



PROGRESOS EN HEPATOLOGÍA

Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C

George Koutsoudakis, Xavier Forns y Sofía Pérez-del-Pulgar*

Servicio de Hepatología, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Barcelona, España

Recibido el 9 de noviembre de 2012; aceptado el 13 de noviembre de 2012
Disponible en Internet el 13 de marzo de 2013

PALABRAS CLAVE

Virus de la hepatitis C;
Hepatitis crónica C;
Proteínas virales;
Replicón;
Cultivo celular del VHC

KEYWORDS

Hepatitis C virus;
Chronic hepatitis C;
Viral proteins;
Replicons;
HCV cell culture

Resumen Desde el descubrimiento del virus de la hepatitis C (VHC), se han desarrollado una plétora de modelos experimentales que nos han permitido el estudio del ciclo de vida del virus y la patogenia de las enfermedades hepáticas relacionadas con el VHC. Estos modelos van desde la inoculación de células en cultivo con suero de pacientes con hepatitis C hasta el uso de modelos «derivados» para el estudio de etapas concretas del ciclo de vida del VHC: las pseudopartículas retrovirales para el estudio de la entrada, los replicones para el estudio de la replicación y el modelo de cultivo celular capaz de reproducir todo el ciclo de vida completo (replicación y producción de partículas infecciosas). La utilización de estas herramientas ha sido y sigue siendo crucial para la identificación de posibles dianas terapéuticas en las diferentes etapas del ciclo de vida del virus y para el cribado de nuevos antivirales. Un claro ejemplo de ello es la reciente aprobación de dos inhibidores de la proteasa viral (boceprevir y telaprevir) en combinación con interferón pegilado (pegIFN) y ribavirina en la terapia contra la hepatitis crónica C. En esta revisión analizaremos los avances en la biología molecular del VHC y destacaremos posibles candidatos como nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la infección por el VHC.
© 2012 Elsevier España, S.L. y AEEH y AEG. Todos los derechos reservados.

The molecular biology of hepatitis C virus

Abstract Since the discovery of the hepatitis C virus (HCV), a plethora of experimental models have evolved, allowing the virus's life cycle and the pathogenesis of associated liver diseases to be investigated. These models range from inoculation of cultured cells with serum from patients with hepatitis C to the use of surrogate models for the study of specific stages of the HCV life cycle: retroviral pseudoparticles for the study of HCV entry, replicons for the study of HCV replication, and the HCV cell culture model, which reproduces the entire life cycle (replication and production of infectious particles). The use of these tools has been and remains crucial to identify potential therapeutic targets in the different stages of the virus's life cycle and to screen new antiviral drugs. A clear example is the recent approval of two viral protease inhibitors (boceprevir and telaprevir) in combination with pegylated interferon and

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: sofiapp@clinic.ub.es (S. Pérez-del-Pulgar).

ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C. This review analyzes the advances made in the molecular biology of HCV and highlights possible candidates as therapeutic targets for the treatment of HCV infection.

© 2012 Elsevier España, S.L. and AEEH y AEG. All rights reserved.

Introducción

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es la principal causa de hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular, así como la indicación más frecuente de trasplante hepático en América, Europa y Japón. Según los datos más recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la hepatitis crónica C afecta aproximadamente a unos 150 millones de personas. Se estima que el VHC infecta cada año a 3-4 millones de personas y que anualmente mueren más de 350.000 personas por enfermedades hepáticas relacionadas con el VHC (WHO, Fact sheet No. 164, julio 2012).

Hasta hace pocos meses, la terapia estándar contra la hepatitis C se ha basado en la combinación de interferón alfa pegilado (pegIFN) y ribavirina. Dado que este tratamiento tiene una eficacia limitada, especialmente en los pacientes infectados por el VHC de genotipos 1 y 4, la reciente adición de inhibidores de la proteasa viral (telaprevir y boceprevir) a la terapia estándar con pegIFN y ribavirina ha supuesto un hito en la terapia contra el VHC, alcanzando una tasa de respuesta de hasta el 80% en pacientes infectados por el VHC de genotipo 1¹⁻³. Sin embargo, este tratamiento no es igualmente efectivo contra todos los genotipos del VHC ni en todas las cohortes de pacientes, por lo que urge el desarrollo de fármacos de nueva generación que, solos o en combinación, sean capaces de eliminar el virus, contrarrestando la variabilidad genética de este, la aparición de mutantes de resistencia y los mecanismos de defensa del huésped.

Las investigaciones sobre la biología molecular del VHC y su interacción con el huésped se han visto limitadas durante años por la falta de un modelo animal apropiado y un sistema de cultivo celular *in vitro* capaz de reproducir el ciclo replicativo completo del VHC, incluida la producción de partículas virales infecciosas⁴⁻⁶. Además, por razones desconocidas, el VHC derivado del suero de pacientes replica en un nivel muy bajo y de forma muy poco reproducible en cultivos primarios de hepatocitos humanos y en líneas celulares derivadas de hepatoma⁷⁻⁹. En esta revisión discutiremos de forma práctica diversos aspectos de la biología molecular del VHC y cómo el desarrollo de modelos experimentales *in vitro* nos ha permitido no solo el estudio del ciclo de vida del VHC y su interacción con su huésped, sino también la identificación de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la infección por el VHC.

Clasificación y variabilidad genética

El VHC pertenece al género hepacivirus de la familia Flaviviridae¹⁰. Además del género hepacivirus, esta familia

contiene virus de los géneros pestivirus (por ejemplo, virus de la diarrea bovina) y flavivirus (por ejemplo, virus del dengue y de la fiebre amarilla) y otros virus todavía sin clasificar, designados GBV-A y GBV-C^{11,12}. Aunque tradicionalmente el VHC ha sido considerado como el único miembro del género hepacivirus, en 2005 se incluyó el virus GBV-B, un virus hepatotrofo que infecta tamarinos^{11,13}. Recientemente, Kapoor et al. han identificado un homólogo canino del VHC en muestras respiratorias de perros¹⁴. El hepacivirus canino es el primer hepacivirus aislado de un animal no primate y filogenéticamente más cercano al VHC descrito hasta la fecha. Además, posteriormente se ha detectado la presencia de virus similares al hepacivirus canino en caballos y se han caracterizado 8 nuevos hepacivirus genéticamente diversos¹⁵.

La variabilidad genética es una de las características biológicas más relevantes del VHC. Mediante el análisis comparativo de las secuencias genómicas de virus aislados en diferentes zonas geográficas se han podido identificar hasta 7 genotipos distintos del VHC, denominados del 1 al 7 según el orden de descubrimiento. Los distintos genotipos difieren entre sí en un 30-35% de los nucleótidos (nt). Asimismo, cada uno de estos genotipos está dividido en subtipos, los cuales difieren entre sí en un 20-25% de la secuencia de nt y son identificados mediante letras, por ejemplo, 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, etc.¹⁶.

El VHC se diversifica también a nivel de cuasi-especie¹⁷. Este término se refiere a la diversidad que existe entre los virus que circulan dentro de un mismo individuo. La diversidad de secuencias se genera continuamente durante la replicación viral debido a que la polimerasa viral no tiene capacidad correctora de errores (1 error cada 10⁴ o 10⁵ nt), y a que la tasa de producción de nuevos viriones es muy alta (10¹² viriones por día) resultando en un gran tamaño poblacional^{18,19}.

Estructura del virus de la hepatitis C

El VHC es un virus pequeño (~ 50 nm de diámetro) y con envuelta. Los primeros análisis por microscopía electrónica de partículas virales aisladas de muestras de suero e hígado de pacientes y chimpancés infectados mostraron la presencia de partículas esféricas de unos 33-70 nm²⁰⁻²³. Posteriormente, con el desarrollo del sistema de cultivo celular del VHC⁴⁻⁶, se han podido visualizar 2 tipos de partículas virales por inmunoelectromicroscopía: partículas de 30-35 nm de diámetro correspondientes a las nucleocápsides y partículas de 50-60 nm, que probablemente sean los viriones infecciosos⁵.

Por analogía con otros miembros de la familia Flaviviridae, se cree que el VHC podría adoptar una estructura icosaédrica. Sin embargo, datos recientes sugieren que el

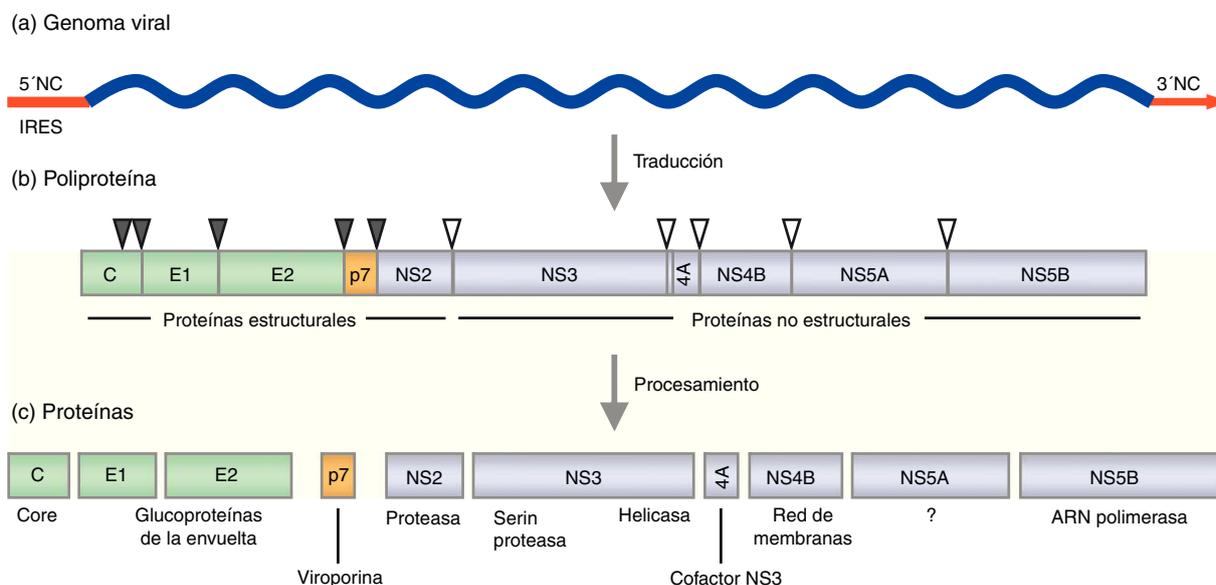


Figura 1 Esquema de la organización genómica del VHC y las proteínas virales. a) Representación lineal del genoma viral: el marco de lectura abierto (azul) y las regiones no traducidas 5' y 3' (rojo). b) Organización de las proteínas en el precursor poliproteico: proteínas estructurales (verde) y no estructurales (lila). Los triángulos grises círculos en negro indican los sitios de corte de las peptidasas celulares para dar lugar a las proteínas estructurales. Los triángulos blancos se refieren a los sitios de corte de las proteasas virales para dar lugar a las proteínas no estructurales. c) Proteínas virales y su función.

VHC tiene una estructura pleomórfica, con las glucoproteínas E1 y E2 incrustadas en la membrana lipídica derivada del retículo endoplasmático de la célula huésped^{24,25}. Bajo la membrana lipídica se encuentra la nucleocápside, compuesta por múltiples copias de la proteína core rodeando al ARN genómico. Las partículas virales aisladas de plasma muestran diferentes densidades y se cree que esto se debe a su asociación con complejos de inmunoglobulinas o con lipoproteínas celulares de baja densidad²⁶⁻²⁸.

Organización genómica

El genoma del VHC está constituido por una única molécula de ARN, de polaridad positiva. El genoma completo contiene aproximadamente 9.600 nt y consta de un único marco de lectura de entre 9.024 y 9.111 nt, dependiendo del genotipo. El marco de lectura está flanqueado por 2 regiones no traducidas en los extremos 5' y 3', las cuales tienen una conservada estructura secundaria (fig. 1). Estas 2 regiones del virus son esenciales para la replicación y la traducción del ARN. El extremo 5' (341 nt) actúa como sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, *internal ribosome entry site*), desde el cual se puede iniciar la síntesis proteica. También contiene señales de la replicación esenciales para la síntesis de los intermediarios replicativos de ARN de polaridad negativa, que servirán como moldes para la replicación viral. Recientemente, se ha descrito que el micro-ARN-122 (miRNA-122, específico del hígado) se une al extremo 5', promoviendo la replicación y traducción del virus²⁹⁻³¹. Además, el secuestro de miRNA-122 mediante oligonucleótidos antisentido, reduce la replicación del VHC tanto en cultivo celular como *in vivo*, lo que sugiere que el miRNA-122 podría ser una diana para la terapia antiviral^{32,33}. El extremo 3' es esencial para la replicación³⁴. Contiene

aproximadamente 225 nt y consta de 3 partes: una primera región de longitud variable de unos 30-40 nt, una cola poli-U/UC también de longitud variable y una secuencia terminal de 98 nt muy conservada denominada 3' X³⁵.

Proteínas virales

La traducción del marco de lectura da lugar a una poliproteína precursora de unos 3.000 aminoácidos (aa), aproximadamente. Esta poliproteína es procesada tanto por proteasas virales como del huésped dando lugar a 3 proteínas estructurales (core, E1, E2), la proteína p7 y 6 proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (fig. 1).

La proteína core se encuentra formando parte de la nucleocápside. Además, se ha señalado que core interacciona directamente con diversas proteínas y vías de señalización celulares que podrían ser importantes para el ciclo de vida del VHC (por ejemplo, apoptosis, transcripción de genes, metabolismo lipídico, respuesta inmunitaria, etc.)³⁶. Las 2 glucoproteínas de la envuelta, E1 y E2, son componentes esenciales de la envuelta del virión y son las responsables de la entrada y fusión viral^{37,38}. La proteína p7, una proteína integral de membrana de función todavía poco conocida. Estudios *in vitro* sugieren que p7 pertenece a la familia de las viroporinas, y que podría actuar como canal iónico de calcio³⁹⁻⁴¹. Asimismo, estudios recientes demuestran que esta proteína está implicada en la morfogénesis y la secreción de partículas infecciosas⁴².

Las 6 proteínas restantes son proteínas no estructurales cuya función se centra básicamente en el procesamiento de la poliproteína y en la replicación viral. La proteína NS2 junto con el dominio aminoterminal de NS3 forma la proteasa NS2-NS3, una proteasa dependiente de cinc que procesa el lugar de corte entre NS2 y NS3. Además, NS2

interacciona molecularmente con p7 y E2 y tiene un papel crucial en la producción de viriones⁴³⁻⁴⁷. La proteína NS3 contiene un dominio serina proteasa en el extremo aminoterminal y un dominio helicasa/ATPasa en el extremo carboxiterminal. La NS4A es un cofactor que se asocia a la proteasa NS3⁴⁸. La proteasa NS3-NS4A es esencial para el ciclo de vida del VHC, catalizando el procesamiento del resto de las proteínas no estructurales en los sitios NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A y NS5A/NS5B. Por este motivo, la proteasa NS3-NS4A es una de las dianas virales más interesantes en la terapia contra el VHC.

La NS4B es una proteína integral de membrana altamente hidrofóbica, en la que se predicen 4 dominios transmembrana y un extremo N-terminal implicado en la unión a las membranas intracelulares^{49,50}. Su principal función es alterar las membranas intracelulares y formar una red de membranas tipo «andamio» denominada *membranous web* que es esencial para la formación del complejo de replicación⁵¹⁻⁵³. La NS5A es una metaloproteasa dependiente de cinc muy fosforilada, cuya función en el ciclo de vida del VHC no está claramente definida⁵⁴. Sin embargo, diversos estudios demuestran que, además de desempeñar un papel importante en la replicación viral⁵⁵⁻⁵⁷ y en la producción de partículas infecciosas⁵⁸⁻⁶⁰, interacciona con un gran número de proteínas celulares, regulando diversas vías de señalización⁶¹⁻⁶⁴. La NS5B es la polimerasa viral. Es una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), que se ha demostrado que es capaz de sintetizar ARN *de novo* y dependiente de cebador (*primer*). Tiene la estructura típica de las polimerasas (estructura de mano derecha), con los dominios dedos, palma y pulgar. La interacción entre los dominios dedos y pulgar sitúa el centro catalítico en la base de la palma, haciendo posible la síntesis del ARN de cadena positiva y negativa del VHC^{65,66}.

Además de las 10 proteínas codificadas en el marco de lectura abierto, se ha descrito la existencia de una forma diferente de la proteína core originada a partir del desplazamiento a través de desplazamientos del marco de lectura del ribosoma. La proteína F (*frameshift*) o ARFP (*alternate reading frame protein*) es una proteína quimérica que contiene los aminoácidos de los extremos N-terminal y C-terminal de core y una nueva parte central codificada por el marco de lectura +1. Esta proteína se expresa de manera natural durante la infección por el VHC de genotipo 1a, ya que se han encontrado anticuerpos anti-proteína F⁶⁷.

Ciclo de vida del virus de la hepatitis C

El VHC replica preferentemente en el citoplasma de los hepatocitos, aunque también se ha descrito la presencia del VHC en otros compartimentos o tipos celulares como células mononucleares de sangre periférica^{68,69}, células dendríticas⁷⁰ o sistema nervioso central⁷¹.

La partícula viral circula libre o asociada a lipoproteínas⁷². El mecanismo exacto mediante el cual el VHC alcanza el citoplasma e inicia la replicación no se conoce con precisión. Las evidencias acumuladas hasta la fecha indican que para llegar desde el endotelio sinusoidal hasta el espacio de Disse, el VHC asociado a lipoproteínas puede o bien difundir a través de las ventanas de las células endoteliales o bien ser capturado y «transmitido» a los hepatocitos adyacentes por las lectinas de tipo C

DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*) y L-SIGN (*liver/lymph node cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*), expresadas mayoritariamente en células dendríticas y en el endotelio sinusoidal, respectivamente^{73,74}. La interacción inicial del virión con la membrana celular está mediada por glucosaminoglucanos (GAG) como el heparán sulfato, que ayudarían a concentrar el virus en la superficie celular⁷⁵⁻⁷⁷ (fig. 2). Como consecuencia de la asociación entre el VHC y las lipoproteínas, también se ha propuesto que el receptor de LDL (LDLR) puede participar en la entrada del VHC en los hepatocitos⁷⁸. A continuación, el VHC interacciona de manera específica y secuencial con el SR-B1 (*scavenger receptor B1*)⁷⁹, la tetraspanina CD81⁸⁰ y las proteínas de las uniones estrechas (*tight junction proteins*), claudina-1⁸¹ y ocludina⁸².

Recientemente se han identificado 2 receptores tirosina cinasa, EGFR (*epidermal growth factor receptor*) y EphA2 (*ephrin type-A receptor 2*) como cofactores de la entrada del VHC. Estos receptores regulan la asociación entre CD81 y claudina-1 y la fusión de la envuelta viral con la membrana plasmática⁸³. Asimismo, en otro estudio muy reciente se ha demostrado que el receptor NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-like 1*), implicado en la absorción intestinal de colesterol, también tiene un papel en la entrada del VHC, probablemente en la fusión de las membranas viral y celular⁸⁴.

Tras la unión a sus receptores, el VHC entra en los hepatocitos por endocitosis dependiente de clatrina⁸⁵. La fusión de la envuelta del virus con la membrana del endosoma tiene lugar en los endosomas tempranos y es un proceso mediado por el pH ácido de los endosomas⁸⁶. Después de la desencapsidación, el ARN viral es liberado al citoplasma y, dirigido por el IRES de la región 5', se traduce directamente dando lugar a una única proteína que es procesada por proteasas celulares y virales. Las proteínas estructurales (core, E1 y E2) y la proteína p7 son procesadas por la peptidasa señal del retículo endoplasmático, mientras que las proteínas no estructurales son procesadas por 2 proteasas virales, la proteasa NS2-3 y la serina proteasa NS3-4A.

Las proteínas virales forman el complejo de replicación, un complejo multiproteico asociado a membranas intracelulares^{52,87}. Esta red de membranas se localiza muy próxima a la membrana del retículo endoplasmático, sugiriendo que deriva de este compartimento. Dentro de este complejo, el ARN de polaridad positiva es copiado a un ARN complementario de polaridad negativa, que sirve de molde para la síntesis de la progenie de ARN genómico de polaridad positiva. Estos ARN genómicos servirán para la síntesis de nuevos ARN complementarios negativos, para la traducción o serán encapsidados. El modelo actual de ensamblaje de las partículas virales postula que las nucleocápsides formadas en el citoplasma adquieren la envuelta de glucoproteínas mientras brotan a través del retículo endoplasmático. Una vez ensambladas, las partículas del VHC son liberadas a través de la vía de secreción celular. Aunque estos procesos son bastante desconocidos, se ha propuesto que existe una asociación entre el metabolismo de los lípidos y los procesos de ensamblaje y liberación del virus^{72,88}. Estudios recientes han demostrado que el core se localiza principalmente en la membrana que rodea las gotas lipídicas (LD, *lipid droplets*) y que esta asociación es importante para la formación de partículas infecciosas *in vitro*. De este modo, el core reclutaría las proteínas no estructurales y los complejos de

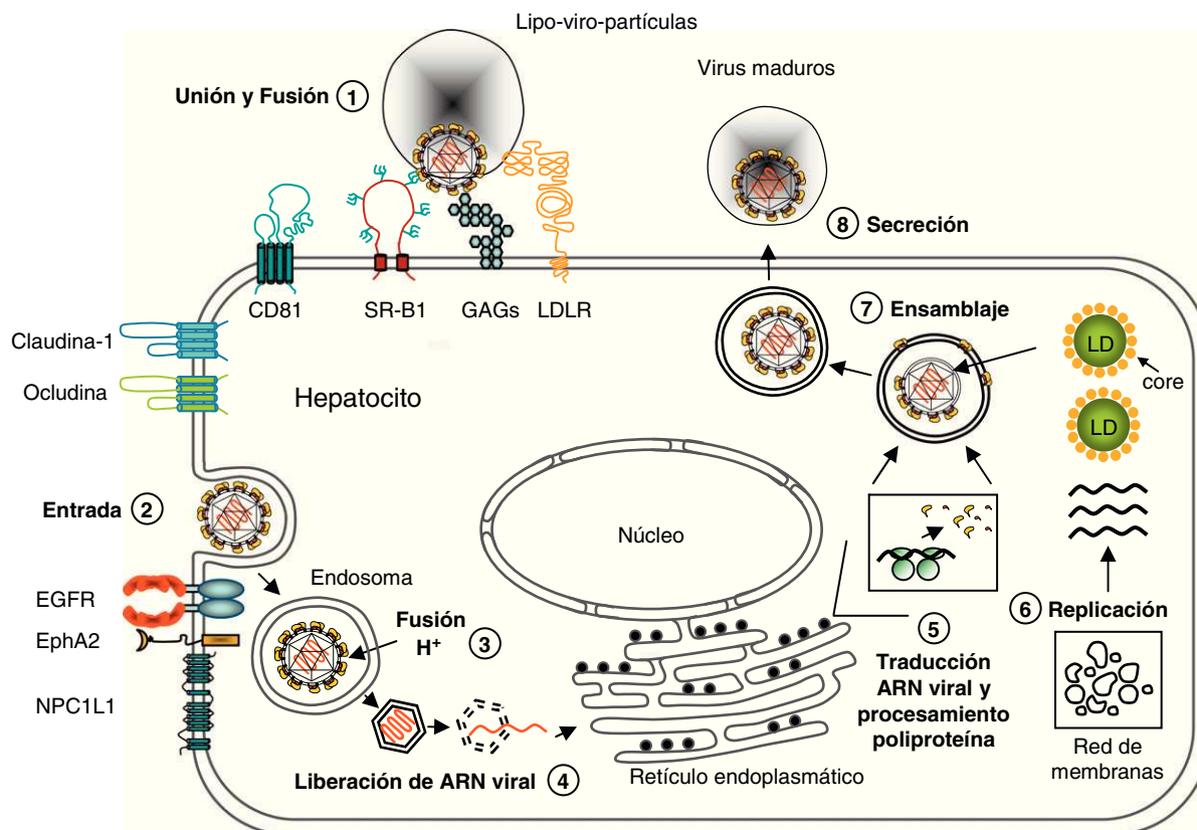


Figura 2 Representación gráfica del ciclo de vida del VHC. La partícula viral circula libre o asociada a lipoproteínas (lipo-viro-partículas). 1) La interacción inicial del virión con la membrana celular está mediada por glucosaminoglucanos (GAG). A continuación, el VHC interacciona de manera secuencial con los receptores LDLR, SR-B1, CD81, claudina-1 y ocludina. Los receptores EGFR y EphA2 (y probablemente NPC1L1) regularían la asociación entre CD81 y claudina-1 y la fusión de la envuelta viral con la membrana plasmática. 2) La entrada en el hepatocito se produce por endocitosis dependiente de clatrina. 3) La fusión de la envuelta del virus con la membrana del endosoma es un proceso mediado por la acidificación del endosoma. 4) Desencapsidación y liberación del ARN viral. 5) Traducción del ARN viral y procesamiento de la poliproteína por proteasas virales y del huésped. 6) Replicación del ARN viral en el complejo de replicación, asociado a la red de membranas. 7) Formación de la cápside y ensamblaje de los nuevos viriones alrededor de los LD. 8) Las partículas del VHC se asocian a lipoproteínas y son liberadas a través de la vía de secreción celular.

replicación en sitios adyacentes a las gotas lipídicas, donde se ensamblarían los viriones^{89,90}. Asimismo, la vía de síntesis de VLDL está implicada en la secreción del VHC. El uso de inhibidores o de ARN de interferencia contra componentes de la vía de síntesis de VLDL, como por ejemplo la proteína de transferencia de triglicéridos microsomales, ApoB y ApoE, reprimen la secreción de partículas infecciosas⁹¹⁻⁹⁵.

Replicación *in vitro* del virus de la hepatitis C derivado del suero de pacientes

Desde el descubrimiento de VHC en 1989, muchos investigadores han intentado infectar células en cultivo con virus aislado de suero de pacientes infectados por el VHC, utilizando tanto líneas celulares humanas de origen hepático como de otros orígenes y/o especies. En un primer estudio sobre la replicación del VHC *in vitro*, Shimizu et al. inocularon células MOLT-4 (línea celular humana derivada de células T) con un suero que contenía VHC⁹⁶. Siete días después de la inoculación, no solo se detectó la presencia de ARN de cadena negativa en las células, sino también la expresión de los antígenos virales de la cápside y NS4

por inmunofluorescencia, demostrando así que estas células eran susceptibles a la replicación del VHC. Sin embargo, el nivel de replicación del VHC en estas células fue muy bajo y el sistema resultó infructuoso para su aplicación *in vitro*. El análisis de otras líneas de origen linfocitario llevó a la identificación de un clon de la línea celular HPB-Ma (derivada de células T), capaz de soportar la replicación del VHC de forma consistente⁹⁷. Además, los autores demostraron que existía una correlación entre la infectividad de diversos inóculos del VHC *in vivo* (chimpancés) y su infectividad *in vitro*. Si bien diversos estudios han descrito la susceptibilidad de líneas celulares derivadas de células T, B y hepatocitos fetales humanos a la infección por el VHC después de su inoculación con suero de pacientes⁹⁸⁻¹⁰³, el mantenimiento y propagación del virus en estos sistemas de cultivo es bastante complejo, debido probablemente a los bajos niveles de replicación del VHC *in vitro*.

El tropismo hepático del VHC se demostró por primera vez en estudios *in vitro* cuando 6 de 7 sueros de pacientes positivos para el VHC infectaron preferentemente a las células PH5CH (línea celular humana derivada de hepatocitos)

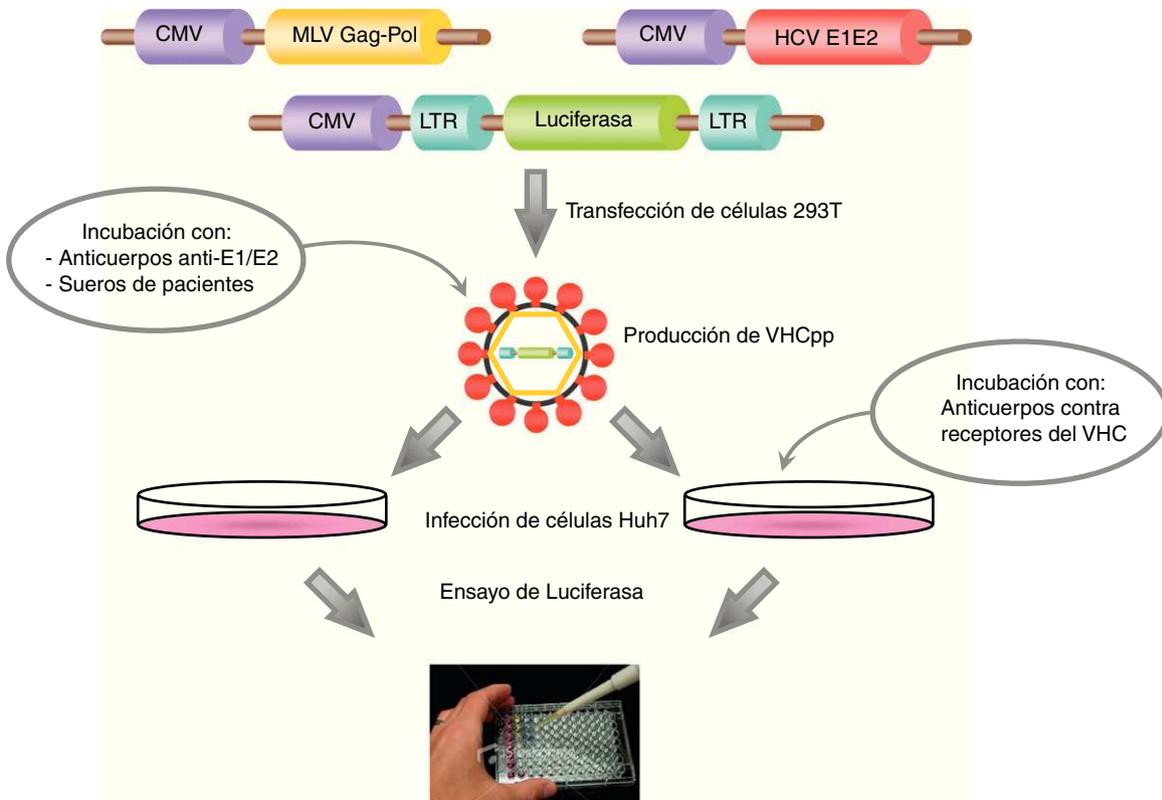


Figura 3 Diagrama de la producción de VHCpp mediante la cotransfección de células 293T con 3 plásmidos que contienen los genes que codifican para las glucoproteínas de la envuelta del VHC, la cápside retroviral y la señal de empaquetamiento, y un gen reportero (luciferasa). Las VHCpp secretadas al medio de cultivo pueden utilizarse para infectar células diana (por ejemplo, Huh7, Huh7.5, etc.). Asimismo, también es posible realizar ensayos de neutralización bien preincubando las VHCpp con anticuerpos anti-E1/E2 o sueros de pacientes infectados, o bien preincubando las células diana con anticuerpos contra los receptores de la entrada del VHC.

que a la células MT-2 (línea celular humana derivada de células T)¹⁰⁴. A partir de entonces, los investigadores concentraron sus esfuerzos en la inoculación de líneas celulares de origen hepático: se establecieron sistemas de cultivo a largo plazo utilizando líneas celulares derivadas de hepatoma humano (Huh7, HepG2)⁸ y se consiguió infectar cultivos primarios de hepatocitos humanos con suero de pacientes positivos para el VHC⁹. A pesar de todo, los modelos basados en la inoculación de cultivos primarios o diferentes líneas celulares con sueros de pacientes con hepatitis C presentaron una baja reproducibilidad y su aplicabilidad se limitó a determinadas muestras de suero muy seleccionadas. Por ello, estos sistemas prácticamente se abandonaron con el descubrimiento de los replicones subgenómicos de genotipos 1a¹⁰⁵ y 1b^{55,106}, que replican de manera autónoma y, preferentemente, en los subclones seleccionados de la línea celular de hepatoma humano Huh7, como por ejemplo, Huh7.5¹⁰⁷ o Huh7-Lunet¹⁰⁸.

Modelos experimentales para el estudio del virus de la hepatitis C *in vitro*

Entrada: pseudopartículas virales

Durante los años 1990, debido a la falta de un sistema de cultivo celular para la propagación del VHC, se utilizaron

sistemas celulares clásicos de expresión transitoria o estable para estudiar la función de las proteínas del VHC. Para el estudio de la entrada del VHC en sus células diana, en el año 2003, Bartosch et al.¹⁰⁹, e independientemente Hsu et al.¹¹⁰, desarrollaron el sistema de infección de las pseudopartículas del VHC (VHCpp). Ambos grupos aprovecharon la propiedad de los retrovirus de que pueden incorporar glucoproteínas heterólogas en su envuelta, en este caso concreto las glucoproteínas de la envuelta E1 y E2 del VHC.

Las VHCpp se producen mediante la cotransfección de células 293T (células embrionarias de riñón humano) con vectores de expresión que codifican para: a) las glucoproteínas del VHC; b) las proteínas retrovirales (cápside y polimerasa) y la señal de empaquetamiento, y c) un gen reportero (luciferasa o proteína verde fluorescente, GFP). Los vectores retrovirales utilizados para la producción de las VHCpp están basados en el virus de la leucemia murina (MLV) o en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1). Las VHCpp son secretadas al medio de cultivo y a partir de las 48h después de la transfección, se recogen los sobrenadantes y se utilizan para infectar las células diana, como por ejemplo, Huh7 y sus derivadas (fig. 3). La infectividad de las VHCpp ha sido analizada en diversas líneas celulares y en cultivos primarios de hepatocitos humanos. Curiosamente, las VHCpp presentan un tropismo claro por las líneas celulares de origen hepático y por los hepatocitos humanos,

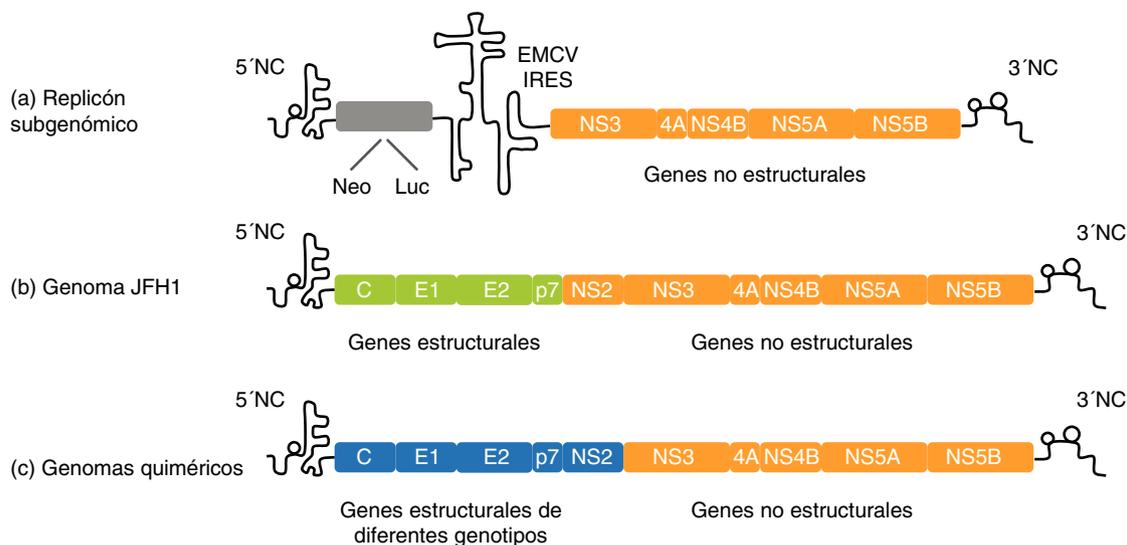


Figura 4 Representación esquemática del replicón subgenómico del VHC y cultivo celular del VHC basado en JFH1. a) Ejemplo de un replicón subgenómico bicistrónico compuesto por: el extremo 5' no codificante (NC) dirigiendo la traducción del gen marcador o de selección, el IRES del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), los genes de la replicasa del VHC y el extremo 3'NC. b) Modelo de cultivo celular del VHC: para la producción de partículas virales se necesitan las proteínas no estructurales y los extremos 5' y 3' de JFH1. c) Los genes core, E1, E2 y p7 se pueden sustituir por los de otras cepas del VHC para construir genomas quiméricos y estudiar *in vitro* las propiedades de los diferentes genotipos del VHC.

mientras que, en general, en las líneas celulares que no son de origen hepático o bien no se infectan o bien la infección es mínima¹⁰⁹.

Cabe destacar que el sistema VHCpp sirve únicamente para el estudio de la entrada del VHC en sus células diana. Aun así, se ha utilizado con éxito para el estudio de los procesos inmediatos a la unión del virus a la célula y en la identificación de los receptores clave en la entrada viral, revelando que la entrada del VHC en los hepatocitos es un proceso muy complejo y muy regulado¹¹¹.

Replicación: replicón subgenómico

En el año 1999 se produjo un gran avance en el campo de la biología molecular del VHC cuando Lohmann et al. desarrollaron los primeros replicones subgenómicos funcionales del VHC¹⁰⁶. Por definición, los replicones son moléculas de ácidos nucleicos capaces de autoduplicarse. En caso del VHC, los replicones de primera generación fueron derivados de un genoma del VHC de genotipo 1b (denominado Con 1) en el que se reemplazaron los genes estructurales por un gen de resistencia a la neomicina (neomicina fosfotransferasa). También se incluyó un segundo elemento IRES para aumentar la traducción de las proteínas no estructurales del VHC, que constituyen la maquinaria de replicación del virus (fig. 4). Así pues, estas construcciones subgenómicas y bicistrónicas pueden autorreplicarse, a través de la síntesis de una cadena negativa, y propagarse en cultivo celular durante años^{56,106}. Las líneas celulares más permisivas para ello son Huh7.5 y Huh7-Lunet¹⁰⁷.

Dado que el sistema del replicón subgenómico del VHC no contiene los genes estructurales, no es capaz de producir partículas virales. Por ello, también se desarrollaron replicones que contenían todo el genoma completo del VHC y un marcador de selección¹¹². Estos replicones genómicos necesitaban mutaciones adaptativas al cultivo celular para

replicar de forma eficiente y en niveles suficientemente altos para la selección por el gen marcador. Aunque los replicones genómicos del VHC fueron muy prometedores, la aparición de mutaciones adaptativas parecía interferir con la producción de partículas¹¹³.

Los replicones subgenómicos han sido herramientas muy valiosas en los estudios de los mecanismos de replicación del VHC y en la caracterización bioquímica y estructural del complejo de replicación viral^{52,114} y en el ensayo de nuevos fármacos contra la hepatitis C (inhibidores de la proteasa y la polimerasa del VHC), incluida la identificación de resistencias a los antivirales¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Ciclo de vida completo: modelo de cultivo celular del virus de la hepatitis C

En 2003, Kato et al. descubrieron un replicón subgenómico basado en una secuencia de genotipo 2a que, por razones desconocidas, replicaba a niveles entre 50 y 500 veces mayores en comparación con los replicones basados en Con 1, sin la necesidad de mutaciones adaptativas¹¹⁸. Este replicón se construyó a partir de un genoma del VHC de genotipo 2a denominado JFH 1 (*Japanese fulminant hepatitis*), obtenido de un paciente japonés que sufrió una hepatitis fulminante¹¹⁹. Dos años más tarde, 3 grupos independientes desarrollaron el modelo del cultivo celular del VHC (VHCcc) basado en el genoma completo de JFH 1 y que era capaz de replicar y producir partículas infecciosas *in vitro*⁴⁻⁶ (fig. 4). Concretamente, la transfección de células Huh7 (o sus derivadas) con ARN de JFH 1 conlleva la producción y liberación de partículas virales al medio de cultivo, que son infecciosas en cultivo celular, en chimpancé y en ratón^{5,6}.

Una mejora importante del sistema ha sido la generación de virus quiméricos basados en JFH 1 con gran capacidad replicativa. Básicamente, estos genomas quiméricos contienen los extremos 3' y 5' y la región NS3-NS5B de JFH 1

(esencial para que se produzca replicación y producción de partículas virales), y la región core-NS2 procedente de otra cepa de genotipo 2a denominada J6^{6,120}. La quimera J6/JFH1 replica en cultivo celular y produce títulos virales unas 100 veces más elevados que su genoma parental JFH1. Además de esta quimera intragenotípica, también se han generado virus quiméricos con todos los genotipos del VHC. A diferencia de la quimera J6/JFH1, estas quimeras intergenotípicas necesitan mutaciones adaptativas al cultivo celular¹²⁰⁻¹²³. Dado que no existe ningún otro genoma del VHC capaz de reproducir el ciclo de vida completo del virus con la misma eficiencia que JFH1 y que el genotipo del VHC influye en la respuesta al tratamiento antiviral, el hecho de disponer de genomas quiméricos de los distintos genotipos del VHC es especialmente relevante para desarrollo de nuevas estrategias antivirales, la evaluación de vacunas y la caracterización de la respuesta inmunitaria humoral en una amplia variedad de genotipos.

Otras estrategias con el fin de optimizar el modelo del VHC han sido la selección de clones de células especialmente permisivos a la replicación del virus^{4,6}, el estudio sistemático de mutaciones adaptativas al cultivo celular, especialmente la identificación aquellas que aumentan los valores virales sin afectar a la replicación³², y la generación de VHC que contienen genes reporteros (por ejemplo, la luciferasa o la proteína fluorescente verde) para facilitar la detección de la infección^{76,124}.

Dianas terapéuticas en las diferentes etapas del ciclo de vida del virus de la hepatitis C

La entrada viral como diana terapéutica

Tal y como se ha descrito en el apartado 4, el VHC necesita diversos receptores con diferente localización en la membrana celular. Esto implica que la entrada del VHC es un proceso complejo y sumamente regulado, pero que a su vez ofrece un gran número de posibles dianas terapéuticas. Potencialmente, la entrada viral se podría inhibir tanto mediante el bloqueo de la partícula viral como de los factores celulares de la entrada. La infección por el VHC se puede impedir mediante el uso de anticuerpos neutralizantes contra las proteínas E1 y/o E2 de la envuelta del virus¹²⁵. Estos anticuerpos neutralizantes han demostrado ser muy potentes al neutralizar cepas de diferentes genotipos *in vitro*^{126,127} pero su eficacia *in vivo* es mucho menor^{128,129}. Esto se podría deberse por un lado a la gran variabilidad genética del VHC, particularmente en las glucoproteínas de la envuelta, por lo que se requerirían anticuerpos neutralizantes de amplio espectro. Por otro lado, el virus circula asociado a lipoproteínas que podrían enmascarar los epítomos neutralizantes. Finalmente, el VHC también puede infectar a las células vecinas mediante transmisión célula a célula, escapando así de la neutralización por los anticuerpos neutralizantes.

El bloqueo de los receptores de la entrada del VHC CD81, SR-B1 y claudina-1 ha demostrado ser eficaz tanto *in vitro* como *in vivo* (ratón), independientemente del genotipo del VHC¹³⁰⁻¹³³. El uso de inhibidores de la entrada tiene especial interés para impedir la recurrencia de la hepatitis C en pacientes que han recibido un trasplante hepático. Actualmente, se está realizando un estudio

piloto de fase clínica 1 para evaluar la seguridad y eficacia preliminar del antagonista de SR-B1 ITX 5061 en pacientes infectados por el VHC y que han recibido un trasplante hepático. Por otro lado, la identificación de EGFR, EphA2 y NPC1L1 como factores de la entrada del virus abre nuevas oportunidades para el desarrollo de nuevos inhibidores. Un aspecto interesante es que actualmente existen 2 moléculas comercializadas, erlotinib (inhibidor de EGFR) y ezetimibe (inhibidor de NPC1L1), que han demostrado actividad antiviral *in vitro* e *in vivo* (ratón)^{83,84}.

La replicación viral como diana terapéutica

La replicación del VHC puede ser inhibida de forma eficiente con inhibidores de la proteasa NS3/4A. En 2011 se aprobaron 2 inhibidores de la proteasa viral, boceprevir y telaprevir, para el tratamiento de la infección por el VHC en combinación con pegIFN y ribavirina. Con la triple terapia, la respuesta virológica sostenida ha aumentado de forma significativa en pacientes infectados por el VHC de genotipo 1. Sin embargo, este tratamiento es menos efectivo contra los genotipos no 1 y conlleva la aparición de efectos secundarios graves^{1,134}. Probablemente, los inhibidores de proteasa de segunda generación vayan dirigidos a disminuir los efectos adversos y ampliar su espectro de eficacia.

La replicación del VHC también puede ser inhibida con inhibidores de la polimerasa viral NS5B, que es la responsable de la replicación viral. Existen 2 tipos de inhibidores de la polimerasa: los análogos de nucleósidos y los no nucleósidos. En general, los análogos de nucleósidos son activos contra múltiples genotipos debido a que se unen al sitio activo de la polimerasa y este está muy conservado entre genotipos. Por el contrario, los inhibidores no nucleósidos son inhibidores alostéricos, por lo que aparentemente son más dependientes del genotipo viral¹³⁵. Recientemente se han reportado datos clínicos muy prometedores del análogo de nucleósido sofosbuvir (GS-7977). En los ensayos clínicos de fase 2, este fármaco fue muy efectivo contra todos los genotipos del VHC, al ser administrado tanto con como sin pegIFN¹³⁶⁻¹³⁸. Actualmente, se encuentra en fase 3 de desarrollo clínico en pacientes con hepatitis crónica C y fase 2 para la prevención de la recurrencia de la hepatitis C en pacientes que han recibido un trasplante hepático.

La proteína no estructural NS4B es esencial para la replicación viral y la formación de los complejos de replicación. Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual ejerce su función, NS4B también podría representar una posible diana terapéutica contra la infección por el VHC. En 2008, Einav et al. demostraron que NS4B era capaz de unirse al ARN del VHC a través del extremo 3' de la cadena negativa y que el clemizol hidrocloreuro (antihistamínico clásico) era un inhibidor potente de esta unión¹³⁹. Asimismo, mediante estudios funcionales utilizando el replicón subgenómico se demostró que, aunque el clemizol inhibía la replicación de forma modesta, ejercía un efecto sinérgico al combinarse con los inhibidores de la proteasa telaprevir o boceprevir¹⁴⁰. En 2010 se completó un estudio clínico de fase 1b en el que se evaluó la seguridad y tolerabilidad de clemizol en pacientes con hepatitis C que no habían sido tratados previamente. Sin embargo, los resultados de este ensayo clínico todavía no han sido publicados.

La proteína NS5A tiene un papel importante en la replicación viral y en la formación de partículas infecciosas. El primer inhibidor de NS5A, daclatasvir, ha demostrado ser un antiviral potente *in vitro* e *in vivo*, siendo capaz de incrementar la actividad antiviral del pegIFN y la ribavirina^{141,142}. Actualmente, se están realizando ensayos clínicos en los que se combinan daclatasvir con asunaprevir (inhibidor de la proteasa NS3) en un régimen libre de pegIFN.

Durante el ciclo viral intervienen numerosos factores celulares que también podrían ser buenos candidatos para la terapia antiviral, solos o en combinación con pegIFN y ribavirina o con los antivirales directos. Las ciclofilinas son proteínas celulares con actividad cis-trans isomerasa (facilita el plegamiento de las proteínas), que se expresan en muchos tejidos humanos y están implicadas en numerosos procesos fisiológicos y en la replicación del VHC. Alisporivir es el prototipo de una nueva clase de inhibidores de la ciclofilina: es un análogo de la ciclosporina A exento de efecto inmunosupresor porque no interacciona con la calcineurina. Estudios *in vitro* han demostrado que alisporivir inhibe la replicación del VHC impidiendo la interacción entre la ciclofilina A y la proteína NS5A de VHC^{143,144}. La eficacia de alisporivir también ha sido demostrada *in vivo*¹⁴⁵ y aunque se encontraba en fases avanzadas de desarrollo clínico para el tratamiento de pacientes con hepatitis crónica C, la FDA ha decidido aplazar el ensayo por un tema de seguridad.

Otra alternativa interesante como diana antiviral es el miRNA-122. Como se ha comentado anteriormente, el miRNA-122 es específico del hígado y se une al extremo 5' del genoma del VHC, promoviendo la replicación y traducción del virus^{29,122}. Estudios *in vitro* han demostrado que el oligonucleótido antisentido miravirsén es un antagonista potente contra los genotipos 1 al 6 del VHC³². Además, la administración de miravirsén a chimpancés infectados por el VHC causó una caída drástica de la carga viral de forma persistente, sin que se evidenciara la aparición de resistencias ni efectos adversos graves (excepto un descenso notable de los niveles de colesterol en suero)³³. Recientemente se han publicado los resultados del estudio clínico de prueba de concepto en el que se ha demostrado la seguridad y eficacia de miravirsén en pacientes infectados por el VHC de genotipo 1¹⁴⁶. Esta prevista la realización de más ensayos clínicos con miravirsén solo o en combinación con antivirales directos como por ejemplo el telaprevir.

La formación de partículas infecciosas como diana terapéutica

El ensamblaje y la liberación de las partículas virales son los procesos menos conocidos del ciclo de vida del VHC. Se sabe que este proceso está muy relacionado con el metabolismo lipídico y que tanto las proteínas estructurales como las no estructurales interactúan con esta vía a distintos niveles¹⁴⁷. Por ello, cabría la posibilidad de bloquear la formación de partículas virales con antivirales contra las proteínas del virus o contra factores celulares como, por ejemplo, determinados componentes del metabolismo de los lípidos.

La proteína core ofrece varias ventajas como posible diana terapéutica. Por un lado, es esencial para la formación de la nucleocápside viral y, en consecuencia, para la formación de las partículas infecciosas. Por otro lado, está muy

conservada entre los genotipos del VHC y es la que presenta la menor variabilidad genética de las proteínas virales en pacientes con hepatitis crónica C. La oligomerización del core es un paso necesario para la formación de la nucleocápside viral, por lo que su inhibición impediría la formación de partículas infecciosas. Estudios recientes han reportado la identificación de péptidos y moléculas pequeñas capaces de inhibir, no solo la dimerización del core, sino también la producción de virus en cultivo celular¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. La proteína p7 podría ser otra diana interesante. La pérdida de p7 suprime completamente la producción de partículas infecciosas, y la pérdida de la su actividad como canal iónico interfiere con la producción de virus en cultivo celular^{40,42,43}. Sin embargo, los antagonistas de los canales iónicos investigados hasta la fecha han demostrado un efecto antiviral muy modesto¹⁵¹.

El plegamiento correcto de las proteínas de la envuelta E1 y E2 es importante tanto para la entrada como para la formación de partículas infecciosas. Dado que E1 y E2 son proteínas muy glucosiladas, se desarrollaron inhibidores de la α -glucosidasas como posibles antivirales en la etapa de ensamblaje del virión. Dos inhibidores de la α -glucosidasa, UT-231B (un iminoazúcar) y celgosivir (pro fármaco de la castanoespemina) llegaron a fase clínica 2, pero ninguno de los 2 progresó a fases más avanzadas del desarrollo clínico: UT-231B por baja eficacia y celgosivir sin justificar el motivo¹⁵². En un estudio reciente se ha demostrado que DGAT1 (*diacylglycerol O-acyltransferase 1*) es un factor esencial para la localización de core alrededor de los *lipid droplets*¹⁵³, por lo que quizás también podría ser un buen candidato como diana terapéutica. Por otro lado, dado que la morfogénesis de las partículas virales está estrechamente ligada a la biogénesis de VLDL, factores celulares asociados a esta vía como ApoB, ApoE y MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*) podrían ser posibles dianas terapéuticas. Por ejemplo, el flavonoide cítrico naringenina es capaz de inhibir la secreción de VLDL *in vitro* e *in vivo* y la producción de virus en cultivo celular. La naringenina inhibe la secreción de ApoB mediante la inhibición de la actividad de MTP y la transcripción de las enzimas HMGR (*3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase*) y ACAT2 (*acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 2*) también implicadas en el metabolismo lipídico¹⁵⁴. Asimismo, diversos estudios *in vitro* han indicado la capacidad de las estatinas para inhibir la replicación del VHC¹⁵⁵. Sin embargo, los resultados de los estudios realizados en pacientes con hepatitis C son contradictorios, por lo que su aplicabilidad en humanos queda en entredicho¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

Conclusiones y perspectivas

Los avances en el conocimiento de las diferentes etapas del ciclo de vida del VHC han permitido que el desarrollo de terapias contra la infección por el VHC aumente de forma exponencial durante los últimos años. La terapia triple estándar actual (pegIFN, ribavirina y telaprevir/boceprevir) ha mejorado sustancialmente la tasa de respuesta de los pacientes infectados por el VHC de genotipo 1. Sin embargo, este tratamiento no es siempre efectivo y a menudo está contraindicado debido a la aparición de efectos adversos en múltiples poblaciones de pacientes. El descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas abrirá nuevas líneas de

desarrollo de medicamentos más potentes, capaces de curar a la mayoría, sino a todos, los pacientes con hepatitis crónica C. En este sentido tiene especial relevancia el desarrollo de fármacos seguros dirigidos a tratar cohortes especiales de pacientes como pacientes que han recibido un trasplante hepático, pacientes coinfectados por otros virus (VHB o VIH) y/o pacientes con manifestaciones extrahepáticas habitualmente secundarias a reacciones autoinmunes, depósito generalizado de inmunocomplejos y trastornos linfoproliferativos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med.* 2011;364:1207–17.
- Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2011;364:2405–16.
- Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med.* 2011;364:2417–28.
- 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 U S A.* 2005;102:9294–9.
- 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;11:791–6.
- 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;309:623–6.
- Ito T, Mukaigawa J, Zuo J, Hirabayashi Y, Mitamura K, Yasui K. Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *J Gen Virol.* 1996;77:1043–54.
- Seipp S, Mueller HM, Pfaff E, Stremmel W, Theilmann L, Goeser T. Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro. *J Gen Virol.* 1997;78:2467–76.
- Fournier C, Sureau C, Coste J, Ducos J, Pageaux G, Larrey D, et al. In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 1998;79:2367–74.
- Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. En: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology.* 5th Edition Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2012. p. 1101–52.
- Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med.* 1995;1:564–9.
- Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:3401–5.
- Thiel HJ, Collett MS, Gould EA. Family Flaviviridae. En: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al., editores. *Virus Taxonomy. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego: Academic Press; 2005. p. 979–96.
- Kapoor A, Simmonds P, Gerold G, Qaisar N, Jain K, Henríquez JA, et al. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:11608–13.
- Burbelo PD, Dubovi EJ, Simmonds P, Medina JL, Henríquez JA, Mishra N, et al. Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. *J Virol.* 2012;86: 6171–8.
- Kuiken C, Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods Mol Biol.* 2009;510:33–53.
- Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol.* 1992;66:3225–9.
- Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science.* 1998;282:103–7.
- Cuevas JM, Gonzalez-Candelas F, Moya A, Sanjuan R. Effect of ribavirin on the mutation rate and spectrum of hepatitis C virus in vivo. *J Virol.* 2009;83:5760–4.
- Bosman C, Valli MB, Bertolini L, Serafino A, Boldrini R, Marcellini M, et al. Detection of virus-like particles in liver biopsies from HCV-infected patients. *Res Virol.* 1998;149:311–4.
- Ishida S, Kaito M, Kohara M, Tsukiyama-Kohora K, Fujita N, Ikoma J, et al. Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. *Hepatol Res.* 2001;20:335–47.
- Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol.* 1994;75 Pt 7:1755–60.
- Jacob JR, Burk KH, Eichberg JW, Dreesman GR, Lanford RE. Expression of infectious viral particles by primary chimpanzee hepatocytes isolated during the acute phase of non-A, non-B hepatitis. *J Infect Dis.* 1990;161:1121–7.
- Gastaminza P, Dryden KA, Boyd B, Wood MR, Law M, Yeager M, et al. Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J Virol.* 2010 Nov;84:10999–1009.
- Merz A, Long G, Hiet MS, Brügger B, Chlanda P, Andre P, et al. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem.* 2011;286:3018–32.
- Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Kochel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol.* 1992;181:293–300.
- Aiyama T, Yoshioka K, Okumura A, Takayanagi M, Iwata K, Ishikawa T, et al. Sequence analysis of hypervariable region of hepatitis C virus (HCV) associated with immune complex in patients with chronic HCV infection. *J Infect Dis.* 1996;174:1316–20.
- Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoeyer M, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol.* 2002;76:6919–28.
- Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science.* 2005;309:1577–81.
- Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, et al. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J.* 2008;27:3300–10.
- Jangra RK, Yi M, Lemon SM. Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol.* 2010;84:6615–25.
- Li YP, Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Bukh J. MicroRNA-122 antagonism against hepatitis C virus genotypes 1-6 and reduced efficacy by host RNA insertion or mutations in the HCV 5' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:4991–6.
- Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, et al. Therapeutic silencing of

- microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*. 2010;327:198–201.
34. Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol*. 2002;76:5326–38.
 35. Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol*. 1996;70:3307–12.
 36. McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat*. 2000;7:2–14.
 37. Bartosch B, Verney G, Dreux M, Donot P, Morice Y, Penin F, et al. An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J Virol*. 2005;79:8217–29.
 38. Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Bevitt DJ, Toms GL. Characterization of the genome and structural proteins of hepatitis C virus resolved from infected human liver. *J Gen Virol*. 2004;85:1497–507.
 39. Gonzalez ME, Carrasco L. Viroporins FEBS Lett. 2003;552:28–34.
 40. Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug. Amantadine FEBS Lett. 2003;535:34–8.
 41. Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, et al. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:6104–8.
 42. Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel AH, Bartenschlager R, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog*. 2007;3:103.
 43. Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol*. 2007;81:8374–83.
 44. Jirasko V, Montserret R, Appel N, Janvier A, Eustachi L, Brohm C, et al. Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem*. 2008;283:28546–62.
 45. Jirasko V, Montserret R, Lee JY, Gouttenoire J, Moradpour D, Penin F, et al. Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1001233.
 46. Dentzer TG, Lorenz IC, Evans MJ, Rice CM. Determinants of the hepatitis C virus nonstructural protein 2 protease domain required for production of infectious virus. *J Virol*. 2009;83:12702–13.
 47. Popescu CI, Callens N, Trinel D, Roingard P, Moradpour D, Descamps V, et al. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1001278.
 48. Bartenschlager R, Lohmann V, Wilkinson T, Koch JO. Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J Virol*. 1995;69:7519–28.
 49. Hugle T, Fehrmann F, Bieck E, Kohara M, Krausslich HG, Rice CM, et al. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology*. 2001;284:70–81.
 50. Lundin M, Monne M, Widell A, Von HG, Persson MA. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol*. 2003;77:5428–38.
 51. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*. 2002;76:5974–84.
 52. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, et al. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol*. 2003;77:5487–92.
 53. Elazar M, Liu P, Rice CM, Glenn JS. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol*. 2004;78:11393–400.
 54. Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem*. 2004;19:48576–87.
 55. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*. 2000;290:1972–4.
 56. Pietschmann T, Lohmann V, Rutter G, Kurpanek K, Bartenschlager R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol*. 2001;75:1252–64.
 57. Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol*. 2001;75:4614–24.
 58. Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, et al. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog*. 2008;4:e1000035.
 59. Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, et al. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol*. 2008;82:7964–76.
 60. Hughes M, Griffin S, Harris M. Domain III of NS5A contributes to both RNA replication and assembly of hepatitis C virus particles. *J Gen Virol*. 2009;90:1329–34.
 61. Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol*. 2001;75:1401–7.
 62. Pflugheber J, Fredericksen B, Sumpter Jr R, Wang C, Ware F, Sodora DL, et al. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:4650–5.
 63. Randall G, Panis M, Cooper JD, Tellinghuisen TL, Sukhodolets KE, Pfeffer S, et al. Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:12884–9.
 64. Benga WJ, Krieger SE, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, et al. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology*. 2010;51:43–53.
 65. Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, Weber PC. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol*. 1999;6:937–43.
 66. Lohmann V, Roos A, Korner F, Koch JO, Bartenschlager R. Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *J Viral Hepat*. 2000;7:167–74.
 67. Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA*. 2001;7:710–21.
 68. Dahari H, Feliu A, Garcia-Retortillo M, Fornis X, Neumann AU. Second hepatitis C replication compartment indicated by viral dynamics during liver transplantation. *J Hepatol*. 2005;42:491–8.
 69. Ramirez S, Perez-del-Pulgar S, Carrion JA, Costa J, Gonzalez P, Massaguer A, et al. Hepatitis C virus compartmentalization and infection recurrence after liver transplantation. *Am J Transplant*. 2009;9:1591–601.

70. Goutagny N, Fatmi A, De L, Penin V, Couzigou F, Inchauspe PG, et al. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2003;187:1951–8.
71. Forton DM, Karayiannis P, Mahmud N, Taylor-Robinson SD, Thomas HC. Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol.* 2004;78:5170–83.
72. Andre P, Perlemuter G, Budkowska A, Brechot C, Lotteau V. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis.* 2005;25:93–104.
73. Cormier EG, Durso RJ, Tsamis F, Boussemart L, Manix C, Olson WC, et al. L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:14067–72.
74. Lozach PY, Amara A, Bartosch B, Virelizier JL, Renzana-Seisdedos F, Cosset FL, et al. C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem.* 2004;279:32035–45.
75. Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem.* 2003;278:41003–12.
76. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, et al. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol.* 2006;80:5308–20.
77. Barth H, Schnober EK, Zhang F, Linhardt RJ, Depla E, Boson B, et al. Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol.* 2006;80:10579–90.
78. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:12766–71.
79. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 2002;21:5017–25.
80. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science.* 1998;282:938–41.
81. Evans MJ, von HT, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature.* 2007;446:801–5.
82. Benedicto I, Molina-Jimenez F, Bartosch B, Cosset FL, Lavillette D, Prieto J, et al. The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol.* 2009;83:8012–20.
83. Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med.* 2011;17:589–95.
84. Sainz Jr B, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, et al. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med.* 2012;18:281–5.
85. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* 2006;80:6964–72.
86. Meertens L, Bertaux C, Dragic T. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol.* 2006;80:11571–8.
87. Miyanari Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotohno K. Hepatitis C virus non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral genome replication. *J Biol Chem.* 2003;278:50301–8.
88. Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeekochchai W, Toms GL. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol.* 2006;80:2418–28.
89. 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;9:1089–97.
90. Counihan NA, Rawlinson SM, Lindenbach BD. Trafficking of hepatitis C virus core protein during virus particle assembly. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002302.
91. Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol.* 2007;81:13783–93.
92. Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV. Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol.* 2008;82:2120–9.
93. Jiang J, Luo G. Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol.* 2009;83:12680–91.
94. Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale Jr M, et al. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:5848–53.
95. Mancone C, Steindler C, Santangelo L, Simonte G, Vlassi C, Longo MA, et al. Hepatitis C virus production requires apolipoprotein A-I and affects its association with nascent low-density lipoproteins. *Gut.* 2011;60:378–86.
96. Shimizu YK, Iwamoto A, Hijikata M, Purcell RH, Yoshikura H. Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:5477–81.
97. Shimizu YK, Purcell RH, Yoshikura H. Correlation between the infectivity of hepatitis C virus in vivo and its infectivity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:6037–41.
98. Bertolini L, Iacovacci S, Ponzetto A, Gorini G, Battaglia M, Carloni G. The human bone-marrow-derived B-cell line CE, susceptible to hepatitis C virus infection. *Res Virol.* 1993;144:281–5.
99. Carloni G, Iacovacci S, Sargiacomo M, Ravagnan G, Ponzetto A, Peschle C, et al. Susceptibility of human liver cell cultures to hepatitis C virus infection. *Arch Virol Suppl.* 1993;8:31–9, 31–9.
100. Iacovacci S, Sargiacomo M, Parolini I, Ponzetto A, Peschle C, Carloni G. Replication and multiplication of hepatitis C virus genome in human foetal liver cells. *Res Virol.* 1993;144:275–9.
101. Kato N, Nakazawa T, Mizutani T, Shimotohno K. Susceptibility of human T-lymphotropic virus type I infected cell line MT-2 to hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;206:863–9.
102. Cribier B, Schmitt C, Bingen A, Kirn A, Keller F. In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 1995;76:2485–91.
103. Nakajima N, Hijikata M, Yoshikura H, Shimizu YK. Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus. *J Virol.* 1996;70:3325–9.
104. Ikeda M, Kato N, Mizutani T, Sugiyama K, Tanaka K, Shimotohno K. Analysis of the cell tropism of HCV by using in vitro HCV-infected human lymphocytes and hepatocytes. *J Hepatol.* 1997;27:445–54.
105. Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, Rice CM. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol.* 2003;77:3181–90.
106. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 1999;285:110–3.

107. Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol.* 2002;76:13001–14.
108. Friebe P, Boudet J, Simorre JP, Bartenschlager R. Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol.* 2005;79:380–92.
109. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med.* 2003;197:633–42.
110. 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 U S A.* 2003;100:7271–6.
111. von HT, Rice CM. Hepatitis C virus entry. *J Biol Chem.* 2008;283:3689–93.
112. Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, et al. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol.* 2002;76:4008–21.
113. Pietschmann T, Zayas M, Meuleman P, Long G, Appel N, Koutsoudakis G, et al. Production of infectious genotype 1b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000475.
114. Aizaki H, Lee KJ, Sung VM, Ishiko H, Lai MM. Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology.* 2004;324:450–61.
115. Lin K, Perni RB, Kwong AD, Lin C. VX-950, a novel hepatitis C virus (HCV) NS3-4A protease inhibitor, exhibits potent antiviral activities in HCV replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:1813–22.
116. He Y, King MS, Kempf DJ, Lu L, Lim HB, Krishnan P, et al. Relative replication capacity and selective advantage profiles of protease inhibitor-resistant hepatitis C virus (HCV) NS3 protease mutants in the HCV genotype 1b replicon system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1101–10.
117. Flint M, Mullen S, Deatly AM, Chen W, Miller LZ, Ralston R, et al. Selection and characterization of hepatitis C virus replicons dually resistant to the polymerase and protease inhibitors HCV-796 and boceprevir (SCH 503034). *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:401–11.
118. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology.* 2003;125:1808–17.
119. Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Hiramoto J, et al. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol.* 2001:64.
120. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:7408–13.
121. Gottwein JM, Scheel TK, Hoegh AM, Lademann JB, Eugen-Olsen J, Lisby G, et al. Robust hepatitis C genotype 3a cell culture releasing adapted intergenotypic 3a/2a (S52/JFH1) viruses. *Gastroenterology.* 2007;133:1614–26.
122. Yi M, Ma Y, Yates J, Lemon SM. Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus. *J Virol.* 2007;81:629–38.
123. Koutsoudakis G, Perez-del-Pulgar S, Coto-Llerena M, Gonzalez P, Dragun J, Mensa L, et al. Cell culture replication of a genotype 1b hepatitis C virus isolate cloned from a patient who underwent liver transplantation. *PLoS One.* 2011;6:e23587.
124. Schaller T, Appel N, Koutsoudakis G, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, et al. Analysis of hepatitis C virus superinfection exclusion by using novel fluorochrome gene-tagged viral genomes. *J Virol.* 2007;81:4591–603.
125. Edwards VC, Tarr AW, Urbanowicz RA, Ball JK. The role of neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. *J Gen Virol.* 2012;93:1–19.
126. Meunier JC, Engle RE, Faulk K, Zhao M, Bartosch B, Alter H, et al. Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:4560–5.
127. Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Lademann JB, Prentoe JC, Knudsen ML, 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.
128. Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang E, Tarr AW, Stamatakis Z, et al. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med.* 2008;14:25–7.
129. Meuleman P, Bukh J, Verhoye L, Farhoudi A, Vanwolleghem T, Wang RY, et al. In vivo evaluation of the cross-genotype neutralizing activity of polyclonal antibodies against hepatitis C virus. *Hepatology.* 2011;53:755–62.
130. Meuleman P, Hesselgesser J, Paulson M, Vanwolleghem T, Desombere I, Reiser H, et al. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology.* 2008;48:1761–8.
131. Syder AJ, Lee H, Zeisel MB, Grove J, Soulier E, Macdonald J, et al. Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *J Hepatol.* 2011;54:48–55.
132. Meuleman P, Catanese MT, Verhoye L, Desombere I, Farhoudi A, Jones CT, et al. A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *Hepatology.* 2012;55:364–72.
133. Fofana I, Fafi-Kremer S, Carolla P, Fauvelle C, Zahid MN, Turek M, et al. Mutations that alter use of hepatitis C virus cell entry factors mediate escape from neutralizing antibodies. *Gastroenterology.* 2012;143:223–33.
134. Poordad F, McCone Jr J, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med.* 2011;364:1195–206.
135. Membreno FE, Lawitz EJ. The HCV NS5B nucleoside and non-nucleoside inhibitors. *Clin Liver Dis.* 2011;15:611–26.
136. Kowdley KV, Lawitz E, Crespo I, Hassanein T, Davis M, DeMicco M, et al. ATOMIC: 97% RVR for PSI-7977 + PEG/RBV x 12 week regimen in HCV GT1: an end to response guided therapy? *J Hepatol.* 2012;56:S1.
137. Lawitz E, Gane EJ, Stedman C, Lalezari JP, Hassanein T, Kowdley KV, et al. PSI-7977 PROTON and ELECTRON: 100% concordance of SVR4 with SVR24 in HCV GT1, GT2 and GT3. *J Hepatol.* 2012;56:S4.
138. Gane EJ, Stedman CA, Hyland RH, Sorensen RD, Symonds WT, Hindes RG, et al. ELECTRON: Once daily PSI-7977 plus RBV in HCV GT1/2/3. *J Hepatol.* 2012;56:S438.
139. Einav S, Gerber D, Bryson PD, Sklan EH, Elazar M, Maerkl SJ, et al. Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nat Biotechnol.* 2008;26:1019–27.
140. Einav S, Sobol HD, Gehrig E, Glenn JS. The hepatitis C virus (HCV) NS4B RNA binding inhibitor clemizole is highly synergistic with HCV protease inhibitors. *J Infect Dis.* 2010;202:65–74.
141. Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature.* 2010;465:96–100.
142. Pol S, Ghalib RH, Rustgi VK, Martorell C, Everson GT, Tatum HA, et al. Daclatasvir for previously untreated chronic hepatitis C genotype-1 infection: a randomised, parallel-group, double-blind, placebo-controlled, dose-finding, phase 2 a trial. *Lancet Infect Dis.* 2012;12:671–7.

143. Paeshuyse J, Kaul A, De CE, Rosenwirth B, Dumont JM, Scalfaro P, et al. The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology*. 2006;43:761–70.
144. Coelmont L, Hanouille X, Chatterji U, Berger C, Snoeck J, Bobardt M, et al. DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A. *PLoS One*. 2010;5:e13687.
145. Flisiak R, Feinman SV, Jablkowski M, Horban A, Kryczka W, Pawlowska M, et al. The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFNalpha2a significantly reduces viral load in treatment-naive hepatitis C patients. *Hepatology*. 2009;49:1460–8.
146. Reesink HW, Janssen HLA, Zeuzem S, Lawitz E, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Final results -Randomized, double-blind, placebo-controlled safety, anti-viral proof-of-concept study of miravirsin, an oligonucleotide targeting miR122, in treatment naive patients with genotype 2 chronic HCV infection. *J Hepatol*. 2012;56:S26.
147. Targett-Adams P, Boulant S, Douglas MW, McLauchlan J. Lipid metabolism and HCV infection. *Viruses*. 2010;2:1195–217.
148. Kota S, Coito C, Mousseau G, Lavergne JP, Strosberg AD. Peptide inhibitors of hepatitis C virus core oligomerization and virus production. *J Gen Virol*. 2009;90:1319–28.
149. Ni F, Kota S, Takahashi V, Strosberg AD, Snyder JK. Potent inhibitors of hepatitis C core dimerization as new leads for anti-hepatitis C agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21:2198–202.
150. Kota S, Takahashi V, Ni F, Snyder JK, Strosberg AD. Direct binding of a hepatitis C virus inhibitor to the viral capsid protein. *PLoS One*. 2012;7:e32207.
151. Steinmann E, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses*. 2010;2:2078–95.
152. Tews BA, Popescu CI, Dubuisson J. Last stop before exit - hepatitis C assembly and release as antiviral drug targets. *Viruses*. 2010;2:1782–803.
153. Herker E, Harris C, Hernandez C, Carpentier A, Kaehlcke K, Rosenberg AR, et al. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med*. 2010;16:1295–8.
154. Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, Van PD, Wakita T, Chung RT, et al. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology*. 2008;47:1437–45.
155. Ikeda M, Abe K, Yamada M, Dansako H, Naka K, Kato N. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology*. 2006;44:117–25.
156. O'Leary JG, Chan JL, McMahon CM, Chung RT. Atorvastatin does not exhibit antiviral activity against HCV at conventional doses: a pilot clinical trial. *Hepatology*. 2007;45:895–8.
157. Bader T, Fazili J, Madhoun M, Aston C, Hughes D, Rizvi S, et al. Fluvastatin inhibits hepatitis C replication in humans. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:1383–9.
158. Forde KA, Law C, O'Flynn R, Kaplan DE. Do statins reduce hepatitis C RNA titers during routine clinical use? *World J Gastroenterol*. 2009;15:5020–7.