiyonlarda kronik enfeksiyon gelişme ihtimalinin daha düşük olduğu gösterilmiştir [1,7,30]. Ek olarak, şempanzelerde ve insanlarda homolog ve heterolog viruslar ile gelişen çoklu enfeksiyonların temizlendiğinin gözlenmiş olması

gibi veriler ve aşı çalışmalarının sunduğu sonuçlar HIV enfeksiyonlarının aksine HCV'ye doğal bağışıklığın var olduğuna ve HCV genotipleri arasında çapraz koruyucu bağışıklığın sağlanabileceğine dair kanıtlar sağlamaktadır [1,7,31].

HCV enfeksiyonlarında adaptif immünitede hem nötralize edici antikörlerin, hem de CD4 T hücre aracılı enflamasyon ve CD8 T hücre aracılı sitotoksitenin rolü bulunmaktadır [1,10,32]. HCV zarf proteinlerini (gpE1 ve gpE2) hedef alan yüksek titreli çapraz nötralizan antikörlerin hızlı indüksiyonunun viral klirensle korele olduğuna ve re-enfeksiyondan koruduğuna dair güçlü kanıtlar vardır [1]. Virus inokulumunun immün serum veya anti-HVR1 antikörleri (gpE2 proteininin hiper-değişken bölgesi 1'e karşı gelişen antikörler) ile ön inkübasyonunun şempanzelerde enfeksiyonun gerilemesine neden olması, ayrıca pasif immünizasyonun enfekte şempanzelerde ve fare modellerinde inkübasyon süresinin uzaması ve viral yükte azalma ile ilişkili olduğunun gösterilmesi bunlardan bazılarıdır [10]. Bununla beraber HCV nötralizan antikörlerinin geç oluşması ve bu süre içerisinde viral epitopların değişime uğraması, antikör temelli yanıtın viral klirens için tek başına yeterli olmadığını göstermektedir. İnsanlarda ve şempanzelerde yapılan çok sayıda çalışma HCV'ye özgü CD4 T yardımcı ve CD8 sitotoksik hücrelerin indüksiyonu ile viral klirensin kinetik ilişkisini açıkça göstermiştir [33]. HCV ile enfekte kişilerin çoğunda, enfeksiyondan hemen sonra gelişen ve vireminin kısmi kontrolünü sağlayan bir CD4 ve CD8 T hücre yanıtı oluşmaktadır. Enfeksiyon temizlenirken virusa özgü T hücreleri, bir hafıza T hücresi fenotipi geliştirmekte ve çok sayıda sitokinin dahil olduğu kapsamlı bir yanıt ortaya çıkmaktadır [10]. Temizlenme sonrası antikör yanıtı zamanla azalırken, 20 yıla kadar tespit edilebilen uzun ömürlü bellek T hücrelerinin oluştuğu gösterilmiş ve bu gözleme dayanarak T hücre yanıtının, antikörlardan daha uzun süre ile koruyucu immünite sağlayabileceği öne sürülmüştür [34]. Tüm bu veriler, optimal bir HCV aşısının çoklu epitopları veya varyant virusları hedef alan nötralizan antikörlerle birlikte, hem CD4 hem de CD8 T hücrelerin aracılık ettiği reaktif

hücrel immün yanıtı uyarmasının önemli bir gereklilik olduğunu göstermektedir [1].

HCV Aşı Çalışmalarında Temel Güçlükler

Genel popülasyona uygulanabilecek bir HCV aşısının geliştirilmesini engelleyen bazı zorluklar hala devam etmektedir [10]. Bu zorluklar arasında virusun aşırı genetik değişkenliği, aşıların test edilmesi için küçük hayvan modellerinin eksikliği, enfeksiyöz HCV üretimini destekleyen ve virus nötralizasyonu çalışmalarına uygun bir hücre kültür sisteminin yakın zamana kadar mevcut olmaması ve klinik çalışmaların yürütülmesinde karşılaşılan güçlükler gibi birçok viral ve viral olmayan faktörler yer alır [1,7,10]. Bu sorunlara rağmen, umut vadeden profilaktik aşı adayları ile ilgili önemli ilerlemeler kaydedilmiş ve bu aşıların bazıları klinik çalışma aşamalarına gelmiştir [1].

1. Genetik heterojenite ve immün yanıtın kaçış

Farklı genotipler arasındaki nükleotid değişkenliği HCV için %30 iken, bu değer HBV'de %8 sapma şeklindedir [35]. Bu yüksek değişkenlik HCV'nin immün sistemden kaçışına yol açarken, antikör ve T hücre yanıtına dirençli varyantların seçimi için de fırsat sunmaktadır [1,18,36]. Akut enfeksiyonlardan sonra kronikleşme oranı HCV'de %50-80'lere ulaşırken, bu oranın HBV'de %5-10 olması immün kaçışın bir yansımasıdır [1]. HCV immün yanıtın çeşitli yollarla gizlenebilmekte ve bu kaçış mekanizmaları hem doğal hem de adaptif immün yanıtı etkilemektedir. Doğal immüniteden kaçış yolları arasında dendritik ve doğal öldürücü hücre yanıtının bozulması ve tip I IFN indüksiyonunun azalması yer alırken, adaptif immün yanıtın kaçış yollarından en önemlisi sürekli yeni viral varyantların üretilmesi ile virusa özgü CD8 T hücrelerin ve nötralizan antikörlerin etkisinden kurtulma şeklindedir [1]. İmmün sistemden kaçışın diğer bir mekanizması da HCV'nin CD81 giriş reseptöründen bağımsız bir şekilde enfekte olmamış duyarlı hücrelere doğrudan hücre-hücre teması yoluyla aktarılması ve böylece virusun nötralizan antikörlerin etkisinden kurtulması şeklindedir [37]. Ayrıca, virusun popülasyondaki döngüsü sırasında HCV glikoproteinlerinde ortaya çıkan tek nokta mutasyonları, glikozilasyon bölgesi modifikasyonları ve viral proteinlerdeki konformasyonel değişiklikler virusun humoral

immün yanıt baskısına adapte olmasına katkıda bulunur. Bunun aksine, HBV zarf proteini (hepatit B yüzey antijeni; HBsAg) ise yüksek oranda korunmuştur ve post-translasyonel modifikasyona uğrama düzeyi HCV'ye göre belirgin olarak sınırlıdır [1]. Viral popülasyonlardaki heterojenite, hedef popülasyonun çeşitliliği ile birleştiğinde bağışıklık yanıtını etkileyebilecek yeni parametreler ortaya çıkmaktadır [10].

2. Koruyucu immünitenin tam anlaşılabilmesi

HCV'ye karşı gelişen koruyucu bağışıklık bağışıklığı konusundaki anlayışımızdaki ilerlemelere rağmen, bazı temel sorular hala devam etmekte ve bunların çözülmesi için ek araştırmalar yapılması gerekmektedir [10]. Bağışıklık yanıtının nasıl koruyucu etkinlik gösterdiğini bilmek, aday aşılarda enfeksiyon riski oluşturmadığının test edilmesi ve klinik çalışma aşamalarına geçilebilmesi için önemlidir [7]. Enfekte bireylerin neden sadece %25'inin böyle bir cevap üretebildiği, kalıcı viremi gelişiminde anahtar rolü olan CD4 T hücrelerin kronik HCV enfeksiyonunun erken aşamalarındaki başarısızlık ve tükenme mekanizmaları, CD8 T hücre tükenmesi ve fonksiyon bozukluğunun altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılabilmiştir [10].

3. Aşı tasarımıyla geleneksel yaklaşımların yetersizliği

Canlı attenüe ve inaktive tam virus aşılarda diğer virüslere karşı etkili olmuş, ancak yakın zamana kadar HCV kültür sistemlerinin yokluğu ve halen devam eden kısıtlamaları HCV için bu aşılarda geliştirilmesi önündeki en önemli zorluklar olmuştur [7]. HCV'nin kültür süşları in-vitro replikasyon verimliliğini artıran adaptif mutasyonlara sahiptir ve ancak bu durumun insanlardaki replikasyon üzerine etkileri bilinmemektedir. Diğer virüslere karşı geliştirilen canlı zayıflatılmış aşılarda, iki ana yolla üretilmiştir. Birincisi virüsün, doğal varyantlarının ortaya çıkabileceği insan dışı primat hücre hatlarına pasajlanması ve insan hücrelerinde düşük replikasyonun gösteren süşların üretilmesidir. İkinci yol ise genetik delesyon oluşturulması veya virülans faktörlerinin etkisiz hale getirilmesini içerir. Bununla birlikte, HCV insan dışı primat hücre hatlarında yüksek düzeylerde

çoğaltılmadığından HCV için virülans faktörleri açık olarak tanımlanmamıştır. Canlı attenüe aşılarda HCV enfeksiyonuna neden olma riskleri de bu yaklaşımın kullanımını sınırlandıran bir başka faktördür [7].

4. Aşı testleri için hayvan modellerinin sınırlılığı

HCV enfeksiyonuna karşı sadece insanlar ve şempanzelerin duyarlı olması ve prelinik çalışmalar için uygun bir immünkompetan küçük hayvan modelinin bulunmaması aşı çalışmalarının önündeki diğer önemli engellerdir [1,7,10]. Şempanzelerde yapılan ilk çalışmalarda bazı aşılarda etkinliği gösterilmiş, ancak şempanze araştırmalarındaki moratoryum nedeni ile bu modelin kullanımı zorlaşmıştır [10]. HCV yaşam döngüsünün izlenebildiği fare modellerinin çoğunun (transplantlı şimerik modeller veya kalıcı vireminin sağlanması için CD4 T hücrelerin elimine edildiği modeller gibi) immünkompetan olmayan hayvanlarda yürütülmesi bu yaklaşımın prelinik aşı testleri için yararlılığını sınırlamaktadır, buna rağmen bu modeller aşı çalışmalarında in-vivo nötralizasyon kapasitesinin doğrulanmasında kullanılmaktadır [10]. Bir diğer alternatif yaklaşım aşılama rejiminin yanı sıra yeni adjuvanların ve vektörlerin prelinik testlerinde küçük hayvanların HCV benzeri kendi virüsleri ile oluşturulan enfeksiyon modelleri üzerinde çalışmaktır [38]. Bu modelin en önemli sınırlaması ise, bu virüslerin HCV'ye yapısal olarak benzemesine rağmen, HCV ile sınırlı dizi homolojisine sahip olmalarıdır [7].

5. Aşı etkinliği testi için klinik model oluşturma güçlüğü

HCV enfeksiyonlarında aşı koruyuculuğunu veya etkinliğini değerlendirmek için bir kohort modelinin oluşturulması veya aşının kronik enfeksiyonu önlediğinin gösterilmesi de çeşitli zorluklar içerir. Enfekte bir birey tespit edildiğinde, gecikmeden tedavisine başlanması gerekeceğinden enfeksiyonun kronik hale gelip gelmeyeceğini belirlemek mümkün olmayacaktır, ki planlama aşamasındaki kapsamlı bir çalışma bu nedenle durdurulmak zorunda kalmıştır [1]. Gelişmiş ülkelerde görece düşük yeni enfeksiyon insidansı nedeniyle, çalışmaya uygun risk altındaki popülasyonu belirlemek zorlaşmıştır. Etkinlik testi için uygun yüksek riskli grupların her biri kendine ait çeşitli güçlükler içerir. İntravenöz

ilaç kullananlarda "sosyal, psikolojik ve marjinalleşme sorunlarıyla ilişkili uyumsuzluk", sağlık çalışanlarında "düşük enfeksiyon insidansı", enfeksiyon insidansının yüksek olduğu gelişmekte olan ülkelerde "destek ve altyapı eksikliği" ve enfeksiyon prevalansının ve insidansının yüksek olduğu hapisane popülasyonlarında "etik konular" bu zorluklara örnek olarak verilebilir [1,10].

Bununla beraber yukarıda bahsedilen sorunların üstesinden gelebilmek için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Risk altındaki popülasyonla ilgili klinik çalışmaları engelleyen güçlüklerin aşılması için dünyanın farklı bölgelerindeki hastaların dahil edildiği çok merkezli ortak kohort modelleri geliştirilmiştir [39]. Son derece etkili DAA'nin varlığı nedeni ile klinik aşı denemelerinin sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılması ve sonrasında oluşturulan deneysel enfeksiyonların DAA ile tedavi edilmesi düşüncesi de ortaya atılmıştır, ki bu yeni bir yaklaşım değildir ve sıtmaya yönelik aşı geliştirme çalışmalarında da kullanılmıştır [10]. Bununla beraber doğal enfeksiyonlara benzeyen HCV enfeksiyonlarının nasıl oluşturulacağı açık değildir, primer HCV izolatlarının hücre hatlarında üretilmesindeki güçlükler, kültür izolatlarının doğal enfeksiyonlardaki viral çeşitliliği sunmaması ve doğrudan enfekte insanlardan elde edilen plazmaları kullanmanın getirdiği ek riskler gibi komplike zorluklar bu yaklaşımın önündeki diğer engellerdir [7]. İnokülüm seviyeleri ve HCV genotipleri özenle seçilse bile, doğal maruziyetin tamamen tekrar edilmesinde başarısız olunabilir. Ayrıca, taşıdığı ciddi etik sorunlar nedeniyle bu yaklaşım üzerinde dikkatle düşünülmesi gerekmektedir [10]. Sonuç olarak, HCV enfeksiyonunun hayvan modelleri ile ilgili sınırlamaları ve planlı çalışmaların yürütüldüğü küçük hasta popülasyonlarında gözlemlenen heterojenlik gibi nedenler aşı çalışmalarında HCV enfeksiyonuna karşı bağışık koruma korelasyonunun tanımlanmasını zorlaştırmaktadır [1].

6. Teknik güçlükler

Aşı çalışmaları için E1/E2 heterodimerlerinin, memeli hücrelerinin endoplazmik retikulumundan hücre içi materyal olarak saflaştırılması

gerekmekte ve bu karmaşık süreç protein üretimini çok güç bir prosedür haline getirmektedir [1]. Aşı etkinliğini değerlendirmek için koruyucu bağışıklık durumunun standart reaktiflerin kullanıldığı immünolojik yöntemler ile izlenmesi de önemlidir. Standart test reaktiflerinin geliştirilmesi ve HCV psödoparçacıkları gibi aşı çalışmalarında kullanılan özel ürünler için uygun saklama koşullarının oluşturulması diğer teknik gereksinimlerdir [10].

7. Diğer faktörler

HCV'nin yeni antiviral ilaçların kullanıldığı tedavi protokolleri ile birkaç yıl içerisinde ortadan kaldırılabileceği düşüncesi nedeniyle HCV çalışmalarına yönelik özel veya kamu yatırımlarının azalması aşı çalışmalarının önündeki diğer engellerdir [1]. HCV eliminasyonuna giden yolda virusun immün kontrolünün moleküler mekanizmalarını anlamak ve etkili aşılar geliştirmek için HCV üzerine yapılan temel araştırmalara ek yatırımlar yapılması gereklidir. Ayrıca, büyük ölçekli klinik araştırmalar ve GMP (iyi üretim uygulamaları) koşullarında büyük ölçekli aşı lotlarının üretimi için gerekli olan altyapının maliyeti yüksektir. Bu nedenle bu tür çalışmaların finansman desteğinin hükümetler, DSÖ gibi kuruluşlar ve akademik-endüstriyel ortaklıklar tarafından güvence altına alınması gerekmektedir [10]. Aşılama rejimlerinin ayrıca, etnik köken, yaş, karaciğer hastalığı evresi, opioid kullanımı ve HIV ko-enfeksiyonu gibi risk altındaki popülasyonun birçoğuyla ilişkili içsel konakçı faktörlerinin üstesinden gelmesi de gerekmektedir [10].

Aşı çalışmalarında güncel durum

HCV aşı geliştirme stratejileri iki temel yaklaşım üzerinden yürütülmektedir. Birincisi virusun enfektivitesini engelleyecek kapsamlı nötralizan antikor üretiminin uyarılmasını, ikincisi ise enfekte hepatositleri ortadan kaldıracak virusa özgü güçlü CD4 ve CD8 T hücre yanıtının indüklemesini hedefler [10]. Birinci yaklaşım korunmuş viral yüzey proteinlerinin hedeflendiği hepatit A, B ve sarı humma aşılarında güçlü nötralizan antikor yanıtlarının indüklenmesi ile çok etkili olmuştur [10]. Bununla beraber, HCV enfeksiyonunu temizlemede humoral yanıtın etki düzeyi hala tartışmalıdır. Zarf glikoproteinlerine

karşı gelişen antikorlar kronik enfeksiyonlu hastaların hemen hepsinde saptanmakla beraber, bu antikorlar her zaman nötralizan özellikte değildir [1]. Benzer şekilde, HCV bağlamında, şempanze veya insan re-enfeksiyon çalışmalarında sterilize bağışıklık gözlenmemiştir [10]. İkinci yaklaşım, geniş bir T hücre yanıtı oluşturmak için HCV genotiplerinde zarf glikoproteinlerine göre daha fazla korunmuş diziler içeren ve başlıca CD8 T hücrelerinin hedefleri olan yapısal olmayan proteinlerin (NS3, NS4 ve NS5) kullanılmasını içerir [7]. Korunmuş epitopların yanı sıra çapraz reaktif antikorları ve T hücre yanıtlarını hedef alan aşılama stratejilerinin daha iyi sonuçlar vermesi muhtemeldir ve günümüzde yürütülen yeni nesil HCV aşı geliştirme stratejileri T hücre aracılı ve antikor temelli yaklaşımların tek bir aşıda birleştirilmesi üzerine kurgulanmaktadır [10,31]. Mevcut veriler, çalışmaları halen devam etmekte olan aşılarda bu tip yanıtları uyarabileceğini, ancak aşılarda indüklenme gücünü arttırmak, daha iyi aşı kapsamı sağlamak ve immün yanıtı genişletmek için ilave yöntemlere ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir [10].

Aşıların ideal amacı, patojene maruz kalınması durumunda enfeksiyona karşı koruma sağlayacak sterilize bağışıklık sağlamaktır [10]. HCV zarf glikoproteinlerini kodlayan aşılarla, T-hücre yanıtlarının yanı sıra antikor üretimi de indüklenmiştir, ancak bu aşılarda hiçbirisi ile sterilize bağışıklık sağlanamamıştır [7]. Bu aşılarda, her ne kadar sterilize bağışıklık sağlanmasa da, primer viremiyi önemli ölçüde azaltmışlardır. Bu nedenle, hastalık sekellerini ve enfeksiyon bulaş riskini azaltabilmek adına, aşı geliştirme çalışmalarında çitayı düşürmenin HCV için makul bir yaklaşım olabileceği değerlendirilmektedir [1,7]. Bu nedenle, birinci nesil aşılarda, daha düşük viral yük ve daha kısa viremi dönemleri ve yüksek viral klirens hızı sağlanması ve böylece HCV enfeksiyonlarının daha hafif geçirilmesi veya baskı altına alınmasıyla viral persistansı önlemesi ve enfeksiyon yayılımını azaltması beklenmektedir [7,10]. Yeni teknik gelişmelerle beraber farklı genotiplere karşı kapsamlı koruyucu antikor yanıtı ortaya çıkarabilecek immünojenlerin tasarım ve seçimi aşı etkinliğini büyük ölçüde artıracaktır [1]. Bu yüzden, konsensüs sekanslar, atalara ait

sekanslar veya mozaik sekanslar kullanılarak HCV'nin değişkenliğinin üstesinden gelebilecek ek antijen tasarım yaklaşımlarını araştırmak önem arz etmektedir [10]. Benzer şekilde T hücre bazlı aşılarda ise, çoklu MHC alelleri tarafından sunulabilen ve ideal T hücre yanıtının (polifonksiyonel, hızlı çoğalan vb.) uyarılmasını teşvik edebilecek antijenlerin tasarlanması gerekmektedir [10].

Anti-HCV antikorlarının üretimini uyarmak için geliştirilen stratejiler; protein temelli, DNA temelli, virus benzeri partikül (VLP) temelli, çiçek virüsü temelli ve tam virus temelli aşılarda içerir [7]. T hücre yanıtını uyarmayı hedefleyen yapısal olmayan protein antijenlerini immünojenik bir şekilde vermek için ise DNA temelli immünizasyon, önce bir DNA aşısı (priming) uygulanması ve ardından rekombinan virus vektörü veya HCV proteini ile kuvvetlendirme (boosting) yapılması yaklaşımı, rekombinan adenovirus uygulaması ve ardından DNA kuvvetlendirmesi, ilk doz ve kuvvetlendirme için replikatif ve non-replikatif rekombinan virusların kombinasyonlarının tercih edilmesi, VLP'ler, hepatit B virüsü yüzey antijeni-HCV rekombinanları ve havuzlanmış sentetik sınıf I peptid epitopları veya lizozomal peptitler de dahil olmak üzere çok sayıda farklı strateji geliştirilmiştir [7].

Kronik HCV enfeksiyonlarının tedavisi için, geçmişte interferon bazlı tedavilerle kombine olarak kullanılmak üzere, günümüzde de yeni geliştirilen DAA'ye yardımcı olmak üzere terapötik aşılarda geliştirilmiştir. Başlıca T hücre yanıtını uyaran etkili terapötik aşı rejimlerinin re-enfeksiyonları önleyerek ve viremik hasta sayısını azaltarak kronik HCV ile ilişkili hastalığın global yükünü azaltmaya katkıda bulunacağı öngörülmektedir [40].

1. Chiron-Novartis: Rekombinan protein aşısı (profilaktik aşı)

Adjuvanlanmış rekombinan gpE1, gpE2 heterodimer aşısı, nötralizan antikor üretimini ve CD4 T hücre yanıtını uyarmayı amaçlayan virus zarf glikoproteinleri gpE1 ve gpE2'nin rekombinan bir şeklidir [1,10]. Şempanzelerde test edilen ilk aşılardan biri olan bu yaklaşım, bazı hayvanlarda homolog veya heterolog HCV re-enfeksiyon

denemelerinde etkili immünojeniklik ve koruyucu immünite göstermiştir [10,41]. İnsan gönüllülerinde MF59C.1 (su içindeki bir yağ emülsiyonu) ile adjuvanlanan gpE1-gpE2'nin prelinik değerlendirme sonuçları, aşının gpE1-gpE2'ye karşı proliferatif CD4 T hücre yanıtlarının yanı sıra çoklu çapraz nötralizan antikör üretimini indüklediğini göstermiştir [31,42].

2. Transgen, TG4040: Adenoviral vektör temelli aşı (immünoterapötik aşı)

Bu yaklaşım şempanze adenoviral vektör bazlı bir aşı modelidir, aşının son versiyonunda HCV genotip 1b NS3, NS4, NS5B proteinlerini kodlayan genleri taşıyan adenoviral vektörler serotip 6 (Ad6) ve 24 (Ad24) ve ardından bir plazmit DNA kuvvetlendirici (modifiye edilmiş vaccinia Ankara) kullanılmıştır [7,10,43]. Bu aşının sağlıklı gönüllülerde virusa özgü çok fonksiyonlu CD4 ve CD8 T hücre yanıtlarını indüklediği gösterilmiş ve şu anda damar içi ilaç-bağımlılarında faz 2 klinik deneme aşamasındadır [10]. Adenoviral vektörlerin ana problemi, vektöre önceden bağışıklık kazanılmasıdır ve bu durum eklenen immünojene bir yanıt ortaya çıkmadan önce onun klirensine yol açabilmektedir [1]. Bununla birlikte, şempanze adenovirusunun (ChAd) gen aracı olarak kullanılmasıyla bu sorunun üstesinden gelinmiştir [40]. Yakın zamanda, özellikle HCV genomunun korunmuş bölgelerini hedefleyen ve çoklu HCV genotiplerini kapsayan T hücreleri indüklemek için simian adenoviral vektörleri kullanan bir HCV aşısı üretilmiştir [44].

3. CIGB-230: Plazmit DNA ve rekombinan protein (immünoterapötik aşı)

Kronik HCV enfeksiyonlu hastaların tedavisi için tasarlanmış olan bu aşı HCV yapısal antijenlerini eksprese eden bir plazmit (pIDKE2) ile bir rekombinan HCV kor proteininin (Co.120) karışımını içerir ve faz 1b aşamasına gelmiştir [1]. İnterferon + ribavirin tedavisine cevap vermeyen HCV ile kronik olarak enfekte 15 hastaya 0, 4, 8, 12, 16 ve 20. haftalarda intramüsküler enjeksiyonla uygulanmış ve spesifik T hücre proliferatif yanıtı, T hücresi IFN-gama salınımında artış, HCV kor antijenine karşı de novo hücresele bağışıklık yanıtı, aşılanmış bireylerin %40'undan fazlasında karaciğer histolojisinde iyileşme veya

fibroziste azalma gibi olumlu sonuçlar elde edilmiştir [45]. Daha yakın zamanda yapılan ve 92 hastanın dahil edildiği başka bir çalışmada ise interferon bazlı tedavi ile kombine CIGB-230 aşısı uygulamasının, kronik hastalarda immün cevabı olumlu yönde değiştirdiği gösterilmiştir [46].

4. Tripep, ChronVac-C: Plazmit DNA (immünoterapötik aşı)

Bu aşı HCV genotip 1a NS3, NS4A proteinlerini eksprese eden plazmit ile yapılan DNA temelli bir terapötik aşılama rejimidir ve faz 1b aşamasına gelmiştir [1]. İntramüsküler ChronVac-C aşılması ve sonrasında HCV genotip 1b NS3,NS4,NS5B eksprese eden modifiye vaccinia Ankara aşısının (MVATG16643) subkutan uygulaması şeklindeki kombine terapötik aşılama yaklaşımı denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır [47].

5. Diğer HCV aşı çalışmaları

Okairos tarafından geliştirilen NS3, NS4 ve NS5 eksprese eden adenoviral vektör temelli aşı faz 2 aşamasına gelmiştir [48]. Innogenetics-GenImmune tarafından yürütülen alum adjuvanlanmış rekombinan gpE1 protein aşısı çalışması ise (bir immünoterapötik aşı) aşının viremiyi veya fibrozis ilerlemesini etkilememesi nedeniyle durdurulmuştur [1]. Intercell AG, IC41 peptit temelli (poliarjinin-HCV peptidi kokteyli) immünoterapötik aşı pegile interferon ile birlikte kronik HCV hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanmış ve faz 2 çalışmaları yapılmıştır [49]. Globe Immune, GI-5005 aşısı ise diğerlerinden farklı olarak kor-NS3 füzyon proteinini eksprese eden ısıyla öldürülmüş rekombinan maya temelli bir immünoterapötik aşı olup faz 2 çalışmaları tamamlanmıştır [50].

Sonuç

Sadece birkaç yıl öncesine kadar, HCV'ye karşı etkili bir aşı geliştirilmesi uzak bir olasılık olarak kabul edilirken, günümüzde daha iyimser bir bakışın var olduğu söylenebilir. DAA ilaçların tedavi başarısı HCV'nin global kontrolü için iyimserliği artırmış olsa da, tedaviye erişimdeki sınırlılıklar ve tedavinin HCV enfeksiyonunun tüm sonuçlarını ortadan kaldıramaması gibi faktörler göz önüne alındığında, bu önemli küresel morbidite ve mortalite nedeninin kontrol altına

alınmasının ancak koruyucu bir aşının geliştirilmesi ile sağlanabileceği düşüncesi önem kazanmaktadır. Son yıllarda hem antikor yanıtını hem de T hücreleri indüklemeyi hedefleyen stratejilerle HCV aşı çalışmalarında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

Sonuç olarak HCV enfeksiyonlarının tedavisindeki ilerlemelere ve yüksek başarı oranlarına rağmen enfeksiyonun yayılımı devam etmekte ve dünya genelinde tedavi edilenlerden daha fazla yeni enfeksiyon olgusu raporlanmaktadır. Enfeksiyonu tedavi etmenin uzun dönem riskleri tamamen ortadan

kaldırılmaması ve tedavi edilen kişilerde re-enfeksiyon riskinin devam etmesi gibi nedenler dikkate alındığında, geliştirilecek ilk aşılarda mutlak koruyuculuk sağlanmasa bile HCV enfeksiyonunun kronikleşme oranlarını azaltacağı ve virusun global yayılımının durdurulmasında tedaviyle beraber önemli avantajlar getireceği beklenmektedir. Ayrıca bu tip bir aşının enfekte annelerden doğan bebekler, enfeksiyon prevalansının yüksek olduğu toplumlarda yaşayanlar ve sağlık çalışanları gibi risk altındaki popülasyon için önemli faydalar sunacağı öngörülmektedir.

Çıkar beyanı: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemiştir. **Finansal Destek:** Bu çalışmaya finansal destek verilmemiştir.

Kaynaklar

1. Zingaretti C, De Francesco R, Abrignani S. Why is it so difficult to develop a hepatitis C virus preventive vaccine? Clin Microbiol Infect 2014; 20 (Suppl 5): 103-9. [Crossref]
2. Wilkins T, Akhtar M, Gititu E, Jalluri C, Ramirez J. Diagnosis and Management of Hepatitis C. Am Fam Physician 2015; 91(12): 835-42.
3. Ergünay K, Abacıoğlu H. Hepatit C Virusunun Genomik Varyasyonları ve Kliniğe Etkileri. Mikrobiyol Bul 2015; 49(4): 625-35. [Crossref]
4. Cebeci İ, Tanoglu A, Şahiner F, Özel M, Öncü K, Yazgan Y, et al. Kronik hepatit C hastalarında antiviral tedaviye yanıtta etkili olabilecek parametrelerin değerlendirilmesi. Gülhane Tıp Derg 2015; 57: 373-7. [Crossref]
5. Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. Nat Med 2013; 19(7): 837-49. [Crossref]
6. Zoulim F, Liang TJ, Gerbes AL, Aghemo A, Deuffic-Burban S, Dusheiko G6, et al. Hepatitis C virus treatment in the real world: optimising treatment and access to therapies. Gut 2015; 64(11): 1824-33. [Crossref]
7. Bailey JR, Barnes E, Cox AL. Approaches, Progress, and Challenges to Hepatitis C Vaccine Development. Gastroenterology 2019; 156(2): 418-30. [Crossref]
8. Bartenschlager R, Baumert TF, Bukh J, Houghton M, Lemon SM, Lindenbach BD, 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 Res 2018; 248: 53-62. [Crossref]
9. Franco RA, Galbraith JW, Overton ET, Saag MS. Direct-acting antivirals and chronic hepatitis C: towards elimination. Hepatoma Res 2018; 4: 74. [Crossref]
10. Shoukry NH. Hepatitis C vaccines, Antibodies, and T Cells. Front Immunol 2018; 9: 1480. [Crossref]
11. WHO. Global health sector strategies on viral hepatitis 2016-2021. Available from: <https://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/>. [Accessed November 28, 2018].
12. Lanini S, Easterbrook PJ, Zumla A, Ippolito G. Hepatitis C: global epidemiology and strategies for control. Clin Microbiol Infect 2016; 22(10): 833-8. [Crossref]
13. Hill AM, Nath S, Simmons B. The road to elimination of hepatitis C: analysis of cures versus new infections in 91 countries. J Virus Erad 2017; 3: 117-23.
14. Sorbo MC, Cento V, Di Maio VC, Howe AYM, Garcia F, Perno CF, et al. Corrigendum to "Hepatitis C virus drug resistance associated substitutions and their clinical relevance: Update. 2018 Drug Resist Updat 2018; 40:40-1. [Crossref]
15. Kanwal F, Kramer JR, Asch SM, Cao Y, Li L, El-Serag HB. Long-term risk of hepatocellular carcinoma in HCV patients treated with direct acting antiviral agents. Hepatology 2019. [Epub ahead of print] [Crossref]
16. International Committee on Taxonomy of Viruses, Washington, DC. Virus Taxonomy: 2018b, July 2018. Available at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> [Accessed July 26, 2019].
17. International Committee on Taxonomy of Viruses, Washington, DC. ICTV reports; Genus: Hepacivirus. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/362/genus-hepacivirus [Accessed August 23, 2019].
18. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. Hepatology 2015; 61(1): 77-87. [Crossref]

- 19.** Huber MK, Sarrazin U, Zeuzem S. Hepatitis C Virus (Chapter 10). In: *Viral Infections and Treatment* (Eds.: RübSamen-Waigmann H, Deres K, Hewlett G, Welker R) Marcel Dekker Inc., 2003, New York. pp.295-367.
- 20.** Kabakçı Alağöz G, Karataylı SC, Karataylı E, Celik E, Keskin O, et al. Hepatitis C virus genotype distribution in Turkey remains unchanged after a decade: performance of phylogenetic analysis of the NS5B, E1, and 5'UTR regions in genotyping efficiency. *Turk J Gastroenterol* 2014; 25(4): 405-10. [[Crossref](#)]
- 21.** Ghany MG, Liang TJ. Natural History of Chronic Hepatitis C. In: *Hepatitis C Virus II: Infection and Disease* (Eds.: Miyamura T, Lemon SM, Walker CM, Wakita T), Springer Japan, 2016. pp.3-56.
- 22.** ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Switzerland. Hepacivirus. Available at: https://viralzone.expasy.org/37?outline=all_by_species [Accessed August 23, 2019].
- 23.** Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007; 9(9): 1089-97. [[Crossref](#)]
- 24.** Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, André P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 2011; 19(2): 95-103. [[Crossref](#)]
- 25.** Tan SL, Pause A, Shi Y, Sonenberg N. Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(11): 867-81. [[Crossref](#)]
- 26.** Araújo FM, Sonoda IV, Rodrigues NB, Teixeira R, Redondo RA, Oliveira GC. Genetic variability in the 5' UTR and NS5A regions of hepatitis C virus RNA isolated from non-responding and responding patients with chronic HCV genotype 1 infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(6): 611-4. [[Crossref](#)]
- 27.** Neufeldt CJ, Joyce MA, Van Buuren N, Levin A, Kirkegaard K, Gale M Jr, et al. The Hepatitis C Virus-Induced Membranous Web and Associated Nuclear Transport Machinery Limit Access of Pattern Recognition Receptors to Viral Replication Sites. *PLoS Pathog* 2016 10; 12(2): e1005428. [[Crossref](#)]
- 28.** Giorda KM, Hebert DN. Viroporins Customize Host Cells for Efficient Viral Propagation. *DNA Cell Biol* 2013; 32(10): 557-64. [[Crossref](#)]
- 29.** Li YP, Ramirez S, Mikkelsen L, Bukh J. Efficient infectious cell culture systems of the hepatitis C virus (HCV) prototype strains HCV-1 and H77. *J Virol* 2015; 89(1): 811-23. [[Crossref](#)]
- 30.** 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: 315-24. [[Crossref](#)]
- 31.** Wong JA, Bhat R, Hockman D, Logan M, Chen C, Levin A, et al. Recombinant hepatitis C virus envelope glycoprotein vaccine elicits antibodies targeting multiple epitopes on the envelope glycoproteins associated with broad cross-neutralization. *J Virol* 2014; 88: 14278-88. [[Crossref](#)]
- 32.** 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* 2019; 68(1): 140-149. [[Crossref](#)]
- 33.** Abdel-Hakeem MS, Shoukry NH. Protective immunity against hepatitis C: many shades of gray. *Front Immunol* 2014; 5: 274. [[Crossref](#)]
- 34.** Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, et al. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 2000; 6(5): 578-82. [[Crossref](#)]
- 35.** Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002; 83: 1267-80. [[Crossref](#)]
- 36.** Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol* 2014; 61(1 Suppl):S14-25. [[Crossref](#)]
- 37.** Timpe JM, Stamatakis Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, et al. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* 2008; 47(1): 17-24. [[Crossref](#)]
- 38.** Billerbeck E, Wolfisberg R, Fahnoe U, Xiao JW, Quirk C, Luna JM, et al. Mouse models of acute and chronic hepacivirus infection. *Science* 2017; 357(6347): 204-8. [[Crossref](#)]
- 39.** Grebely J, Morris MD, Rice TM, Bruneau J, Cox AL, Kim AY, et al. Cohort profile: the international collaboration of incident HIV and hepatitis C in injecting cohorts (InC3) Study. *Int J Epidemiol* 2013; 42:1649-59. [[Crossref](#)]
- 40.** Swadling L, Halliday J, Kelly C, Brown A, Capone S, Ansari MA, et al. Highly-Immunogenic Virologically-Vectored T-cell Vaccines Cannot Overcome Subversion of the T-cell Response by HCV during Chronic Infection. *Vaccines (Basel)* 2016; 4(3); pii: E27. [[Crossref](#)]
- 41.** Choo QL, Kuo G, Ralston R, Weiner A, Chien D, Van Nest G, et al. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:1294-8. [[Crossref](#)]
- 42.** 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: 6367-73. [[Crossref](#)]
- 43.** 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. [[Crossref](#)]
- 44.** von Delft A, Donnison TA, Lourenco J, Hutchings C, Mullarkey CE, Brown A, et al. The generation of a simian adenoviral vectored HCV vaccine encoding genetically conserved gene segments to target multiple HCV genotypes. *Vaccine* 2018; 36: 313-21. [[Crossref](#)]

- 45.** Alvarez-Lajonchere L, Shoukry NH, Gra B, Amador-Cañizares Y, Helle F, Bédard N, et al. Immunogenicity of CIGB-230, a therapeutic DNA vaccine preparation, in HCV-chronically infected individuals in a Phase I clinical trial. *J Viral Hepat* 2009; 16(3): 156-67. [[Crossref](#)]
- 46.** Amador-Cañizares Y, Martínez-Donato G, Alvarez-Lajonchere L, Vasallo C, Dausá M, Aguilar-Noriega D, et al. HCV-specific immune responses induced by CIGB-230 in combination with IFN- α plus ribavirin. *World J Gastroenterol* 2014; 20(1): 148-62. [[Crossref](#)]
- 47.** Fournillier A, Frelin L, Jacquier E, Ahlén G, Brass A, Gerossier E, et al. A heterologous prime/boost vaccination strategy enhances the immunogenicity of therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *J Infect Dis* 2013; 208(6): 1008-19. [[Crossref](#)]
- 48.** Strickland GT, El-Kamary SS, Klenerman P, Nicosia A. Hepatitis C vaccine: supply and demand. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 379-86. [[Crossref](#)]
- 49.** Firbas C, Boehm T, Buerger V, Schuller E, Sabarth N, Jilma B, et al. Immunogenicity and safety of different injection routes and schedules of IC41, a hepatitis C virus (HCV) peptide vaccine. *Vaccine* 2010; 28: 2397-407. [[Crossref](#)]
- 50.** Jacobson IM, McHutchinson JG, Boyer TD, Schiff ER, Everson GT, Pockros PJ, et al. GI-5005 therapeutic vaccine plus PEG-IFN/RIBAVIRIN in genotype 1 chronic HCV patients. *J Hepatol* 2010; 52: A2006. [[Crossref](#)]