

Aus dem Institut für Virologie  
der Universität zu Köln  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Florian Klein

**Molekulare und strukturelle Charakteristika  
breitneutralisierender  
Hepatitis-C-Virus-Antikörper**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Julian Potthoff  
aus Bergisch Gladbach

promoviert am 26. September 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. F. Klein

2. Gutachter: Professor Dr. med. D. Nierhoff

3. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. C. Erhardt

**Erklärung:**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Prof. Dr. med. Florian Klein

Dr. rer. nat. Timm Peer Christopher Weber

sowie Unterstützung durch die Koautorinnen und Koautoren der vorgelegten Publikation.

Der wissenschaftliche Beitrag der Autoren, die zu der hier aufgeführten Publikation beigetragen haben, wird explizit in Kapitel 4.1 angegeben und stellt jeweils eine eigenständige wissenschaftliche Leistung dar.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten

Dissertationsschrift stehen. Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit von mir durchgeführten Experimente, sind nach entsprechender Anleitung durch Professor Klein von mir selbst geplant und durchgeführt worden.

Um eine bessere Lesbarkeit zu erreichen, wird in dieser Arbeit auf die gleichzeitige Verwendung weiblicher und männlicher Sprachformen verzichtet. Trotz Verwendung des generischen Maskulinums stehen sämtliche Personenbezeichnungen somit gleichermaßen für alle Geschlechter.

**Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:**

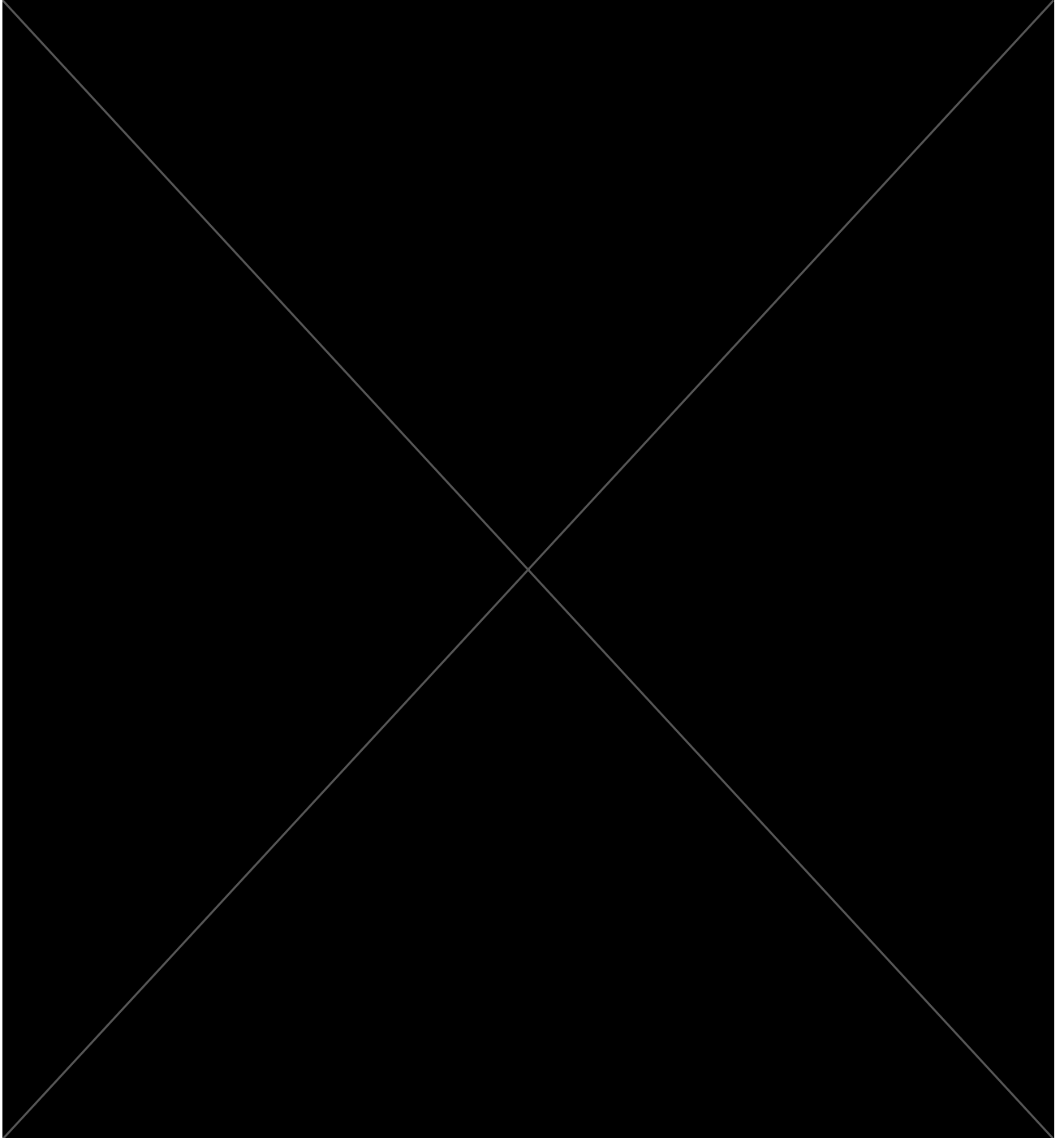
Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Kürten, den 31.01.2024

Unterschi

A black rectangular box with a white 'X' drawn across it, indicating a redacted signature. There is a faint blue scribble above the box.

# Danksagung



Widmung:

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>16</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>17</b>
1.1 Das Hepatitis-C-Virus	17
1.1.1 Epidemiologie und Übertragung	17
1.2 Pathologische Effekte der HCV-Infektion	19
1.2.1 Hepatische Manifestationen	19
1.3 Extrahepatische Manifestationen	20
1.3.1 Diagnose der HCV- Infektion	21
1.3.2 Therapie der HCV- Infektion	22
1.4 Virusbiologie und Lebenszyklus	22
1.4.1 Das HCV-Genom und seine Proteine	23
1.4.2 Der HCV-Partikel als Lipoviropartikel	25
1.4.3 Der Zelleintritt des Hepatitis-C-Virus	26
1.5 HCV Immunantwort und Immunevasion	29
1.6 Impfstoffentwicklung und Antikörper	30
1.7 Die Hüllproteine und ihre Epitope	33
1.7.1 Das Envelope Protein E1	34
1.7.2 Das Envelope Protein E2	34
1.7.3 Das Epitop AS 412	36

1.7.4	Das Front-Layer Epitop	36
1.7.5	Das E1/E2-Interface-Epitop	37
1.8	Fragestellungen dieser Arbeit	38
1.8.1	Literaturrecherche	38
1.8.2	Methodenauswahl und Zielsetzung	39
<b>2</b>	<b>Hauptteil: Publikation Immunity, 2022</b>	<b>42</b>
2.1	Supplemental Information	65
2.1.1	Supplementary Tables	65
2.1.2	Supplementary Figures	83
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>90</b>
3.1	Notwendigkeit eines HCV-Impfstoffes	90
3.2	Evaluation der Methodenauswahl	91
3.3	Ergebnisse des Serumscreenings	92
3.4	Mutationsmuster von HCV-bNAbs	92
3.5	Limitationen dieser Studie	95
3.5.1	Neutralisationsassay	96
3.5.2	Einfluss des Bait-Proteins	97
3.6	Ausblick	98
<b>4</b>	<b>Anhang</b>	<b>100</b>
4.1	Beitrag zur vorgelegten Publikation	100
4.2	Abbildungsverzeichnis	107
4.3	Tabellenverzeichnis	107

4.4	Literaturverzeichnis	109
4.5	Publikationen	120

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
A.F.	Andrew Flyak (Autor der Publikation)
AA	Amino acid / Aminosäure
Ab	Antibody
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure (ELISA-Reagenz)
AdCh3NSmut MVA- Nsmut	Chimpanzee Adenovirus 3 Nonstructural mutated Modified Vaccinia Ankara Nonstructural mutated
AIHA	Autoimmun-hämolytische Anämie
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
AS	Antigenic Site
B.L.	Bettina Langhans (Autorin der Publikation)
BIS	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Puffersubstanz)
bNAb	Broadly Neutralising Antibody / Breitneutralisierender Antikörper
BSA	Bovine Serum Albumin / Bovines Serumalbumin
BSA	Buried Surface Areas
C.K.	Christoph Kreer (Autor der Publikation)
CD (CD19, CD81)	Cluster of Differentiation / („Unterscheidungsgruppen“)
cDNA	complementary DNA / komplementäre DNA
CDR	Complementarity-Determining Regions / Komplementaritätsbestimmende Regionen
COVID-19	Coronavirus Disease 2019

CRC	Collaborative Research Centres (DFG)
Cys	Cystein
D.B.	Dorothea Bankwitz (Autorin der Publikation)
D.N.	Dirk Nierhoff (Autor der Publikation)
DAA	Direct Acting antivirals
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid (Bestandteil von Einfriermedium)
DNA	Deoxyribonucleic Acid / Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOE	Departement of Energy
DTT	Dithiothreitol
DZIF	Deutsches Zentrum für Infektionsforschung
E. Coli	Escherichia coli
E.K.	Elena Knops (Autorin der Publikation)
E1	Envelope Protein 1
E2	Envelope Protein 1
EC50	Half Maximal Effective Concentration
ecto	Ectodomain
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERC	European Research Council

EXC	Exzellenscluster
F.K.	Florian Klein (Autor der Publikation)
Fab	Fragment Antigen Binding / Fab-Fragment
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FWR	Framework Regions / Framework-Regionen
GAG	Glykosaminoglykane
GL	Germline / Keimbahn
GT	Genotyp
H.J.	Hanna Janicki (Autorin der Publikation)
HC	Heavychain / Schwere Kette
HCV	Hepatitis-C-Virus
HCVcc	Hepatitis-C-Virus-Cellculture Assay
HCVpp	Hepatitis-C-Virus-Pseudoparticle Assay
HDL	High Density Lipoprotein
HEK 293-6E	Zelllinien für AB Produktion (Human Embryonic Kidney)
Hep-2 assay	Hep-2 Cell Based Indirect Immunofluorescence Assay
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Puffersubstanz)
His-tag	Polyhistidin-Tag
HIV /HIV-1	Human Immunodeficiency Virus
HRP	horseradish peroxidase / Meerrettichperoxidase
Huh	Zelllinien für HCV-Zellkulturverfahren (Human Hepatoma)
HVR	Hyper Variable Region
ID	Identifizier / Identifikationsnummer

IgG	Immunglobulin G
IgH	Genlokus IgH (Schwere Kette)
IgK	Genlokus IgK (Kappa)
IgL	Genlokus IgL (Lambda)
IMGT	International ImMunoGeneTics Information System®
IRES	Internal Ribosomal Entry Site / Interne Ribosomale Eintrittsstelle
ITP	Immunthrombozytopenie
J.P.	Julian Potthoff (Autor der Publikation)
JFH-1	Zellkultur Virenstamm (Japanese Fulminant Hepatitis)
L.D.	Leona Dold (Autorin der Publikation)
L.G.	Lutz Gieselmann (Autor der Publikation)
L.S.	Luisa J. Ströh (Autorin der Publikation)
LC	Lightchain / Leichte Kette
LDL-R	Low Density Lipoprotein-Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
M.H.	Marcel Horning (Autor der Publikation)
M.L.	Maurice Labuhn (Autor der Publikation)
M.S.E.	Meryem S. Ercanoglu (Autorin der Publikation)
mAb	Monoclonal Antibody / Monoklonaler Antikörper
MEM NEAA	Minimum Essential Medium Non Essential Amino Acids
MID	Molecular Identifier
N.P.	Nico Pfeifer (Autor der Publikation)
Nab	Neutralising Antibody / Neutralisierender Antikörper

NGS	Next Generation Sequencing
NIGMS	National Institute of General Medical Sciences (USA)
NIH	National Institute of Health (USA)
NPC1L	Niemann-Pick C1-like Protein 1
NS (NS 2-5b)	Nonstructural Protein / Nichtstrukturprotein
ORF	Open Reading Frame / Offener Leserahmen
P.J.B.	Pamela J. Bjorkman (Autorin der Publikation)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell / Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate-Buffered Saline / Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphat gepuffertes Saline (PBS) mit Tween™ (Detergenz)
PCR	Polymerase Chain Reaction / Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
pIgG	Polyclonal Immunglobulin G / Polyklonales Immunglobulin G
R.K.	Rolf Kaiser (Autor der Publikation)
Rmsd	Root-Mean-Square Deviation
RNA	Ribonucleic Acid / Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S.B.	Sven Bizu (Autor der Publikation)
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus type 2
SCARB1	Scavenger Receptor Class B type 1
SD	Standard deviation / Standardabweichung

sec	Seconds / Sekunden
SEC	Size Exclusion Chromatography
SHIV	Simian-Human Immunodeficiency Virus
SLAC	Stanford Linear Accelerator Center
SLIC	Sequence and Ligation Independent Cloning
SRA	Sequence Read Archive
SSRL	Sstanford Synchrotron Radiation Lightsource
SVM	Support Vector Machine
T.K.	Thomas Krey (Autor der Publikation)
T.P.	Thomas Pietschmann (Autor der Publikation)
T.S.	Till Schoofs (Autor der Publikation)
T.W.	Timm Weber (Autor der Publikation)
TBS	Tris-buffered saline / TBS-Pufferlösung
Th	Threshold
TOPO	Topoisomerase-based cloning
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Pufferlösung)
TTU	Thematical Translational Units (DZIF)
U.S.	United States (of America)
U.S.	Ulrich Spengler (Autor der Publikation)
UMI	Unique Molecular Identifier
UTR	Untranslated Region / Untranslatierte Region
VR	Variable Region
WHO	World Health Organization / Weltgesundheitsorganisation

WHO-EMRO World Health Organization - Regional Office for the Eastern Mediterranean

WHO-EURO World Health Organization - Regional Office for Europe

## Zusammenfassung

Hepatitis C ist eine virale Leberentzündung, die durch eine Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) ausgelöst wird. Etwa ein Prozent der Weltbevölkerung ist chronisch mit dem Virus infiziert, das einen schwerwiegenden Einfluss auf Lebensqualität und -erwartung hat. Jährlich versterben weltweit etwa 400 000 Menschen an den Folgen dieser Infektion.

Jahrzehntelange Forschung führte schließlich zur Zulassung antiviraler Medikamente, die eine anhaltende virologische Unterdrückung der chronischen Infektion und somit erstmals eine zuverlässige Heilung ermöglichen. Diese Errungenschaften wurden im Jahr 2020 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin honoriert. Aufgrund niedriger Diagnoseraten und hoher Therapiekosten bleiben jedoch 98% der Infektionen unbehandelt. Die Entwicklung eines protektiven Impfstoffes ist bislang an der hohen genetischen Diversität und Mutationsrate des Erregers gescheitert.

In dieser Studie identifizierten wir innerhalb einer Kohorte chronisch Infizierter jene Individuen mit herausragender HCV-Serumneutralisation. Durch Analyse von 310 humanen, affinitätsgereiften monoklonalen Antikörpern (mAbs) aus dem Blut der Spender entschlüsselten wir molekulare Voraussetzungen einer breiten Antikörperantwort.

Hohe Neutralisationsraten wurden durch den Gebrauch des Gensegment 1-69 der schweren Kette und somatische Mutationen im Bereich der CDRH1 und CDRH2 vermittelt. Anhand von Strukturanalysen beschrieben wir die wichtige Rolle von Serin-Ersatzmutationen an den Positionen 30 und 31, sowie neutralen und hydrophoben Bereichen an der Spitze der CDRH3. Schließlich gelang es durch den Einsatz künstlicher Intelligenz einen *de novo* Antikörper zu generieren, der diese Erkenntnisse berücksichtigt und so mehrere Virus-Genotypen und Subtypen neutralisiert. Die Beschreibung der Charakteristika breitneutralisierender Antikörper (bNAbs) soll die Entwicklung neuer Impfstoffe anleiten.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Hepatitis-C-Virus

Das HCV ist ein Einzelstrang-RNA-Virus mit positiver Polarität (ss(+)RNA). Es bildet das Genus der Hepaciviridae innerhalb der Familie der Flaviviren. Das behüllte Virus zeichnet sich durch eine enorme genetische Diversität aus und wird derzeit in acht Genotypen (1-8) mit über 90 Subtypen unterteilt <sup>1,2</sup>. Zwischen den einzelnen Genotypen unterscheiden sich bis zu 33% der Nukleotide und auch intragenotypisch erreicht die Variabilität unter einzelnen Subtypen noch 25% <sup>3</sup>. Der Mensch ist das einzige bekannte natürliche Reservoir des HCV <sup>4</sup>.

### 1.1.1 Epidemiologie und Übertragung

Das HCV ist pandemisch verbreitet. Nach Schätzungen der WHO (World Health Organization) war mit 71 Millionen Menschen im Jahr 2015 etwa 1% der Weltbevölkerung chronisch mit HCV infiziert. Die Hälfte der Infizierten lebt in den Hochinzidenzländern China, Pakistan, Indien, Ägypten und Russland <sup>5</sup>. Die höchste Prävalenz erreicht die HCV-Infektion mit 2,3% der Gesamtbevölkerung im Mittleren Osten (WHO-Region EMRO) und einem Anteil von 1,5% in Europa (WHO Region EURO). Die Verteilung der einzelnen HCV-Genotypen stellt sich regional sehr heterogen dar. Während in Europa und Amerika bei den meisten Infektionen der Genotyp 1 einschließlich seiner Subtypen nachgewiesen wird, zirkulieren in Zentralafrika und dem Mittleren Osten vorrangig Subtypen des Genotyp 4. In Indien hingegen erreicht der Genotyp 3 die höchste Prävalenz. Global gesehen sind Genotyp 1 mit 44% und Genotyp 3 mit 25% die am häufigsten nachgewiesenen Virusvarianten <sup>5</sup>. Im Jahr 2015 kam es nach Schätzungen der WHO weltweit zu 1,75 Millionen Neuinfektionen mit dem HCV <sup>6</sup>.

Die Übertragung erfolgt maßgeblich über die parenterale Exposition zu virämischem Blut <sup>7</sup>. Der vorherrschende Übertragungsmodus unterscheidet sich in Abhängigkeit von den sozio-ökonomischen Verhältnissen des jeweiligen Landes. Seit den frühen 1990er Jahren ist in

Ländern mit hohem Einkommen der Gebrauch intravenöser Drogen und die damit verbundene Mehrfachnutzung von Injektionsnadeln der Hauptübertragungsweg der Infektion. Die Transfusion von Blut und Blutbestandteilen, die in früheren Jahren als Hauptrisikofaktor für eine Infektion galt, spielt in diesen Ländern seit der Implementierung effektiver Screening-Methoden heute eine untergeordnete Rolle<sup>6,8</sup>. In Ländern mit niedrigem Einkommen stellen jedoch unsichere Gesundheitsprodukte wie Bluttransfusionen nach wie vor den häufigsten Infektionsweg dar<sup>7,9</sup>. Bis heute führt die WHO 11 Länder auf, in denen die Überprüfung von Blutprodukten auf das HCV unzureichend ist, oder gänzlich unterbleibt<sup>10</sup>. Ein weiterer seltener Übertragungsweg ist die vertikale Übertragung durch Blutkontakt während der Geburt. Bei 5,8% aller Geburten einer HCV-positiven Mutter wird das Virus so vertikal auf das Kind übertragen. Hierbei haben Kinder, deren Mütter mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) koinfiziert sind, mit 10,8% eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit mit dem HCV infiziert zu werden<sup>11</sup>.

Die sexuelle Ansteckung stellt einen weiteren, selteneren Übertragungsweg dar. Während die Übertragung bei heterosexuellen Paaren mit 0,07% pro Jahr sehr selten ist, gilt Geschlechtsverkehr zwischen homosexuellen Männern als wichtiger Risikofaktor für eine Ansteckung mit dem HCV<sup>12</sup>. Insbesondere in dieser Risikogruppe erhöht eine Koinfektion mit HIV die Wahrscheinlichkeit der Übertragung signifikant<sup>13,14</sup>.

Im Jahr 2016 verstarben etwa 524 000 Menschen an den direkten und indirekten Folgen einer HCV-Infektion. Laut Modellierungen wird diese Zahl bis 2040 auf 839 000 ansteigen<sup>15</sup>. Damit setzt sich der Trend aus dem Zeitraum 1990 – 2013 fort, in dem die jährliche Mortalität bereits von 338 000 auf 484 000 angestiegen war<sup>16</sup>.

Erschwert durch den asymptomatischen Charakter der Hepatitis C wird weltweit nur etwa ein Fünftel der Infektionen diagnostiziert<sup>17</sup>. Von den Patienten mit gesichertem Infektionsstatus haben lediglich 15% Zugang zur effektiven DAA-Therapie. Seit Zulassung dieser Medikamente haben bis Ende des Jahres 2018 weltweit insgesamt 2,6 Millionen Menschen eine DAA-

Therapie erhalten <sup>17</sup>. Gemessen an der Inzidenz von 1,75 Millionen Neuinfektionen jährlich zeugen diese Zahlen von einem wachsenden globalen Infektionsgeschehen <sup>6</sup>.

## 1.2 Pathologische Effekte der HCV-Infektion

HCV gehört zu den Viren, die eine chronische Infektion aufrechterhalten können. Dabei verursacht es eine Bandbreite an Schäden. Diese lassen sich in die namensgebenden hepatischen Manifestationen und die oft weniger beachteten extrahepatischen Manifestationen unterteilen. Beide Kategorien beinhalten onkologische Erkrankungen und haben einen erheblichen Einfluss auf Lebensqualität- und -erwartung der Betroffenen.

### 1.2.1 Hepatische Manifestationen

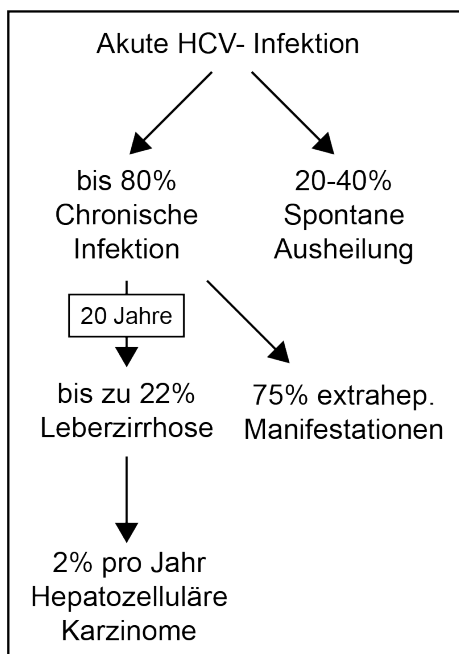
Die Hepatitis C ist eine virale Leberentzündung, die durch das HCV verursacht wird. Nach einer Inkubationszeit von bis zu 26 Wochen manifestiert sich zunächst eine akute Hepatitis, die bei über 75% der Patienten keinerlei Symptome verursacht <sup>18</sup>. Sie verläuft zumeist nicht ikterisch und ruft allenfalls unspezifische Symptome wie Fieber, Übelkeit oder Bauchschmerzen hervor <sup>19</sup>. Bei 20-40% der Infizierten kommt es bemerkenswerterweise zur spontanen Ausheilung der Hepatitis C <sup>20</sup>. Diese erfolgt mit höherer Wahrscheinlichkeit in der Frühphase der Erkrankung und ist signifikant häufiger bei Frauen zu beobachten <sup>21,22</sup>. Mit bis zu 80% entwickelt die überwiegende Mehrheit der Patienten jedoch eine chronische Hepatitis C (**Abbildung 1**)<sup>16,18</sup>.

Definitionsgemäß liegt eine chronische Hepatitis C vor, wenn der Nachweis viraler RNA im Blut länger als sechs Monate lang möglich ist <sup>23</sup>. Sie verläuft typischerweise ebenfalls symptomarm, wodurch die Diagnose und somit der Zugang zur Therapie erheblich erschwert wird <sup>24</sup>.

Häufig unbemerkt, verursacht die jahrelange, chronische Infektion eine fortschreitende Leberzellschädigung, die bei bis zu 22% der Patienten nach 20 Jahren zur Entwicklung einer

Leberzirrhose führt<sup>25</sup>. Der Verlauf der Hepatitis C ist interindividuell höchst unterschiedlich und wird von verschiedenen Risikofaktoren beeinflusst. Insbesondere ein höheres Alter, männliches Geschlecht, gesteigerter Alkoholkonsum und eine Koinfektion mit dem HIV beschleunigen die Progression der Erkrankung teils gravierend. Durch die progrediente Leberzerstörung entfaltet das HCV ebenfalls ein onkogenes Potential.

Eine HCV-Infektion gilt als Hauptrisikofaktor für die Entstehung des Hepatozellulären Karzinoms (HCC)<sup>23,26</sup>. So haben Patienten mit Hepatitis C induzierter Leberzirrhose ein jährliches Risiko von 2% an dem lebereigenen Tumor zu erkranken. Dieses onkogene Risiko persistiert sogar nach erfolgreicher Therapie der Infektion<sup>27</sup>. Die inoperable Organschädigung



**Abbildung 1: Verlauf einer HCV-Infektion**

und das karzinogene Potential machen die Hepatitis C weltweit zu einer führenden Indikation für Lebertransplantationen<sup>28</sup>.

### 1.3 Extrahepatische Manifestationen

Bis zu 75% der Infizierten sind von den vielfältigen extrahepatischen Manifestationen der HCV-Infektion betroffen<sup>18,29</sup>. Diese weniger bekannten Effekte beeinflussen die körperliche und psychische Gesundheit, womit sie nachweislich einen zusätzlichen schwerwiegenden Einfluss auf die Lebensqualität der Betroffenen haben<sup>18,30</sup>.

Zu den extrahepatischen Manifestationen zählen neben autoimmunologischen Phänomenen wie dem Sjögren- Syndrom auch Stoffwechselerkrankungen und onkologische Krankheitsbilder (**Tabelle 1**)<sup>29</sup>. Von besonderer Relevanz ist die Kryoglobulinämische Vaskulitis. Sie betrifft etwa 30% der HCV-Infizierten und ist damit die häufigste extrahepatische Manifestation<sup>30</sup>.

## Extrahepatische Manifestationen

Verschiedene Organbeeinträchtigungen	Zentrales Nervensystem	Depression Fatigue Kognitive Störung
	Herz	Erhöhtes kardiovaskuläres Risiko
	Endokrine Drüsen	Diabetes mellitus Typ II Hypothyreose
	Niere	Chronische Niereninsuffizienz Glomerulonephritis
	Haut	Lichen planus Porphyria cutanea tarda
	Autoimmunphänomene	Induktion von Autoantikörpern (Rheumafaktor, ANCA, Antikardiolipin, Antithyroid, Anti-smooth-muscle) Sjögren- Syndrom (Sicca- Syndrom)
	Blutbildung, Blut	Autoimmun-Zytopenien (ITP, AIHA) Monoklonale Gammopathie
Lymphoproliferative Erkrankungen		Lymphadenopathie Splenomegalie
	Kryoglobulinämische Vaskulitis	Membranoproliferative Glomerulonephritis Purpura Ulcerationen der Haut Arthralgien, Arthritis Periphere Neuropathie Lymphome

**Tabelle 1: Extrahepatische Manifestationen einer HCV-Infektion.**

Die chronische HCV-Infektion geht mit einer signifikanten Erhöhung des individuellen Krebsrisikos einher. Neben dem Risiko für lebereigene Tumoren (siehe 1.2.1) steigt insbesondere das Risiko für B-Zell-Lymphome deutlich an. In der Folge haben HCV-positive Patienten gegenüber der Normalbevölkerung ein 35-fach höheres Risiko an einem B-Non-Hodgkin-Lymphom zu erkranken<sup>29 31</sup>.

### 1.3.1 Diagnose der HCV- Infektion

Der indirekte serologische Nachweis der Infektion gelingt frühestens zwei und spätestens acht Wochen nach der Ansteckung<sup>32,33</sup>. Eine Untersuchung auf HCV-Antikörper eignet sich als Suchtest für eine Infektion. Zur Differenzierung zwischen einer aktiven oder ausgeheilten Infektion ist jedoch ein direkter Nukleinsäure Nachweis unerlässlich.

Spätestens zwei Wochen nach der Ansteckung ist die virale RNA durch RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) im Serum des Patienten feststellbar. Dieser Nachweis gilt als Goldstandard der Diagnosesicherung. Die Durchführung ist allerdings kostspielig und setzt eine hohe technische Expertise voraus. Bis zur Etablierung pangentypischer Therapieregime war die Sequenzierung der nachgewiesenen Isolate notwendig, wodurch zusätzliche Kosten entstehen.

### **1.3.2 Therapie der HCV- Infektion**

Die Einführung direkt antiviral wirksamer Substanzen (engl.: Direct-Acting Antivirals – DAAs) läutete eine Revolution in der Therapie der Hepatitis C ein. Seither gelten die zuvor standardmäßig angewendeten Interferon basierten Therapieregime angesichts der zahlreichen und häufig auftretenden Nebenwirkungen, bei gleichzeitig niedrigen Erfolgsaussichten als obsolet. Heute ist die Erkrankung durch die orale DAA-Therapie nebenwirkungsarm und verlässlich mit Heilungsraten von über 90% möglich <sup>34 35</sup>.

Die hohen Kosten der Wirkstoffe limitieren jedoch bis heute deren Erfolg im Einsatz in den einkommensschwachen Hochprävalenzgebieten. Weltweit verbleiben zudem Risikogruppen wie Gefängnisinsassen und Drogenabhängige aufgrund der geschilderten Problematik unterversorgt <sup>17,36</sup>.

## **1.4 Virusbiologie und Lebenszyklus**

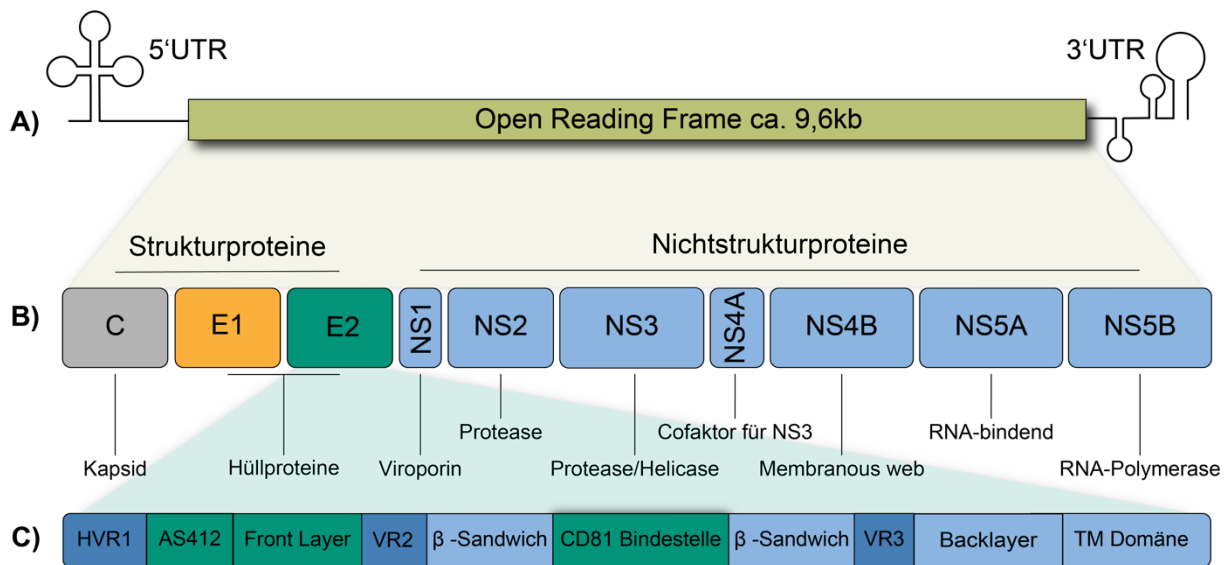
Ein detailliertes Verständnis der komplexen Virusbiologie des HCV ist ein notwendiges Kriterium zur Etablierung von Therapien und Impfstoffen. Aus diesem Wissen lassen sich Ansatzpunkte und mögliche Hindernisse dieser Vorhaben ableiten. Die zahlreichen Fluchtmutationen sind neben anderen Faktoren ein zentraler Mechanismus der HCV-Immunevasion und sollen im Folgenden dargestellt werden.

### 1.4.1 Das HCV-Genom und seine Proteine

Das Genom eines HCV-Partikels hat eine Länge von etwa 9,6 kb und liegt als RNA-Einzelstrang positiver Polarität vor. Es enthält einen singulären, offenen Leserahmen (ORF), der an beiden Enden durch untranslatierte Regionen (UTR) flankiert wird (**Abbildung 2A**), die als Cis-Elemente ebenfalls in die Replikation eingreifen<sup>37</sup>. Am 5' Ende fungiert die 340 Nukleotide messende UTR als Internal Ribosome Entry Site und vermittelt den Eintritt ins Ribosom. Die UTR des 3' Endes enthält genetisch konservierte Abschnitte um die RNA-Polymerase des HCV zu dirigieren.<sup>38</sup>

Die Translation des ORF führt zur Produktion eines vorläufigen Polyproteins mit einer Länge von etwa 3000 Aminosäuren. Dieses wird durch virale und wirtseigene Proteasen prozessiert und bringt drei Strukturproteine und sieben Nicht-Strukturproteine hervor<sup>39</sup> (**Abbildung 2B**).

Das Strukturprotein „Core“ bildet im späteren Virion das Kapsid. Es umhüllt die RNA und vermittelt den Kontakt zur Lipiddoppelmembran, die von den Wirtszellen abgeschnürt wird. Darin eingebettet liegen die Envelope Proteine E1 und E2, deren Funktion die Interaktion mit den wirtseigenen Zelloberflächenproteinen ist, wodurch die Endozytose des Virions vermittelt wird.



**Abbildung 2: Das virale Genom und seine Proteine**

Das Genom beinhaltet einen einzigen für das virale Polyprotein codierenden open reading frame. Er wird von zwei untranslatierten Regionen – UTRs flankiert.

**(A)** Die Proteine des viralen Polyproteins und deren Funktionen. Die Strukturproteine Core - C, Envelope – E1 und E2. Nicht-Strukturproteine NS1 bis NS5B.

**(B)** Das Envelope Protein E2 mit seinen Untereinheiten. Variable Regionen in grün: hypervariable region 1 – HVR1, VR2, VR3. In hellblau strukturebende Elemente: Front layer, und Back layer.  $\beta$ -Sandwiches, die Transmembran - TM Domäne und farblich hervorgehoben die CD81 Bindestelle sowie AS421 antigenic site 412

Die Nichtstrukturproteine (NS1-5B) haben vielfältige Aufgaben in der Virusreplikation **(Abbildung 2B)**. Das Nichtstrukturprotein NS1 enthält das Viroporin p7, ein Protonenkanal-Hexamer, dessen Aufgabe eine Anpassung des niedrigen pH-Wertes des Endoplasmatischen Retikulums ist, um so die empfindlichen viralen Glykoproteine E1 und E2 zu schützen<sup>39-41</sup>. NS2 und NS3 dienen als Proteasen und Autoproteasen der Prozessierung des viralen Polyproteins. NS3 enthält zusätzlich eine Helikase-Domäne, wobei NS4A dieser als Cofaktor dient. Die Vervielfältigung der viralen RNA findet in Konvoluten der Zellmembran statt, die als „Membranous-Web“ bezeichnet werden<sup>39</sup>. Das virale Nichtstrukturprotein NS4B induziert

diese Membranveränderungen und dient dem Replikationskomplex mit vier Transmembrandomänen als Anker. Zur Replikation seiner Erbinformation benötigt das Virus die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B.

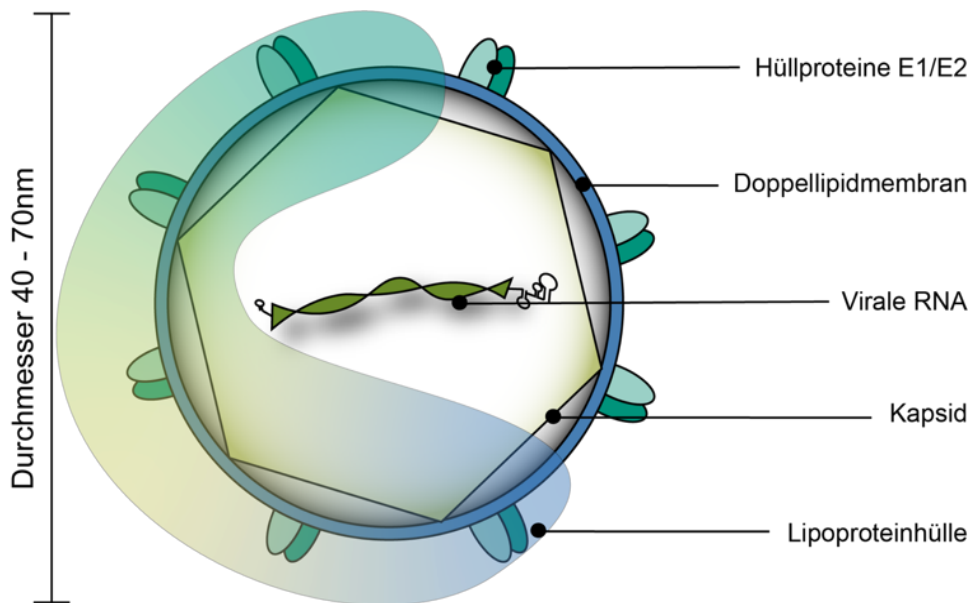
Das Enzym kann sowohl positiv als auch negativ orientierte RNA-Stränge vervielfältigen, wobei das Verhältnis durch die 3'UTR reguliert wird. Diese bildet im negativ-Strang, der als Matrize dient, eine Haarnadelstruktur, wodurch die Synthese von positiv-Strängen hochreguliert wird <sup>42</sup>. Diese wiederum dienen als Ausgangspunkt zur Produktion neuer Virionen. Die virale Polymerase synthetisiert dabei ohne Proof-reading-Funktion, was die massenhafte Produktion fehlerhafter Gen-Kopien und somit der Bildung von Quasispezies zur Folge hat <sup>43</sup>. Als Quasispezies bezeichnet man Virionen die sich von einer Stammsequenz ableiten, sich jedoch genetisch unterscheiden. Die daraus resultierende Variabilität des Genoms ist in den Envelope Proteinen, betont in den Hypervariablen Regionen (HVR1, VR2-3) (**Abbildung 2C**), besonders ausgeprägt. Gerade diese genetische Vielfalt ermöglicht dem Virus Flucht-Mutationen zur Umgehung der spezifischen Immunantwort und ist maßgeblicher Faktor der viralen Immunevasion <sup>44,45</sup>. Mathematische Modellierungen zeigen, dass aufgrund der hohen Mutationsquote und bei einer Replikationsrate von etwa  $10^{11}$  Virionen/Tag jede denkbare Variante täglich produziert wird <sup>46</sup>.

#### 1.4.2 Der HCV-Partikel als Lipoviropartikel

Ein Viruspartikel des HCV hat einen Durchmesser von 40-70nm. Die virale RNA im Kern des Partikels wird vom Kapsid umgeben, welches wiederum von einer Lipiddoppelmembran bedeckt ist, die der Wirtszelle entstammt. Eingebettet in dieser Membran liegen ausschließlich die Oberflächenproteine E1 und E2 (**Abbildung 3**). Der Lebenszyklus des HCV ist, wie der anderer Flaviviren, eng mit dem zellulären Fettstoffwechsel verbunden <sup>47,48</sup>. Bereits wenige Jahre nach seiner Entdeckung wies man im Rahmen von Zentrifugationsstudien virale RNA in der low-density Fraktion des Serums nach. Zudem ließ sich die Erbinformation nicht nur mittels

Anti-IgG-Antikörpern, sondern ebenso mittels Apolipoprotein-B-Antiserum aus dem Blut isolieren und vermehren<sup>49</sup>.

Diese und darauffolgende Studien führten zur Erkenntnis, dass die Virionen im Blut gebunden an Lipoproteine, als sogenannte Lipoviropartikel (**Abbildung 3**) flottieren<sup>50</sup>.



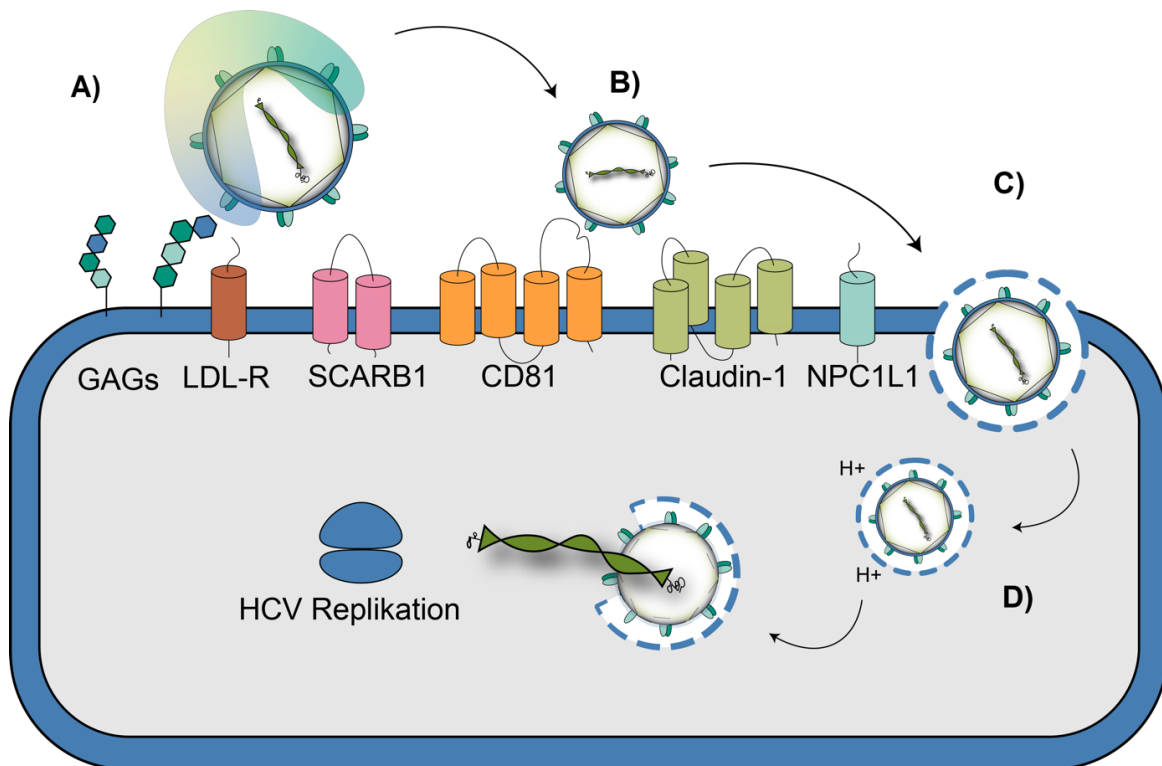
**Abbildung 3: Schematische Darstellung eines HCV-Lipoviropartikels**

Die Virusmembran und darin eingelagerte Envelope Proteine sind demnach von außen mit Lipoproteinen bedeckt, sodass mögliche Epitope auf deren Oberfläche vor Zugriff durch das Immunsystem geschützt werden<sup>45,51</sup>.

### 1.4.3 Der Zelleintritt des Hepatitis-C-Virus

Der Zelleintritt des HCV in die Hepatozyten ist ein komplexer Prozess, bei dem eine Reihe von Wirtsmolekülen involviert ist. Neben dem HDL-Rezeptor (High Density Lipoprotein) Scavenger Rezeptor B1 (SCARB1) spielt das Tetraspanin CD81(Cluster of Differentiation 81) eine zentrale Rolle<sup>52,53</sup>.

Der initiale Kontakt der viralen Envelope Proteine zur Zelloberfläche wird über Glykosaminoglykane, den low-density-Lipoprotein Rezeptor (LDL-R) und SCARB1 vermittelt (**Abbildung 4A**). Hierdurch kommt es innerhalb des viralen Oberflächenprotein zu einer Konformationsänderung, wodurch die CD81-Bindestelle freigegeben wird. Die Bindung von HCV und CD81 induziert schließlich eine Signalkaskade, welche eine Wanderung des nun adhären Virus zur lateralen Zellmembran zur Folge hat (**Abbildung 4B**). Dort angekommen trifft der HCV -CD81-Komplex auf das Tight-junction-Protein Claudin-1, wodurch die Clathrin-vermittelte-Endozytose und somit der Zelleintritt des Virus eingeleitet wird (**Abbildung 4C**)<sup>53</sup>. Im sauren Milieu des Vesikels fusioniert die virale mit der endosomalen Membran (**Abbildung 4D**). So gelangt die ss(+)-RNA des Virus ins Zytosol und kann dort, gebunden an Lipidtropfen, sogenannten Lipid droplets abgelesen und repliziert werden<sup>39</sup>.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des viralen Zelleintritts**

- (A)** Der im Blut flottierende Lipoviruspartikel nimmt über Glykosaminoglykane (GAGs), den LDL-Rezeptor (LDL-R) und den HDL-Rezeptor SCARB1 Kontakt zur Zelloberfläche auf. Durch den Kontakt wird die CD81-Bindestelle auf dem Oberflächenprotein E2 freigegeben.
- (B)** Die Bindung von CD81 löst eine Signalkaskade aus, die zur Lateralisierung des adhärenen Viruspartikel führt. Hier angekommen kommt es zur Bindung an Claudin-1.
- (C)** Clathrin-vermittelte Endozytose des Virus-Rezeptor-Komplexes.
- (D)** Der niedrige pH-Wert im Zellinneren führt zur Fusion des Endosoms mit der Virusmembran, wodurch die Virus RNA ins Zytosol gelangt und repliziert werden kann.

## 1.5 HCV Immunantwort und Immunevasion

Die Fähigkeit die spezifische Immunantwort zu überwinden, ermöglicht es dem HCV eine chronische Infektion zu etablieren. Diese hat eine fortschreitende Zerstörung des Leberparenchyms zur Folge<sup>18</sup>. Von besonderem Interesse für die Untersuchung der HCV-Immunantwort ist die Tatsache, dass es einigen Individuen gelingt, eine erfolgreiche Immunabwehr aufzubauen und die Infektion spontan zu heilen. Doch selbst die spontane Ausheilung induziert keine sterile Immunität gegenüber Reinfektionen, scheint aber eine „partielle Immunität“ zu gewähren<sup>54,55</sup>. So sind im Falle einer Reinfektion weniger HCV-RNA-Kopien im Blut nachweisbar und die Infektion heilt in 83% der Fälle erneut und damit signifikant häufiger aus als es bei der Primärinfektionen der Fall ist<sup>55,56</sup>.

Erste Studien an Schimpansen zeigten, dass die spontane Ausheilung der Hepatitis C mit der Induktion einer HCV-spezifischen T-Zellantwort assoziiert zu sein scheint. Tiere, deren CD4+ T-Helferzellen man ausschaltete, entwickelten zudem häufiger eine chronische Virämie<sup>57,58</sup>. Diese Erkenntnisse werden durch Beobachtungen gestützt, wonach Koinfektionen mit dem HIV einen fulminanten Verlauf der Hepatitis-C verursachen<sup>59</sup>.

Der Beitrag von neutralisierenden Antikörpern (nAb) zur erfolgreichen Immunantwort blieb hingegen lange unklar. Dies lässt sich in Teilen auf methodische Einschränkungen bei der Erforschung der HCV-Antikörperreaktion zurückführen<sup>60</sup>. Zunächst schien die HCV-Antikörperantwort für die spontane Ausheilung im Tiermodell ebenso vernachlässigbar zu sein, wie für eine erfolgreiche, interferonbasierte Therapie infizierter Menschen<sup>61-63</sup>.

Nach methodischen Verbesserungen konnte schließlich nachgewiesen werden, dass die frühzeitige Induktion HCV neutralisierender Antikörper mit der spontanen Genesung assoziiert ist. Insbesondere das frühe Auftreten von Antikörpern gegen die HVR1 im Envelope Protein E2 steht nachweislich mit einer frühen spontanen Ausheilung in Verbindung<sup>64</sup>.

## 1.6 Impfstoffentwicklung und Antikörper

Nach zahlreichen Rückschlägen wurde der Versuch, einen protektiv wirksamen Impfstoff gegen HCV zu entwickeln, nahezu aufgegeben. Im Jahr 2023 sind lediglich drei aktive, klinische HCV-Impfstoffstudien gemeldet, während für das aufgrund der genetischen Diversität und der chronischen Virämie vergleichbare HIV über fünfzig solcher Studien registriert sind <sup>65</sup>.

Zuletzt lag die Hoffnung auf therapeutischen, T-Zell basierten Impfstoffen (**Tabelle 2**), deren Ziel nicht die Immunität gegen die primäre Infektion, sondern die Verhinderung chronischer Verläufe ist <sup>66</sup>. In einer lang erwarteten randomisierten Studie verfehlte der aussichtsreichste Kandidat AdCh3NSmut MVA-NSmut jedoch dieses Ziel und stellte das bis dato vielversprechende Konzept der therapeutischen HCV-Impfung infrage <sup>67</sup>.

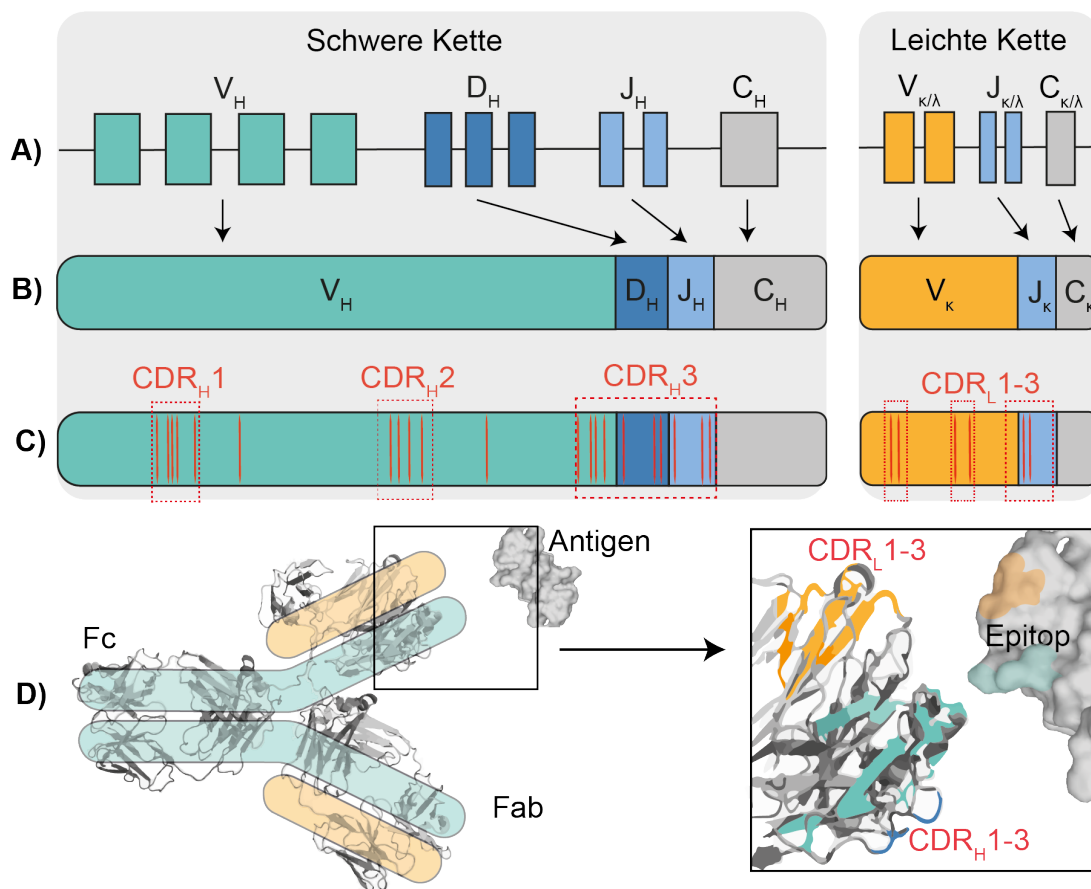
Ansatz	Wirkung	Immunogen	Mechanismus	Fortschritt	Status	Ref.
Protein-Impfstoffe	Prophylaktisch	E1E2	Antikörper	Schimpansen	Veröffentlicht	68,69
		E1E2 (Cenv3)	Antikörper	Phase I	Unbekannt	NCT01718834
		E1E2-MF59C.1	Antikörper	Phase I	Veröffentlicht	70,71
		Core-iscomatrixTM	Antikörper	Phase I	Veröffentlicht	72
	Therapeutisch	E1E2 (Cenv3)	Antikörper	Phase II	Veröffentlicht	73
		IC41- poly-L-Arginin	T-Zell- Immunität	Phase I/II	Veröffentlicht	74–76
		IC41-Imiquimod	T-Zell- Immunität	Phase II	Veröffentlicht	77
		IC41	T-Zell- Immunität	Phase II	Abgeschlossen	NCT00601770
Viralen Vektor	Prophylaktisch	Ad6NSmut DNA-NSmut	T-Zell- Immunität	Schimpansen	Veröffentlicht	78
		Ad6NSmut ChAd3NSmut	T-Zell- Immunität	Phase I	Veröffentlicht	79
	Therapeutisch	AdCh3NSmut MVA-NSmut	T-Zell- Immunität	Phase I/II	Veröffentlicht	67
		TG4040	T-Zell- Immunität	Phase I	Veröffentlicht	80
		TG4040 + SOC	T-Zell- Immunität	Phase II	Veröffentlicht	81
		Ad6NSmut ChAd3NSmut	T-Zell- Immunität	Phase I	Veröffentlicht	82
		Ad6NSmut MVA-Nsmut + SOC	T-Zell- Immunität	Phase I	Veröffentlicht	83
DNA-Vektor	Prophyl.	E2	Antikörper	Schimpansen	Veröffentlicht	84
	Therapeutisch	Core E1E2 (CIGB-230)	Antikörper	Phase II	Veröffentlicht	85
		NS3/4A (ChronVac-C)	T-Zell- Immunität	Phase II	Unbekannt	NCT01335711
HCV-LP	Prophyl.	Core E1E2	T-Zell- Immunität	Schimpansen	Veröffentlicht	86

**Tabelle 2: Darstellung verschiedener Ansätze von Impfstoffstudien**

Tabelle vgl. <sup>65,87</sup>

Die entscheidende Wirkebene aller bislang zugelassenen, präventiven Impfstoffe ist die B-Zell-vermittelte Antikörperantwort <sup>88,89</sup>. Antikörper (Ab) sind hochspezialisierte Immunglobuline der spezifischen Immunabwehr, deren Tetramere aus jeweils zwei schweren (englisch heavy chain, Abk. H und HC) und leichten Ketten (englisch light chain, Abk. L und LC) bestehen. An der Basis der Y-förmigen Quartärstruktur bilden die genetisch konstanten Regionen der

schweren Ketten die Fc-Domäne (**Abbildung 5D**). An den gegenüberliegenden Enden entsteht durch die Faltung und Verbindung der variablen Regionen die genetische Diversität, die es ermöglicht verschiedenste Epitope zu binden. Dies wird zum einen durch die V(D)J-Rekombination (**Abbildung 5B**), und zum anderen durch die somatische Hypermutation (**Abbildung 5C**) erreicht. Durch diesen Prozess kann HCV am Zelleitritt und der Replikation gehindert werden, was als Neutralisation bezeichnet wird. Der Kontakt zum jeweiligen Epitop wird durch die Complementarity-determining Regions (CDR) vermittelt, in denen besonders häufig somatische Mutationen auftreten. (**Abbildung 5C und 5D**)



**Abbildung 5: V(D)J-Rekombination, somatische Hypermutation und Opsonierung.**

- (A) Der B-Zellrezeptor und spätere Antikörper besteht aus einer schweren und leichten Kette (engl. Heavy (H) und light (L) chain). Auf Seiten der schweren Kette stehen für die Bildung 56  $V_H$ , 23  $D_H$  und 6  $J_H$ -Genabschnitte zur Verfügung. Zur Bildung einer leichten Kette unterscheiden sich Lambda( $\lambda$ )- und Kappa( $\kappa$ )-Genlokus. Mit 33  $V_\lambda$  und 5  $J_\lambda$  gegenüber 41  $V_\kappa$  und 5  $J_\kappa$ .
- (B) V(D)J-Rekombination. Zur Bildung der beiden Ketten findet jeweils ein Genabschnitt Verwendung. Darauf folgt der dazugehörige  $C_H$ ,  $C_K$  oder  $C_\lambda$ -Abschnitt.

- (C) Somatische Hypermutation. Zur weiteren Affinitätsreifung kommt es durch die somatische Hypermutation. Insbesondere innerhalb der CDR werden vermittelt durch die AID (activation-induced-deaminase) Mutationen eingefügt. Vereinzelt findet auch in den dazwischenliegenden Framework-Segmenten statt.
  
- (D) Die Proteinfaltung wird durch V(D)J-Rekombination und Somatische Hypermutation beeinflusst und resultiert in einzigartigen B-Zell-Rezeptoren. Durch verschiedene nicht-kovalente Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen) wird eine unter physiologischen Bedingungen irreversible Bindung des Epitops erreicht.

Aufgrund der genetischen Variabilität der HCV-Oberflächenproteine ist es unabdingbar, dass eine breite Antikörperantwort induziert wird, die idealerweise alle Genotypen und deren Subgruppen erfasst. Der Fokus der Impfstoffforschung liegt daher auf der strukturbasierten Erforschung sogenannter breitneutralisierender Antikörper, die im Gegensatz zu den subtypspezifisch neutralisierenden, meist HVR1-gerichteten Antikörpern, eine Schutzwirkung gegen eine breite Anzahl von Virusstämmen gewähren<sup>90-92</sup>. Die immunologische Erforschung von HCV-bNAbs wird allerdings durch komplexe in-vitro-Modelle und das Fehlen belastbarer Tiermodelle erheblich erschwert<sup>93,94</sup>. Nichtsdestotrotz gelang es in den vergangenen Jahren zahlreiche HCV-bNAbs und deren Epitope zu identifizieren<sup>95</sup>. Die Epitope dieser Antikörper liegen in genetisch konservierten Bereichen der Envelopeproteine E1 und E2. Fluchtmutationen innerhalb dieser Epitope sind mit einer Einbuße der viralen Infektiosität verbunden, weil hierdurch die Fähigkeit zum Zelleintritt beeinträchtigt wird.

## 1.7 Die Hüllproteine und ihre Epitope

Die Strukturproteine E1 und E2 bilden ein non-kovalent stabilisiertes Heterodimer und sind jeweils mit einer Transmembrandomäne am C-Terminus verankert und somit als Typ-I Transmembranproteine klassifiziert<sup>96,97</sup>. Der Proteinkomplex liegt eingebettet in der viralen Oberflächenmembran und befähigt das Virus Kontakt zur Wirtszelle herzustellen, um mittels Endozytose aufgenommen zu werden<sup>98</sup>. Dies macht die beiden Glykoproteine zu den einzig

möglichen Zielstrukturen neutralisierender Antikörper, die das Virus vom Zelleintritt abhalten können.

Die Entschlüsselung der komplexen Proteinstruktur stellt sich bis heute als technisch höchst anspruchsvoll dar. Nachdem im Jahr 2013 erstmals die Kristallstruktur der E2-Ektodomäne im Komplex mit dem Antikörper AR3C Einblicke in die Proteinstruktur gewährte, gelang es erst im Jahr 2022 eine Kristallstruktur des gesamten Dimers abzubilden <sup>99,100</sup>.

### 1.7.1 Das Envelope Protein E1

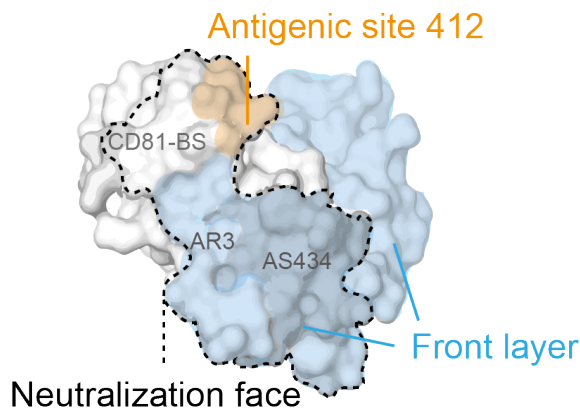
Neben der C-terminalen Transmembrandomäne enthält das Glykoprotein E1 einen konservierten Bereich zur Fusion mit E2 sowie eine N-terminale Domäne. Untersuchungen am prototypischen Isolat H77 des Genotyps 1a zeigten, dass E1 ebenso wie sein Fusionspartner hochgradig glykosyliert ist. E1 weist je nach Genotyp vier bis fünf N-Glykosylierungen auf, die zur Proteinfaltung beitragen <sup>96</sup>. E1 ist weitaus weniger immunogen als E2 und dient nur wenigen bekannten neutralisierenden Antikörpern als Zielstruktur. Die Funktion von E1 bei Bindung und Zelleintritt wird als modulierend beschrieben und ist bis heute unzureichend aufgeklärt <sup>101</sup>.

### 1.7.2 Das Envelope Protein E2

Von besonderer Relevanz für die immunologische Forschung ist das Glykoprotein E2, das den Zellkontakt und somit den Zelleintritt des Virus vermittelt. Das Protein unterliegt ebenfalls einer starken posttranslationalen Modifikation und weist bis zu 11 N-Glykosylierungen auf. Diese zahlreichen Glykane („Glycan Face“) schützen das Virus vor Zugriff durch die spezifische Immunabwehr und sind ein weiterer Mechanismus der Immunevasion <sup>102</sup>.

E2 ist durch eine exorbitante genetische Variabilität gekennzeichnet, die vor allem in der HVR1, sowie den variablen Regionen 1 und 2 (VR2, VR3) (**Abbildung 2C**) Ausdruck findet.

Insbesondere die HVR1 ist sehr immunogen und präsentiert dem Immunsystem als „Köder-Epitop“ stetig neue Zielstrukturen, wodurch die Immunantwort von konservierten Bereichen



**Abbildung 6: Neutralization face und Epitope**

Die Neutralization face und ihre dazugehörigen, teils überlappende Epitope auf E2 des Isolats H77c. Antigenic site 412 in grün, das front-layer-Epitop in blau. Sie enthält die CD-81 Bindestelle (CD81-BS). Ebenfalls markiert sind die Bindungsorte AR3 und AS434 innerhalb des Front-layer-Epitops. Nicht dargestellt ist das E1/E2-Interface-Epitop. Abbildung vgl.<sup>103</sup>

der Proteinkette abgelenkt, und die Induktion (breit-)neutralisierender Antikörper verhindert wird<sup>104</sup>. Darüber hinaus werden wichtige Epitope räumlich durch das strukturelle Korrelat der HVR1 verdeckt<sup>105,106</sup>.

Im Kontrast zu den variablen Bereichen steht die, für den viralen Lebenszyklus essenzielle CD81-Bindestelle, die aus dem Front Layer und dem CD81-Binding-Loop gebildet wird. Durch ELISA-Epitopkartierung (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) und Kristallstrukturen der E2-Ectodomäne konnte hier die immunogene Neutralization Face (zu deutsch etwa: Neutralisierungsfläche) identifiziert werden<sup>107</sup>. Diese hydrophobe Fläche enthält die genetisch konservierten Abschnitte der CD81-Bindestelle (**Abbildung 6**), deren Blockade der entscheidende Mechanismus zur Neutralisierung des Erregers zu sein scheint<sup>108</sup>. Auf E2 wurden von unterschiedlichen Forschungsgruppen teils überlappende Epitope identifiziert. Dies resultiert in einer uneinheitlichen Nomenklatur. Die Nummerierung von Aminosäuren

orientiert sich hierbei zumeist am prototypischen GT 1a-Isolat H77c, dessen Kristallstruktur in Komplex mit dem Antikörper AR3C 2013 veröffentlicht wurde <sup>99</sup>.

### 1.7.3 Das Epitop AS 412

Die Antigenic Site 412 (AS412) ist ein lineares Epitop im N-terminalen Abschnitt der Neutralizing face (**Abbildung 6**). In ihr findet sich ein strukturell flexibles Epitop, welches in drei Konformationen vorliegen kann und dadurch weniger immunogen zu sein scheint <sup>109</sup>. Wahrscheinlich ist die strukturelle Flexibilität der Grund dafür, dass AS412-Antikörper selten isoliert werden. Beispiele für die kleine Gruppe der bislang isolierten AS412 gerichteten bNAbs sind AP33 und HCV1, die aus Mäusen, bzw. aus humanisierten Mäusen stammen.

Bemerkenswerterweise wurde bislang kein humaner AS412 gerichteter Antikörper mit natürlicher Paarung der schweren und leichten Kette identifiziert, was die Bedeutung dieses Epitops schmälert.

### 1.7.4 Das Front-Layer Epitop

Das Front Layer Epitop auf der Vorderseite von E2 wird durch den gleichnamigen Genabschnitt gebildet (**Abbildung 2C**), und lässt sich in die teils überlappenden Bereiche AR3 (**Abbildung 6**), Domain B und Domain C unterteilen. Die potentesten aller bislang isolierten bNAbs binden das Front Layer-Epitop. Auffällig ist eine deutliche Überrepräsentation des V<sub>H</sub>-Gens 1-69 bei Front-layer-bNAbs (**Tabelle 3**). Mit seiner hydrophoben Endung im Bereich der CDR<sub>H2</sub> spricht die Nutzung von V<sub>H</sub> 1-69 für eine besondere Rolle hydrophober Wechselwirkungen bei der Bindung des Epitops. Das V<sub>H</sub>-Gen 1-69 ist ebenso ein wichtiger Keimbahnvorläufer für Influenza- und HIV- bNAbs, bei denen vergleichbare Bindungscharakteristika vorliegen <sup>110</sup>.

Die Frontlayer-bNAbs HEPC3 und HEPC74 wurden aus Individuen isoliert, die zuvor eine Hepatitis C spontan ausgeheilt hatten und teilen sich diese Bindungscharakteristika mit dem

zuvor beschriebenen bNAbs AR3C (**Tabelle 3**)<sup>109</sup>. Strukturanalysen konnten zeigen, dass ein Disulfid-Bindungs-Muster im D<sub>H</sub>-kodierten Teil der CDR<sub>H3</sub> essenziell für die Bindung dieser Antikörper ist<sup>111</sup>.

Durch die Immunisierung mit einem rekombinanten E1E2 Immunogen konnte im Tiermodell eine vielversprechende breitneutralisierende Immunantwort erzielt werden. Die potentesten Serumproben dieser Studie zielten auf das Front Layer Epitop und seine Untereinheiten<sup>112</sup>. Somit ist dieses Epitop für die Impfstoffentwicklung von großem Interesse.

	Epitop	Antikörper	Herkunft	V <sub>H</sub> -Gen	Referenz
CD-81 Bindestelle	AS 412	HC33.8	Hefe/Phagen-Display	3-23	113
		HCV-1	Chimärer mAb	3-33	114
		AP33	Muriner mAb	murin	115
	Front Layer	HEPC3	Single-Cell-Cloning	1-69	116
		HEPC74	Single-Cell-Cloning	1-69	116
		AR3C*	Hefe/Phagen-Display	1-69	117
		HC84.27	Hefe/Phagen-Display	1-69	118
	E1/E2-Interface	AR4A*	Hefe/Phagen-Display	1-69	119
AR5A*		Hefe/Phagen-Display	1-69	119	

\*Antikörper stammen vom selben Spender

**Tabelle 3: Auswahl vorbeschriebener HCV-bNAbs**

Antikörper sortiert nach Bindungsort mit Angabe der Isolationsmethode, des verwendeten V<sub>H</sub>-Gens und der Erstpublikation. Insbesondere bei front-layer-bindenden bNAbs ist eine Überrepräsentation von V<sub>H</sub>-1-69 festzustellen. Die wenigsten Antikörper weisen ihre natürliche Quartärstruktur auf. Tabelle Vgl.<sup>95</sup>

### 1.7.5 Das E1/E2-Interface-Epitop

Das E1/E2 Interface ist ein kaum untersuchtes Epitop am Interaktionsort der Proteinketten. Der hier bindende, breitneutralisierende Antikörper AR4A verknüpft nur membrangebundene Dimere des Proteinkomplexes E1/E2<sup>120</sup>. Neusten Erkenntnissen zufolge scheint jedoch ausschließlich ein AR4A-E2 Kontakt vorzuliegen. Es handelt sich somit um ein metastabiles

Konformationsepitop, das möglicherweise über die antikörpervermittelte Stabilisierung eines nicht-infektiösen Konformationszustandes seine Wirkung erzielt <sup>91,100,121</sup>.

## 1.8 Fragestellungen dieser Arbeit

HCV überwindet die spezifische Immunantwort und ist in der Lage eine chronische Infektion zu etablieren. Oftmals unbemerkt, führt diese zu einer Hepatitis, die mit bösartigen Neubildungen und einer Zerstörung der Leber einhergehen kann. Verschiedene Ansätze zur Entwicklung eines Impfstoffes sind gescheitert (**Tabelle 2**). Die hohe Prävalenz, niedrige Diagnosezahlen und die Gefahr einer Reinfektion lassen das Ziel einer Elimination der Erkrankung durch flächendeckenden Einsatz von DAAs bis 2030 unrealistisch erscheinen und unterstreichen die dringende Notwendigkeit eines protektiven Impfstoffs.

### 1.8.1 Lieraturrecherche

Wie dargelegt, sind zahlreiche Faktoren bekannt, die es dem Virus ermöglichen die Immunantwort zu umgehen. Gegenläufig ist wenig über Faktoren bekannt, die eine erfolgreiche Immunabwehr des Erregers begünstigen. Etwa ein Fünftel der Infektionen heilt spontan und nahezu folgenlos aus. Diese Ausheilung ist assoziiert mit dem frühen Auftreten neutralisierender Antikörper <sup>56,122–124</sup>. Trotz methodischer Einschränkungen des Forschungsfeldes, die insbesondere im Fehlen eines belastbaren Kleintiermodelles vorliegen, ist es gelungen potente HCV- bNAbs zu identifizieren. Einige dieser Antikörper vermittelten bei Mäusen einen Schutz vor HCV-Infektionen. Ebenso wurde nachgewiesen, dass bestehende Infektionen durch die Infusion dieser Antikörper erfolgreich behandelt werden können <sup>125</sup>.

Über die Charakteristika dieser Antikörper, die diese Wirkungen vermitteln war bis dato wenig bekannt. In unserer Literaturrecherche fielen neben der oft geringen Kohortengröße methodische Einschränkungen auf (**Tabelle 4**).

<b>Jahr</b>	<b>Autoren</b>	<b>Methode</b>	<b>Patientenanzahl</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Referenz</b>
2008	Law/Burton	Phagen-Display	1	7	120
2009	Broering/Babcock	Humanisierte Mäuse	2	2	114
2012	Giang/Law	Phagen-Display	1	3	121
2012	Keck/Foung	Phagen-Display	1	9	118
2017	Bailey/Crowe	EBV Hybridoma	2	15	116
2019	Merat / Schinkel	Immortalisation	13	12	126
2019	Colbert / Bailey	EBV Hybridoma	1	13	127
2019	Olbrich/ Wardemann	single cell sort; RT-PCR, HCVpp assay	15	82	128

**Tabelle 4: Ausgewählte Publikationen mit systematischen Untersuchungen HCV-gerichteter Antikörper**

Publikationen sortiert nach Datum unter Angabe der Autoren, der eingesetzten Methodik, Patientenanzahl, Anzahl der generierten Antikörper und Referenz. Auffällig ist die Unterrepräsentation von Methoden, die eine Untersuchung voll-humaner, affinitätsgereifter Antikörper erlauben. Die Patientenkohorten sind meist gering und erlauben keine verlässlichen Aussagen über Patientenbezogene Einflussfaktoren auf die B-Zell-Antwort.

### **1.8.2 Methodenauswahl und Zielsetzung**

Für den Aufbau eines geeigneten Studiendesigns orientierten wir uns an Erfahrungen der Erforschung von HIV-Antikörpern. Hier war es gelungen, durch das Screening umfangreicher Kohorten Individuen mit herausragender Serumneutralisation zu identifizieren. Aus ihrem Blut wurden durch den Einsatz von Single-Cell-Cloning-basierten B-Zell-Repertoireanalysen hochpotente HIV-bNAbs isoliert. Das Single-Cell-Cloning birgt gegenüber Display-Methoden entscheidende Vorteile. Es erhält die natürlicherweise vorliegende Paarung der schweren und

leichten Antikörperkette, während diese in Display-Verfahren mitunter verloren geht. Des Weiteren ist es möglich seltene Antikörper zu isolieren, die auf anderem Wege verloren gehen könnten <sup>129</sup>.

Um die Neutralisation des HCV durch Antikörper zu bestimmen, stehen verschiedene Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Hierbei steht das HCV-Pseudopartikel (HCVpp) System, in dem HCV-Envelope Proteine auf der Oberfläche von Vektorviren (HIV-1 oder Murines-Leukämievirus) exprimiert werden, dem HCVcc-Assay (cell culture) gegenüber. Die HCV Pseudopartikel sind in Zellkultur nicht replikativ, wodurch im HCVpp System lediglich der Einfluss auf einen einzigen Infektionszyklus untersucht werden kann. Im Gegensatz dazu rekapitulieren HCVcc-Partikel in vitro den gesamten Lebenszyklus des Virus und sind darüber hinaus auch im Tiermodell infektiös verwendbar. Obwohl in Studien vergleichbare Neutralisationswerte zwischen HCVcc und HCVpp gezeigt wurden, existieren Unterschiede. HCV- Pseudopartikel sind beispielsweise empfindlicher gegenüber Antikörperneutralisation, sodass diese überschätzt werden könnte. Angesichts der komplexen Virusbiologie entschieden wir uns zur Verwendung des HCVcc-Neutralisationsassay, um möglichst authentische Versuchsbedingungen zu gewährleisten.

Unsere Hypothese lautete, dass durch die Verwendung des HCVcc-Assays und Single-Cell-Cloning-basierten B-Zell-Repertoireanalysen neue Erkenntnisse gewonnen werden können. Durch die Untersuchung voll-humaner, affinitätsgereifter Antikörper zielten wir darauf ab, die molekularen Charakteristika einer breiten HCV-Neutralisation aufzudecken und systematisch zu beschreiben. Zur Prüfung unserer Hypothese wurde der folgende schrittweise Aufbau festgelegt.

1. Großangelegtes Serum-IgG-Screening (n>400) zur systematischen Beschreibung der HCV-Antikörperantwort und Suche nach Individuen mit herausragend potenter und breiter Virusneutralisation („Top-Neutralizer“) im HCVcc System.

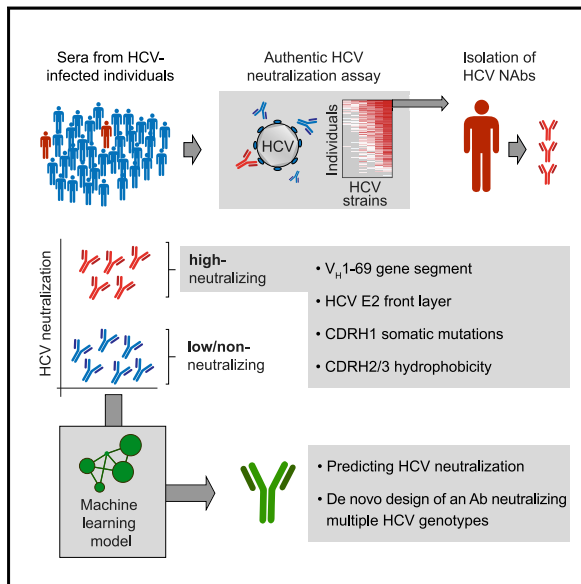
2. Analyse des HCV-reaktiven B-Zell-Repertoires der Top-Neutralizer basierend auf einem Single-Cell-Cloning Verfahren
3. Produktion humaner HCV-Antikörper aus dem Blut der Top-Neutralizer
4. Identifikation und Produktion breitneutralisierender, monoklonaler Antikörper mit authentischer Quartärstruktur
5. Beschreibung molekularer Charakteristika breitneutralisierender Antikörper und deren Bindung

## **2 Hauptteil: Publikation Immunity, 2022**

# Immunity

## Analysis of antibodies from HCV elite neutralizers identifies genetic determinants of broad neutralization

### Graphical abstract



### Authors

Timm Weber, Julian Pothhoff, Sven Bizu, ..., Thomas Pietschmann, Andrew I. Flyak, Florian Klein

### Correspondence

florian.klein@uk-koeln.de

### In brief

Broadly neutralizing antibodies (bNAb)s can protect from HCV infection, but little is known about their development and specific characteristics. Weber, Pothhoff et al. isolated potent HCV bNAb)s from individuals with exceptional HCV antibody responses and determined the genetic requirements for high neutralizing activity. Based on these data, they computationally designed a *de novo* antibody that efficiently neutralized multiple HCV genotypes.

### Highlights

- Screening identified individuals with exceptional HCV Ab responses
- Isolated broad and potent HCV-neutralizing Abs from elite neutralizers
- Identified genetic antibody features associated with potent HCV neutralization
- Designed *de novo* HCV Ab by machine learning that neutralized multiple HCV genotypes

Weber et al., 2022, Immunity 55, 1–14  
 February 8, 2022 © 2021 Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.12.003>



Article

# Analysis of antibodies from HCV elite neutralizers identifies genetic determinants of broad neutralization

Timm Weber,<sup>1,16</sup> Julian Potthoff,<sup>1,16</sup> Sven Bizu,<sup>2</sup> Maurice Labuhn,<sup>3</sup> Leona Dold,<sup>1,4,5</sup> Till Schoofs,<sup>1,17</sup> Marcel Horning,<sup>1</sup> Meryem S. Ercanoglu,<sup>1</sup> Christoph Kreer,<sup>1</sup> Lutz Gieselmann,<sup>1,5</sup> Kanika Vanshylla,<sup>1</sup> Bettina Langhans,<sup>4,5</sup> Hanna Janicki,<sup>1</sup> Luisa J. Ströh,<sup>9</sup> Elena Knops,<sup>9</sup> Dirk Nierhoff,<sup>7</sup> Ulrich Spengler,<sup>4,5</sup> Rolf Kaiser,<sup>5,6</sup> Pamela J. Bjorkman,<sup>8</sup> Thomas Krey,<sup>9,10,11,12,13</sup> Dorothea Bankwitz,<sup>3</sup> Nico Pfeifer,<sup>2</sup> Thomas Pietschmann,<sup>3,13,14</sup> Andrew I. Flyak,<sup>8</sup> and Florian Klein<sup>1,5,6,15,18,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Experimental Immunology, Institute of Virology, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, 50931 Cologne, Germany

<sup>2</sup>Methods in Medical Informatics, Department of Computer Science, University of Tübingen, 72076 Tübingen, Germany

<sup>3</sup>Twincore, Centre for Experimental and Clinical Infection Research, Institute of Experimental Virology, 30625 Hannover, Germany

<sup>4</sup>Department of Internal Medicine I, University Hospital of Bonn, 53127 Bonn, Germany

<sup>5</sup>German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Bonn-Cologne, 50931 Cologne, Germany

<sup>6</sup>Institute of Virology, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, 50931 Cologne, Germany

<sup>7</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, 50931 Cologne, Germany

<sup>8</sup>Division of Biology and Biological Engineering, California Institute of Technology, Pasadena, CA 91125, USA

<sup>9</sup>Institute of Virology, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany

<sup>10</sup>Center of Structural and Cell Biology in Medicine, Institute of Biochemistry, University of Lübeck, 23562 Luebeck, Germany

<sup>11</sup>Centre for Structural Systems Biology (CSSB), 22607 Hamburg, Germany

<sup>12</sup>German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Hamburg-Luebeck-Borstel-Riems, 23562 Luebeck, Germany

<sup>13</sup>Cluster of Excellence RESIST (EXC 2155), Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany

<sup>14</sup>German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Hannover-Braunschweig, 30625 Hannover, Germany

<sup>15</sup>Center for Molecular Medicine Cologne (CMCC), Faculty of Medicine and University of Cologne, 50931 Cologne, Germany

<sup>16</sup>These authors contributed equally

<sup>17</sup>Present address: GlaxoSmithKline Vaccines, 1300 Wavre, Belgium

<sup>18</sup>Lead contact

\*Correspondence: [florian.klein@uk-koeln.de](mailto:florian.klein@uk-koeln.de)

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.12.003>

## SUMMARY

The high genetic diversity of hepatitis C virus (HCV) complicates effective vaccine development. We screened a cohort of 435 HCV-infected individuals and found that 2%–5% demonstrated outstanding HCV-neutralizing activity. From four of these patients, we isolated 310 HCV antibodies, including neutralizing antibodies with exceptional breadth and potency. High neutralizing activity was enabled by the use of the *VH1-69* heavy-chain gene segment, somatic mutations within CDRH1, and CDRH2 hydrophobicity. Structural and mutational analyses revealed an important role for mutations replacing the serines at positions 30 and 31, as well as the presence of neutral and hydrophobic residues at the tip of the CDRH3. Based on these characteristics, we computationally created a *de novo* antibody with a fully synthetic *VH1-69* heavy chain that efficiently neutralized multiple HCV genotypes. Our findings provide a deep understanding of the generation of broadly HCV-neutralizing antibodies that can guide the design of effective vaccine candidates.

## INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection can cause progressive liver fibrosis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (Freeman et al., 2001), resulting in almost 400,000 deaths/year (Thomas, 2019). Treatment with direct-acting antivirals (DAAs) has revolutionized HCV therapy, with success rates exceeding 95% (Luna et al., 2019). However, due to a high fraction of missed diagnoses and high treatment costs, less

than 10% of HCV-infected individuals worldwide are effectively treated. Moreover, successfully treated individuals are not protected from re-infection (Bailey et al., 2019; Roingard and Beaumont, 2020; Thomas, 2019). Therefore, the development of an effective HCV vaccine is of critical clinical need.

Neutralizing antibodies (NAbs) can protect from HCV infection in animal models and are therefore of the utmost interest for immunization strategies (Kinchen et al., 2018a). HCV NAbs target two envelope glycoproteins, E1 and E2 (Farci et al., 1996;

Osburn et al., 2014). Due to the extraordinary genetic diversity of HCV, with 7 major genotypes that differ in 30% of their amino acid sequence and exceed the diversity of HIV-1 (Bailey et al., 2019), a successful vaccine would have to elicit antibodies with broad neutralizing activity (i.e., broadly neutralizing antibodies, bNAbs). In recent years, several HCV bNAbs were identified, most of which target the CD81 binding site on E2 that is necessary for host cell entry (Bailey et al., 2017; Clayton et al., 2002; Colbert et al., 2019; Law et al., 2008; Merat et al., 2016, 2019). Together with T cells, NAbs play an important role in the spontaneous clearance of HCV infection (Kinchen et al., 2018b; Logvinoff et al., 2004; Osburn et al., 2014; Pestka et al., 2007). In animal models, treatment with HCV bNAbs achieved protection from HCV infection as well as abrogation of established infection (de Jong et al., 2014; Keck et al., 2016; Law et al., 2008; Morin et al., 2012). On a molecular level, HCV bNAbs are characterized by a preference for the use of gene segment *VH1-69* (Chen et al., 2019) and a low to average rate of somatic mutations (5%–14% and 1%–9% for the immunoglobulin heavy and light chains, respectively; Bailey et al., 2017). The existence of bNAbs with high germline (GL) identity has raised hopes for a broadly protective HCV vaccine. However, the first HCV vaccine trials have led to mostly strain-specific humoral immune responses both in non-human primates and humans (Bailey et al., 2019; Chen et al., 2020; Choo et al., 1994; Kinchen et al., 2018a; Ströh and Krey, 2020). Therefore, a better understanding of the natural HCV antibody response is required, particularly of antibody features leading to broad neutralization.

Research on bNAbs targeting HIV-1 has benefited from strategies in which patient cohorts were screened for individuals with exceptional serum neutralization (i.e., “elite neutralizers”), followed by single B cell isolation and antibody cloning (Burton et al., 2012; Klein et al., 2013b; Scheid et al., 2009; Schommers et al., 2020). In an analogous approach, we identified HCV elite neutralizers and defined characteristic properties that are critical for mediating broad and potent neutralizing activity. By processing mutational and structural information, we built a machine learning model that was able to predict and to design a *de novo* E2-specific  $V_H1-69$  antibody that efficiently neutralized HCV. Our findings provide a detailed understanding of features that drive HCV-neutralizing activity and support HCV vaccine strategies that aim to induce  $V_H1-69$  HCV NAbs (Bailey et al., 2017; Chen et al., 2019, 2021).

## RESULTS

### HCVcc screening identified 5% of HCV-infected individuals with outstanding neutralizing activity

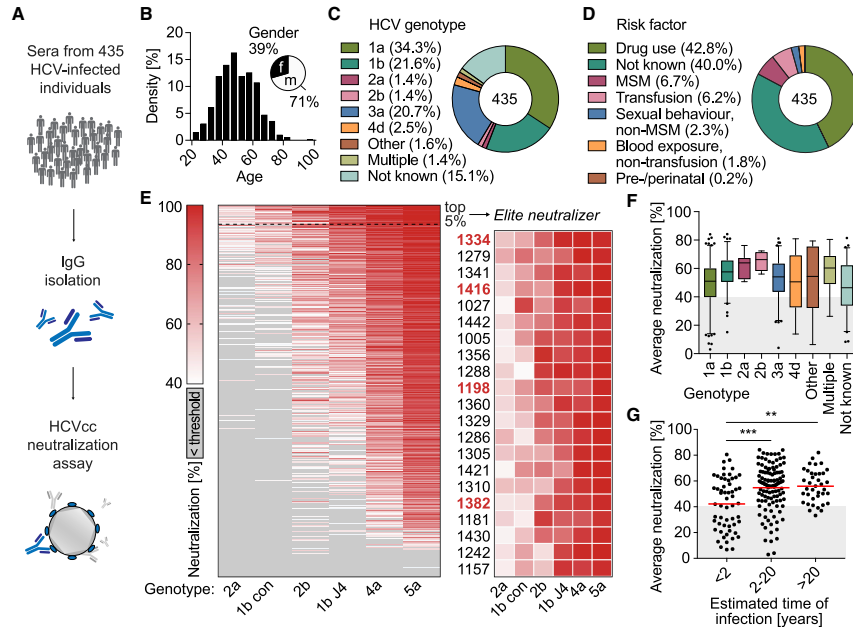
To identify individuals with broad and potent HCV antibody responses, we collected sera from 435 HCV patients at multiple sites in Germany (Figure 1A). Most of these individuals were chronically infected (>96%), and samples were mainly collected before starting DAA therapy (Figure S1A). The majority of individuals were male (71%) and had a median age of 49 years. Study participants were mainly infected with HCV genotypes 1 (56%) and 3 (21%), with drug use being the predominant risk factor (43%, Figures 1B–1D). Polyclonal immunoglobulin G (pIgG) was isolated from the sera and screened for neutralizing activity using an authentic HCV cell culture (HCVcc) assay (Figure 1E; Koutsou-

dakis et al., 2006; Wakita et al., 2005). Neutralization was tested against 6 distinct HCVcc strains (Bankwitz et al., 2021) covering 4 major genotypes (1, 2, 4, 5): 1bCon (Con1), 1bJ4 (J4/JFH1), 2a (J6/JFH1), 2b (J8/JFH1), 4a (ED43/JFH1), and 5a (SA13/JFH1). Based on data from immunoglobulin G (IgG) isotype controls, we defined reduction of infection by at least 40% as meaningful virus neutralization (Figure S1B). HCV strains showed different sensitivities to pIgG neutralization. Infection with genotype 5a was inhibited (>40% reduction) by 92% of all samples, whereas infection with genotype 2a was inhibited by only 16% of all samples (Figure 1E). pIgGs that neutralized more resistant strains (2a, 1b con) were also able to neutralize more sensitive strains (4a, 5a), but not vice versa. Ranking of the pIgG samples by average neutralization across all tested genotypes identified 21 of 435 analyzed individuals neutralizing HCV with exceptional breadth and potency (5%; Figure 1E). These so called elite neutralizers exhibited activity against all 6 tested HCVcc strains. Neither the HCV genotype that the individuals were infected with (Figure 1F), nor gender (Figure S1C), or age (Figure S1D) significantly impacted average neutralization. However, pIgGs from individuals who had been infected for more than 20 years showed more robust neutralizing activity than pIgGs from recently infected subjects ( $p = 0.0028$ , Figure 1G). pIgGs from individuals co-infected with HIV neutralized HCV less efficiently ( $p = 0.0042$ , Figure S1E). Average neutralization was calculated directly from the measured % neutralization values. An alternative calculation method in which we first set values of 40% and below to zero led to almost identical statistics (Figure S5). We concluded that the antibody response against HCV varies substantially between infected individuals, with a small fraction of individuals having elite HCV-neutralizing activity.

### HCV elite neutralizer B cell responses are polyclonal and $V_H1-69$ biased

In order to examine the antibody response in HCV elite neutralizers more closely, we collected peripheral blood from 4 selected individuals (Table S1) and isolated single HCV-reactive B cells by flow cytometry. 0.1%–0.8% of  $IgG^+$  B cells reacted with fluorescently labeled HCV E2 core protein (Kong et al., 2013) of genotype 2b. In total, 1,887 E2-reactive B cells were isolated by flow cytometry (Figures 2A and S2A; Table S2), of which 1,519 productive heavy-chain sequences were obtained that passed quality control (346–457 per individual). Sequence analysis revealed a polyclonal response, mainly of the IgG1 subclass, with 32%–83% clonally related sequences per individual and not more than 6–15 sequences belonging to the same B cell clone (mean clone size: 3; Figures 2B and S2B; Table S2).

Compared with the general  $IgG^+$  B cell repertoires of the same 4 individuals obtained by next-generation sequencing (NGS), HCV-reactive B cells carried longer heavy-chain complementarity-determining regions 3 (CDRH3s; mean difference of 3 amino acids,  $p < 0.0001$  for each individual; Figures 2C and S2C) and had slightly more  $V_H$  gene somatic mutations (difference in mean GL identity of 0.4%–2.9%,  $p = 0.079$ – $<0.0001$  for each individual; Figures 2D and S2D). HCV-reactive B cells utilized different  $V_H$  gene segments, however, *VH1-69* was 3.3-fold overrepresented in clonal HCV-specific B cells compared with full  $IgG^+$  B cell repertoires of the same individuals ( $p = 0.064$ ) and 7.3-fold overrepresented compared with  $IgG^+$  B cell



**Figure 1. HCVcc screening identified 5% of HCV-infected individuals with outstanding “neutralizing activity”**

(A) pIgG from 435 HCV-infected individuals was screened for neutralizing activity in an HCVcc assay.  
 (B) Age and gender distribution of HCV-infected individuals.  
 (C) HCV genotypes that individuals were infected with.  
 (D) Self-reported most likely risk factor for HCV infection.  
 (E) Left panel: screening of pIgG for neutralizing activity against authentic HCV virions. Huh 7.5 cells were infected with 6 different HCVcc strains (columns) carrying a Renilla luciferase reporter gene, in the presence of 300  $\mu\text{g/mL}$  pIgG from HCV-infected individuals (rows). HCV neutralization was determined by reduction of luciferase activity in Huh 7.5 cells relative to cells infected with virus alone. Sorted by row means (average neutralization). Medians of triplicate measurements. Screening was performed once. Right panel: enlarged heatmap showing IDs of individuals with average neutralization in the top 5% range and neutralization of all HCVcc strains. Red IDs: individuals who later donated peripheral blood mononuclear cells.  
 (F) Influence of the HCV genotype on average neutralization of pIgG samples. Lines, boxes, and whiskers indicate medians, 25%–75%, and 5%–95% percentiles, respectively.  
 (G) Influence of estimated time of HCV infection on average neutralization. Data are plotted for 209 individuals. No data on time of infection were available for 226 individuals. Lines indicate means. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ; two-tailed Mann-Whitney test with Bonferroni correction. See also Figure S1.

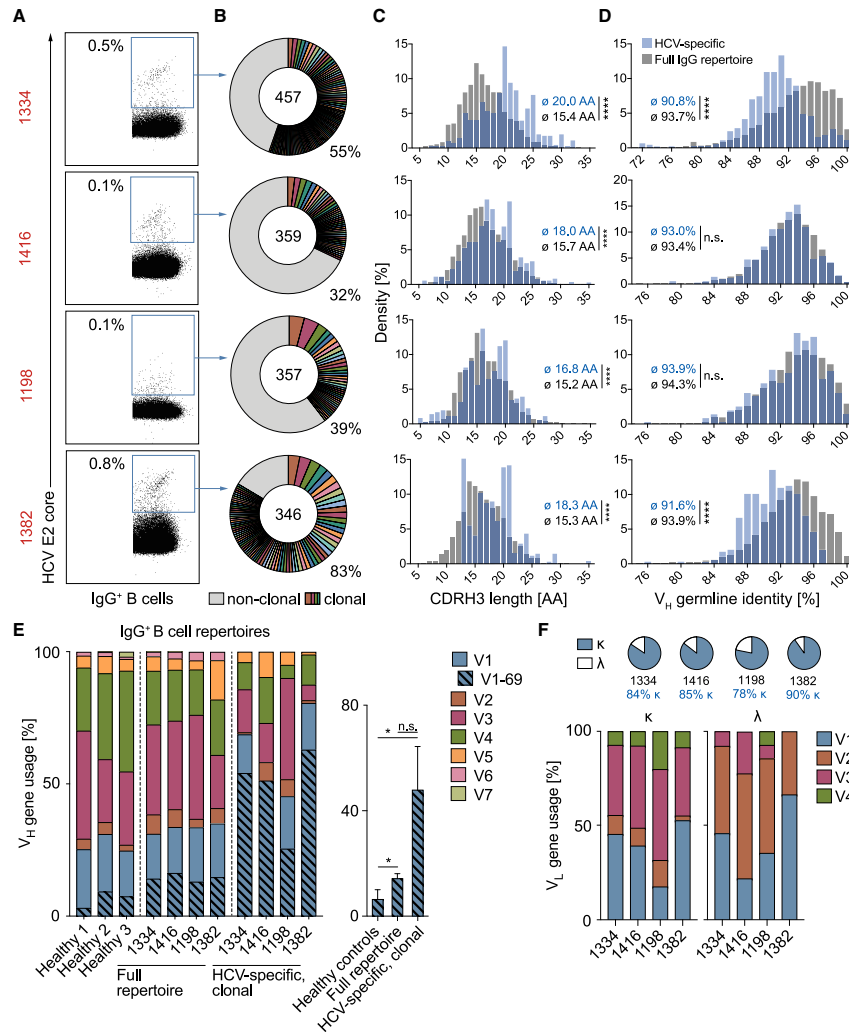
repertoires of healthy donors ( $p = 0.022$ ; Figure 2E). From 310 corresponding light chains, 84% were  $\kappa$ , utilizing mainly  $V_{\kappa}1$  and  $V_{\kappa}3$  family gene segments (Figure 2F) with moderate somatic mutation (94.8% mean V gene GL identity; Figure S2D). Taken together, E2 core-reactive B cell repertoires from HCV elite neutralizers are polyclonal and show no gross deviation from the normal human B cell repertoire except for a bias toward use of the  $V_H$  gene segment 1-69 and slightly longer CDRH3s.

#### Potent HCV neutralization requires $V_H1-69$ and E2 front-layer targeting

To generate a panel of monoclonal antibodies from HCV elite neutralizers, we cloned 310 heavy- and light-chain pairs into expression vectors and produced them as IgG1 isotypes in HEK293-6E cells (Table S3). 218 antibodies bound to E2 core

protein in ELISA, whereas no binding to E2 could be detected among 92 antibodies (Figure S3A). Binding affinities were similar to those of the HCV bNAb AR3C (Law et al., 2008), which was previously identified by phage display ( $\text{EC}_{50}$  in the range of 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ; Figures S3A and S3B). ELISA binding was detected for 94% of  $V_H1-69$  antibodies and for less than half (49%) of non- $V_H1-69$  antibodies (Figure S3C). No binding was detected for  $V_H1-69$  control antibodies reactive against HIV-1, ruling out unspecific binding of  $V_H1-69$  antibodies with the HCV E2 core protein (Figure S3D).

To identify HCV antibodies with high neutralizing breadth and potency, we screened all antibodies for neutralization of authentic HCV virions in an HCVcc assay. Of 310 tested antibodies, 39 (13%; range: 8.5%–23% per individual) neutralized all 6 HCVcc strains (>40% inhibition at 50  $\mu\text{g/mL}$ ; Figure 3A).



**Figure 2. HCV elite neutralizer B cell repertoires are polyclonal and V<sub>H</sub>1-69 biased**

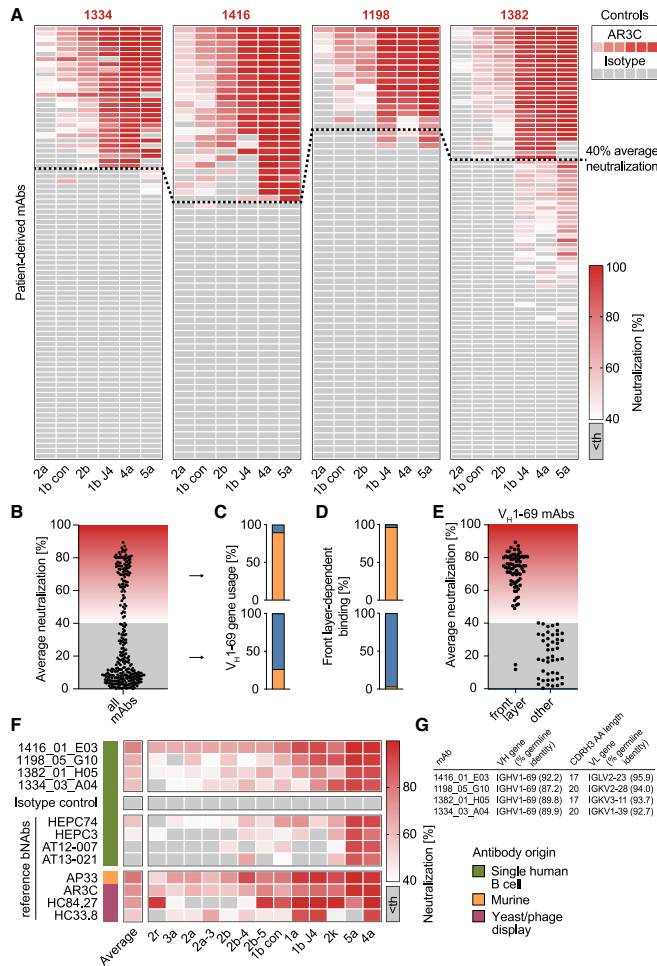
(A) Exemplary dot plots of IgG<sup>+</sup> B cell analysis (see also Figure S2A). Numbers in red indicate percent frequencies of E2 core-reactive B cells within IgG<sup>+</sup> B cells (see also Table S2). Sorting was performed once.

(B) Clonal relationship of E2 core-reactive B cells. Clones are shown in different colors. Numbers of productive heavy-chain sequences are depicted in the chart center. Clone sizes are proportional to the total number of productive heavy-chains per clone.

(C–E) Frequencies of CDR3 length (C), V gene germline identity (D), as well as V gene segments (E) of productive heavy-chain sequences obtained from E2 core-reactive B cells compared with NGS reference data from full IgG<sup>+</sup> B cell repertoires of the same individuals. Reference data from three randomly selected healthy donors in (E) are also included in a previous publication (Kreer et al., 2020b). Right panel of (E): quantification of V<sub>H</sub>1-69 heavy-chain frequencies. Means ± SDs are plotted. Not significant (n.s.), p > 0.05, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001; two-tailed Mann-Whitney test with Bonferroni correction (C and D) or two-tailed t test with Bonferroni correction (E).

(F) Characteristics of amplified light chains.

See also Figure S2 and Tables S1 and S2.



**Figure 3. B cells of HCV elite neutralizers encode highly broad and potent bNAbs**

(A) 310 antibodies isolated from HCV elite neutralizers were screened at a concentration of 50  $\mu$ g/mL for neutralizing activity against HCV as in Figure 1E. Medians of triplicate measurements. Screening was performed once. Antibodies with an average neutralization above 40% (indicated by a dashed line) were defined as potent neutralizers. Th, threshold.

(B) Distribution of average neutralization for all patient-derived antibodies from (A).

(C) Percentage of antibodies utilizing the V<sub>H</sub> gene segment 1-69 among potent (upper panel) or low/non-neutralizers (lower panel).

(D) Percentage of antibodies binding the E2 protein in a front-layer-dependent manner within all antibodies binding the E2 protein. Determined by ELISA with either wildtype or front layer knockout E2 protein of strain 1a157.

(E) Average neutralization as in (B) for V<sub>H</sub>1-69 antibodies that bind E2 in either a front layer-dependent or a front layer-independent way.

(F) Four top hits from the neutralization screen in (A) along with a set of reference HCV-specific antibodies were re-tested for neutralizing activity against an extended panel of 13 HCVcc strains, including those used for the first screen. Medians of triplicate measurements, representative of 3 independent experiments.

(G) Genetic properties of the 4 isolated HCV bNAbs assayed in (F). Germline identity is indicated on nucleotide level.

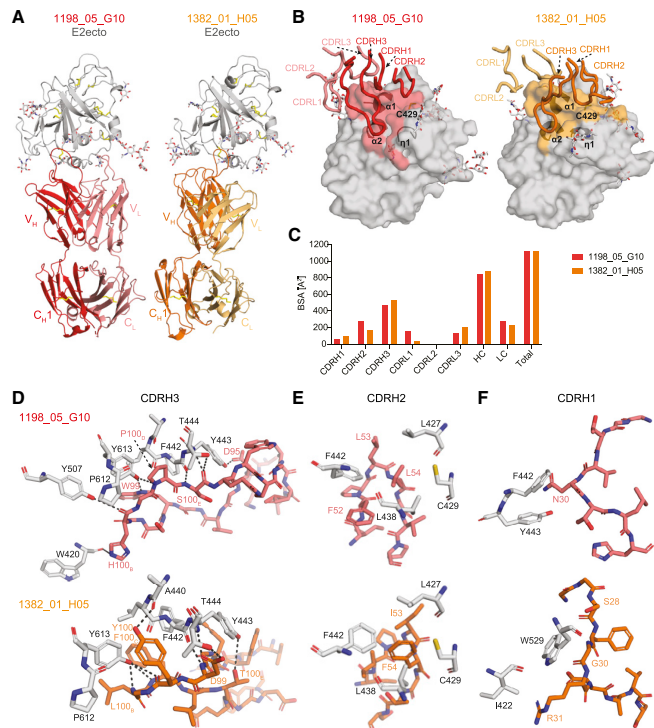
See also Figure S3 and Table S3.

Based on average neutralization values, the antibodies could be divided into two groups: (1) potent NABs with an average neutralization above 40% and (2) low/non-NABs with average neutralization below 40% (98 and 212 antibodies, respectively; Figures 3A and 3B). The two groups markedly differed by V<sub>H</sub> gene usage: although only 26% of low/non-NABs utilized V<sub>H</sub>1-69, 90% of potent neutralizers were encoded by V<sub>H</sub>1-69 (Figure 3C). Of note, use of V<sub>H</sub>1-69 is a feature of previously described HCV bNAbs binding to a structural component of E2 referred to as the front layer (Ströh and Krey, 2020). The E2 front layer consists mainly of a  $\beta$ -strand and a short  $\alpha$ -helix. Together with the CD81-binding loop, it forms the hydrophobic CD81-binding site of E2 (Kong et al., 2013; Tzarum et al., 2018). We performed an ELISA

using a modified E2 protein in which selected amino acids of the front layer were replaced by alanine residues or, as a control, the same protein with an intact front layer. As a result, 96.6% of potent NABs depended on an intact front layer, whereas binding of low/non-NABs was in most cases front-layer independent (96.5%; Figure 3D). We conclude that the presence of both the usage of the V<sub>H</sub>1-69 gene segment and E2 front-layer dependency is a hallmark of potent HCV-neutralizing activity among human antibodies. V<sub>H</sub>1-69 E2 antibodies that are front-layer independent show no or only low neutralizing activity (Figure 3E).

**B cells of HCV elite neutralizers encode highly broad and potent bNAbs**

From 310 obtained antibodies, we identified 4 antibodies (1416\_01\_E03, 1198\_05\_G10, 1382\_01\_H05, 1334\_03\_A04) with exceptional neutralizing activity against 6/6 tested HCVcc strains (Figures 3F and 3G). We tested these bNAbs against an extended HCVcc panel and compared their neutralization potencies with 8 reference HCV-specific bNAbs (Figure 3F). The extended HCVcc panel covered 13 strains representing the major genotypes 1-5 and 9 distinct subtypes (Bankwitz et al.,



**Figure 4. Crystal structures of 1198\_05\_G10-E2ecto and 1382\_01\_H05-E2ecto complexes reveal a distinct binding mode of human HCV bNAbs**

(A) Crystal structures of the 1198\_05\_G10-E2ecto and 1382\_01\_H05-E2ecto complexes. E2ecto is shown as a cartoon representation with N-glycans highlighted as sticks and disulfide bonds shown as yellow sticks. Fabs are shown as cartoons with 1198\_05\_G10-HC colored in red; 1198\_05\_G10-LC—light red, 1382\_01\_H05-HC—orange, and 1382\_01\_H05-LC—yellow. The structures were superimposed on E2 proteins.

(B) Comparison of 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05 CDR loop positions and corresponding E2 epitopes. Epitopes on the E2 front-layer surface were defined as residues in E2 containing an atom within 4 Å of the bound Fab. The positions of three  $\alpha$ 1-helices and Cys429 residue are indicated.

(C) Comparison of buried surface areas (BSAs). (D) Interactions of CDRH3 loops with E2ecto. Potential hydrogen bonds are shown as black dashed lines and residues at the interface are indicated. Hydrogen bonds for the 3.2 Å 1382\_01\_H05-E2ecto structure should be considered tentative.

(E) Interactions of Fab CDRH2 loops with E2ecto. Residues at the interface are indicated.

(F) Interactions of Fab CDRH1 loops with E2ecto. Residues at the interface are indicated.

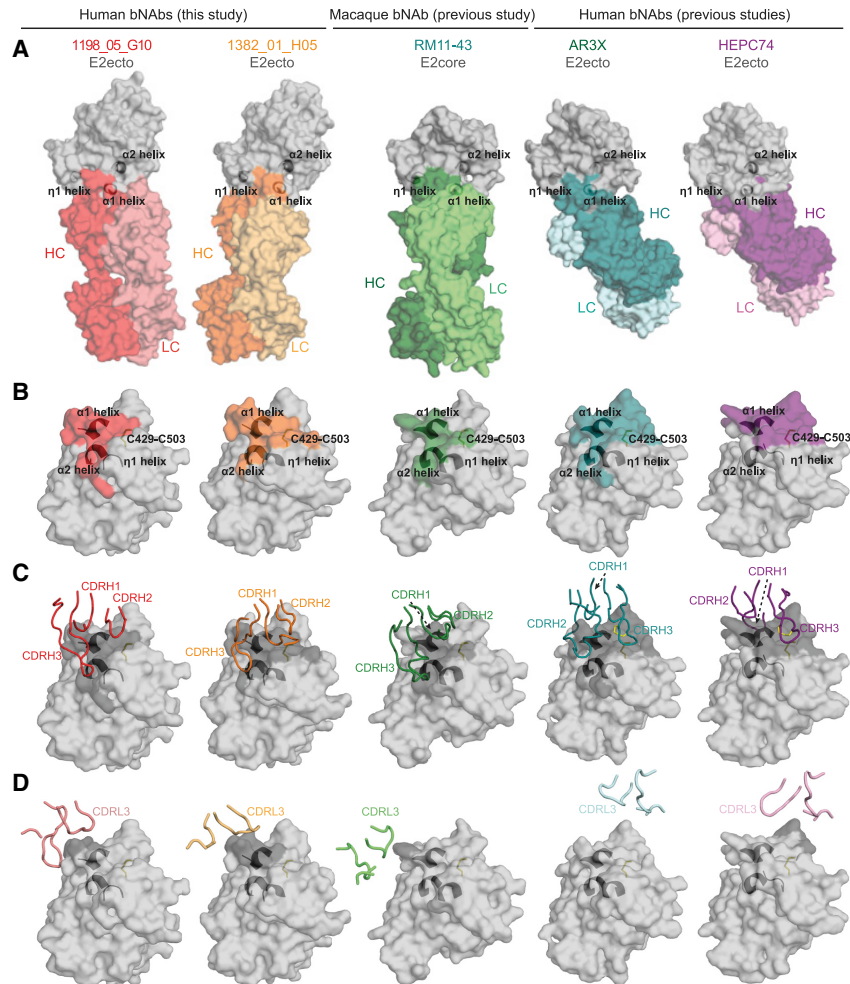
See also Tables S4 and S5.

2021). Four of the reference bNAbs originated from single human B cells with the original pairing of heavy- and light chains (HEPC74, HEPC3; Bailey et al., 2017; and AT12-007, AT13-021; Merat et al., 2016), one is of murine origin (AP33; Clayton et al., 2002), and 3 were identified by screening combinatorial display libraries (AR3C, HC84.27, HC33.8; Keck et al., 2012, 2013). 1416\_01\_E03 showed the best activity by neutralizing all HCV strains (13/13) with 77% average neutralization (range: 65%–98%; 50  $\mu$ g/mL) and substantially exceeded all human reference antibodies (Figure 3F; average neutralization and breadth: HEPC74; 57% (12/13), HEPC3 45% (8/13), AT12-007 39% (6/13), AT13-021 35% (5/13)). 1198\_05\_G10, 1382\_01\_H05, and 1334\_03\_A04 inhibited infection of 12, 13, and 12 HCVcc strains by average 65%, 60%, and 59%, respectively. Only phage-display-derived bNAb AR3C, as well as AP33, a bNAb of murine origin, showed similarly high activity. Some  $V_{H1-69}$  bNAbs against HIV-1 (e.g., 4E10) are polyreactive, meaning that they also react with multiple unrelated antigens (Haynes et al., 2005a), but the identified HCV bNAbs did not show any signs of auto- or polyreactivity (Figures S3E and S3F). Thus, the identification of HCV elite neutralizers enabled us to identify bNAbs with extraordinary potency and breadth, targeting all HCV genotypes and subtypes tested.

**Crystal structures of 1198\_05\_G10-E2ecto and 1382\_01\_H05-E2ecto complexes reveal a distinct binding mode of human HCV bNAbs**

To verify the epitope specificity of bNAbs 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05, we determined their crystal structures in complex with the E2 ectodomain (E2ecto; Figure 4; Table S4). In line with our ELISA data, both antibodies bind to the conserved epitope in the E2 front layer (Figure 4A). Although superposition of the two complexes revealed that 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05 bind E2ecto in slightly different orientations (Figure 4A), CDRH3 loops of both bNAbs contacted the same antigenic region on the E2 surface (Figure 4B). As found for other front-layer-specific bNAbs, both antibodies contact E2ecto primarily by CDRH3 residues, burying 462 or 532 Å<sup>2</sup> (42% or 48% of the total Fab buried surface area, BSA) for 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05, respectively (Figure 4C; Table S5). However, in contrast to other front-layer-specific bNAbs in which the light chains do not play a role in the interaction with E2 envelope (Flyak et al., 2018; Kong et al., 2013; Tzarum et al., 2019), 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05 light chains accounted for 25% and 21% (280 or 232 Å<sup>2</sup>) of the total BSA (Figure 4C), respectively.

Although 1198\_05\_G10, 1382\_01\_H05, as well as other front-layer-specific  $V_{H1-69}$  antibodies (e.g., AR3X and HEPC74) show



**Figure 5. 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05 share a similar binding mode with vaccine-induced bNAbs**

(A) Surface representations of 1198\_05\_G10-E2, 1382\_01\_H05-E2, and other bNAb-E2 crystal structures. The location of  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -, and  $\eta 1$ -helices in E2 are indicated by black cartoon representations. The structures were superimposed on E2 proteins.

(B) Comparison of 1198\_05\_G10, 1382\_01\_H05, RM11-43, AR3X, and HEPC74 epitopes. Epitopes on the E2 front layer (surface representation) were defined as residues in E2 containing an atom within 4 Å of the bound Fab. The location of  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -, and  $\eta 1$ -helices in E2 are indicated by black cartoon representations and the C429-C503 disulfide bond is indicated by yellow sticks.

(C) CDRH loops mapped onto the E2 surface. HC interacting residues are colored in gray on the E2 surface.

(D) CDRL loops mapped onto the E2 surface. LC interacting residues are colored in gray on the E2 surface.

See also Tables S4 and S5.

similar binding footprints on the E2 surface (Figure 5; Flyak et al., 2018, 2020), we observed different approach angles of the HCV bNAbs 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05. Both antibodies CDRH3s' contact the hydrophobic groove formed by three  $\alpha$ -he-

lices: short  $\eta 1$ -helix in the front-layer N terminus (residues 421-425), helix  $\alpha 1$  (residues 438-443) C-terminus, and back layer  $\alpha 2$  helix (613-617; Figures 4B and 4D; Table S5). All eight putative hydrogen bonds with the E2 glycoprotein are formed exclusively



by 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05 CDRH3 loops, with at least half of hydrogen bonds centered around two E2 residues: Thr444 (C-terminal end of  $\alpha$ 1-helix) and Tyr613 ( $\alpha$ 2 helix in the back layer of E2; Figure 4D).

A unique feature of  $V_H1-69$  antibodies is the presence of hydrophobic residues at the tip of the CDRH2 loop that facilitates interactions with hydrophobic epitopes. In contrast to some HCV bNAbs that utilize their CDRH2 tips to interact with a hydrophobic groove formed by three  $\alpha$ -helices (AR3C, HEPC3, HEPC74; Flyak et al., 2018; Kong et al., 2013; Tzarum et al., 2019), the hydrophobic residues of 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05 CDRH2s interact with the E2 front-layer near Cys429 and the  $\alpha$ 1-helix (Figures 4B and 4E), a region of E2, which is recognized by CDRH3 residues of previously described front-layer-specific HCV bNAbs. Differently positioned CDRH1 loops for both bNAbs play a minor role in the E2-Fab-binding interface by making contacts with the E2 front layer (both 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05) and the CD81-binding loop (only 1382\_01\_H05; Figure 4F). In summary, 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05 bind the E2 front layer with approach angles and CDR interactions distinct from previously identified HCV bNAbs.

#### 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05 share a similar binding mode with vaccine-induced bNAbs

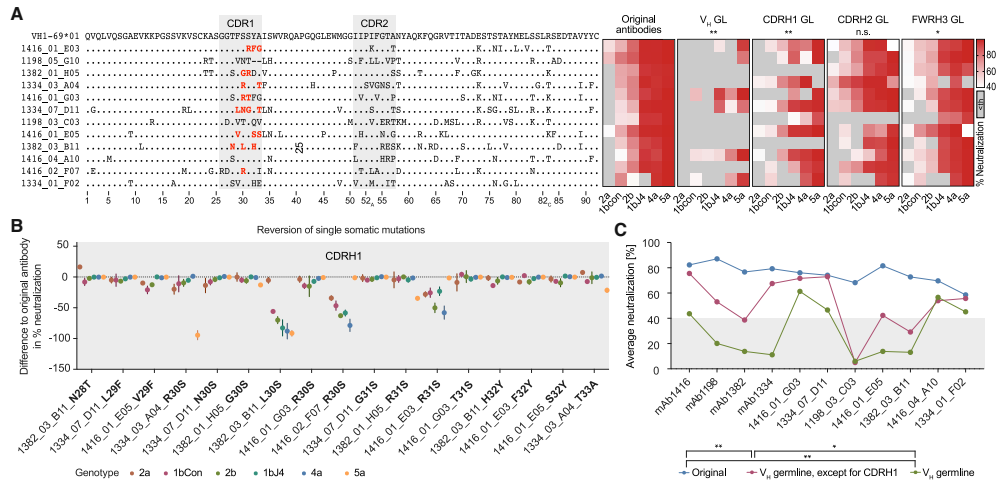
Recently, two bNAbs (RM2-01 and RM11-43) were isolated from macaques immunized with an HCV vaccine candidate (Chiron recombinant E1E2 complex; Chen et al. 2021). Both macaque antibodies utilized the *VH1.36* gene segment, a macaque ortholog to human *VH1-69* (94.8% nucleotide identity). Structural comparison with known human HCV bNAbs indicated that RM2-01 and RM11-43 recognized overlapping epitopes. However, both antibodies displayed a unique binding mode in which the CDRH3 loops reach out to the E2 back layer (Chen et al., 2021), a feature not yet described for human HCV bNAbs. Interestingly, structural analyses of 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05 revealed the same binding mode as for RM2-01 and RM11-43 (Figure 5A; Chen et al. 2021). All four antibodies showed a similar binding footprint (Figure 5B; Chen et al., 2021), utilizing their CDRH3s to bind the hydrophobic pocket formed between three E2  $\alpha$ -helices. Moreover, their hydrophobic CDRH2s bind to the E2 front layer near cysteine 429 (Cys429; Figures 4B and 5C) with a minimal impact of their light chains on the E2-Fab-binding interface (Figure 5D). The binding mode of 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05 is distinct from other human bNAbs that predominantly utilize a CDRH3  $\beta$ -hairpin with or without disulfide motif to recognize front-layer epitopes near Cys429 (HEPC74- and AR3C-like bNAbs; Flyak et al., 2018; Kong et al., 2013; Tzarum et al., 2019). Notably, the human bNAb AR3X isolated from a chronically infected individual (Flyak et al., 2020) mimics the CDRH3-interaction of 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05 with E2 by utilizing an ultra-long insertion in its CDRH2 to reach out to the  $\alpha$ 2-helix in the back layer (Figure 5). In summary, the HCV bNAbs 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05 display a distinct binding mode similar to bNAbs induced by an HCV vaccine in macaques. We conclude that immunization of human subjects with an E1E2 complex may induce bNAbs resembling those isolated from elite neutralizers.

#### *VH1-69* CDRH1 somatic mutations are critical for broad HCV neutralization

We then investigated the genetic characteristics of  $V_H1-69$  antibodies from HCV elite neutralizers. Although various mutations have been described at an individual HCV antibody level (Bailey et al., 2017; Chen et al., 2019; Flyak et al., 2018; Tzarum et al., 2019), we investigated the impact of somatic mutations in a sample of 12  $V_H1-69$  bNAbs (Figure 6A). To this end, we reverted the heavy-chain of all 12  $V_H1-69$  antibodies to GL. Reverted antibodies showed a marked reduction in neutralizing potency and breadth, dropping from 87% (average breadth of all 12 HCV bNAbs; range: 67%–100%) to 25% (range: 0%–67%). Thus, all  $V_H1-69$  antibodies tested require  $V_H$  somatic mutations for broad HCV-neutralizing activity. To narrow down whether mutations in a defined region are of particular importance, we reverted the CDRH1, CDRH2, and heavy-chain framework region 3 (FWRH3) separately. For none of the antibodies, reversions of a single region (CDRH1, CDRH2, or FWRH3) were sufficient to abolish HCV-neutralizing activity. However, reverting the CDRH1 significantly reduced HCV neutralization (60%–87% breadth; Figure 6A). Next, we reverted single somatic mutations within the CDRH1. Although the majority of changes showed no effect, 4 out of 8 antibodies were highly sensitive to reverting position 30 or 31 back to the GL-encoded serine. These antibodies lost neutralizing activity against one to several HCVcc strains by up to 58%, 78%, 91%, and 94% (Figures 6A and 6B). In contrast, re-insertion of single mutations into the  $V_H$  GL-reverted antibodies did not substantially restore their HCV-neutralizing capacity (Figure S4A). However, re-insertion of all CDRH1 somatic mutations at once led to a significant improvement in neutralizing activity (57% instead of 25% of HCVcc strains neutralized; Figures 6C and S4B). Thus, distinct somatic mutations within the  $V_H1-69$  gene, particularly within the CDRH1, facilitate broad HCV neutralization.

#### Potent HCV-neutralizing activity requires a pattern of genetic features and can be predicted

Efficient neutralization of HCV was only achieved by the fraction of E2 core-reactive  $V_H1-69$  antibodies targeting the E2 front layer (Figure 3). Therefore, we asked whether common sequence features separate antibodies into potent and non-/low HCV neutralizers. To this end, we used a machine learning approach. First, amino acid sequences of the  $V_H$  gene segments of all produced  $V_H1-69$  antibodies were assigned to the two groups of potent ( $n = 88$ ) and low/non-neutralizers ( $n = 56$ ; Figure 3E). This dataset was used to train a support vector machine that provided a classification on the basis of  $V_H$  amino acid sequences with an average accuracy of 78% as determined by 10-fold cross-validation. The model's accuracy could be further increased to 87% by considering full  $V_HD_HJ_H$  amino acid sequences. In both models, distinct somatic mutations within the *VH1-69* gene segment contributed to classify high neutralizer. Consistent with our experimental data, somatic mutations within the CDRH1 played an important role, in particular mutations changing the serines at positions 30 and 31 (Figure 7A). Interestingly, there were also somatic mutations determining non-/low neutralizers, for example affecting the CDRH2 germline amino acids F54 and A57 (Figure 7A). Although beneficial mutations, such as S30R or S31L, were



**Figure 6. V<sub>H</sub>1-69 CDRH1 somatic mutations are critical for broad HCV neutralization**  
**(A)** Left panel: alignment of amino acid sequences of 12 HCV antibodies to V<sub>H</sub>1-69\*01 (K73 is encoded by the V<sub>H</sub>1-69\*06 germline allele and therefore is not necessarily a somatic mutation). Right panel: effect of partial germline-reversion on HCVcc neutralization at an antibody concentration of 50 μg/mL. Medians of triplicate measurements. Th, threshold.  
**(B)** Effect of single V<sub>H</sub>1-69 amino acid germline-reversions on HCVcc neutralization. The reverted mutations are also highlighted in (A) in red. Means ± SD of triplicate measurements.  
**(C)** HCVcc average neutralization (6-virus panel) by antibodies with V<sub>H</sub> gene segments reverted to germline, except for the CDRH1. Medians of triplicate measurements. Representative of 3 (A) or 2 (B and C) independent experiments. Not significant (n.s.), \*p ≤ 0.05, \*\*p ≤ 0.01; Wilcoxon matched-pairs signed rank test with Bonferroni correction. Average neutralization values across all 6 tested HCVcc strains for each mutated antibody were compared pairwise with average neutralization values of corresponding original antibodies (A) or among each other (C). GL, germline. See also Figure S4.

associated with higher average neutralization, unfavorable mutations, such as F54S or A57E, were significantly associated with poor average neutralization (Figure 7B). Moreover, in the V<sub>H</sub>D<sub>H</sub>J<sub>H</sub>-based model, CDRH3 loops with neutral or hydrophobic amino acids at the tip contributed to the classification as a potent neutralizer, whereas hydrophilic amino acids in the CDRH3 tip contributed to the classification as a non-/low neutralizer (Figure 7A). This is in line with our structural data showing that CDRH3s of potent neutralizers contact a hydrophobic groove in the E2 protein.

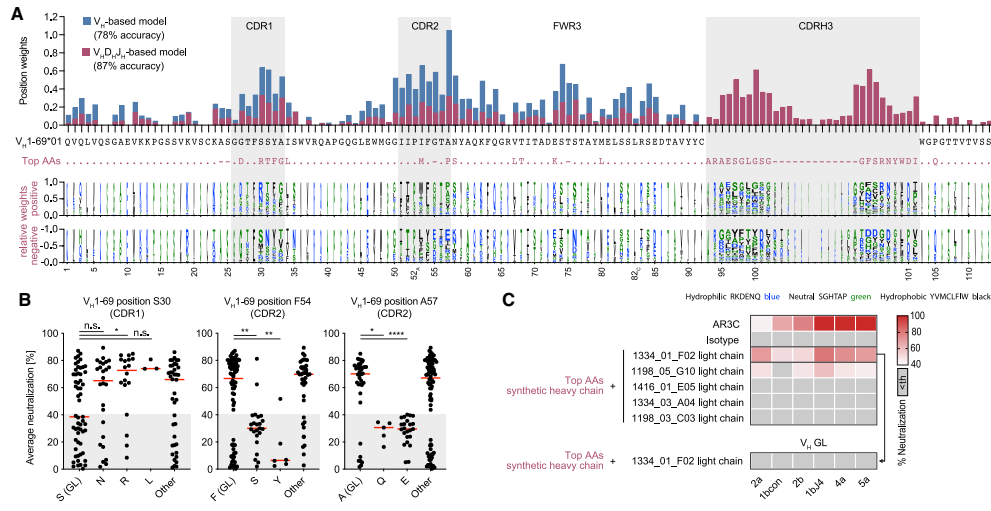
In order to validate model-based predictions for potent HCV-neutralizing activity, we derived a fully synthetic heavy-chain sequence where each position was filled with the amino acid having the strongest weight for the classification as a potent HCV NAb (Figure 7A). This *de novo* sequence carried 17 somatic mutations and a CDRH3 that had less than 50% identity with any of the CDRH3s of the 1,519 sorted and analyzed HCV-reactive B cells. Pairing this sequence with different light chains from HCV NAb resulted in identifying a *de novo* broadly HCV NAb (6/6 tested HCVcc strains, Figure 7C). Like naturally occurring HCV antibodies, the synthetic heavy-chain antibody lost its neutralizing capacity when somatic mutations in the V<sub>H</sub> gene segment were reverted to GL (Figure 7C), demonstrating the importance of distinct V<sub>H</sub>1-69 somatic mutations for high HCV-neutralizing activity. We conclude that distinct mutational patterns exist that predict high HCV-neutralizing activity for V<sub>H</sub>1-69 antibodies.

This has direct consequences to inform vaccine-mediated strategies to induce HCV NAb.

## DISCUSSION

Despite the development of efficient treatment with DAAs, HCV infection remains a major public health challenge. Most likely, HCV will not be brought under global control until a protective vaccine is developed. The genetic diversity of HCV has posed a problem for vaccine development. However, HCV NAb can protect from HCV infection in animal models and a better understanding of their characteristics and mode of induction is urgently needed (Bailey et al., 2019; Kinchen et al., 2018a).

Previously, human bNAbs against HCV were isolated from single individuals using combinatorial display libraries or B cell immortalization (Bailey et al., 2017; Clayton et al., 2002; Colbert et al., 2019; Law et al., 2008; Merat et al., 2016, 2019). More recently, use of large-scale donor screening, as well as the development of single B cell isolation and cloning methods, has led to the identification of numerous very broad and potent human antibodies targeting infectious pathogens (Burton et al., 2012; Ehrhardt et al., 2019; Giesemann et al., 2021; Kinchen et al., 2018b; Klein et al., 2013a; Kreer et al., 2020b; Liu et al., 2020; Pinto et al., 2020; Scheid et al., 2009; Schommers et al., 2020; Suryadevara et al., 2021). Building on these experiences, we screened HCV-infected individuals and identified elite



**Figure 7. Potent HCV-neutralizing activity requires a pattern of genetic features and can be predicted**  
(A) Top panel: total weights of  $V_H1$ -69-amino-acid positions contributing to the classification as an efficient neutralizer in  $V_H1$ -based or  $V_H1D_H1J_H1$ -based machine learning models. The  $V_H1-69^*01$  germline amino acids are shown in black and the most impactful amino acids for the  $V_H1D_H1J_H1$ -based model (top AAs) are shown in violet. Bottom panel: log plot with letter heights representing relative weights of amino acids at each position for positive or negative classification of the encoded antibodies as efficient neutralizers. Letter widths represent absolute weights. Insertions are omitted for clarity.  
(B) Average neutralization values of antibodies with indicated amino acid sequence features in the HCVcc screen shown in Figure 3A. Lines indicate medians.  
(C) HCVcc neutralization values of antibodies with a synthetic heavy-chain amino acid sequence as depicted in (A) in violet. Medians of triplicate measurements. Representative of 2 independent experiments. Th, threshold.  
Not significant (n.s.),  $p > 0.05$ , \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ; two-tailed Mann-Whitney test with Bonferroni correction. GL, germline.

neutralizers from which we isolated single E2 core-specific B cells and produced a large panel of HCV antibodies. This strategy led us to identify exceptionally broad NABs, including bNAb 1416\_01\_E03, which is, to the best of our knowledge, the broadest naturally occurring HCV NAB isolated so far.

We used authentic HCV virions (HCVcc) instead of the more widely used HCV pseudoparticle (HCVpp) assay to determine antibody-mediated neutralization. Authentic HCV virions have a unique structure: they incorporate lipoproteins to form lipoviro-particles. This impacts host cell entry and might mediate immune evasion (Perin et al., 2016; Sainz et al., 2012; Wrensch et al., 2018). Although there is a correlation between HCVpp and HCVcc neutralization (Kinchen and Bailey, 2018), the differences between HCVpp and HCVcc may impact virus-antibody interplay. The HCVcc assay is thus a more physiological approach (Bankwitz et al., 2021).

Among all the isolated HCV antibodies,  $V_H1-69$  was the most prevalent gene segment.  $V_H1-69$  antibodies could be divided into two groups: 61% ( $n = 88$ ) that bound the front layer and neutralized HCV at high or very high activities and 39% ( $n = 56$ ) that bound the E2 core protein elsewhere and carried no or only low HCV-neutralizing activity. This substantially extends previous observations in which E2-binding  $V_H1-69$  antibodies were classified as potent neutralizing in general (Bailey et al., 2017; Chen et al., 2020; Tzarum et al., 2019). Interestingly,

HCV E2-reactive  $V_H1-69$  NABs had characteristic sequence properties that distinguish them from low/non-neutralizing E2-reactive  $V_H1-69$  antibodies found in the same patients. These included CDRH1 mutations, such as S30R or S31L, as well as CDRH3 hydrophobicity. In addition, other mutations, such as F54S in the CDRH2, were associated with low/non-neutralizing activity. Crystal structure analyses of the two HCV bNABs 1198\_05\_G10 and 1382\_01\_H05 revealed how these features are linked to efficient HCV neutralization. Both CDRH3 and CDRH2 make hydrophobic contacts with E2. Notably, whereas CDRH1 plays a minor role in direct E2 interaction, somatic mutations, such as serine replacement at position 30 or 31, are likely to avoid clashes between CDRH1 and the CD81-binding loop (e.g., by W529) of E2. Based on these findings, high versus low/non-neutralizing activity of  $V_H1-69$  antibodies could be predicted with 87% accuracy by using heavy-chain sequence data in a machine learning model. Notably, we were able to computationally derive a fully synthetic heavy-chain that could be used to produce an HCV cross-NAB, demonstrating the existence of a mutational pattern driving HCV neutralization.

Identifying genetic features and distinct somatic mutations is critical for developing effective vaccine design strategies. Although we demonstrated that distinct CDRH1 mutations are critical for HCV-neutralizing activity, a combination of mutations is required in  $V_H1-69$  antibodies to achieve broad and potent

HCV neutralization. A previously described human-origin HCV bNAb targeting the E2 front layer, HEPC3, also relies on a combination of multiple *VH1-69* somatic mutations, including critical mutations within the CDRH1 and dispensable mutations within the CDRH2 (Bailey et al., 2017). The previously identified E2 front-layer-specific *VH1-69* bNAbs HEPC3, HEPC74, and AR3C carry CDRH3s of 17-, 18-, and 18-amino-acid length, respectively. Antibodies with exceptional neutralizing activity that we isolated from HCV elite neutralizers carried CDRH3s of similar lengths (17–20 amino acids). There are also *VH1-69* bNAbs against HIV-1, such as 4E10, that carry a similarly long hydrophobic CDRH3 (18 amino acids for 4E10; Cardoso et al., 2005; Chen et al., 2019; Irimia et al., 2016). Interestingly, 4E10 and some other HIV bNAbs using *VH1-69* are polyreactive. This can complicate the induction of such antibodies because they are more likely to be removed during B cell development (Haynes et al., 2005a, 2005b; Kelsoe and Haynes, 2017). In contrast, the HCV bNAbs isolated in this study did not show any signs of auto- or polyreactivity.

Our findings lead to the question of whether HCV bNAbs like those isolated from elite neutralizers can be induced by a future vaccine. Interestingly, structural analyses of the isolated antibodies demonstrated that they bind the E2 protein in a similar way to antibodies elicited in macaques by immunization with a recombinant E1E2 complex (Chen et al., 2021). Moreover, these macaque antibodies utilized a homolog of *VH1-69*, with critical CDRH1 somatic mutations, including mutation of germline-encoded S31, analogous to HCV bNAbs that we isolated in our study. Thus, broadly protective HCV antibodies are not only characterized by *VH1-69* usage but also require a characteristic CDRH mutational pattern that seems to be inducible by an HCV vaccine. Sequential immunization (Escalano et al., 2016) would be one potential approach to expand suitable B cell clones and drive their maturation.

#### Limitations of the study

An important question regarding HCV immunity is why some individuals can clear the virus naturally. With our chronically infected cohort of HCV-infected individuals, we were not able to address this question. In addition, we were not able to study the development of broad neutralization in the interplay with viral resistance during the course of chronic infection. HCV-specific B cells were sorted using a fluorescently labeled bait protein (E2 core). With a different bait (e.g., E1-E2 heterodimer), we might have identified different HCV-specific B cells. We have made best efforts to cover the global diversity of HCV strains, but HCV-neutralizing breadth was determined by a selection of representative HCV strains that may not fully cover the genetic diversity of HCV.

#### STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead contact
  - Materials availability
  - Data and code availability

#### ● EXPERIMENTAL MODELS AND SUBJECT DETAILS

- HCV-infected individuals and sample collection
- Cell lines

#### ● METHOD DETAILS

- Isolation of polyclonal serum IgG (pIgG)
- Virus particle production
- HCVcc neutralization assay
- Expression and purification of E2 constructs
- B cell isolation
- Antibody heavy- and light chain gene amplification and sequence analysis
- Next generation sequencing and evaluation of IgG<sup>+</sup> B cell repertoires
- Cloning and production of monoclonal antibodies
- ELISA analysis to determine antibody binding activity to HCV E2 protein or polyreactivity
- Hep-2 assay
- Expression and purification of E2-Fab complexes
- Crystallization, data collection and structure determinations
- Reversion of *VH1-69* somatic mutations to the germline sequence
- Machine learning

#### ● QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.12.003>.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank all study participants who devoted time to our research; members of the Klein, Pietschmann, Pfeifer, Krey, and Bjorkman Laboratories for continuous support and helpful discussions, Maike Schlotz and Carola Ruping for help with sample processing, and Henning Gruell for valuable discussions. We thank the Caltech Protein Expression Center for help with protein expression and the Caltech Molecular Observatory for assistance with structural studies.

This work was funded by grants from the European Research Council (ERC-STG-639961 to F.K.), the German Center for Infection Research (DZIF TTU 05.817 and TTU 05.821 to F.K., T.P., T.K., and T.W.) and the German Research Foundation (DFG) (CRC 1310 to F.K., T.P., and T.K. are funded by the DFG under Germany's Excellence Strategy (EXC 2155 "RESIST"—project ID 39087428). This research was also supported by the U.S. National Institutes of Health (NIH) (NIH grant R01 AI127469 to P.J.B.) and (NIH grant K99 AI153465 to A.I.F.) (content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the NIH) and the Molecular Observatory at Caltech supported by the Gordon and Betty Moore Foundation. Use of the Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, SLAC National Accelerator Laboratory, is supported by the U.S. Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences (contract no DE-AC02-76SF00515). The SSRL Structural Molecular Biology Program is supported by the DOE Office of Biological and Environmental Research and by NIHGM5 (P41GM103393).

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, T.W., T.P., A.I.F., and F.K.; methodology, T.W., J.P., S.B., M.L., L.D., T.S., M.H., M.S.E., C.K., L.G., K.V., P.J.B., T.K., D.B., N.P., T.P., A.I.F., and F.K.; investigation, T.W., J.P., S.B., M.L., L.D., T.S., M.H., M.S.E., C.K., L.G., K.V., H.J., D.B., and A.I.F.; software, S.B., C.K., and N.P.; formal analysis, T.W., J.P., L.D., T.S., M.H., C.K., N.P., A.I.F., and F.K.; resources,



B.L., L.S., E.K., D.N., U.S., R.K., P.J.B., T.K., T.P., and F.K.; writing—original draft, T.W., J.P., A.I.F., and F.K.; supervision, P.J.B., T.K., N.P., T.P., and F.K.

#### DECLARATION OF INTERESTS

Reported antibodies are in the process of being patented.

Received: July 16, 2021

Revised: October 21, 2021

Accepted: December 6, 2021

Published: January 5, 2022

#### REFERENCES

- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.-W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221.
- Bailey, J.R., Barnes, E., and Cox, A.L. (2019). Approaches, progress, and challenges to hepatitis C vaccine development. *Gastroenterology* **156**, 418–430.
- Bailey, J.R., Flyak, A.I., Cohen, V.J., Li, H., Wasilewski, L.N., Snider, A.E., Wang, S., Learn, G.H., Kose, N., Loerinc, L., et al. (2017). Broadly neutralizing antibodies with few somatic mutations and hepatitis C virus clearance. *JCI Insight* **2**, e92872.
- Bankwitz, D., Bahaj, A., Labuhn, M., Doepke, M., Ginkel, C., Khera, T., Todt, D., Ströh, L.J., Dold, L., Klein, F., et al. (2021). Hepatitis C reference viruses highlight potent antibody responses and diverse viral functional interactions with neutralising antibodies. *Gut* **70**, 1734–1745.
- Battye, T.G.G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H.R., and Leslie, A.G.W. (2011). IMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67**, 271–281.
- Blight, K.J., McKeating, J.A., and Rice, C.M. (2002). Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* **76**, 13001–13014.
- Burton, D.R., Poignard, P., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2012). Broadly neutralizing antibodies present new prospects to counter highly antigenically diverse viruses. *Science* **337**, 183–186.
- Cardoso, R.M.F., Zwick, M.B., Stanfield, R.L., Kunert, R., Binley, J.M., Katinger, H., Burton, D.R., and Wilson, I.A. (2005). Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41. *Immunity* **22**, 163–173.
- Chen, F., Nagy, K., Chavez, D., Willis, S., McBride, R., Giang, E., Honda, A., Bukh, J., Ordoxianian, P., Zhu, J., et al. (2020). Antibody responses to immunization With HCV envelope glycoproteins as a baseline for B-cell-based vaccine development. *Gastroenterology* **158**, 1058–1071, e6.
- Chen, F., Tzarum, N., Lin, X., Giang, E., Velázquez-Moctezuma, R., Augestad, E.H., Nagy, K., He, L., Hernandez, M., Fouch, M.E., et al. (2021). Functional convergence of a germline-encoded neutralizing antibody response in rhesus macaques immunized with HCV envelope glycoproteins. *Immunity* **54**, 781–796, e4.
- Chen, F., Tzarum, N., Wilson, I.A., and Law, M. (2019). V H 1–69 antiviral broadly neutralizing antibodies: genetics, structures, and relevance to rational vaccine design. *Curr. Opin. Virol.* **34**, 149–159.
- Chen, V.B., Arendall, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Ralston, R., Weiner, A., Chien, D., Van Nest, G., Han, J., Berger, K., Thudium, K., Kuo, G., et al. (1994). Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1294–1298.
- Clayton, R.F., Owsianka, A., Aitken, J., Graham, S., Bhella, D., and Patel, A.H. (2002). Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles. *J. Virol.* **76**, 7672–7682.
- Colbert, M.D., Flyak, A.I., Ogega, C.O., Kinchen, V.J., Massaccesi, G., Hernandez, M., Davidson, E., Doranz, B.J., Cox, A.L., Crowe, J.E., and Bailey, J.R. (2019). Broadly neutralizing antibodies targeting new sites of vulnerability in hepatitis C virus E1E2. *J. Virol.* **93**, e02070–e02018.
- Cortes, C., and Vapnik, V. (1995). Support-vector networks. *Mach. Learn.* **20**, 273–297.
- de Jong, Y.P., Dorner, M., Mommersteeg, M.C., Xiao, J.W., Balazs, A.B., Robbins, J.B., Winer, B.Y., Gerges, S., Vega, K., Labitt, R.N., et al. (2014). Broadly neutralizing antibodies abrogate established hepatitis C virus infection. *Sci. Transl. Med.* **6**, 254ra129.
- Ehrhardt, S.A., Zehner, M., Krähling, V., Cohen-Dvashi, H., Kreer, C., Elad, N., Gruell, H., Ercanoglu, M.S., Schommers, P., Gieselmann, L., et al. (2019). Polyclonal and convergent antibody response to Ebola virus vaccine rVSV-ZEBOV. *Nat. Med.* **25**, 1589–1600.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132.
- Escolano, A., Steichen, J.M., Dosenovic, P., Kulp, D.W., Golijanin, J., Sok, D., Freund, N.T., Gitlin, A.D., Oliveira, T., Araki, T., et al. (2016). Sequential immunization elicits broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies in Ig knockin mice. *Cell* **166**, 1445–1458, e12.
- Evans, P.R., and Murshudov, G.N. (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1204–1214.
- Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Giannis, D., Strazzer, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H.J., and Purcell, R.H. (1996). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15394–15399.
- Flyak, A.I., Ruiz, S., Colbert, M.D., Luong, T., Crowe, J.E., Bailey, J.R., and Bjorkman, P.J. (2018). HCV broadly neutralizing antibodies use a CDRH3 disulfide motif to recognize an E2 glycoprotein site that can be targeted for vaccine design. *Cell Host Microbe* **24**, 703–716, e3.
- Flyak, A.I., Ruiz, S.E., Salas, J., Rho, S., Bailey, J.R., and Bjorkman, P.J. (2020). An ultralong CDRH2 in HCV neutralizing antibody demonstrates structural plasticity of antibodies against E2 glycoprotein. *Elife* **9**, e53169.
- Freeman, A.J., Dore, G.J., Law, M.G., Thorpe, M., Von Overbeck, J., Lloyd, A.R., Marinos, G., and Kaldor, J.M. (2001). Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **34**, 809–816.
- Gieselmann, L., Kreer, C., Ercanoglu, M.S., Lehnen, N., Zehner, M., Schommers, P., Potthoff, J., Gruell, H., and Klein, F. (2021). Effective high-throughput isolation of fully human antibodies targeting infectious pathogens. *Nat. Protoc.* **16**, 3639–3671.
- Haynes, B.F., Fleming, J., St Clair, E.W., Katinger, H., Stiegler, G., Kunert, R., Robinson, J., Scearce, R.M., Plonk, K., Staats, H.F., et al. (2005a). Cardioliipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* **308**, 1906–1908.
- Haynes, B.F., Moody, M.A., Verkoczy, L., Kelseo, G., and Alam, S.M. (2005b). Antibody polyspecificity and neutralization of HIV-1: a hypothesis. *Hum. Antibodies* **14**, 59–67.
- Irimia, A., Sarkar, A., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2016). Crystallographic identification of lipid as an integral component of the epitope of HIV broadly neutralizing antibody 4E10. *Immunity* **44**, 21–31.
- Kabat, E.A. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest (United States Department of Health and Human Services. Public Health Service, National Institutes of Health).
- Keck, Z.-Y., Xia, J., Wang, Y., Wang, W., Krey, T., Prentoe, J., Carlsen, T., Li, A.Y.-J., Patel, A.H., Lemon, S.M., et al. (2012). Human monoclonal antibodies to a novel cluster of conformational epitopes on HCV E2 with resistance to neutralization escape in a genotype 2a isolate. *PLoS Pathog* **8**, e1002653.
- Keck, Z., Wang, W., Wang, Y., Lau, P., Carlsen, T.H.R., Prentoe, J., Xia, J., Patel, A.H., Bukh, J., and Fong, S.K.H. (2013). Cooperativity in virus neutralization by human monoclonal antibodies to two adjacent regions located at the amino terminus of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J. Virol.* **87**, 37–51.
- Keck, Z.-Y., Wang, Y., Lau, P., Lund, G., Rangarajan, S., Fauvel, C., Liao, G.C., Holtsberg, F.W., Warfield, K.L., Aman, M.J., et al. (2016). Affinity

- maturation of a broadly neutralizing human monoclonal antibody that prevents acute hepatitis C virus infection in mice. *Hepatology* 64, 1922–1933.
- Kelsoe, G., and Haynes, B.F. (2017). Host controls of HIV broadly neutralizing antibody development. *Immunol. Rev.* 275, 79–88.
- Kinchen, V.J., and Bailey, J.R. (2018). Defining breadth of hepatitis C virus neutralization. *Front. Immunol.* 9, 1703.
- Kinchen, V.J., Cox, A.L., and Bailey, J.R. (2018a). Can broadly neutralizing monoclonal antibodies lead to a hepatitis C virus vaccine? *Trends Microbiol.* 26, 854–864.
- Kinchen, V.J., Zahid, M.N., Flyak, A.I., Soliman, M.G., Learn, G.H., Wang, S., Davidson, E., Doranz, B.J., Ray, S.C., Cox, A.L., et al. (2018b). Broadly neutralizing antibody mediated clearance of human hepatitis C virus infection. *Cell Host Microbe* 24, 717–730, e5.
- Klein, F., Diskin, R., Scheid, J.F., Gaebler, C., Mouquet, H., Georgiev, I.S., Pancera, M., Zhou, T., Incesu, R.B., Fu, B.Z., et al. (2013a). Somatic mutations of the immunoglobulin framework are generally required for broad and potent HIV-1 neutralization. *Cell* 153, 126–138.
- Klein, F., Mouquet, H., Dosenovic, P., Scheid, J.F., Scharf, L., and Nussenzweig, M.C. (2013b). Antibodies in HIV-1 vaccine development and therapy. *Science* 341, 1199–1204.
- Kong, L., Giang, E., Nieuwma, T., Kadam, R.U., Cogburn, K.E., Hua, Y., Dai, X., Stanfield, R.L., Burton, D.R., Ward, A.B., et al. (2013). Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science* 342, 1090–1094.
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2006). Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J. Virol.* 80, 5308–5320.
- Kreer, C., Döring, M., Lehnen, N., Ercanoglu, M.S., Gieselmann, L., Luca, D., Jain, K., Schommers, P., Pfeifer, N., and Klein, F. (2020a). openPrimeR for multiplex amplification of highly diverse templates. *J. Immunol. Methods* 480, 112752.
- Kreer, C., Zehner, M., Weber, T., Ercanoglu, M.S., Gieselmann, L., Rohde, C., Halwe, S., Korenkov, M., Schommers, P., Vanshylla, K., et al. (2020b). Longitudinal isolation of potent near-germline SARS-CoV-2-neutralizing antibodies from COVID-19 patients. *Cell* 182, 843–854, e12.
- Krey, T., D'Alayer, J., Kikuti, C.M., Saulnier, A., Damier-Piolle, L., Petitpas, I., Johansson, D.X., Tawar, R.G., Baron, B., Robert, B., et al. (2010). The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog* 6, e1000762.
- Krissinel, E., and Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* 372, 774–797.
- Law, M., Maruyama, T., Lewis, J., Giang, E., Tarr, A.W., Stamatakis, Z., Gastaminza, P., Chisari, F.V., Jones, I.M., Fox, R.I., et al. (2008). Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat. Med.* 14, 25–27.
- Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Duroux, P., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Aouinti, S., Carillon, E., Duvergey, H., Houles, A., Paysan-Lafosse, T., et al. (2015). IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. *Nucleic Acids Res* 43, D413–D422.
- Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V., and Lefranc, G. (2003). IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 55–77.
- Liu, L., Wang, P., Nair, M.S., Yu, J., Rapp, M., Wang, Q., Luo, Y., Chan, J.F.W., Sahi, V., Figueroa, A., et al. (2020). Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature* 584, 450–456.
- Logvinoff, C., Major, M.E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S.M., Alter, H., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2004). Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 10149–10154.
- Luna, J.M., Saeed, M., and Rice, C.M. (2019). Taming a beast: lessons from the domestication of hepatitis C virus. *Curr. Opin. Virol.* 35, 27–34.
- Merat, S.J., Bru, C., van de Berg, D., Molenkamp, R., Tarr, A.W., Koekkoek, S., Kootstra, N.A., Prins, M., Ball, J.K., Bakker, A.Q., et al. (2019). Cross-genotype AR3-specific neutralizing antibodies confer long-term protection in injecting drug users after HCV clearance. *J. Hepatol.* 71, 14–24.
- Merat, S.J., Molenkamp, R., Wagner, K., Koekkoek, S.M., Van De Berg, D., Yasuda, E., Böhne, M., Claassen, Y.B., Grady, B.P., Prins, M., et al. (2016). Hepatitis C virus broadly neutralizing monoclonal antibodies isolated 25 years after spontaneous clearance. *PLoS One* 11, e0165047.
- Morin, T.J., Broering, T.J., Leav, B.A., Blair, B.M., Rowley, K.J., Boucher, E.N., Wang, Y., Cheslock, P.S., Knauber, M., Olsen, D.B., et al. (2012). Human monoclonal antibody HCV1 effectively prevents and treats HCV infection in chimpanzees. *PLoS Pathog* 8, e1002895.
- Osburn, W.O., Snider, A.E., Wells, B.L., Latanich, R., Bailey, J.R., Thomas, D.L., Cox, A.L., and Ray, S.C. (2014). Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses. *Hepatology* 59, 2140–2151.
- Pappas, L., Foglierini, M., Piccoli, L., Kallewaard, N.L., Turrini, F., Silacci, C., Fernandez-Rodríguez, B., Agatic, G., Giacchetto-Sasselli, I., Pellicciotta, G., et al. (2014). Rapid development of broadly influenza neutralizing antibodies through redundant mutations. *Nature* 516, 418–422.
- Perin, P.M., Haid, S., Brown, R.J.P., Doerrbecker, J., Schütze, K., Zeilinger, C., von Schaeuwen, M., Heller, B., Vercauteren, K., Luxenburger, E., et al. (2016). Flunarizine prevents hepatitis C virus membrane fusion in a genotype-dependent manner by targeting the potential fusion peptide within E1. *Hepatology* 63, 49–62.
- Pestka, J.M., Zeisel, M.B., Bläser, E., Schürmann, P., Bartosch, B., Cosset, F.L., Patel, A.H., Meisel, H., Baumert, J., Viazov, S., et al. (2007). Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 6025–6030.
- Pinto, D., Park, Y.J., Beltramello, M., Walls, A.C., Tortorici, M.A., Bianchi, S., Jaconi, S., Culap, K., Zatta, F., De Marco, A., et al. (2020). Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature* 583, 290–295.
- Roingard, P., and Beaumont, E. (2020). Hepatitis C vaccine: 10 good reasons for continuing. *Hepatology* 71, 1845–1850.
- Sainz, B., Barretto, N., Martin, D.N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K.A., Yu, X., Chayama, K., Alrefai, W.A., et al. (2012). Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat. Med.* 18, 281–285.
- Scheid, J.F., Mouquet, H., Feldhahn, N., Seaman, M.S., Velinzon, K., Pietzsch, J., Ott, R.G., Anthony, R.M., Zebroski, H., Hurley, A., et al. (2009). Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 458, 636–640.
- Schommers, P., Gruell, H., Abernathy, M.E., Tran, M.K., Dingens, A.S., Gristick, H.B., Barnes, C.O., Schoofs, T., Schlotz, M., Vanshylla, K., et al. (2020). Restriction of HIV-1 escape by a highly broad and potent neutralizing antibody. *Cell* 180, 471–489, e22.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539.
- Sirkoski, A.M., Sierra, S., Qurishi, N., Bagel, B., Schelhorn, E.S., Lengauer, T., Erhardt, A., Goesser, T., Esser, S., Häussinger, D., et al. (2013). 1204 The Pepsi project: HCV resistance screening and prediction of pi-containing therapy outcome. *J. Hepatol.* 58, S489–S490.
- Ströh, L.J., and Krey, T. (2020). HCV glycoprotein structure and implications for B-cell vaccine development. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–20.
- Suryadevara, N., Shrihari, S., Gilchuk, P., VanBlargan, L.A., Binshtein, E., Zost, S.J., Nargi, R.S., Sutton, R.E., Winkler, E.S., Chen, E.C., et al. (2021). Neutralizing and protective human monoclonal antibodies recognizing the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 spike protein. *Cell* 184, 2316–2331, e15.
- Thomas, D.L. (2019). Global elimination of chronic hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 380, 2041–2050.
- Tiller, T., Meffre, E., Yurasov, S., Tsuiji, M., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H. (2008). Efficient generation of monoclonal antibodies from



- single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J. Immunol. Methods* 329, 112–124.
- Tzarum, N., Giang, E., Kong, L., He, L., Prentoe, J., Augestad, E., Hua, Y., Castillo, S., Lauer, G.M., Bukh, J., et al. (2019). Genetic and structural insights into broad neutralization of hepatitis C virus by human VH 1–69 antibodies. *Sci. Adv.* 5, eaav1882.
- Tzarum, N., Wilson, I.A., and Law, M. (2018). The neutralizing face of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *Front. Immunol.* 9, 1315.
- Vander Heiden, J.A., Yaari, G., Uduman, M., Stern, J.N.H., O'Connor, K.C., Hafler, D.A., Vigneault, F., and Kleinstein, S.H. (2014). pRESTO: a toolkit for processing high-throughput sequencing raw reads of lymphocyte receptor repertoires. *Bioinformatics* 30, 1930–1932.
- Von Boehmer, L., Liu, C., Ackerman, S., Gittlin, A.D., Wang, Q., Gazumyan, A., and Nussenzweig, M.C. (2016). Sequencing and cloning of antigen-specific antibodies from mouse memory B cells. *Nat. Protoc.* 11, 1908–1923.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., Mizokami, M., et al. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11, 791–796.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E., and Nussenzweig, M.C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301, 1374–1377.
- Wrensch, F., Crouchet, E., Ligat, G., Zeisel, M.B., Keck, Z.-Y., Fong, S.K.H., Schuster, C., and Baumert, T.F. (2018). Hepatitis C virus (HCV)-apolipoprotein interactions and immune evasion and their impact on HCV vaccine design. *Front. Immunol.* 9, 1436.
- Ye, J., Ma, N., Madden, T.L., and Ostell, J.M. (2013). IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool. *Nucleic Acids Res* 41, W34–W40.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., and Chisari, F.V. (2005). Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 9294–9299.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Anti-Human CD20-Alexa Fluor 700 (Clone 2H7)	BD Biosciences	Cat#560631; RRID: AB_1727447
Goat Anti-Human IgG-HRP	Southern Biotech	Cat#2040-05; RRID: AB_2795644
HCV Antibody AP33	<a href="#">Clayton et al., 2002</a>	N/A
HCV Antibody AR3C	<a href="#">Law et al., 2008</a>	N/A
HCV Antibody AT12-007	<a href="#">Merat et al., 2016</a>	N/A
HCV Antibody AT13-021	<a href="#">Merat et al., 2016</a>	N/A
HCV Antibody HC33.8	<a href="#">Keck et al., 2013</a>	N/A
HCV Antibody HC84.27	<a href="#">Keck et al., 2012</a>	N/A
HCV Antibody HEPC-3	<a href="#">Bailey et al., 2017</a>	N/A
IgG1 isotype control antibody MGO-53	<a href="#">Wardemann et al., 2003</a>	N/A
Monoclonal anti-HCV E2 patient-derived antibodies	This paper	N/A
Monoclonal anti-HIV patient-derived antibodies	This paper	N/A
PE Mouse Anti-human IgG (clone G18-145)	BD Biosciences	Cat#555787; RRID: AB_396122
StrepMAB-Classic Oyster 645 conjugate	IBA Lifesciences	Cat#2-1555-050; RRID:
HIV-1 Antibody 4E10	Laboratories of P.W.H.I. Parren and D. Burton; The Scripps Research Institute, La Jolla, California	N/A
<b>Bacterial and virus strains</b>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Thermo Fisher	Cat#18263012
HCVcc strain "1b Con" (Con1/1b/R2a)	<a href="#">Bankwitz et al., 2021</a>	Gen Bank (E1/E2 sequence): AJ238799.1
HCVcc strain "1b J4" (J4/1b/R2a)	<a href="#">Bankwitz et al., 2021</a>	Gen Bank (E1/E2 sequence): AF054247.1
HCVcc strain "2a" (JcR-2a)	<a href="#">Bankwitz et al., 2021</a>	Gen Bank (E1/E2 sequence): NC_009823.1
HCVcc strain "2b" (J8/2b/R2a)	<a href="#">Bankwitz et al., 2021</a>	Gen Bank (E1/E2 sequence): JQ745651.1
HCVcc strain "4a" (ED43/4a/R2a)	<a href="#">Bankwitz et al., 2021</a>	Gen Bank (E1/E2 sequence): NC_009825.1
HCVcc strain "5a" (SA13/5a/R2a)	<a href="#">Bankwitz et al., 2021</a>	Gen Bank (E1/E2 sequence): MH427311.1
HCVcc strain "1a.H77" (H77c/1a/R2a)	<a href="#">Bankwitz et al., 2021</a>	Gen Bank (E1/E2 sequence): NC_038882.1
HCVcc strain "2a-3" (2a-3/2a/R2a)	<a href="#">Bankwitz et al., 2021</a>	Gen Bank (E1/E2 sequence): KM361734.1
HCVcc strain "2b-4" (2b-4/2b/R2a)	<a href="#">Bankwitz et al., 2021</a>	Gen Bank (E1/E2 sequence): KM361730.1
HCVcc strain "2b-5" (2b-5/2b/R2a)	<a href="#">Bankwitz et al., 2021</a>	Gen Bank (E1/E2 sequence): KM361731.1
HCVcc strain "2k" (2k/2k/R2a)	<a href="#">Bankwitz et al., 2021</a>	Gen Bank (E1/E2 sequence): AB031663.1
HCVcc strain "2r" (2r/2r/R2a)	<a href="#">Bankwitz et al., 2021</a>	Gen Bank (E1/E2 sequence): JF735115.1
HCVcc strain "3a" (S52/3a/R2a)	<a href="#">Bankwitz et al., 2021</a>	Gen Bank (E1/E2 sequence): GU814264.1
<b>Chemicals, peptides, and recombinant proteins</b>		
ABTS solution	Thermo Fisher	Cat#002024
Adenosine triphosphate	Roche (Sigma Aldrich)	Cat#000000011140965001
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)	Carl Roth	Cat#8076.3
Branched Polyethylenimine, 25 kDa	Sigma Aldrich	Cat#408727; CAS: 9002-98-6
Cardiolipin	Sigma Aldrich	Cat#C0563
Colenterazine	PJK Biotech	Cat#102171
Cytidine triphosphate	Roche (Sigma Aldrich)	Cat#000000011140922001
DAPI	Thermo Fisher	Cat#D1306; CAS: 581-88-4
DMEM, high glucose	Gibco (Thermo Fisher)	Cat#41965039
DMSO	Sigma Aldrich	Cat#D2650; CAS: 67-68-5
dNTP Mix	Thermo Fisher	Cat#R1122
DTT	Sigma Aldrich	Cat#GE17-1318-01 CAS: 3483-12-3

(Continued on next page)



**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Fetal bovine serum (FBS)	Sigma Aldrich	Cat#F9665
Fetal bovine serum (FBS), HCVcc assay tested	Capricorn Scientific	Cat#FBS-11A, Lot#CP16-1515
FreeStyle Expression Medium	Thermo Fisher	Cat#12338001
Guanosine triphosphate	Roche (Sigma Aldrich)	Cat#000000011140957001
HEPES	Gibco (Thermo Fisher)	Cat#15630-080
Histopaque-1077	Sigma Aldrich	Cat#H8889
Human insulin	Sigma Aldrich	Cat#I9278
KLH	Sigma Aldrich	Cat#H8283
L-Glutamine	Gibco (Thermo Fisher)	Cat#25030024
LPS from <i>E. coli</i>	Sigma Aldrich	Cat#L2637
MEM NEAA	Gibco (Thermo Fisher)	Cat#11140-050
NOVA Lite Hep-2 ANA Kit	Inova Diagnostics / Werfen	Cat#066708100
Penicillin-Streptomycin	Gibco (Thermo Fisher)	Cat#15140122
Platinum Taq Green Hot Start DNA Polymerase	Thermo Fisher	Cat#11966034
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Life Sciences	Cat#17061805
Q5 Hot Start High Fidelity DNA Polymerase	NEB	Cat#M0493L
Recombinant HCV E2 protein pT1056 (GT 2b)	This paper	N/A
RNaseOUT	Thermo Fisher	Cat#10777019
Rnasin	Promega	Cat#N2515
RQ1 RNase-free DNase I	Promega	Cat#M6101
Spermidine	Sigma Aldrich	Cat#S2626-1G CAS: 124-20-9
SuperScript IV Reverse Transcriptase	Thermo Fisher	Cat#18090050
T4 DNA Polymerase	New England Biolabs	Cat#M0203L
T7 RNA Polymerase	Promega	Cat#P2075
Uridine triphosphate	Roche (Sigma Aldrich)	Cat#000000011140949001
<b>Critical commercial assays</b>		
CD19 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec	Cat#130-050-301
EZ-Link sulfo-NHS-biotin	Thermo Fisher	A39256
RNA cleanup kit	Machery Nagel	Cat#740948.5
<b>Deposited data</b>		
HCV antibody heavy and light chain sequences	This paper	GenBank: OL704862 - OL705481
NGS data of IgG repertoires	This paper	NCBI SRA: SAMN23561202- SAMN23561205
1198_05_G10-E2ecto structure	This paper	PDB: 7RFB
1382_01_H05-E2ecto structure	This paper	PDB: 7RFC
Matlab code for machine learning	This paper	DOI: 10.5281/zenodo.5713270
<b>Experimental models: Cell lines</b>		
HEK 293-6E cell line	National Research Council Canada (NRC)	NRC file 11565
Huh 7.5 cell line	<a href="#">Blight et al., 2002</a>	RRID: CVCL_7927
Huh 7.5.1 cell line	<a href="#">Zhong et al., 2005</a>	RRID: CVCL_E049
<b>Experimental models: Organisms/strains</b>		
None	N/A	N/A
<b>Oligonucleotides</b>		
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher	Cat#SO142
Single cell PCR Primers	<a href="#">Kreer et al., 2020a</a>	N/A
SLIC heavy chain reverse primer (GGGTGCCAGGGGAAGACCGAT GGCCCTTGGTCGAGGC)	<a href="#">Kreer et al., 2020b</a>	N/A
SLIC kappa chain reverse primer (CTCATCAGATGGCGGAAGATG AAGACAGATGGTCAGCCACCGTACG)	<a href="#">Kreer et al., 2020b</a>	N/A

(Continued on next page)

<b>Continued</b>		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
SLIC lambda chain reverse primer (GAAGCTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG)	<a href="#">Kreer et al., 2020b</a>	N/A
VH1-69 genotyping primer fwd (AGGAAGGGATCCTGGTTT)	Adapted from <a href="#">Pappas et al. (2014)</a>	N/A
VH1-69 genotyping primer rev (GATGTGGGTTTCACTGTGT)	Adapted from <a href="#">Pappas et al. (2014)</a>	N/A
<b>Recombinant DNA</b>		
Human antibody expression vector IgG1	<a href="#">Tiller et al., 2008</a>	Available through Addgene as plasmid #80795
Human antibody expression vector Ig kappa	<a href="#">Tiller et al., 2008</a>	Available through Addgene as plasmid #80796
Human antibody expression vector Ig lambda	<a href="#">Tiller et al., 2008</a>	Available through Addgene as plasmid #99575
Plasmids encoding HCVcc strains (see section Bacterial and Virus Strains for details)	<a href="#">Bankwitz et al., 2021</a>	N/A
<b>Software and algorithms</b>		
Adobe Illustrator CC 2018	Adobe	NA
FlowJo 10.5.3	FlowJo, LLC	NA
Geneious R10 and Geneious Prime	Geneious	RRID: SCR_010519
IgBlast	National Library of Medicine; <a href="#">Ye et al., 2013</a>	RRID: SCR_002873
Prism 7	GraphPad	RRID: SCR_002798
Python 3.6.8	Python Software Foundation; <a href="https://www.python.org/">https://www.python.org/</a>	RRID: SCR_008394
<b>Other</b>		
Amicon MWCO 30 kDa	Merck Millipore	Cat#Z677108
FACSAria Fusion	BD	N/A
Microscope DMI3000 B	Leica	N/A
Pierce High Sensitivity Streptavidin-HRP	Thermo Fisher	Cat#21130

## RESOURCE AVAILABILITY

### Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Florian Klein ([florian.klein@uk-koeln.de](mailto:florian.klein@uk-koeln.de)).

### Materials availability

Antibodies will be made available by the lead contact upon request with a Material Transfer Agreement for non-commercial usage.

### Data and code availability

- Nucleotide sequences of all antibodies have been deposited at Genbank. NGS data have been deposited at the Sequence Read Archive (SRA). Coordinates for atomic models have been deposited at the Protein Data Bank (PDB). The data are publicly available as of the date of publication and accession numbers are listed in the key resources table.
- All original code has been deposited at Zenodo and is publicly available as of the date of publication. The Digital Object Identifier (DOI) is listed in the key resources table.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

## EXPERIMENTAL MODELS AND SUBJECT DETAILS

### HCV-infected individuals and sample collection

Samples were obtained under study protocols 11-312 and 16-054 (approved by the Ethics Commission of the Medical Faculty of the University of Cologne) as well as study protocol 017/16 (approved by the Ethics Commission of the Medical Faculty of the University

of Bonn). All participants provided written informed consent. Serum was collected from patients (71% male, median age 49 years; see Figure 1B) treated at the Clinic for Gastroenterology, Department I of Internal Medicine, University Hospital of Bonn, Germany, or enrolled in the PEPSI study (Sirkoski et al., 2013) at hospitals or as outpatients in the German cities of Bielefeld, Bonn, Cologne, Dortmund, Dresden, Duisburg, Düsseldorf, Iserlohn, Lüdenscheid, Munich, Osnabrück, and Wuppertal. For the donation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), patients were invited to the University Hospital of Bonn or Cologne.

#### Cell lines

HEK 293-6E cells (National Research Council Canada, file 11565) were maintained in FreeStyle Expression Medium (Thermo Fisher) containing 0.2% Penicillin-Streptomycin (Gibco) in a shaking incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Huh 7.5 (Blight et al., 2002) and Huh 7.5.1 cells (Zhong et al., 2005) were maintained in DMEM (Gibco) supplemented with 2 mM L-glutamine (Gibco), 10% FBS (Capricorn), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco) and 1% MEM NEAA (Gibco) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. HEK 293-6E cells are female. Huh 7.5 and Huh 7.5.1 cells are male.

#### METHOD DETAILS

##### Isolation of polyclonal serum IgG (pIgG)

Serum samples were heat-inactivated at 56°C for 40 min and then incubated with Protein G Sepharose (GE Life Sciences) overnight at 4°C. pIgG was eluted by adding 0.1 M glycine at pH 3.0 onto the Protein G Sepharose in chromatography columns. Eluate was buffered with 1/10 volume of 1 M Tris, pH 8.0. Subsequently, Amicon 30 kDa spin membranes (Millipore) were used to perform buffer exchange to PBS (Gibco) and to adjust pIgG concentration. pIgG concentration was measured using a Nanodrop (A280). IgG samples were stored at 4°C.

##### Virus particle production

HCV particles were produced as previously published (Koutsoudakis et al., 2006; Wakita et al., 2005). Plasmids containing a T7 promoter, a Renilla luciferase gene, and genomes of the previously described (Bankwitz et al., 2021) HCVcc strains 1bCon (Con1), 1bJ4 (J4/JFH1), 2a (J6/JFH1), 2b (J8/JFH1), 4a (ED43/JFH1), and 5a (SA13/JFH1) were used as templates for *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase (Promega) in 80 mM HEPES pH 7.5, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.125 mM (each) ribonucleotides (Roche), 2 mM spermidine (Sigma Aldrich), 40 mM DTT, and 1 U/μL RNasin (Promega) for 4 h at 37°C. DNA was digested with DNase (Promega) for 30 min at 37°C. RNA was purified using an RNA cleanup kit (Machery Nagel). RNA was electroporated at 975 μF and 270 V into 6 × 10<sup>5</sup> Huh 7.5.1 cells (Zhong et al., 2005), suspended in 400 μL Cytomix buffer (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6). Cells were then cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 2 mM L-glutamine (Gibco), 10% FBS (Capricorn), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco) and 1% MEM NEAA (Gibco) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Supernatant was harvested after 48, 72, and 96 h, pooled, aliquoted, and stored at -80°C until further use.

##### HCVcc neutralization assay

Neutralization assays were performed as previously described (Koutsoudakis et al., 2006; Wakita et al., 2005). In brief, Huh 7.5 cells (Blight et al., 2002) were seeded at a density of 10<sup>4</sup> cells per well in a 96-well plate (Falcon) in 200 μL supplemented DMEM (see above) and incubated for 24 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Equal volumes of viral supernatant and antibodies (final concentration of 50 μg/mL) or purified pIgG (final concentration of 300 μg/mL) were mixed and co-incubated at 37°C for 30-60 min and 40 μL was added to pre-cultured Huh 7.5 cells, from which the medium had been aspirated. After 4 h of culture, 160 μL supplemented DMEM (see above) was added to each well. After 3 days of culture, supernatant was removed and cells were washed with PBS (Gibco) and lysed by adding 35 μL ddH<sub>2</sub>O and freezing at -80°C. 20 μL of the thawed lysate was transferred to a white microtiter assay plate (Berthold). 60 μL of 0.424 μg/mL coelenterazine (PJK Biotech) in PBS was added to each well in a plate reader (Tri Star, Berthold). Renilla luminescence was determined (counting time 0.1 sec) after a reaction delay of 5 sec and shaking (1 sec). Luminescence was quantified relative to wells infected with virus alone (at least 4 control wells on the same assay plate) to obtain % neutralization values. For example, if the median luminescence of the virus-only control wells on a given plate was 10,000 arbitrary units (AU), then ≥ 10,000 AU luminescence of a well on the same plate would indicate 0% neutralization; 2,000 AU luminescence would indicate 80% neutralization; and 0 AU luminescence would indicate 100% neutralization. Besides virus-only control wells, each plate contained one control well with a published HCV bNAb (AR3C) and one control well with an isotype control antibody (MGO-53). For each independent experiment, % neutralization values were determined in technical triplicates. As a measure of neutralization breadth, we determined the fraction of HCVcc strains neutralized. For a strain to be considered neutralized, we chose a cutoff neutralization value of 40% based on our experience that neutralization values of the isotype control were routinely smaller than 20% and never exceeded 40% (see also Figure S1B).

##### Expression and purification of E2 constructs

An E2 core fragment (residues 412 – 645; pT1056) of isolate UKNP2.5.1 lacking HVR2 with asparagines constituting N-linked glycosylation sites 4 and 9 mutated to aspartic acid was produced as bait for B cell isolation in *Drosophila* S2 cells as described before (Krey et al., 2010) and purified from the supernatant using a StrepTactin Superflow column (IBA) followed by gel filtration chromatography using a Superdex 200 Increase 10/300 GL column (GE Healthcare). For ELISA experiments to determine front layer-dependent

E2 binding, His-tagged E2ecto protein (residues 384 – 643) was expressed by transiently transfecting Expi293F cells (National Research Council of Canada) and purified from clarified supernatants using a HisTrap FF column (GE Healthcare) followed by SEC on a Superdex 200 Increase 10/300 GL column (GE Healthcare) to separate monomeric E2ecto proteins from oligomeric species. 1a157 E2ecto  $\Delta$ FRLY contains mutations T425A, L427A, N428A, S432A, G436A, W437A, G530A, and D535A that disable E2 front layer epitopes. For structural studies, the His-tag was removed from an expression vector encoding a strain 1b09 E2 ectodomain.

#### B cell isolation

Blood was drawn into syringes pre-filled with heparin. PBMCs were isolated using density gradient separation medium (Histopaque, Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions and stored at  $-150^{\circ}\text{C}$  in 10% DMSO (Sigma-Aldrich) and 90% (v/v) FBS (Sigma-Aldrich). B cells were obtained from PBMCs by magnetic separation using CD19 Microbeads (Miltenyi Biotec). B cells were stained with anti-human CD20-Alexa Fluor 700 (BD), anti-human IgG-PE (BD), DAPI (Thermo Fisher), recombinant HCV E2 core protein pT1056 (245 ng/ $\mu\text{L}$ ), and StrepMAB-Classic Oyster 645 conjugate (IBA Lifesciences). For single-cell sorting of HCV-reactive B cells, DAPI<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>pT1056<sup>+</sup> cells were sorted into 96-well plates containing 4  $\mu\text{L}$  of lysis buffer per well consisting of 0.5x PBS (Gibco), 0.5 U/ $\mu\text{L}$  RNasin (Promega), 0.5 U/ $\mu\text{L}$  RNaseOUT (Thermo Fisher), and 10 mM DTT using a FACSAria Fusion cell sorter (BD). To obtain IgG B cells for next-generation sequencing,  $2 \times 10^5$  DAPI<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> cells were sorted into FBS (Sigma Aldrich), which was subsequently removed by centrifugation. Sorted cells were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Antibody heavy- and light chain gene amplification and sequence analysis

Single cell amplification of antibody heavy and light chain genes was done as previously published (Ehrhardt et al., 2019; Gieselmann et al., 2021; Kreer et al., 2020a, 2020b; Schommers et al., 2020). Cells were lysed, followed by reverse transcription of RNA into cDNA using Superscript IV reverse transcriptase (Thermo Fisher) and random hexamer primers (Invitrogen) in the presence of RNasin (Promega) and RNaseOUT (Thermo Fisher). cDNA was used as template for heavy and light chain amplification through semi-nested PCR using PlatinumTaq HotStart DNA polymerase (Thermo Fisher) with V gene-specific forward primer mixes (Kreer et al., 2020a), published reverse primers (Tiller et al., 2008), and KB extender. PCR products were analyzed by gel electrophoresis and Sanger sequencing. Sequences that passed quality control (chromatograms with mean Phred scores of at least 28 and length of at least 240 nucleotides) were annotated with IgBLAST (Ye et al., 2013) and trimmed to the variable region (FWR1 to the end of the J gene). In a second quality control step, sequences were excluded when their variable regions contained more than 15 base calls with Phred scores below 16, frame shifts, or stop codons. For each HCV-infected individual, B cells were grouped into clones with same V, D, and J gene usage and at least 75% amino acid identity within their CDRH3s as previously described (Kreer et al., 2020b).

#### Next generation sequencing and evaluation of IgG<sup>+</sup> B cell repertoires

For reference IgG repertoires, we generated cDNA from  $2 \times 10^5$  CD20<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup> B cells by 5' rapid amplification of cDNA ends (5'RACE) and performed 2x300 bp Illumina sequencing followed by sequence analysis with an in-house pipeline, as described previously (Ehrhardt et al., 2019). Briefly, data processing comprised an initial filtering of raw-reads for a mean Phred score of 25 and a minimal read length of 250 base pairs. Sequences were then grouped by an 18 nucleotide unique molecular identifier (UMI), which was added during 5'RACE, as well as an additional molecular identifier (MID) of 18 nucleotides (covering the CDR3) to exclude wrongly assigned sequences. Sequences that were not assigned to a UMI/MID group (single reads) were excluded from further analyses. For all other groups, alignments were performed with Clustal Omega (Sievers et al., 2011) and consensus sequences were built with quality-weighted base call frequencies. The two 300 bp consensus reads were assembled with the pRESTO toolkit (Vander Heiden et al., 2014) and sequences were annotated with IgBLAST (Ye et al., 2013). Only productive sequences (i.e., without frame-shift or stop-codons) were used for repertoire analyses.

#### Cloning and production of monoclonal antibodies

PCR products obtained in the first round of semi-nested single-cell PCR (described above) were used as templates for PCR amplification with specific forward- and reverse primers for the respective V- and J-regions with expression vector overhangs (Kreer et al., 2020b; Tiller et al., 2008). Analogous V(D)J segments encoding mutated antibody variants or published control antibodies, flanked by expression vector overhangs, were synthesized as double-stranded DNA fragments (IDT DNA). PCR products or DNA fragments were cloned into human antibody expression vectors (IgG1 heavy-, kappa-, or lambda chain) by sequence- and ligation-independent cloning (SLIC) assembly as previously published (Von Boehmer et al., 2016). 293-6E cells (National Research Council Canada) were co-transfected with plasmids encoding heavy- and light chains using 25 kDa branched polyethylenimine (PEI, Sigma Aldrich). 293-6E cells were cultured for antibody production at  $37^{\circ}\text{C}$  and 6%  $\text{CO}_2$  in FreeStyle 293 Expression Medium (Gibco) containing 0.2% penicillin/streptomycin (Gibco). After 7 days, supernatants were harvested by centrifugation and incubated with Protein G Sepharose (GE Life Sciences) overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Antibodies were eluted by adding 0.1 M glycine at pH 3.0 onto the Protein G Sepharose in chromatography columns. Eluate was buffered with 1/10 volume of 1 M Tris, pH 8.0. Subsequently, Amicon 30 kDa spin membranes (Millipore) were used to perform buffer exchange to PBS (Gibco) and to adjust concentrations. Antibody concentrations were measured using a Nanodrop (A280). Antibodies were stored at  $4^{\circ}\text{C}$ .



Control antibodies directed against HIV-1 were isolated as part of an as yet unpublished study in our laboratory. Single B cells directed against a stabilized HIV envelope glycoprotein were sorted as previously published (Schommers et al., 2020) and monoclonal antibodies were cloned and produced as described above.

#### ELISA analysis to determine antibody binding activity to HCV E2 protein or polyreactivity

96-well ELISA plates (Corning) were coated with 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HCV E2 protein in PBS overnight at 4°C. For polyreactivity ELISA (Haynes et al., 2005a; Wardemann et al., 2003), plates were coated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  human insulin (Sigma) or 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Lipopolysaccharide from *E. Coli* (Sigma) or 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Keyhole limpet hemocyanin (Sigma) in PBS overnight at room temperature; or plates were coated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bovine cardiolipin (Sigma) in pure ethanol overnight at room temperature. For coating with cardiolipin, plates were allowed to dry out. After washing six times with PBS-T (PBS, 0.05% v/v Tween-20), plates were blocked with 200  $\mu\text{L}$  of 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA, Carl Roth) in PBS, and incubated for 90 min at room temperature. Plates were then washed as before and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-human IgG antibody (Southern Biotech) was added (diluted 1:1000 in 2% w/v BSA/PBS) and incubated for 60 min at room temperature. Plates were then washed as before and ABTS solution (Thermo Fisher) was added. Readout was performed at an absorbance of 415 nm with subtraction of 695 nm background using a plate reader (Tecan Sunrise).

#### Hep-2 assay

Monoclonal antibodies were tested at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS using the NOVA Lite HEP-2 ANA Kit (Inova Diagnostics) including a kit-supplied high control according to the manufacturer's instructions. Images were acquired using a DMI3000 B microscope (Leica).

#### Expression and purification of E2-Fab complexes

1198\_05\_G10 Fab-1b09 E2ecto and 1382\_01\_H05 Fab-1b09 E2ecto complexes for structural studies were produced in Expi293F cells in the presence of 5  $\mu\text{M}$  kifunensine (Sigma) by co-transfecting expression vectors encoding His-tagged Fab and untagged E2ecto to allow isolation of stable Fab-E2 complexes (Flyak et al., 2018). Protein complexes were purified from supernatants using Ni-NTA chromatography on HisTrap HP column (GE Healthcare) followed by SEC on a Superdex 200 Increase 10/300 GL column (GE Healthcare).

#### Crystallization, data collection and structure determinations

Commercially-available screens (Hampton Research and Molecular Dimensions) were used to screen initial crystallization conditions by vapor diffusion in sitting drops. 1198\_05\_G10-E2ecto crystals were grown using 0.2  $\mu\text{L}$  of protein complex in TBS and 0.2  $\mu\text{L}$  of mother liquor (0.1 M ammonium acetate, 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 17% PEG 10,000) and cryoprotected in Al's oil. 1382\_01\_H05-E2ecto crystals were grown using 0.2  $\mu\text{L}$  of protein complex in TBS and 0.2  $\mu\text{L}$  of mother liquor (0.03 M citric acid, 0.07 M BIS-TRIS propane pH 7.6, 20% PEG 3,350) and cryoprotected in mother liquor supplemented with 25% (v/v) glycerol. X-ray diffraction data from cryopreserved crystals were collected at the Stanford Synchrotron Radiation Lightsources on beamline 12-2 using a PILATUS 6M detector. Images were processed and scaled using iMosflm (Battye et al., 2011) and Aimless as implemented in the CCP4 software suite (Evans and Murshudov, 2013). Structures were solved by molecular replacement using the HEPc74 (PDB 6MEH) and 1b09 HCV E2ecto (PDB 6MEI) structures as search models. The models were refined and validated using Phenix.refine (Adams et al., 2010). Iterative manual model building and corrections were performed using Coot (Emsley and Cowtan, 2004). Glycans were initially interpreted and modeled using  $F_o - F_c$  maps calculated with model phases contoured at  $2\sigma$ , followed by  $2F_o - F_c$  simulated annealing composite omit maps generated in Phenix in which modeled glycans were omitted to remove model bias (Adams et al., 2010). The quality of the final models was examined using MolProbity (Chen et al., 2010).

Models were superimposed and figures rendered using the PyMOL molecular visualization system (Version 2.1, Schrödinger, LLC). Buried surface areas (BSAs) were determined using the PDBePISA web-based interactive tool (Krissinel and Henrick, 2007). Potential hydrogen bonds were assigned using criteria of a distance of  $<4.0 \text{ \AA}$  and an A-D-H angle of  $>90^\circ$ , and the maximum distance allowed for a van der Waals interaction was 4.0  $\text{ \AA}$ . Rmsd calculations were done in PyMOL following pairwise C $\alpha$  alignments. Antibody residues were numbered according to the Kabat numbering scheme, and ImmunoGeneTics (IMGT) definitions of CDRs were used throughout the paper (Kabat, 1991; Lefranc et al., 2003).

#### Reversion of VH1-69 somatic mutations to the germline sequence

First, we determined germline VH1-69 allelic variants by sequencing of genomic DNA. For this, a fragment of the VH1-69 gene was amplified as previously published (Pappas et al., 2014) from PBMC genomic DNA. PCR products were cloned into TOPO vectors. At least 8 clones per individual were sequenced by Sanger sequencing. To revert VH1-69 somatic mutations to germline, sequences were replaced by those of the most similar VH1-69 allelic variant from the global ImmunoGeneTics (IMGT) database up until FWR3 (Lefranc et al., 2015). CDRs were defined according to the IMGT scheme (Lefranc et al., 2003).

#### Machine learning

Our machine learning problem was a classification task and stated as follows:

Given  $V_H$  gene segment amino acid sequences and the HCV neutralization efficacy (good/bad) of the corresponding antibodies, build a model which predicts the HCV neutralization efficacy of antibodies encoded by any  $V_H$  gene segment sequence.



Since this is a binary classification task and the number of training samples was not large enough to build accurate deep learning models, we trained an SVM (Cortes and Vapnik, 1995), which is known to perform well for small to medium sized problems. We made use of the Statistics and Machine Learning toolbox of MATLAB 2019b to train the SVM. We encoded the amino acid sequences with binary encoding and used a linear kernel, since polynomial kernels of degree two and three showed similar performance and linear kernels allow for a more direct explainability. We determined the best parameters ( $C=1$ ) by 10-fold cross-validation with  $C \in \{10^{-5}, 10^{-4}, \dots, 10^5\}$ .

In this study we were especially interested in the feature importance, the impact of amino acids at their position on the classifier. Therefore, we determined the weights of the features from the trained SVM: First we retrieved the Lagrange multipliers, which are the coefficients from the dual problem. Second, we computed the weight vector by summing up the product of the Lagrange multiplier, label and binary encoding at each position. In the course of this we can distinguish between positive and negative weights. We end up with one vector resembling the impact of each amino acid at each position.

#### **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

Flow cytometry analysis and quantifications were done with FlowJo10. Statistical analyses were done with GraphPad Prism (v9), Microsoft Excel for Mac (v14.7.3), Python (v3.6.8), and R (v3.6.0). The logo plot in Figure 7A was created with WebLogo 3.

## 2.1 Supplemental Information

### 2.1.1 Supplementary Tables

Patient ID	Gender	Age [years]	HCV genotype	Risk factor	Estimated time of infection [years]	HCV status at serum collection
1334	Female	54	1b	NA	6	Chronic
1416	Female	43	1a	Drug use	15	Chronic
1198	Male	48	1a	Drug use	NA	Chronic
1382	Male	64	1a	Drug use	7	Chronic

**Supplementary Table 1: PBMC donors for B cell analysis, related to Figure 2**

<b>Patient ID</b>	<b>% IgG+ B cells*</b>	<b>% bait positive*†</b>	<b>Isolated B cells</b>	<b>Productive Heavy chains</b>	<b>% clonal</b>	<b>Total clones</b>	<b>Mean clone size</b>	<b>Largest clone size</b>	<b>Produced mAbs</b>	<b>E2 core-binding mAbs</b>	<b>Neutralizing mAbs</b>
1334	7.72 ± 0.18	0.45 ± 0.02	600	457	55	96	2.6	6	85	68	28
1416	25.2 ± 0.33	0.13 ± 0.01	414	359	32	42	2.7	7	64	40	26
1198	6.66 ± 0.72	0.41 ± 0.33	448	357	39	38	3.7	15	67	19	16
1382	21.8 ± 0.24	0.79 ± 0.10	425	346	83	84	3.4	11	94	91	29
<b>Mean</b>	-	-	<b>472</b>	<b>380</b>	<b>52</b>	<b>65</b>	<b>3.1</b>	<b>10</b>	<b>77.5</b>	<b>55</b>	<b>25</b>
<b>Sum</b>	-	-	<b>1887</b>	<b>1519</b>	-	<b>260</b>	-	-	<b>310</b>	<b>218</b>	<b>99</b>

**Supplementary Table 2: B cell analysis summary, related to Figure 2**

\* % IgG and bait positive cells show mean ± SD over all sorted plates.

† Corresponds to the fraction within IgG+ B cells.

Name	Clone	Clone size	V <sub>H</sub> gene	V <sub>H</sub> gene germline identity [% nt]	V <sub>L</sub> gene	V <sub>L</sub> gene germline identity [% nt]	ELISA EC50 [µg/mL]	HCVcc average neutralization [%]
1198_01_A03	1198_0	1	HV3-73	94,7	LV4-60	97,6	>1	12,2
1198_01_A06	1198_6	2	HV1-69	88,1	KV3-11	95,5	0,28	63,1
1198_01_B05	1198_26	3	HV3-7	89,2	KV1-5	92	>1	4,3
1198_01_B08	1198_36	2	HV5-51	93,2	LV1-47	96,2	>1	6,9
1198_01_B09	1198_0	1	HV1-46	86,4	KV1-5	94,3	>1	5
1198_01_B11	1198_25	2	HV3-64D	93,5	KV3-20	96,2	>1	7,2
1198_01_C02	1198_25	2	HV3-64D	92,1	KV3-20	96,5	>1	9,1
1198_01_C10	1198_1	2	HV1-2	91,9	KV1-33	94,3	>1	10,1
1198_01_D01	1198_18	4	HV2-70	95,6	KV1-5	96,1	>1	6,2
1198_01_D06	1198_26	3	HV3-7	89,2	KV1-5	92,4	>1	8,4
1198_01_D07	1198_0	1	HV3-7	87,3	KV2-30	94,3	>1	6,4
1198_01_D11	1198_23	5	HV3-30	94,8	KV2-30	97,7	>1	11,8
1198_01_E01	1198_19	15	HV3-21	93,6	LV2-14	92,6	>1	0,6
1198_01_E10	1198_36	2	HV5-51	94,9	LV1-47	97,3	>1	10,6
1198_01_E11	1198_7	2	HV1-69	98,3	LV2-14	97,6	0,07	75,2
1198_01_F02	1198_0	1	HV3-23	87,2	KV3-15	93,7	>1	0,8
1198_01_F03	1198_8	10	HV1-69	91,1	KV1-39	94,3	0,05	32,9
1198_01_F10	1198_27	3	HV3-7	91,2	KV4-1	94,8	>1	11,2
1198_01_F11	1198_27	3	HV3-7	91,2	KV4-1	94,8	>1	8,7
1198_01_F12	1198_2	5	HV1-2	94,9	KV4-1	98	>1	8,6
1198_01_G06	1198_3	15	HV1-2	95,6	KV4-1	98,4	>1	9,3
1198_01_G08	1198_21	4	HV3-23	90,1	KV3-11	96,5	>1	8,3
1198_01_G09	1198_8	10	HV1-69	91,1	KV1-39	93,9	0,04	39,3
1198_01_G11	1198_1	2	HV1-2	90,5	KV1-33	91	>1	9,7

Name	Clone	Clone size	V <sub>H</sub> gene	V <sub>H</sub> gene germline identity [% nt]	V <sub>L</sub> gene	V <sub>L</sub> gene germline identity [% nt]	ELISA EC50 [µg/mL]	HCVcc average neutralization [%]
1198_01_H11	1198_22	4	HV3-23	94,9	KV3-20	96,8	>1	8,6
1198_02_B06	1198_3	15	HV1-2	95,9	KV4-1	97,4	>1	12,8
1198_02_C07	1198_17	5	HV2-5	93,3	LV2-14	92	>1	7,8
1198_02_D06	1198_10	3	HV1-69	92,2	KV3-20	97,2	0,05	40,1
1198_02_F01	1198_11	2	HV1-69	90,2	KV3-15	96,2	0,03	78,7
1198_02_F11	1198_34	5	HV4-39	94,2	KV2-30	96,3	>1	19,2
1198_03_A11	1198_24	2	HV3-53	90,8	KV3-20	94,6	>1	12,3
1198_03_B02	1198_0	1	HV1-3	84,4	KV1-33	87	>1	14,2
1198_03_B03	1198_28	2	HV3-7	91,8	KV4-1	94,7	>1	5,6
1198_03_C03	1198_13	3	HV1-69	84,9	KV3-11	94,1	0,08	81,9
1198_03_F03	1198_0	1	HV1-69	76,6	LV2-14	85,9	0,65	3,8
1198_03_F06	1198_5	4	HV1-3	87,8	LV2-11	98	>1	7,6
1198_03_F07	1198_33	2	HV3-74	99,7	KV3-20	99	>1	7,3
1198_03_G03	1198_37	3	HV5-51	91,5	LV2-14	94,1	>1	11,7
1198_03_G07	1198_7	2	HV1-69	97,9	LV2-14	97,9	0,09	65,1
1198_03_G08	1198_0	1	HV4-39	96,3	LV1-47	98	>1	17,7
1198_03_H02	1198_6	2	HV1-69	88,2	KV3-11	92,3	0,11	73,2
1198_03_H06	1198_35	2	HV4-4	91,5	KV3-20	90,7	>1	6,3
1198_04_A01	1198_9	5	HV1-69	92,5	KV3-11	95,1	0,34	51
1198_04_C04	1198_22	4	HV3-23	94,2	KV3-20	96,5	>1	0,8
1198_04_C06	1198_20	4	HV3-21	95,9	LV1-44	95,9	>1	11,9
1198_04_C09	1198_0	1	HV3-7	87,1	KV4-1	90,6	>1	5,8
1198_04_D01	1198_0	1	HV3-53	96,6	KV3-20	97,9	>1	6,3
1198_04_E03	1198_34	5	HV4-39	94,2	KV2-30	96,7	>1	4,8

Name	Clone	Clone size	V <sub>H</sub> gene	V <sub>H</sub> gene germline identity [% nt]	V <sub>L</sub> gene	V <sub>L</sub> gene germline identity [% nt]	ELISA EC50 [µg/mL]	HCVcc average neutralization [%]
1198_04_E04	1198_13	3	HV1-69	84,9	KV3-11	94,1	0,1	80,2
1198_04_E06	1198_14	3	HV1-69	86,4	KV3D-15	94,4	0,13	80,2
1198_04_E07	1198_0	1	HV4-39	100	KV3-20	99,7	>1	3,2
1198_04_E08	1198_23	5	HV3-30	94,8	KV2-30	97,7	>1	7,8
1198_04_E10	1198_29	2	HV3-7	93,2	KV4-1	94,7	>1	2
1198_04_F11	1198_14	3	HV1-69	88,1	KV3D-15	93,4	0,11	79
1198_04_G02	1198_0	1	HV1-69	86,4	LV3-21	94,8	>1	10,8
1198_04_G03	1198_37	3	HV5-51	92,8	LV2-14	93,3	>1	4,7
1198_04_H02	1198_30	2	HV3-7	93,2	LV1-47	97	0,1	36,5
1198_05_A02	1198_15	2	HV1-69	83,4	KV3-11	91,6	0,12	80
1198_05_A09	1198_9	5	HV1-69	88,9	KV3-11	91,3	0,16	62,5
1198_05_B02	1198_0	1	HV1-69	86,9	KV3-20	97,6	>1	47,1
1198_05_B04	1198_2	5	HV1-2	97,3	KV4-1	96,4	>1	2,8
1198_05_B10	1198_12	2	HV1-69	90,2	KV3-11	96,9	0,13	69,9
1198_05_C06	1198_28	2	HV3-7	91,5	KV4-1	95,1	>1	4,2
1198_05_G06	1198_4	2	HV1-2	96,3	KV4-1	97	>1	5,2
1198_05_G08	1198_5	4	HV1-3	89,8	LV2-11	98,3	>1	3,3
1198_05_G10 (mAb1198)	1198_0	1	HV1-69	87,2	KV2-28	94	0,07	89,4
1198_05_H01	1198_38	2	HV5-51	93,2	KV2-28	97	>1	0,6
1334_01_A06	1334_75	2	HV3-48	89,4	KV3-15	95,5	0,12	4,5
1334_01_A08	1334_0	1	HV1-69	87,5	KV1-39	94,1	0,04	62
1334_01_B08	1334_51	2	HV1-69	84,9	KV1-39	93	0,1	74,9
1334_01_B09	1334_35	2	HV1-69	88,4	KV3-20	96,8	0,03	68,2

Name	Clone	Clone size	V <sub>H</sub> gene	V <sub>H</sub> gene germline identity [% nt]	V <sub>L</sub> gene	V <sub>L</sub> gene germline identity [% nt]	ELISA EC50 [µg/mL]	HCVcc average neutralization [%]
1334_01_B12	1334_0	1	HV4-39	87,5	KV3-20	92,4	>1	4,2
1334_01_C04	1334_0	1	HV1-69	92,2	KV3-11	96,2	0,03	9,4
1334_01_C05	1334_66	2	HV2-5	95,3	KV3-20	94,1	>1	10,3
1334_01_C09	1334_84	2	HV3-74	89,8	KV3-20	92,7	0,14	29,6
1334_01_C12	1334_36	5	HV1-69	90,1	KV3-20	92,4	>1	1,9
1334_01_D04	1334_0	1	HV3-21	84,1	KV3-20	88,8	>1	4,9
1334_01_D11	1334_50	3	HV1-69	93,9	KV1-17	98,9	>1	21,5
1334_01_E03	1334_20	3	HV1-69	88,4	KV3-15	97,9	0,08	6,9
1334_01_E12	1334_8	2	HV1-18	91,6	KV3-20	95,5	0,06	8,7
1334_01_F02	1334_44	4	HV1-69	89,1	KV3-15	93,7	0,08	82
1334_01_G08	1334_79	2	HV3-72	94,7	KV4-1	95,3	0,08	77
1334_01_G10	1334_78	2	HV3-7	94,3	LV3-25	94,6	>1	6,7
1334_01_H05	1334_73	2	HV3-30	91,9	KV2-28	96	0,1	4,9
1334_02_A01	1334_58	3	HV1-69	89,1	KV3-20	97,2	0,1	8,5
1334_02_A05	1334_0	1	HV4-34	87	KV2-28	92,7	0,1	71,9
1334_02_A12	1334_9	2	HV1-18	92,5	LV1-51	95,6	0,18	1,4
1334_02_B04	1334_90	2	HV4-4	90,5	KV3-11	94,4	0,07	72,9
1334_02_B06	1334_85	2	HV4-31	89,3	KV1-12	92,2	>1	3,4
1334_02_C04	1334_1	2	HV1-18	85,8	KV3-20	93,4	0,07	2,2
1334_02_D06	1334_6	2	HV1-18	89,8	KV3-20	97,2	0,08	2
1334_02_D11	1334_65	2	HV1-8	92,6	KV1-39	95,8	0,09	27,8
1334_02_E02	1334_93	4	HV4-61	91,9	KV1-12	94,1	0,07	16,5
1334_03_A04 (mAb1334)	1334_49	2	HV1-69	89,9	KV1-39	92,7	0,09	84,9

Name	Clone	Clone size	V <sub>H</sub> gene	V <sub>H</sub> gene germline identity [% nt]	V <sub>L</sub> gene	V <sub>L</sub> gene germline identity [% nt]	ELISA EC50 [µg/mL]	HCVcc average neutralization [%]
1334_03_A06	1334_0	1	HV4-39	98	LV1-44	99	>1	12,9
1334_03_B03	1334_55	2	HV1-69	92,5	LV2-14	94,4	0,11	63,7
1334_03_B04	1334_0	1	HV3-74	97,3	KV3-20	97,6	>1	6,9
1334_03_B05	1334_51	2	HV1-69	89	KV1-39	94,3	0,14	62,4
1334_03_C06	1334_92	2	HV4-59	93,8	KV3-20	95,2	0,12	16,6
1334_03_E08	1334_3	6	HV1-18	90,4	KV2-30	98,3	0,08	0,9
1334_03_F03	1334_4	2	HV1-18	86,8	KV1-39	91,5	0,1	2,6
1334_03_F07	1334_62	3	HV1-69	91,9	KV3-20	97,2	0,1	9,1
1334_03_F10	1334_80	3	HV3-73	99,7	KV1-27	98,9	>1	0
1334_03_G05	1334_0	1	HV1-69	88,8	KV3-11	93,4	>1	12,1
1334_03_H02	1334_96	2	HV5-51	86,6	LV2-23	93,5	0,1	9,5
1334_03_H05	1334_40	4	HV1-69	85,5	KV1-39	90,2	0,15	74,6
1334_03_H10	1334_64	3	HV1-69	86,9	KV1-39	90,8	0,1	23,7
1334_04_A12	1334_28	2	HV1-69	92,2	KV1-39	97,2	0,05	64,2
1334_04_B01	1334_17	2	HV1-69	92,5	KV4-1	95,4	0,1	49
1334_04_B05	1334_7	2	HV1-18	84,6	KV3-20	92,7	0,1	8,6
1334_04_D07	1334_0	1	HV1-69	92,9	KV4-1	94,7	0,08	77,6
1334_04_D12	1334_41	3	HV1-69	89,7	KV1-39	92,2	0,12	17,9
1334_04_F05	1334_2	2	HV1-18	84,1	KV4-1	92,7	0,13	10,1
1334_04_F06	1334_83	2	HV3-74	95,3	KV3-20	95,1	0,08	8,2
1334_04_F10	1334_0	1	HV3-23	91,4	LV1-44	94,9	0,06	0,2
1334_04_G03	1334_29	3	HV1-69	93,2	KV1-39	93,7	0,1	76,1
1334_04_G05	1334_0	1	HV1-69	87,8	LV1-51	93,2	0,1	17,7
1334_04_H08	1334_95	6	HV5-51	85	KV4-1	87	>1	0,3

Name	Clone	Clone size	V <sub>H</sub> gene	V <sub>H</sub> gene germline identity [% nt]	V <sub>L</sub> gene	V <sub>L</sub> gene germline identity [% nt]	ELISA EC50 [µg/mL]	HCVcc average neutralization [%]
1334_05_A02	1334_86	3	HV4-31	93	KV1-39	94,2	0,16	3,9
1334_05_B07	1334_77	2	HV3-7	90,1	KV4-1	89,4	>1	5,9
1334_05_B09	1334_43	2	HV1-69	91,6	LV2-23	95,5	0,1	0,3
1334_05_C07	1334_92	2	HV4-59	93,8	KV3-20	95,2	0,05	0,8
1334_05_D08	1334_0	1	HV2-26	93	KV2-28	96	0,08	16,1
1334_05_E01	1334_0	1	HV1-69	90,5	KV1-33	93,7	0,03	74,9
1334_05_E07	1334_45	2	HV1-69	91,2	KV1-27	93,3	0,11	73,3
1334_05_E11	1334_76	2	HV3-48	92,2	LV1-44	95,9	0,03	3,9
1334_05_F04	1334_23	3	HV1-69	88,5	KV1-9	97,2	0,11	2,4
1334_05_G02	1334_13	2	HV1-24	90,5	KV1-39	90,6	0,08	1,5
1334_05_G05	1334_26	3	HV1-69	94,3	KV3-20	97,2	0,16	2
1334_05_H04	1334_61	2	HV1-69	94,2	KV1-9	93,3	0,15	55,2
1334_05_H07	1334_74	2	HV3-33	95,2	KV2-28	98	0,1	3,2
1334_06_B02	1334_39	3	HV1-69	89,5	KV1-39	91,6	0,09	2,7
1334_06_B03	1334_0	1	HV1-69	84,5	KV1-39	93	0,06	62,4
1334_06_C09	1334_0	1	HV1-18	90,2	KV3-11	95,8	0,34	0,7
1334_06_D02	1334_0	1	HV1-69	91,9	KV1-9	95,4	0,11	59,5
1334_06_D10	1334_40	4	HV1-69	84,1	KV1-39	91,6	0,07	69,8
1334_06_E02	1334_47	3	HV1-69	92,8	KV3-15	96,9	0,19	43,7
1334_07_A03	1334_0	1	HV1-69	86,7	KV1-33	94,1	>1	2,8
1334_07_A05	1334_29	3	HV1-69	90,9	KV1-39	92,6	0,07	77,2
1334_07_B10	1334_68	2	HV3-21	88,5	KV1-33	90,1	0,08	4,9
1334_07_C01	1334_0	1	HV1-69	92,8	KV2-24	93,3	0,06	70,5
1334_07_C08	1334_0	1	HV4-4	81,4	LV2-11	84,3	>1	3,3

Name	Clone	Clone size	V <sub>H</sub> gene	V <sub>H</sub> gene germline identity [% nt]	V <sub>L</sub> gene	V <sub>L</sub> gene germline identity [% nt]	ELISA EC50 [µg/mL]	HCVcc average neutralization [%]
1334_07_C12	1334_71	2	HV3-23	90,5	KV1-39	95,4	0,03	1,3
1334_07_D11	1334_38	2	HV1-69	89,9	KV3-11	94,4	0,08	81,8
1334_07_E01	1334_27	5	HV1-69	90,5	KV2-28	96	>1	1,2
1334_07_F01	1334_0	1	HV1-69	92,6	LV2-14	93,4	0,13	3,1
1334_07_F04	1334_0	1	HV1-69	83,4	KV1-27	95,1	0,08	69,4
1334_07_F11	1334_72	2	HV3-23	93,5	LV1-51	98,3	0,06	0,7
1334_07_G06	1334_12	2	HV1-24	90,8	KV1-5	93,2	0,04	0
1334_07_H07	1334_0	1	HV4-59	91,8	LV2-8	94,6	>1	4,7
1334_07_H09	1334_5	2	HV1-18	89,8	KV2-30	98	0,04	12,5
1334_07_H10	1334_24	3	HV1-69	92,9	KV1-39	94,3	0,07	69,7
1382_01_A06	1382_2	6	HV1-18	93,5	KV3-15	97,6	0,07	19
1382_01_A09	1382_4	6	HV1-18	89,8	KV1-39	93	0,06	8,4
1382_01_B01	1382_80	11	HV4-59	97,9	KV1-39	98,2	0,04	10,4
1382_01_B03	1382_2	6	HV1-18	90,8	KV3-15	97,6	0,06	16,4
1382_01_B04	1382_40	3	HV1-69	87,5	KV3-20	93,1	0,06	71,2
1382_01_B11	1382_0	1	HV1-69	88,4	KV1-39	92,2	0,08	28,5
1382_01_E07	1382_15	5	HV1-69	92,5	KV1-39	94,7	0,03	32,9
1382_01_E09	1382_56	3	HV1-69	90	KV3-11	96,9	0,07	69,7
1382_01_E10	1382_84	3	HV5-51	89,5	KV4-1	95,7	0,06	24,8
1382_01_F01	1382_12	6	HV1-46	91,9	KV1-39	95,1	0,05	13,1
1382_01_F09	1382_15	5	HV1-69	93,9	KV1-39	96,1	0,05	10,8
1382_01_G05	1382_69	3	HV2-70	95,3	KV1-9	94,6	0,06	29,2
1382_01_G08	1382_80	11	HV4-59	93,2	KV1-39	95,1	0,05	22,4
1382_01_G11	1382_10	3	HV1-46	92,5	KV1-39	95,1	0,05	11,9

Name	Clone	Clone size	V <sub>H</sub> gene	V <sub>H</sub> gene germline identity [% nt]	V <sub>L</sub> gene	V <sub>L</sub> gene germline identity [% nt]	ELISA EC50 [µg/mL]	HCVcc average neutralization [%]
1382_01_H05 (mAb 1382)	1382_41	2	HV1-69	89,8	KV3-11	93,7	0,07	86,1
1382_01_H07	1382_30	5	HV1-69	89,2	KV3-15	88,9	0,06	67,1
1382_01_H08	1382_74	4	HV4-34	95,2	LV1-47	96,3	0,1	46,1
1382_01_H10	1382_4	6	HV1-18	90,2	KV1-39	93,3	0,06	7
1382_02_A02	1382_75	3	HV4-34	91,8	KV1-33	92,6	0,11	4
1382_02_A05	1382_69	3	HV2-70	95,6	KV1-9	96,8	0,09	39
1382_02_B04	1382_23	3	HV1-69	91,4	KV1-39	94,7	0,07	30,6
1382_02_B05	1382_0	1	HV1-18	91,2	KV3-15	98,6	0,06	21
1382_02_B08	1382_30	5	HV1-69	87,5	KV3-15	95,1	0,05	65,3
1382_02_B09	1382_77	2	HV4-4	92,2	LV1-40	97	0,07	80,2
1382_02_C02	1382_14	5	HV1-69	92,9	KV3-20	95,2	0,06	60,8
1382_02_C05	1382_42	4	HV1-69	85,3	KV1-12	91,6	0,06	51,7
1382_02_C06	1382_29	3	HV1-69	84,7	KV3-15	91,3	0,07	74
1382_02_C11	1382_7	2	HV1-18	96,6	KV2-30	99	0,05	7,8
1382_02_D02	1382_6	2	HV1-18	96,9	KV3D-15	98,3	0,08	20,1
1382_02_D03	1382_19	11	HV1-69	88,8	KV1-39	91,9	0,07	33,3
1382_02_D05	1382_15	5	HV1-69	91,5	KV1-39	92,9	0,05	38,5
1382_02_D10	1382_47	2	HV1-69	91,8	KV1-39	94	0,06	30
1382_02_E03	1382_5	5	HV1-18	89,1	KV3-15	94,4	0,07	11,2
1382_02_E04	1382_63	2	HV1-69	89,8	KV1-39	93,3	0,06	17,4
1382_02_F10	1382_53	6	HV1-69	95,6	KV3-15	99,6	0,06	72
1382_02_G02	1382_25	5	HV1-69	94,5	KV3-20	95,8	0,07	75,8
1382_02_G07	1382_1	10	HV1-18	93,2	KV3-15	96,5	0,07	15,4

Name	Clone	Clone size	V <sub>H</sub> gene	V <sub>H</sub> gene germline identity [% nt]	V <sub>L</sub> gene	V <sub>L</sub> gene germline identity [% nt]	ELISA EC50 [µg/mL]	HCVcc average neutralization [%]
1382_02_H03	1382_33	2	HV1-69	90,8	KV3-20	92,8	0,07	33,2
1382_02_H04	1382_76	3	HV4-34	94,8	KV1-33	92,3	0,08	3,5
1382_02_H07	1382_34	5	HV1-69	91,5	LV2-18	96,3	0,06	17,3
1382_03_A05	1382_9	4	HV1-2	92,6	KV1-39	95,8	0,04	46,7
1382_03_A07	1382_76	3	HV4-34	91,4	KV1-33	95,4	0,06	11,5
1382_03_A11	1382_21	2	HV1-69	80,4	KV3-20	92	0,05	18,3
1382_03_B04	1382_55	2	HV1-69	92,5	KV3-20	93,4	0,05	18,8
1382_03_B07	1382_38	2	HV1-69	92,9	KV1-5	97,5	0,07	69,6
1382_03_B11	1382_18	4	HV1-69	88,2	KV4-1	92,1	0,05	80,8
1382_03_C07	1382_27	8	HV1-69	95,3	KV3-15	98,2	0,05	63,6
1382_03_C08	1382_1	10	HV1-18	95,6	KV3D-15	97,9	0,05	20,8
1382_03_D01	1382_57	2	HV1-69	85,1	KV4-1	94,1	0,05	73,9
1382_03_D02	1382_27	8	HV1-69	87,6	KV3-15	96,8	0,05	75
1382_03_D06	1382_58	2	HV1-69	86,4	KV3-20	94,8	0,05	70,7
1382_03_D07	1382_67	2	HV1-69	93,5	KV1-39	93,6	0,06	27,7
1382_03_D11	1382_60	2	HV1-69	91,2	KV4-1	96,1	0,04	77,5
1382_03_E03	1382_75	3	HV4-34	91,4	KV1-33	93	0,08	5,7
1382_03_G06	1382_46	3	HV1-69	87,3	KV1-39	93,2	0,05	34,6
1382_03_G09	1382_10	3	HV1-46	91,9	KV1-39	94,4	0,04	10,5
1382_03_G10	1382_40	3	HV1-69	88,5	KV3-20	93,4	0,05	76,1
1382_03_H08	1382_21	2	HV1-69	89,3	KV3-20	98,3	0,05	11,8
1382_04_A06	1382_70	4	HV3-33	93,2	LV1-44	96,9	>1	7,2
1382_04_A10	1382_74	4	HV4-34	94,2	LV1-47	95,6	0,11	50,1
1382_04_B06	1382_4	6	HV1-18	89,8	KV1-39	93,3	0,05	12,7

Name	Clone	Clone size	V <sub>H</sub> gene	V <sub>H</sub> gene germline identity [% nt]	V <sub>L</sub> gene	V <sub>L</sub> gene germline identity [% nt]	ELISA EC50 [µg/mL]	HCVcc average neutralization [%]
1382_04_B07	1382_11	2	HV1-46	91,6	KV3-11	96,1	>1	9,5
1382_04_B10	1382_19	11	HV1-69	94,8	KV1-39	96,1	0,06	38
1382_04_C09	1382_0	1	HV3-7	97,3	LV2-23	96,3	0,05	4,3
1382_04_C10	1382_45	3	HV1-69	91,2	LV1-47	94,2	0,09	14,7
1382_04_C11	1382_12	6	HV1-46	89,5	KV1-39	93,6	0,06	22,8
1382_04_D02	1382_59	5	HV1-69	91,8	KV1-39	92,9	0,06	39,6
1382_04_E05	1382_31	5	HV1-69	89,4	KV1-39	93,4	0,05	33,8
1382_04_E08	1382_80	11	HV4-59	92,8	KV1-39	96,5	0,05	31,3
1382_04_F02	1382_0	1	HV1-69	92,2	LV2-14	96,3	0,05	73,2
1382_04_F05	1382_83	2	HV4-61	92,3	KV1-33	95,1	0,07	5,1
1382_04_F06	1382_60	2	HV1-69	90,2	KV4-1	96,4	0,04	76,3
1382_04_F07	1382_73	7	HV3-64	93,6	KV1-NL1	97,9	0,03	9
1382_04_G01	1382_8	2	HV1-18	87,1	KV3-15	95,1	0,04	11,6
1382_04_H01	1382_59	5	HV1-69	90,5	KV1-39	91,9	0,06	35,5
1382_04_H04	1382_49	3	HV1-69	89	KV1-39	95,3	0,06	29,5
1382_04_H08	1382_64	2	HV1-69	85,4	KV3-20	91,7	0,07	66,1
1382_05_A06	1382_11	2	HV1-46	91,9	KV3-11	96,1	>1	0,7
1382_05_A10	1382_55	2	HV1-69	90,1	KV3-20	94,3	0,05	6,1
1382_05_B08	1382_71	2	HV3-48	89,1	KV1-33	94,6	0,08	3,6
1382_05_B09	1382_53	6	HV1-69	95,6	KV3-15	98,9	0,05	73,7
1382_05_C06	1382_24	2	HV1-69	93,2	KV1-39	98,6	0,05	26,7
1382_05_D06	1382_22	7	HV1-69	92,8	KV1-39	95,3	0,06	29,3
1382_05_D07	1382_54	2	HV1-69	87,5	KV4-1	93,8	0,05	71,2
1382_05_D08	1382_84	3	HV5-51	91,9	KV4-1	96	0,08	28,2

Name	Clone	Clone size	V <sub>H</sub> gene	V <sub>H</sub> gene germline identity [% nt]	V <sub>L</sub> gene	V <sub>L</sub> gene germline identity [% nt]	ELISA EC50 [µg/mL]	HCVcc average neutralization [%]
1382_05_E09	1382_80	11	HV4-59	95,5	KV1-39	94,7	0,05	5,8
1382_05_E11	1382_13	2	HV1-69	89,5	KV1-39	93	0,05	23,9
1382_05_F06	1382_65	2	HV1-69	93,5	KV1-39	95,1	0,05	19,8
1382_05_G01	1382_46	3	HV1-69	88	KV1-39	93,6	0,05	16,4
1382_05_G05	1382_77	2	HV4-4	92,2	LV1-40	98,7	0,09	76,9
1382_05_H05	1382_5	5	HV1-18	93,5	KV3-15	97,2	0,06	9,8
1382_05_H07	1382_47	2	HV1-69	89	KV1-39	92,1	0,06	24,7
1382_05_H08	1382_48	2	HV1-69	96,3	KV2D-29	97,3	0,06	75
1382_05_H11	1382_2	6	HV1-18	91,5	KV3-15	96,5	0,06	10,7
1416_01_A04	1416_40	6	HV5-51	91,9	KV4-1	94,4	0,18	44,4
1416_01_D08	1416_8	2	HV1-69	83,4	KV1-16	92,3	0,08	75,1
1416_01_D10	1416_27	2	HV3-9	96,3	KV3-20	97,2	0,17	3,6
1416_01_E03 (mAb1416)	1416_9	2	HV1-69	92,2	LV2-23	95,9	0,09	85,1
1416_01_E05	1416_8	2	HV1-69	91,2	KV1-16	95,8	0,11	87,2
1416_01_E08	1416_6	3	HV1-69	91,7	KV3-20	92,4	0,06	53,8
1416_01_E09	1416_6	3	HV1-69	90,3	KV3-20	92,4	0,07	71,5
1416_01_F03	1416_20	4	HV2-26	94,3	KV1-39	95,1	>1	7,5
1416_01_G03	1416_7	3	HV1-69	90,2	KV2-30	96,3	0,06	83,8
1416_01_G06	1416_21	2	HV2-5	91,3	KV3-20	93,7	>1	2,7
1416_01_G10	1416_28	3	HV3-9	91,3	KV1-39	94,3	0,05	8,6
1416_01_H06	1416_24	2	HV3-7	94,5	KV2-30	95,3	0,03	6,9
1416_02_A07	1416_37	3	HV4-59	95,2	KV1-12	94,8	0,08	57,1
1416_02_A08	1416_22	2	HV2-5	93,7	KV4-1	96,3	>1	5,3

Name	Clone	Clone size	V <sub>H</sub> gene	V <sub>H</sub> gene germline identity [% nt]	V <sub>L</sub> gene	V <sub>L</sub> gene germline identity [% nt]	ELISA EC50 [µg/mL]	HCVcc average neutralization [%]
1416_02_A09	1416_10	2	HV1-69	85,1	KV3-20	95,1	0,06	1,7
1416_02_A10	1416_29	2	HV3-9	90,5	KV1-39	93,9	0,06	5,1
1416_02_B02	1416_33	2	HV4-34	95,1	KV3D-15	96,9	>1	7,6
1416_02_B08	1416_20	4	HV2-26	94,3	KV1-39	94,8	>1	4,8
1416_02_B09	1416_11	2	HV1-69	88,7	KV1-16	94,8	0,08	83,2
1416_02_B10	1416_42	3	HV5-51	88,4	LV2-14	91,2	>1	6,9
1416_02_B11	1416_24	2	HV3-7	94,9	KV2-30	94,6	>1	8,1
1416_02_C04	1416_0	1	HV1-69	84,8	KV2-30	93,4	0,09	81,2
1416_02_C07	1416_3	6	HV1-69	88,1	KV3-20	92	0,07	80,2
1416_02_D03	1416_0	1	HV5-51	83,4	LV2-23	89,7	>1	2,6
1416_02_D04	1416_0	1	HV1-69	91,7	KV3-20	92,4	0,08	50,6
1416_02_D07	1416_15	3	HV1-69	92,2	KV3-11	94,8	0,1	80,3
1416_02_E02	1416_9	2	HV1-69	89,2	LV2-23	94,3	0,09	83,9
1416_02_E06	1416_14	5	HV1-69	94,2	KV4-1	97,4	0,44	9,8
1416_02_E08	1416_11	2	HV1-69	87,5	KV1-16	94,4	0,1	77,7
1416_02_E10	1416_12	2	HV1-69	89,5	KV1-16	95,8	0,07	79,1
1416_02_F01	1416_16	2	HV1-69	88,5	KV3-20	93	0,07	5,1
1416_02_F02	1416_30	2	HV3-9	93,6	KV1-39	94,4	0,06	3,3
1416_02_F05	1416_36	2	HV4-39	97,7	LV2-14	98,6	>1	5,9
1416_02_F07	1416_1	4	HV1-69	91,2	KV3-20	94,5	0,12	80,7
1416_02_G06	1416_0	1	HV1-69	89,8	KV3-20	95,1	0,07	6,1
1416_02_G08	1416_16	2	HV1-69	90,8	KV3-20	94,1	0,08	5,4
1416_02_H03	1416_0	1	HV1-69	89,2	KV2-30	96,3	0,09	80,5
1416_02_H04	1416_2	7	HV1-69	90,9	KV1-39	94,7	0,1	79,6

Name	Clone	Clone size	V <sub>H</sub> gene	V <sub>H</sub> gene germline identity [% nt]	V <sub>L</sub> gene	V <sub>L</sub> gene germline identity [% nt]	ELISA EC50 [µg/mL]	HCVcc average neutralization [%]
1416_02_H09	1416_4	2	HV1-69	91,2	KV3-20	97,2	0,06	5
1416_03_A03	1416_25	2	HV3-7	93,5	LV7-43	90,8	>1	8,5
1416_03_A09	1416_35	2	HV4-34	93,5	KV1-39	93,4	>1	20,6
1416_03_B04	1416_0	1	HV3-49	87	LV1-44	89,2	>1	15
1416_03_C02	1416_35	2	HV4-34	93,5	KV1-39	93,4	>1	9,6
1416_03_C06	1416_25	2	HV3-7	91,5	LV7-43	91,8	>1	8,5
1416_03_E07	1416_18	2	HV1-69	91,4	KV3-20	94,1	0,07	63,6
1416_03_E11	1416_0	1	HV1-69	89,8	KV3-11	94,4	0,09	80,3
1416_03_H06	1416_0	1	HV1-69	84	LV2-8	94,6	>1	6,8
1416_03_H07	1416_33	2	HV4-34	96,2	KV3D-15	97,6	>1	15,6
1416_04_A10	1416_17	2	HV1-69	90,8	KV3-20	97,2	0,14	80,8
1416_04_B07	1416_22	2	HV2-5	96	KV4-1	96,3	>1	14,8
1416_04_C04	1416_2	7	HV1-69	93,2	KV1-39	94,4	0,08	70,4
1416_04_C05	1416_39	2	HV4-61	93,3	LV2-23	94,6	>1	8,1
1416_04_C06	1416_18	2	HV1-69	90,8	KV3-20	94,8	0,07	59,5
1416_04_D08	1416_0	1	HV4-34	94,5	KV1-5	96,5	>1	21,8
1416_04_E03	1416_26	2	HV3-9	91,9	KV1-39	95,3	0,07	7,9
1416_04_E04	1416_38	3	HV4-61	98	KV3-15	99,3	>1	3,4
1416_04_F06	1416_31	2	HV4-34	91,8	KV1-33	95,8	0,12	3,4
1416_04_G02	1416_38	3	HV4-61	98	KV3-15	99,3	>1	7,3
1416_04_H03	1416_21	2	HV2-5	91,6	KV3-20	94,4	>1	7
1416_04_H08	1416_19	2	HV1-69	82,4	KV1-16	95,1	0,08	55,8
1416_05_A07	1416_28	3	HV3-9	92,3	KV1-39	94	0,05	8,2
1416_05_D08	1416_23	2	HV3-43	89,9	KV3-11	95,4	>1	8,1

Name	Clone	Clone size	V <sub>H</sub> gene	V <sub>H</sub> gene germline identity [% nt]	V <sub>L</sub> gene	V <sub>L</sub> gene germline identity [% nt]	ELISA EC50 [µg/mL]	HCVcc average neutralization [%]
1416_05_E11	1416_34	2	HV4-34	94,2	KV1-39	95,4	>1	3
1416_05_F08	1416_0	1	HV1-69	89,9	LV1-47	95,5	0,11	65,8

**Supplementary Table 3: Isolated HCV antibodies, related to Figure 3**

PDB ID	<b>mAb1198 Fab E2ecto<sub>1b09</sub></b>	<b>mAb1382 Fab E2ecto<sub>1b09</sub></b>
<b>Data collection<sup>a,b</sup></b>		
Space group	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Cell Dimensions		
<i>a, b, c</i> (Å)	68.1, 102.4, 131.5	104.3, 140.2, 142.8
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90, 92.7, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	43.8-2.7 (2.8-2.7)	52.2-3.2 (3.4-3.2)
R <sub>merge</sub> (%)	9.3 (85.2)	27.9 (116.9)
R <sub>pim</sub> (%)	6.0 (56.3)	13.6 (57.1)
CC <sub>1/2</sub> (%)	98.9 (60.3)	91.2 (41.6)
<I/σI>	6.4 (1.5)	4.0 (1.5)
Completeness (%)	95.9 (97.1)	98.1 (98.5)
Redundancy	3.1 (3.1)	5.2 (5.0)
Wilson <i>B</i> -factor (Å <sup>2</sup> )	74.8	69.1
<b>Refinement and Validation</b>		
Resolution (Å)	43.8-2.7 (2.8-2.7)	52.2-3.2 (3.4-3.2)
Unique Reflections	47,728 (4,814)	33,544 (3,316)
Number of atoms		
Protein	10,070	10,010
Ligand	417	352
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> (%)	21.5/26.2	23.3/28.3
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.008	0.008
Bond angles (°)	1.4	1.2
Poor rotamers (%)	0.1	0
Ramachandran plot		
Favored (%)	96.0	94.6
Allowed (%)	3.8	5.2
Disallowed (%)	0.2	0.2
Average <i>B</i> -factor (Å <sup>2</sup> )	91.8	72.6

<sup>a</sup>For each structure reported, data were derived from a single crystal.

<sup>b</sup>Numbers in parentheses correspond to the highest resolution shell

**Supplementary Table 4: Data collection and refinement statistics for mAb1198 Fab-1b09 E2ecto and mAb1382 Fab-1b09 E2ecto complexes, related to Figures 4 and 5**

List of mAb1198 heavy chain (chain A)-E2ecto <sub>1509</sub> (chain C) interface residues (the residues on each row are not matched interactive partners)					
Heavy chain	Bond	BSA (Å <sup>2</sup> )	E2ecto <sub>1509</sub>	Bond	BSA (Å <sup>2</sup> )
A:VAL 29		2	C:TRP 420	H	41
A:ASN 30		47	C:ILE 422		71
A:THR 31		5	C:THR 425		11
A:PHE 52		63	C:LEU 427		56
A:LEU 53		59	C:CYS 429		25
A:LEU 54		95	C:ASN 430		2
A:VAL 56		57	C:ASP 431		14
A:THR 58		1	C:HIS 434		3
A:GLN 64		2	C:LEU 438		54
A:ARG 73		22	C:ALA 439		16
A:ASP 95	H	5	C:ALA 440		5
A:GLY 96		3	C:LEU 441		36
A:TRP 99	H	141	C:PHE 442	H	152
A:SER 100		2	C:TYR 443	H	121
A:GLY 100A		25	C:THR 444	H	61
A:HIS 100B	H	71	C:HIS 445		21
A:GLY 100C		13	C:PRO 505		13
A:PRO 100D	H	102	C:TYR 507	H	7
A:SER 100E	H	36	C:VAL 515		1
A:GLN 100F		18	C:TRP 529		32
A:TRP 100G		45	C:GLU 531		2
A:SER 100H		2	C:PRO 612		39
			C:TYR 613	H	43
<b>Total</b>		<b>814</b>			<b>827</b>

Hydrogen bonds			
##	Heavy chain	Distance (Å)	E2ecto <sub>1509</sub>
1	A:HIS 100B[ NE2]	3.62	C:TRP 420[ O ]
2	A:SER 100E[ N ]	2.54	C:PHE 442[ O ]
3	A:TRP 99[ NE1]	2.60	C:TYR 613[ OH ]
4	A:PRO 100D[ N ]	3.32	C:TYR 613[ OH ]
5	A:ASP 95[ OD1]	2.17	C:TYR 443[ OH ]
6	A:HIS 100B[ O ]	3.46	C:TYR 507[ OH ]
7	A:SER 100E[ O ]	2.95	C:THR 444[ N ]
8	A:SER 100E[ O ]	3.55	C:THR 444[ OG1]

List of mAb1198 light chain (chain B)-E2ecto <sub>1509</sub> (chain C) interface residues (the residues on each row are not matched interactive partners)					
Light chain	Bond	BSA (Å <sup>2</sup> )	E2ecto <sub>1509</sub>	Bond	BSA (Å <sup>2</sup> )
B:HIS 27D	H	52	C:HIS 434		2
B:SER 27E		31	C:GLY 436		2
B:THR 28		23	C:ALA 439		19
B:TYR 32		34	C:TYR 443		17
B:ALA 91	H	3	C:THR 444		19
B:LEU 92	H	25	C:HIS 445	H	114
B:GLU 93		6	C:LYS 446	H	48
B:ILE 94		77	C:PHE 447		28
B:PRO 95		16	C:VAL 622		18
B:ARG 95A		1			
<b>Total</b>		<b>268</b>	<b>Total</b>		<b>267</b>

Hydrogen bonds			
##	Light chain	Distance (Å)	E2ecto <sub>1509</sub>
1	B:HIS 27D[ NE2]	3.01	C:HIS 445[ O ]
2	B:ALA 91[ O ]	3.02	C:HIS 445[ NE2]
3	B:LEU 92[ O ]	3.43	C:LYS 446[ NZ ]

List of mAb1198 heavy chain (A) and light chain (B) residues interacting with E2ecto <sub>1509</sub> glycans (chain C) (interactive partners are grouped together)					
Ab chain	Bond	BSA (Å <sup>2</sup> )	E2ecto <sub>1509</sub>	Bond	BSA (Å <sup>2</sup> )
A:ARG 73		21	C:NAG4231		25
B:LEU 92		1	C:NAG4481		1
B:LEU 27C		5	C:NAG6232		10
B:LEU 27D		1			
B:LEU 27E		4			
<b>Total</b>		<b>33</b>	<b>Total</b>		<b>37</b>

\* Type of putative interaction: H - hydrogen bond, BSA: buried surface area, Å<sup>2</sup>.

List of mAb1382 heavy chain (chain H)-E2ecto <sub>1509</sub> (chain D) interface residues (the residues on each row are not matched interactive partners)					
Heavy chain	Bond	BSA (Å <sup>2</sup> )	E2ecto <sub>1509</sub>	Bond	BSA (Å <sup>2</sup> )
H:SER 28		11	D:TRP 420		17
H:GLY 30		28	D:ILE 422		71
H:ARG 31		57	D:THR 425		14
H:ILE 52		0	D:LEU 427		63
H:ILE 53		42	D:ASN 428	H	28
H:PHE 54		105	D:CYS 429		21
H:THR 56		14	D:ASP 431		2
H:LYS 73	H	52	D:LEU 438		40
H:SER 74		38	D:ALA 440	H	11
H:ARG 94		4	D:LEU 441		13
H:TRP 95		7	D:PHE 442	H	110
H:PHE 97		32	D:TYR 443	H	62
H:GLY 98		30	D:THR 444	H	55
H:ASP 99	H	56	D:HIS 445		5
H:TYR 100	H	133	D:GLY 504		0
H:GLY 100A		24	D:PRO 505		14
H:LEU 100B	H	125	D:TYR 507		8
H:PHE 100C	H	115	D:VAL 515		6
H:THR 100E	H	6	D:TRP 529		82
			D:GLU 531		62
			D:PRO 612		32
			D:TYR 613	H	67
			D:TRP 616		4
<b>Total</b>		<b>879</b>			<b>787</b>

Hydrogen bonds			
##	Heavy chain	Distance (Å)	E2ecto <sub>1509</sub>
1	H:ASP 99[ OD1]	3.03	D:THR 444[ N ]
2	H:ASP 99[ OD2]	3.02	D:THR 444[ OG1]
3	H:TYR 100[ O ]	3.46	D:TYR 613[ OH ]
4	H:THR 100E[ OG1]	3.74	D:TYR 443[ OH ]
5	H:LYS 73[ NZ ]	3.32	D:ASN 428[ OD1]
6	H:ASP 99[ N ]	2.82	D:PHE 442[ O ]
7	H:TYR 100[ OH ]	2.66	D:ALA 440[ O ]
8	H:LEU 100B[ N ]	2.89	D:TYR 613[ OH ]
9	H:PHE 100C[ N ]	3.67	D:TYR 613[ OH ]

List of mAb1382 light chain (chain L)-E2ecto <sub>1509</sub> (chain D) interface residues (the residues on each row are not matched interactive partners)					
Light chain	Bond	BSA (Å <sup>2</sup> )	E2ecto <sub>1509</sub>	Bond	BSA (Å <sup>2</sup> )
L:ASP 30		27	D:LEU 438		19
L:TYR 32		4	D:ALA 439		29
L:ARG 91		1	D:PHE 442		14
L:GLY 92		12	D:TYR 443		71
L:ASN 93	H	42	D:HIS 445	H	50
L:TRP 94		137	D:LYS 446		28
L:PRO 95A		9			
<b>Total</b>		<b>232</b>	<b>Total</b>		<b>210</b>

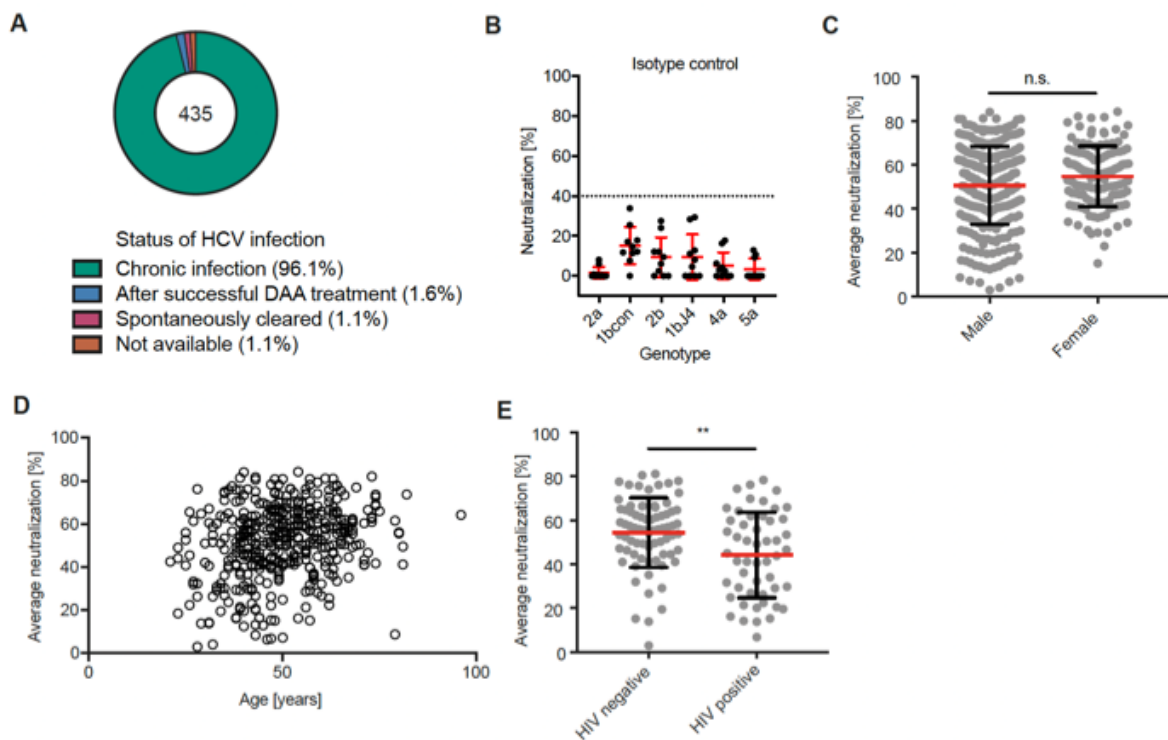
Hydrogen bonds			
##	Light chain	Distance (Å)	E2ecto <sub>1509</sub>
1	L:ASN 93[ OD1]	3.64	D:HIS 445[ NE2 ]

List of mAb1382 heavy chain (H) and light chain (L) residues interacting with E2ecto <sub>1509</sub> glycans (chain D) (interactive partners are grouped together)					
Ab chain	Bond	BSA (Å <sup>2</sup> )	E2ecto <sub>1509</sub>	Bond	BSA (Å <sup>2</sup> )
H:SER 74		1	D:NAG5321		1
<b>Total</b>		<b>1</b>	<b>Total</b>		<b>1</b>

\* Type of putative interaction: H - hydrogen bond, BSA: buried surface area, Å<sup>2</sup>.

Supplementary Table 5: Interface residues between Fabs and E2ecto proteins, related to Figures 4 and 5

### 2.1.2 Supplementary Figures

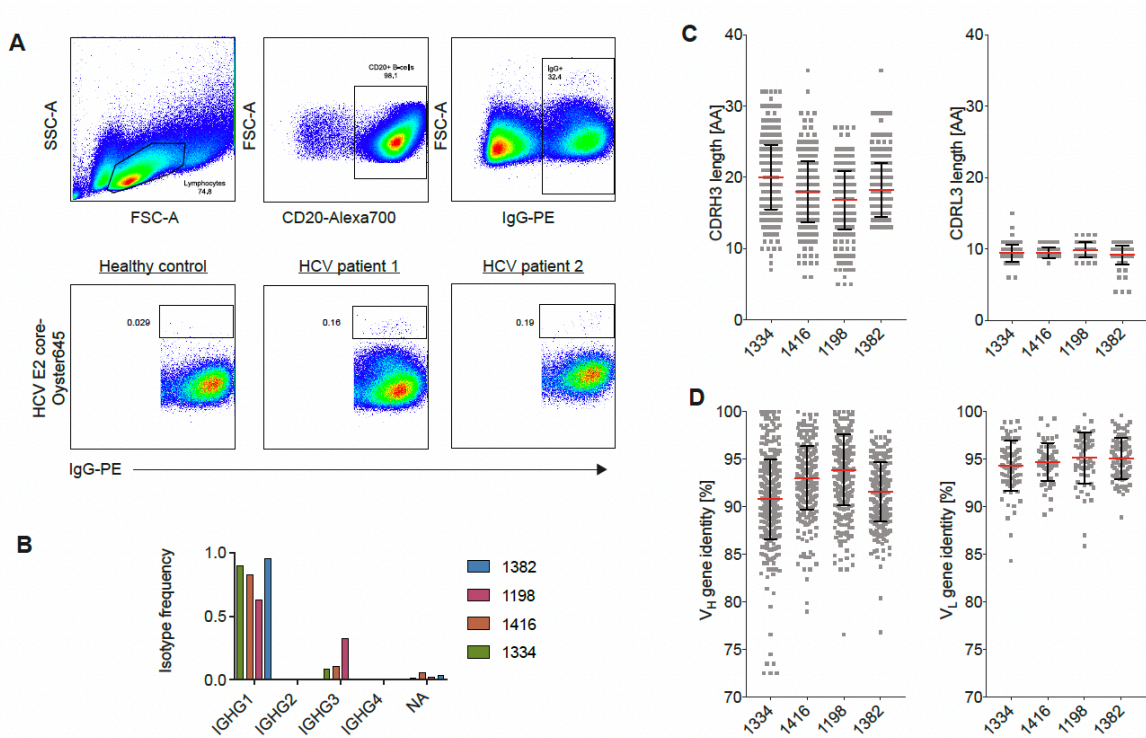


Supplementary Figure 1: Identification of HCV elite neutralizers, relating to Figure 1.

- (A) Status of HCV infection in our cohort of 435 HCV patients.
- (B) HCVcc neutralization values of an isotype control antibody (MGO-53). Each dot represents one independent experiment and is the median of triplicate measurements. Lines indicate means  $\pm$ SD of 10 independent experiments.
- (C) Influence of gender on average neutralization. Lines indicate means  $\pm$ SD.
- (D) Influence of age on average neutralization.

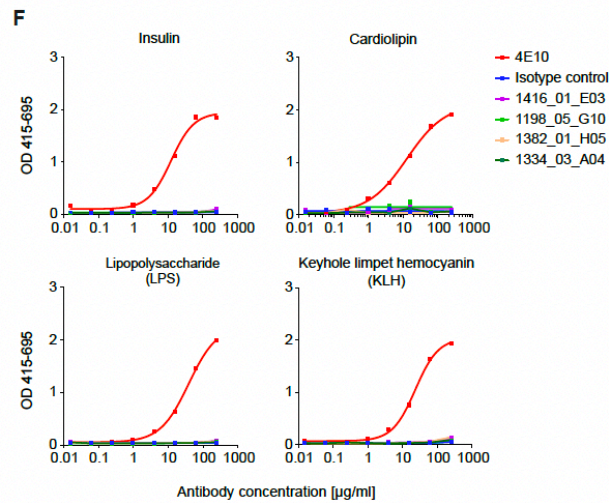
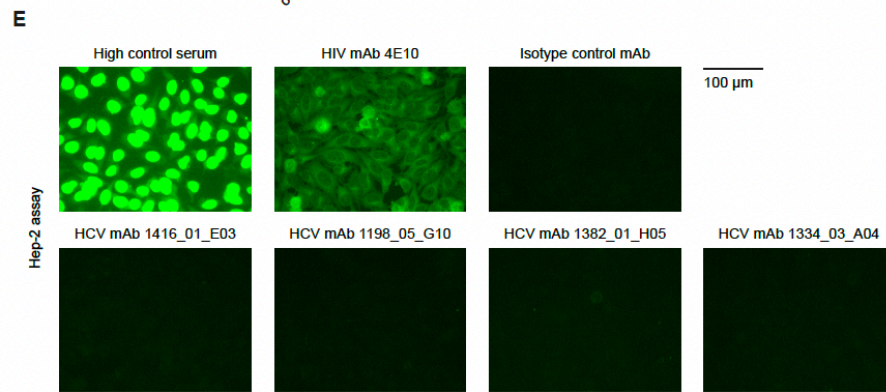
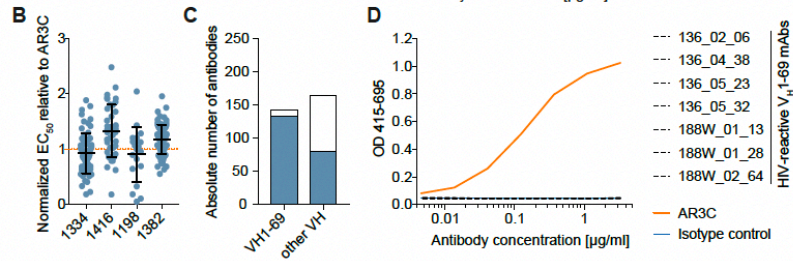
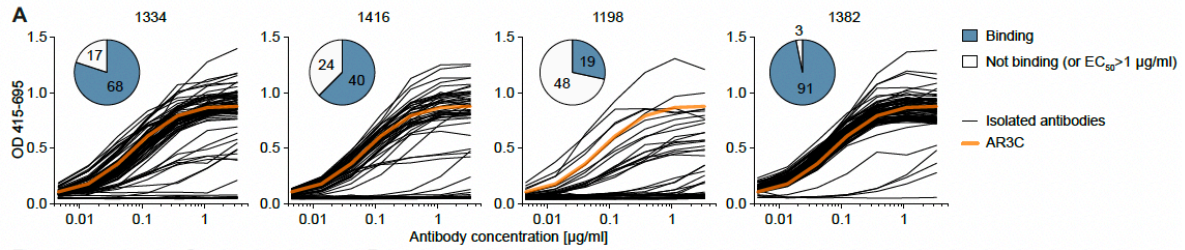
(E) Influence of HIV status on average neutralization. Data is plotted for 125 individuals. No information about the HIV status was available for 310 individuals. Lines indicate means  $\pm$ SD.

N.s., not significant; \*\* $p \leq 0.01$ ; two-tailed Mann-Whitney test.



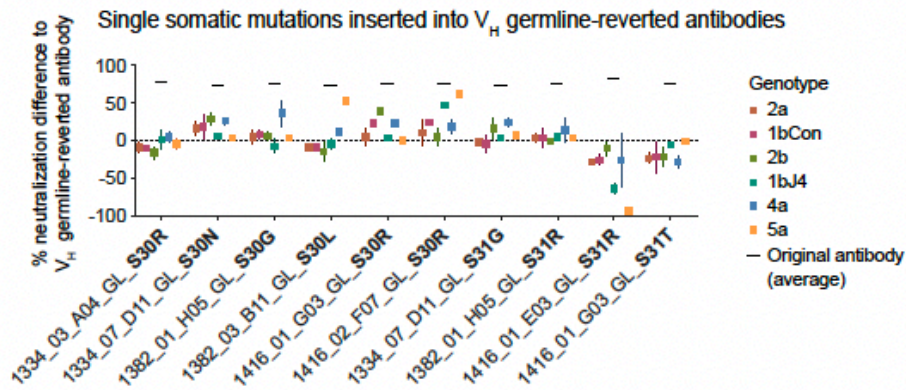
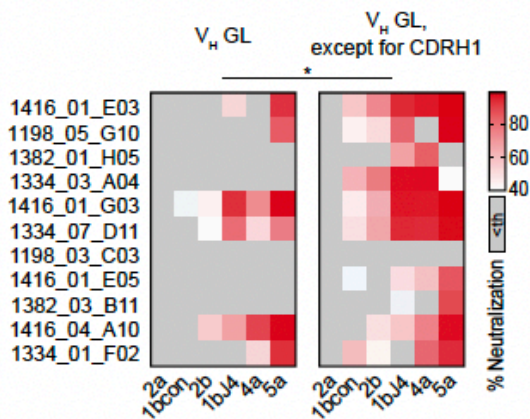
**Supplementary Figure 2: Characteristics of HCV-specific B cells, relating to Figure 2.**

- (A) Representative FACS plots showing the gating strategy for the sorting of single HCV-specific memory B cells (upper panel) and FACS plots of HCV patient memory B cells in comparison to healthy control memory B cells (lower panel).
- (B) Frequencies of IgG isotypes in sorted HCV-specific memory B cells, determined by analysis of all heavy chain sequences that passed quality control.
- (C) Length distribution of heavy and light chain CDR3s of analyzed sequences from sorted HCV-specific memory B cells.
- (D) V gene identity distribution of heavy and light chains of analyzed sequences from sorted HCV-specific memory B cells.



**Supplementary Figure 3: Characteristics of isolated monoclonal antibodies, relating to Figure 3.**

- (A)** ELISA binding of all 310 produced monoclonal antibodies to E2 core protein of genotype 2b. HCV antibody AR3C was used as a positive control. Means of duplicate measurements.
- (B)** Normalized EC50 values for all antibodies with an EC50 < 1 µg/mL in the ELISA shown in (A), relative to control antibody AR3C.
- (C)** Number of antibodies with an EC50 < 1 µg/mL (blue) or an EC50 > 1 µg/mL (white)utilizing VH1-69 or a different VH gene segment.
- (D)** ELISA as in (A) with HIV-1 specific monoclonal antibodies utilizing VH1-69. Means of duplicate measurements.
- (E)** Hep-2 assay for the detection of poly-/autoreactive antibodies. HEP-2 cells were incubated with antibodies at concentrations of 100 µg/mL and analyzed by indirect immunofluorescence.
- (F)** ELISA for the detection of poly-/autoreactive antibodies binding to human insulin, bovine cardiolipin, E.coli lipopolysaccharide, or keyhole limpet hemocyanin.

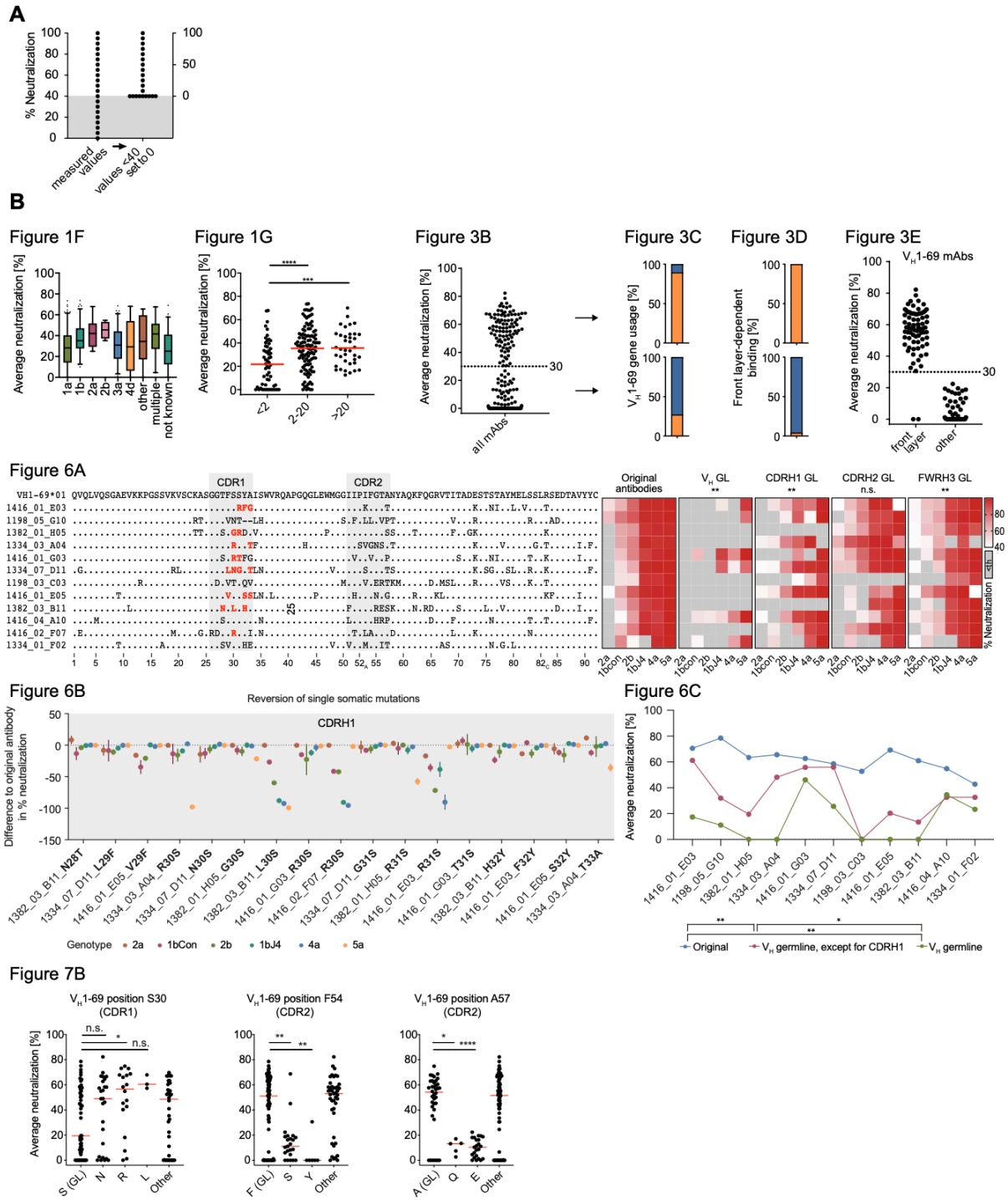
**A****B**

**Supplementary Figure 4: Influence of somatic mutations on the function of HCVneutralizing antibodies, relating to Figure 6.**

- (A) Effect of single V<sub>H</sub>1-69 amino acid mutations in otherwise V<sub>H</sub> germline-reverted antibodies on HCVcc neutralization. The reverted mutations are also highlighted in main Figure 6A in red. Means  $\pm$ SD of triplicate measurements. Representative of 2 independent experiments.
- (B) HCVcc neutralization by antibodies with V<sub>H</sub> gene segments reverted to germline, except for the CDRH1 (relating to main Figure 6C). Medians of triplicate measurements. Representative of 2 independent experiments. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ ; Wilcoxon matched-pairs signed rank test with Bonferroni correction for multiple testing. Average neutralization values across all 6 tested HCVcc strains for each “V<sub>H</sub>GL, except for CDRH1” antibody were compared pairwise to corresponding “V<sub>H</sub>GL” antibodies. GL, germline.

Supplementary Figure 5

Alternative calculations with 40% neutralization set to 0%



**Supplementary Figure 5: An alternative method of determining average neutralization values, relating to Figures 1, 3, 6, and 7.**

Indicated panels of Figures 1, 3, 6, and 7 were re-calculated with an alternative method of determining average neutralization values. Instead of averaging the measured % neutralization values for the 6 HCVcc strains directly, 40% neutralization was first set to zero for each strain.

Schematic representation of re-calculation of neutralization values for each strain prior to calculation of average neutralization values.

Alternative calculation of neutralization values does not significantly impact the meaning of the data or the statistics

## 3 Diskussion†

### 3.1 Notwendigkeit eines HCV-Impfstoffes

Anhand neuer Modellierungen der HCV-Epidemiologie lassen sich erstmals rückläufige Zahlen ableiten. So hat sich die Prävalenz im Zeitraum 2015 – 2020 von 71,1mio (95% KI 62,5-79,4) auf 56,8 Mio. (95% KI 55,2-67,8) chronisch Infizierte reduziert <sup>130</sup>. Ein Großteil dieser Entwicklung entfällt auf das Hochinzidenzland Ägypten, das in diesem Zeitraum etwa 3,5 Mio. Patienten erfolgreich mit DAAs behandelte <sup>131</sup>. In Ermangelung eines Impfstoffes ist die Identifikation und gezielte Behandlung der Erkrankten die einzige Option, der Pandemie zu begegnen. Doch sowohl Diagnoseraten als auch Therapieerfolge liegen weit hinter den Zielsetzungen der WHO zurück. Um eine Eliminierung zu erreichen, sollen laut WHO bis zum Jahr 2030 80% der Erkrankten mit DAAs behandelt werden <sup>6</sup>. Mit 641 000 Patienten hatten im Jahr 2020 hingegen lediglich 1,13% der weltweit Infizierten Zugang zur Therapie <sup>130</sup>. Bemerkenswerterweise haben selbst Länder mit hohen Einkommensstrukturen Probleme, diese Ziele zu erreichen. In Deutschland lag die HCV-Inzidenz im Meldejahr 2014 vor Verfügbarkeit der DAAs bei 5890 und hat sich bis 2019 kaum verändert (5940 Neuinfektionen)<sup>132</sup>. Im Jahr 2022 haben sich die HCV-Fallzahlen hierzulande erneut um ca. 70% im Vergleich zum Vorjahr auf 7.919 Fälle erhöht. Dies ist zum einen auf erniedrigte Diagnoseraten und Meldezahlen während der COVID-19-Pandemie (Coronavirus Disease 2019) und auf die einsetzende Fluchtmigration aus dem Hochinzidenzland Ukraine zurückzuführen <sup>133</sup>.

Währenddessen erleben die USA, befeuert durch die Opioid-Krise ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Fallzahlen <sup>134,135</sup>. Erfolge bei der Bekämpfung des HCV durch den alleinigen

---

† Teile der Inhalte von Abschnitt 5 wurden in Analysis of antibodies from HCV elite neutralizers identifies genetic determinants of broad neutralization, Immunity veröffentlicht.

Einsatz von DAAs, die beispielsweise das Hochinzidenzland Ägypten vorweisen kann, erfordern die Implementierung extensiver und kostspieliger Screening Programme. Diese stellen neben den hohen Therapiekosten eine weitere finanzielle Hürde dar. Anhand der aktuellen Zahlen scheinen die Ziele zur Eliminierung der Erkrankung durch DAAs in weite Ferne gerückt zu sein <sup>130</sup>. Ein protektiver Impfstoff wäre zur Erreichung dieser Ziele von herausragender Bedeutung.

Im Zuge der SARS-COV-2-Pandemie erzielte die Forschung, auch durch großzügige Finanzierung und ein enormes öffentliches Interesse, bemerkenswerte Erfolge und brachte innerhalb weniger Monate verschiedene Impfstoffe zur Zulassung. Dieser rasche Durchbruch sollte angesichts der 400 000 jährlichen Todesfälle durch HCV als Anreiz gesehen werden, neue Ansätze für einen Impfstoff zu entwickeln. Obwohl zahlreiche Indizien für die Machbarkeit einer prophylaktischen Impfung sprechen, gibt es im Jahr 2024 keine registrierte klinische Studie <sup>65</sup>.

### **3.2 Evaluation der Methodenauswahl**

In vorangegangenen Studien wurden bereits einige HCV-bNAbs beschrieben, die jedoch zumeist mittels Hefen- bzw. Phagen-Display oder B-Zell Immortalisierung isoliert wurden <sup>113-119</sup> (**Tabelle 4**). Diese Techniken liefern jedoch nur eingeschränkt verwertbare Informationen über die Beschaffenheit der Antikörper und das B-Zell Repertoire der Spender. So kommt es beispielsweise zu einer Aufhebung der natürlichen Paarung von schwerer und leichter Kette, oder einer veränderten Glykosylierung durch Expression in *E. coli*. Erfahrungen aus dem Feld der HIV-bNAbs haben gezeigt, dass diese Methoden mit zahlreichen Nachteilen behaftet sind <sup>136</sup>. Der Einsatz von Single-B-cell-cloning im Hochdurchsatzverfahren hat hingegen zur Identifikation hochpotenter Antikörper gegen zahlreiche Erreger geführt <sup>129,136,145,137-144</sup>. Mit der Entwicklung verbesserter Methoden, wie beispielsweise dem Zellkulturverfahren HCVcc, vergrößerte sich das Wissen über die HCV-Antikörperantwort, obwohl oben genannte

Methoden nicht auf die HCV-bNAb-Forschung übertragen wurden<sup>93,146,147</sup>. Hiermit legen wir erstmals eine systematische Studie auf Basis dieser Methode vor und präsentieren robuste Daten.

### **3.3 Ergebnisse des Serumscreenings**

Durch das Screening der polyklonalen Antikörperantwort von 435 HCV-infizierten Patienten konnten wir detaillierte Aussagen über Einflussfaktoren auf die HCV-Antikörperantwort treffen. Wir zeigten, dass weder der zugrundeliegende Genotyp der Infektion noch das Geschlecht oder Alter der Probanden einen signifikanten Einfluss auf die Serumneutralisation hatten. Diese Daten stehen im Widerspruch zu vorherigen Beobachtungen, nach denen eine Infektion mit dem HCV-Genotyp 1b mit der frühen Induktion von bNAbs assoziiert sein sollte<sup>148</sup>. Signifikant positiv wurde die Serum-Neutralisation durch die Dauer der Infektion beeinflusst. So schnitten die Seren von Patienten, die nachweislich >20 Jahre virämisch gewesen waren besser ab als jene von kürzlich infizierten Spendern ( $p = 0,0028$ ). Als negativer Einflussfaktor ( $p = 0,0042$ ) konnte eine Koinfektion mit HIV, wie auch in anderen Arbeiten vorbeschrieben<sup>149</sup>, bestätigt werden. Diese Daten erklären klinische Beobachtungen von höheren Virustitern und raschem Progress der Leberzirrhose im Fall einer Koinfektion<sup>150</sup>.

Des Weiteren gelang uns der Nachweis, dass etwa 5% der infizierten Individuen eine herausragende Serumneutralisation aller getesteter HCVcc Stämme erreicht. Hierdurch konnten wir vorbestehende Hinweise auf die Existenz dieser Patientengruppe erweitern und quantifizieren<sup>151</sup>.

### **3.4 Mutationsmuster von HCV-bNAbs**

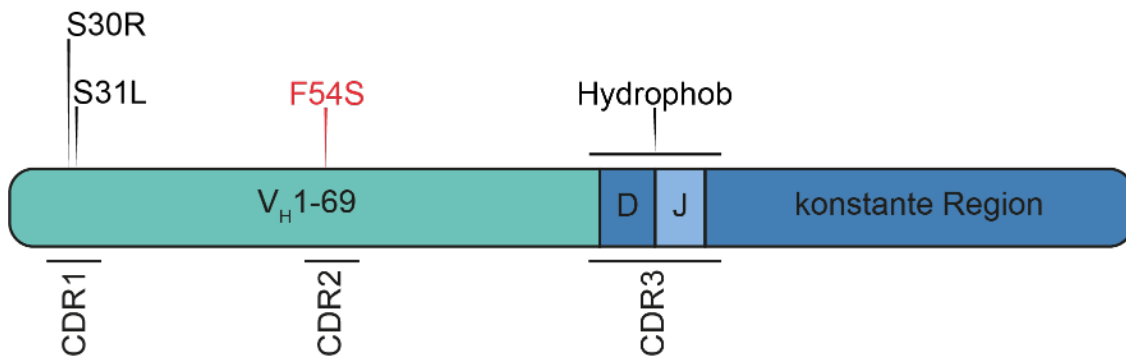
Aus den PBMCs der Top-neutralizer isolierten wir über ein single-cell-cloning Verfahren 310 HCV-Antikörper. Diese Strategie ermöglichte es uns, genetische und molekulare Eigenschaften der bNAbs zu entschlüsseln.

Durch die Korrelation der via Sanger-Sequenzierung gewonnenen Daten mit NGS-Repertoire-Analysen derselben Patienten wurden belastbare Daten über molekulare Charakteristika von Anti-HCV-bNABs vorgelegt. Hierbei erweiterten wir Erkenntnisse vorangegangener Studien, die eine geringe Anzahl somatischer Mutationen beschreiben. Konkordant zu Ergebnissen anderer Autoren zeigten wir, dass HCV bnAbs im Gegensatz zu HIV bnAbs eine physiologische Länge der CDR3 aufweisen<sup>95</sup>.

Übereinstimmend mit Studienergebnissen anderer Arbeitsgruppen war V<sub>H</sub>-1-69 das am weitesten verbreitete V<sub>H</sub>-Gensegment<sup>152</sup>. Die V<sub>H</sub>1-69-Antikörper ließen sich in zwei Gruppen unterteilen: 61% (n=88) der Antikörper banden das front layer-Epitop und wiesen eine hohe bis sehr hohe Neutralisation auf, die restlichen 39% (n= 56) zielten auf andere Epitope des E2-Proteins und vermittelten keine oder allenfalls eine schwache Neutralisation des Virus **(Figure 3E)**.

Unsere Erkenntnisse widersprechen vorherigen Beobachtungen, wonach V<sub>H</sub>1-69 Antikörpern generell eine hohe Virusneutralisation zugesprochen wurde<sup>116,153,154</sup>.

Bemerkenswerterweise wiesen die potenten HCV E2-reaktiven V<sub>H</sub>1-69-NABs Eigenschaften innerhalb ihrer Gensequenz auf, die sie von nicht oder schwach neutralisierenden Antikörpern der jeweiligen Patienten unterschieden. Dazu gehörten Mutationen in der CDR<sub>H</sub>1, wie S30R oder S31L sowie Änderungen der Hydrophobizität innerhalb der CDR<sub>3H</sub>. Andererseits waren Mutationen wie F54S in der CDR<sub>H</sub>2 wiederum assoziiert mit schwacher oder fehlender HCV-Neutralisation **(Abbildung 7)**. Die Kristallstrukturanalysen der beiden HCV bNABs mAb1198 und mAb1382 erweiterten das Verständnis darüber, wie diese Merkmale mit der effizienten Neutralisation des HCV verbunden sind. Schließlich wird der E2-Kontakt der CDR<sub>H</sub>2 sowie der CDR<sub>H</sub>3 über hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der schweren Kette eines VH1-69-HCV bNAbs.**

Gezeigt wird die Position von Mutationen, die das Neutralisationsverhalten von HCV-E2-reaktiven Antikörpern beeinflussen. Mutationen mit positivem Einfluss auf die Virusneutralisation in schwarz, Mutationen mit negativem Einfluss in roter Schriftfarbe.

Während die CDRH1 eine untergeordnete Rolle bei der direkten Interaktion mit E2 spielt, erfüllen die darin enthaltenen Substitutionsmutationen an Position 30 und 31 den Zweck, Zusammenstöße mit dem CD81-binding loop zu verhindern (z.B. W529). Eine basierend auf diesen Erkenntnissen programmierte künstliche Intelligenz konnte die Neutralisationsaktivität von VH1-69 mit einer Genauigkeit von 87% vorhersagen. Bemerkenswerterweise gelang es außerdem, durch den Einsatz künstlicher Intelligenz, eine vollkommen synthetische schwere Kette zu generieren, die für die Produktion eines Antikörpers diente, der mehrere HCV-Genotypen im HCVcc-Assay neutralisiert. Diese Ergebnisse sprechen klar für ein Mutationsmuster von HCV-NAbs und dienen als Beweis für die Verwertbarkeit unserer Daten.

Die Identifizierung molekularer Merkmale und gerichteter somatischer Mutation ist elementar für die Entwicklung neuer, effektiver Strategien zur Impfstoffentwicklung. In dieser Studie konnten wir keine Merkmale identifizieren, die einer Induktion von HCV-bNAbs in vivo widerspricht. In dieser Studie identifizierten wir also induzierbare genetische und strukturelle Charakteristika, die genutzt werden können, um neuartige Immunogene zu entwickeln. In der Tat zeigen die Kristallstrukturanalysen unserer bNAbs ein vergleichbares Bindungsverhalten, wie jene Antikörper, die kürzlich aus dem Blut immunisierter Makaken

isoliert wurden <sup>110</sup>. Diese Makaken-Antikörper nutzten ein dem V<sub>H</sub> 1-69 entsprechendes Gen mit somatischen Mutationen, die das in der Keimbahn codierte Serin an Position 31 ersetzten. Breitneutralisierende protektive HCV-Antikörper werden nach unseren neuen Erkenntnissen somit nicht nur durch den Gebrauch des V<sub>H</sub>-Gens 1-69 gekennzeichnet: Sie benötigen darüber hinaus ein Muster von charakteristischen Mutationen, die höchstwahrscheinlich durch einen Impfstoff hervorgerufen werden können. Eine sequenzielle Immunisierung könnte demnach ein potentieller Ansatz sein, um passende B-Zellpopulationen zu expandieren und deren Reifung zu leiten <sup>155</sup>.

Eine weitere Frage, die unsere Untersuchungen aufwirft ist, warum HCV-bNAbs, wie jene, die wir aus Patientenblut isolierten, nicht häufiger auch in natura auftreten. Mögliche Erklärungen liegen beispielsweise in der Unzugänglichkeit der Epitope (Lipoviropartikel, Glykosylierung, und HVR1 Blockade). Eine weitere Rolle spielt sicherlich die ständige Präsentation neuer Epitope durch die hohe Mutationsrate und den daraus resultierenden Quasispezies, wodurch die Ressourcen des Immunsystems in der Bildung nicht neutralisierender Antikörper gebunden werden.

### 3.5 Limitationen dieser Studie

Mit 435 Individuen konnten wir auf eine große Anzahl von Kohorte zurückgreifen. Im Hinblick auf den Infektionsstatus gibt es jedoch innerhalb der PEPSI-Kohorte geringfügige Unterschiede. So ist beispielsweise die Gruppe der Patienten, die eine Hepatitis C spontan ausheilten mit 1,1% (**Figure S1**) deutlich unterrepräsentiert. Die Untersuchung einer Kohorte, die den natürlichen Verlauf der Infektion (**Abbildung 1**) besser widerspiegelt, hätte möglicherweise einen größeren Anteil an Elite-neutralizern hervorgebracht.

### 3.5.1 Neutralisationsassay

Zur Analyse der Neutralisation entschieden wir uns für den technisch anspruchsvolleren HCVcc-Neutralisations-Assay, um der komplexen Virusbiologie Rechnung zu tragen. HCVcc-Partikel weisen aufgrund ihres Ursprungs aus Huh- Zellen eine authentische Assoziation mit Apolipoproteinen auf<sup>156</sup>. Diese kann bei den aus HEK-293T-Zellen stammenden HCVpp, nicht angenommen werden. Dieser Unterschied macht Pseudopartikel sensibler für die Neutralisation durch Antikörper<sup>157</sup>.

Für beide Methoden (HCVcc- und HCVpp-Assay) existieren mittlerweile Stämme aller relevanten HCV-Genotypen, um die Variabilität der Oberflächenproteine in Neutralisationsexperimenten abzubilden<sup>158</sup>.

Ein Nachteil der HCVcc Methode ist jedoch die begrenzte Anzahl von Isolaten, die zur Testung zur Verfügung stehen, sodass argumentiert werden kann, dass die intragenotypische Variabilität schlechter abgebildet wird. So nutzten wir maximal 13 verschiedene virale Konstrukte (**Figure 1, Figure 3F**), um die Breite der Virusneutralisation durch unsere bNAbs zu determinieren. Standardisierte HCVpp-panels, wie beispielsweise das der Johns-Hopkins University, ermöglichen hingegen die Verwendung von 113 verschiedenen Isolaten<sup>159</sup>. Dieser Umstand limitiert die Aussagen hinsichtlich der Neutralisationsbreite der in dieser Studie charakterisierten Antikörper. Hier könnten weitere Experimente auf Basis des HCVpp-Systems robuste Daten liefern, da diese womöglich die Heterogenität des E2 Proteins besser abbilden. Ein weiterer Nachteil der HCVcc Methode besteht in der Möglichkeit von Zell-Kultur-adaptiven Mutationen. Da der Assay den gesamten Lebenszyklus wiederholt rekapituliert, ist angesichts der hohen Mutationsrate des HCV anzunehmen, dass sich zur Anpassung an die Bedingungen der Zell-Kultur adaptive Mutationen durchsetzen. Diese Mutationen könnten einen Einfluss auf die Ergebnisse unserer Neutralisationsexperimente ausgeübt haben. Zum einen wären Punktmutationen oder Konformationsmutationen denkbar, die das Bindungsverhalten von Antikörpern sowohl negativ als auch positiv beeinflussen. Darüber hinaus besteht die

Möglichkeit adaptiver Mutationen, welche wiederum zu einer gesteigerten Virusreplikation geführt haben könnten, die sich über die Luciferaseaktivität auch auf unsere Messungen und Ergebnisse ausgewirkt hätte. Eine Sequenzierung hinsichtlich solcher Mutationen wird durch den notwendigen BSL-3 Sicherheitsstandard erheblich erschwert, da keine HCVcc-Bestandteile das Labor verlassen dürfen. Wir versuchten diese Effekte durch wiederholte Messungen mit jeweils frisch generierten Virusgenerationen zu negieren.

### 3.5.2 Einfluss des Bait-Proteins

Ein ausschlaggebender Punkt bei der Isolierung von mAbs aus einzelnen, antigenspezifischen B-Gedächtniszellen, ist die Beschaffenheit des sogenannten bait-Proteins im Rahmen des FACS. Dieses aus Erregerbestandteilen bestehende Protein wird genutzt, um aus der Gesamtheit der CD19<sup>+</sup>-B-Zellen die Subgruppe der HCV-reaktiven Gedächtniszellen zu isolieren. Hieraus wird verständlich, dass eine möglichst physiologische und vollständige Proteinbiochemie notwendig ist. Fehlende oder nicht zugängliche Epitope auf dem bait-Protein führen folglich zu einem Selektionsfehler, weil *in natura* bindende Antikörper verloren gehen und nicht untersucht werden können. Erfahrungen aus der Forschung zu HIV-bNAbs suggerieren, dass neben der natürlichen Faltung eines Proteins auch die authentische Glykosylierung eine wichtige Rolle spielt <sup>160,161</sup>. Für das in unserer Studie verwendete E2 Protein pt1056, das in Schneider S2 Zellen (*Drosophila*) produziert wurde, ist anzunehmen, dass keine authentische Glykosylierung vorhanden ist, da sich die Glykosylierung von Proteinen aus *Drosophila*-Zellen nachweislich von der menschlicher Zellen unterscheidet <sup>162–164</sup>. Eine vergleichende Studie mit E2-Protein aus insekten- und menschlichen Zellen zeigte, dass die Bindung mehrerer Antikörper ohne menschliche Glykosylierung verloren geht <sup>165</sup>. Durch die Verwendung eines in Insektenzellen produzierten bait-Proteins könnten somit in dieser Studie B-Gedächtniszellen verlorengegangen sein, wodurch die Qualität der daraus gewonnenen Daten beeinträchtigt sein könnte. Darüber hinaus limitiert die Verwendung eines einzelnen bait-Proteins die Aussagekraft hinsichtlich des B-Zell-Repertoires der Spender.

### 3.6 Ausblick

Aus der hier vorgelegten Arbeit geht hervor, welche Charakteristika zu einer breiten und potenten Neutralisation von HCV-bNAbs beitragen. In vorherigen Studien wurde bereits gezeigt, dass diese Antikörper die genetische Vielfalt des Erregers überwinden können. Das Ziel einer sterilen Immunität durch Impfung sollte in Zukunft wieder konsequenter verfolgt werden.

In anknüpfenden Forschungsarbeiten zu HCV-bNabs sollten verschiedene physiologische bait-Proteine zum Einsatz kommen. So würde die Heterogenität von HCV besser abgebildet, wodurch der Selektionsfehler vor Untersuchung des HCV-reaktiven B-Zell-Repertoires geschwächt werden könnte. Interessant in diesem Zusammenhang ist die kürzlich publizierte Kristallstruktur des vollständigen E1E2- Heterodimers <sup>100</sup>. Durch die Verwendung eines solchen Proteinkomplexes als bait-Protein könnten neuere Erkenntnisse über HCV-bNAbs gewonnen werden, da auch Konformationsepitope wie das E1/E2-Interface-Epitop zugänglich werden. Um die genaue Auswirkung von bait-Proteinen auf die Gewinnung von HCV-spezifischen B-Zellen bestimmen zu können, wären eigenständige Studien notwendig.

Durch weitere Erkenntnisse über die Charakteristika von bNAbs und bNAb-Epitope könnten gezielt Immunogene geschaffen werden, die darauf abzielen, eine analoge Antikörperbildung zu induzieren. Keines der bislang identifizierten bNAb-Merkmale spricht gegen ihre Induzierbarkeit im Menschen. Ende des Jahres 2022 wurde eine Immunisierungsstudie publiziert, die nachweisen konnte, dass durch Verabreichung eines E1E2-nanopartikel-Immunogens HCV-bNAbs in Mäusen induziert werden können <sup>112</sup>.

Für die zahlreichen HCV-bNAbs in unserer Studie sind verschiedene direkte Nutzungsoptionen denkbar. Die molekular und strukturell detailliert beschriebenen bNAbs können in weiteren Studien als Referenzantikörper eingesetzt werden. Hierbei kann insbesondere das herausragende Isolat 1416\_01\_E03 als Referenz für eine breite und potente Virusneutralisation angesehen werden. Zu Forschungszwecken ist ebenfalls eine Nutzung in

Competition-ELISA Experimenten möglich, um die Epitope neu isolierter Antikörper zu bestimmen. Zu dieser Nutzung wurden die Plasmide bereits international an Arbeitsgruppen versendet.

Ob HCV-bNAbs einen Schutz gegenüber einer Infektion in Menschen vermitteln, ist eine offene Frage, die es zu beantworten gilt. Sollten sie eine sterile Immunität gewähren, wäre eine vektorvermittelte Immunprophylaxe durch Adeno-assoziierte Viren denkbar. HIV-bNAbs wurden auf diesem Wege erfolgreich als Gentherapie verabreicht. In der Folge waren in vivo dauerhaft wirksame HIV-bNAbs nachweisbar und führten zur „funktionellen Ausheilung“ von SHIV in Rhesusmakaken. Derzeit werden klinische Phase-1-Studien zur Prophylaxe von HIV bei Menschen nach diesem Konzept durchgeführt <sup>166</sup>.

## **4 Anhang**

### **4.1 Beitrag zur vorgelegten Publikation**

Diese kumulative Dissertationsschrift basiert hauptsächlich auf der im Kapitel 2 vorgelegten Publikation. Im folgenden Abschnitt ist der jeweilige Beitrag der Autoren und Koautoren detailliert dargestellt.

#### **Analysis of antibodies from HCV elite neutralizers identifies genetic determinants of broad neutralization**

Timm Weber, Julian Potthoff, Sven Bizu, Maurice Labuhn, Leona Dold, Till Schoofs, Marcel Horning, Meryem S. Ercanoglu, Christoph Kreer, Lutz Gieselmann, Bettina Langhans, Hanna Janicki, Luisa J. Ströh, Elena Knops, Dirk Nierhoff, Ulrich Spengler, Rolf Kaiser, Pamela J. Bjorkman, Thomas Krey, Dorothea Bankwitz, Nico Pfeifer, Thomas Pietschmann, Andrew I. Flyak, Florian Klein

#### **Timm Weber:**

- Zellkultur der Zelllinien Huh 7.5.1, Huh 7.5, HEK293-6E
- Produktion von Viruspartikeln mittels in vitro Transkription und RNA-Elektrophorese in HUH 7.5.1- Zellen
- HCVcc-Neutralisationsassay zur Bestimmung der Virusneutralisation durch monoklonale Antikörper
- Isolation von einzelnen HCV-reaktiven B-Gedächtniszellen mittels MACS und single-cell-FACS aus den PBMCs der elite neutralizer 1334 und 1198
- Semi-nested-single-cell PCR zur Amplifikation aller Antikörper-Genabschnitte aus den HCV reaktiven B-Gedächtniszellen der elite neutralizer 1334 und 1198 zur Sanger-Sequenzierung

- Analyse des HCV-reaktiven B-Zellrepertoires anhand der amplifizierten Genabschnitte hinsichtlich V(D)J-Rekombination, somatischer Mutation und Klonalität.
- Produktion monoklonaler Antikörper über SLIC und Transformation chemisch kompetenter DH5 $\alpha$ -E. coli mit anschließender Aufreinigung und Colony-PCR. Anschließend Expression in HEK293-6E-Zellen
- ELISA und Kompetitions- ELISA zur Bestimmung des Bindungsverhaltens der monoklonalen Antikörper.
- HCVcc-Neutralisationsassay im S3- Sicherheitslabor zur Bestimmung der Virusneutralisation durch monoklonale Antikörper und Identifizierung von HCV-bNAbs.
- Gensequenzanalyse der gefundenen nAbs und bNAbs hinsichtlich V(D)J-Rekombination, somatischer Mutationen und Proteineigenschaften.
- Mutationsexperimente von V<sub>H</sub> 1-69 Antikörpern mit anschließender Testung in ELISA und HCVcc-Neutralisationsassay
- Diskussion von Forschungsfortschritt und -ergebnissen im Rahmen regelmäßiger Konferenzen sowie Vorträgen im Labor und im Institut für Virologie. Zudem Besuch des wissenschaftlichen Kongresses TTU Hepatitis des DZIF.
- Abschließende Analyse aller Ergebnisse und Verschriftlichung des Manuskriptes zur Publikation inklusive der Anfertigung von Abbildungen und Diagrammen.

### **Julian Potthoff**

- Zellkultur der Zelllinien Huh 7.5.1, Huh 7.5 und HEK293-6E
- Produktion von Viruspartikeln mittels in vitro-Transkription und RNA-Elektrophorese in Huh 7.5.1- Zellen.
- Etablierung und Validierung des HCVcc-Neutralisationsassays im S3 Sicherheitslabor des Labors für experimentelle Immunologie in Köln.
- Isolation des Polyklonalen Serum-IgGs aus Blut und Serumproben von HCV-Infizierten Patienten mittels IgG-Sepahrose

- Planung, Durchführung und Auswertung des IgG-Screenings im HCVcc-Neutralisationsassay im S3-Sicherheitslabor mit 435 Patientenproben zur Identifikation von elite neutralizern
- Isolation von PBMCs aus dem Blut aller Top- neutralizer über eine Ficoll-Gradienten-Zentrifugation
- Isolation von einzelnen HCV-reaktiven B-Gedächtniszellen mittels MACS und single-cell-FACS aus den PBMCs der elite neutralizer 1334 und 1198
- Semi-nested-single-cell PCR zur Amplifikation aller Antikörper-Genabschnitte aus den HCV reaktiven B-Gedächtniszellen der elite neutralizer 1334 und 1198 zur Sanger-Sequenzierung
- Analyse des HCV-reaktiven B-Zellrepertoires anhand der amplifizierten Genabschnitte hinsichtlich V(D)J-Rekombination, somatischer Mutation und Klonalität.
- Produktion monoklonaler Antikörper über SLIC und Transformation chemisch kompetenter DH5 $\alpha$ -E. coli mit anschließender Aufreinigung und Colony-PCR. Anschließend Expression in HEK293-6E-Zellen
- ELISA und Kompetitions- ELISA zur Bestimmung des Bindungsverhaltens der monoklonalen Antikörper.
- HCVcc-Neutralisationsassay im S3- Sicherheitslabor zur Bestimmung der Virusneutralisation durch monoklonale Antikörper und Identifizierung von HCV-bNAbs.
- Gensequenzanalyse der gefundenen nAbs und bNAbs hinsichtlich V(D)J-Rekombination, somatischer Mutationen und Proteineigenschaften.
- Diskussion von Forschungsfortschritt und -ergebnissen im Rahmen regelmäßiger Konferenzen sowie Vorträgen im Labor und im Institut für Virologie. Zudem Besuch der wissenschaftlichen Kongresse TTU Hepatitis des DZIF und HCV2018
- Abschließende Analyse aller Ergebnisse und Verschriftlichung des Manuskriptes zur Publikation inklusive der Anfertigung von Abbildungen und Diagrammen.

**Sven Bizu**

- Programmierung, und Validierung des maschinellen Lernens der künstlichen Intelligenz zur Vorhersage von Virusneutralisation durch Antikörper

### **Maurice Labuhn**

- HCVcc Neutralisationsassays im S3-Sicherheitslabor in Hannover anhand weiterer Viruskonstrukte zur Validierung der bestehenden Ergebnisse und genaueren Bestimmung der Inter-genotypischen Neutralisation

### **Leona Dold**

- Etablierung und Validierung des HCVcc-Neutralisationsassay im S3 Sicherheitslabor des Labors für experimentelle Immunologie in Köln.
- Isolation des polyklonalen Serum-IgGs aus Serumproben von HCV-Infizierten Patienten.
- Kontaktierung von Patienten der Kohorte inkl. der elite neutralizer zur Blutentnahme
- Diskussion von Forschungsfortschritt und -ergebnissen im Rahmen regelmäßiger Konferenzen sowie Vorträgen im Labor und im Institut für Virologie.

### **Till Schoofs**

- Zellkultur der Zelllinien Huh 7.5.1, Huh 7.5, HEK293-6E
- Produktion von Viruspartikeln mittels in vitro Transkription und RNA-Elektrophorese in HUH 7.5.1- Zellen.
- Etablierung und Validierung des HCVcc-Neutralisationsassay im S3 Sicherheitslabor des Labors für experimentelle Immunologie in Köln.
- Isolation von einzelnen HCV-reaktiven B-Gedächtniszellen mittels MACS und single-cell-FACS aus den PBMCs HCV-infizierter Patienten insbesondere Entwicklung der FACS-Strategie.
- Diskussion von Forschungsfortschritt und -ergebnissen im Rahmen regelmäßiger Konferenzen Institut für Virologie sowie wissenschaftliche Überarbeitung des

Manuskriptes zur Publikation. Zudem Besuch des wissenschaftlichen Kongresses  
TTU- Hepatitis des DZIF

### **Marcel Horning**

- Zellkultur der Zelllinien Huh 7.5.1, Huh 7.5
- Isolation des polyklonalen Serum-IgGs aus Serumproben von HCV-Infizierten Patienten.
- HCVcc-Neutralisationsassay zur Bestimmung der Virusneutralisation durch polyklonales IgG aus 435 Patientenproben
- Auswertung des IgG-Screenings und Identifikation der elite neutralizer.
- Anlage und Pflege eines Patientenregisters mit anonymisierten, klinischen Patientendaten.

### **Meryem S. Ercanoglu**

- Isolation von einzelnen HCV-reaktiven B-Gedächtniszellen mittels single-cell-FACS aus den PBMCs HCV-infizierter Patienten insbesondere Entwicklung der FACS-Strategie.

### **Christoph Kreer**

- Programmierung eines Analyseprogramms, für den automatisierten Vergleich von Antikörper-Gensequenzen mit Datenbankeinträgen auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Analyse des HCV-reaktiven B-Zellrepertoires anhand der amplifizierten Genabschnitte hinsichtlich V(D)J-Rekombination, somatischer Mutation und Klonalität.

### **Lutz Gieselmann**

- Kontaktierung und Aufklärung des elite neutralizers 1198 zur Blutentnahme und Plasmaapharese
- Aufbereitung und Amplifikation von Genmaterial der elite neutralizer für NGS zur Erstellung eines Referenz-IgG -Repertoires

### **Bettina Langhans**

- Bereitstellung von Patientenproben

#### **Hanna Janicki**

- Zellkultur der Zelllinien Huh 7.5 und HEK293-6E
- Aufreinigung von Antikörper-DNA aus Kulturen transformierter DH5 $\alpha$ -E. coli
- Expression und Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern aus HEK293-6E-Zellen

#### **Luisa J. Ströh**

- Produktion und Aufreinigung des E2-Proteins pt1056 (bait)

#### **Elena Knops**

- Bereitstellung von Patientenproben der PEPSI-Kohorte

#### **Dirk Nierhoff**

- Bereitstellung von Patientenproben

#### **Ulrich Spengler**

- Bereitstellung von Patientenproben

#### **Rolf Kaiser**

- Bereitstellung von Patientenproben

#### **Pamela J. Bjorkman**

- Beaufsichtigung des Forschungsprozesses hinsichtlich der Kristallstrukturanalysen
- Überarbeitung des Manuskriptes zur Publikation

#### **Thomas Krey**

- Beaufsichtigung des Forschungsprozesses hinsichtlich der Proteinbiochemie von pt1056
- Bereitstellung des E2-Proteins pt1056
- Überarbeitung des Manuskriptes zur Publikation

### **Dorothea Bankwitz**

- Aufreinigung Bereitstellung von DNA-Plasmiden
- Überarbeitung des Manuskriptes zur Publikation

### **Nico Pfeifer**

- Beaufsichtigung des Forschungsprozesses hinsichtlich der Programmierung von künstlicher Intelligenz

### **Thomas Pietschmann**

- Beaufsichtigung des Forschungsprozesses hinsichtlich der Neutralisations Experimente in Hannover
- Überarbeitung des Manuskriptes zur Publikation

### **Andrew I. Flyak**

- Expression der E2-Fab Komplexe in der Zelllinie Expi293F mit anschließender Aufreinigung über Ni-NTA Chromatographie
- Kristallisation und Kristallstrukturanalysen
- Verschriftlichung des Manuskriptes zur Publikation inklusive der Anfertigung von Abbildungen und Diagrammen

### **Florian Klein**

- Entwicklung von Forschungs idee und -konzept. Wissenschaftliche Fragestellungen
- Koordinative Beaufsichtigung des Forschungsprozesses

## 4.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Verlauf einer HCV-Infektion .....	20
Abbildung 2:	Das virale Genom und seine Proteine .....	24
Abbildung 3:	Schematische Darstellung eines HCV-Lipoviropartikels.....	26
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des viralen Zelleintritts .....	28
Abbildung 5:	V(D)J-Rekombination, somatische Hypermutation und Opsonierung. ....	32
Abbildung 6:	Neutralization face und Epitope .....	35
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der schweren Kette eines VH1-69- HCV bNAbs.....	94
Supplementary Figure 1:	Identification of HCV elite neutralizers, relating to Figure 1.....	83
Supplementary Figure 2:	Characteristics of HCV-specific B cells, relating to Figure 2. ...	84
Supplementary Figure 3:	Characteristics of isolated monoclonal antibodies, relating to Figure 3.....	86
Supplementary Figure 4:	Influence of somatic mutations on the function of HCVneutralizing antibodies, relating to Figure 6.....	87
Supplementary Figure 5:	An alternative method of determining average neutralization values, relating to Figures 1, 3, 6, and 7.....	89

## 4.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Extrahepatische Manifestationen einer HCV-Infektion. ....	21
Tabelle 2:	Darstellung verschiedener Ansätze von Impfstoffstudien .....	31
Tabelle 3:	Auswahl vorbeschriebener HCV-bNAbs .....	37

Supplementary Table 1:	PBMC donors for B cell analysis, related to Figure 2 .....	65
Supplementary Table 2:	B cell analysis summary, related to Figure 2 .....	66
Supplementary Table 3:	Isolated HCV antibodies, related to Figure 3 .....	80
Supplementary Table 4:	Data collection and refinement statistics for mAb1198 Fab-1b09 E2ecto and mAb1382 Fab-1b09 E2ecto complexes, related to Figures 4 and 5 .....	81
Supplementary Table 5:	Interface residues between Fabs and E2ecto proteins, related to Figures 4 and 5 .....	83

## 4.4 Literaturverzeichnis

- 1 Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, *et al.* Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *J Infect Dis* 2018; **218**: 1722–9.
- 2 Viruses IC on T of. A web resource to manage the classification and genotype and subtype assignments of hepatitis C virus. HCV Classification
- 3 Simmonds P, Bukh J, Combet C, *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; **42**: 962–73.
- 4 Kolykhalov AA, Agapov E V., Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science (80- )* 1997; **277**: 570–4.
- 5 Blach S, Zeuzem S, Manns M, *et al.* Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017; **2**: 161–76.
- 6 WHO. Global hepatitis report. 2017.
- 7 Alter MJ. Prevention of Spread of Hepatitis C. 2002. DOI:10.1053/jhep.2002.36389.
- 8 Ramadori G, Meier V. Hepatitis C virus infection: 10 years after the discovery of the virus. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; **13**: 465–71.
- 9 Thursz M, Fontanet A. HCV transmission in industrialized countries and resource-constrained areas. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; **11**: 28–35.
- 10 Organization WH. The 2016 global status report on blood safety and availability. Geneva PP - Geneva: World Health Organization <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254987>.
- 11 Benova L, Mohamoud YA, Calvert C, Abu-Raddad LJ. Vertical Transmission of Hepatitis C Virus: Systematic Review and Meta-analysis. 2014. DOI:10.1093/cid/ciu447.
- 12 Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, *et al.* Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. *Hepatology* 2013; **57**: 881–9.
- 13 Briat A, Dulioust E, Galimand J, *et al.* Hepatitis C virus in the semen of men coinfectd with HIV-1: prevalence and origin. *AIDS* 2005; **19**: 1827–35.
- 14 Hagan H, Jordan AE, Neurer J, Cleland CM. Incidence of sexually transmitted hepatitis C virus infection in HIV-positive men who have sex with men. *AIDS* 2015; **29**: 2335–45.
- 15 Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, *et al.* Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016–40 for 195 countries and territories. *Lancet* 2018; **392**: 2052–90.
- 16 Stanaway JD, Flaxman AD, Naghavi M, *et al.* The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet (London, England)* 2016; **388**: 1081–8.
- 17 World Health Organization. Accelerating access to hepatitis C diagnostics and treatment. Global

- progress report 2020. 2021.
- 18 Spearman CW, Dusheiko GM, Hellard M, Sonderup M. Hepatitis C. *Lancet* 2019; **394**: 1451–66.
  - 19 Kamal SM. Acute hepatitis C: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2008; **103**: 1283–97; quiz 1298.
  - 20 Micallef JM, Kaldor JM, Dore GJ. Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat* 2006; **13**: 34–41.
  - 21 Grebely J, Page K, Sacks-Davis R, *et al.* The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2014; **59**: 109–20.
  - 22 Bulteel N, Partha Sarathy P, Forrest E, *et al.* Factors associated with spontaneous clearance of chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2016; **65**: 266–72.
  - 23 Thomas DL, Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2005; **9**: 383–98, vi.
  - 24 Denniston MM, Klevens RM, McQuillan GM, Jiles RB. Awareness of infection, knowledge of hepatitis C, and medical follow-up among individuals testing positive for hepatitis C: National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2008. *Hepatology* 2012; **55**: 1652–61.
  - 25 Freeman A, Dore GJ, Law MG, *et al.* Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001; **34**: 809–16.
  - 26 Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Prim* 2021; **7**: 6.
  - 27 Ioannou GN, Beste LA, Green PK, *et al.* Increased Risk for Hepatocellular Carcinoma Persists Up to 10 Years After HCV Eradication in Patients With Baseline Cirrhosis or High FIB-4 Scores. *Gastroenterology* 2019; **157**: 1264-1278.e4.
  - 28 Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, *et al.* Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Second Leading Etiology of Liver Disease Among Adults Awaiting Liver Transplantation in the United States. *Gastroenterology* 2015; **148**: 547–55.
  - 29 Cacoub P, Saadoun D. Extrahepatic Manifestations of Chronic HCV Infection. *N Engl J Med* 2021; **384**: 1038–52.
  - 30 Younossi Z, Park H, Henry L, Adeyemi A, Stepanova M. Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C: A Meta-analysis of Prevalence, Quality of Life, and Economic Burden. *Gastroenterology* 2016; **150**: 1599–608.
  - 31 Pozzato G, Mazzaro C, Dal Maso L, *et al.* Hepatitis C virus and non-Hodgkin’s lymphomas: Meta-analysis of epidemiology data and therapy options. *World J Hepatol* 2016; **8**: 107–16.
  - 32 Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am* 2015; **44**: 717–34.
  - 33 Chevaliez S. Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2011; **17**: 116–21.

- 34 Daniel KE, Saeian K, Rizvi S. Real-world experiences with direct-acting antiviral agents for chronic hepatitis C treatment. *J Viral Hepat* 2020; **27**: 195–204.
- 35 Gonzales Zamora JA. Adverse Effects of Direct Acting Antivirals in HIV/HCV Coinfected Patients: A 4-Year Experience in Miami, Florida. *Dis (Basel, Switzerland)* 2018; **6**: 51.
- 36 Iyengar S, Tay-Teo K, Vogler S, *et al.* Prices, Costs, and Affordability of New Medicines for Hepatitis C in 30 Countries: An Economic Analysis. *PLoS Med* 2016; **13**: e1002032–e1002032.
- 37 Choo QL, Richman KH, Han JH, *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 2451–5.
- 38 Adams RL, Pirakitikulr N, Pyle AM. Functional RNA structures throughout the Hepatitis C Virus genome. *Curr Opin Virol* 2017; **24**: 79–86.
- 39 Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, André P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 2011; **19**: 95–103.
- 40 Gentzsch J, Brohm C, Steinmann E, *et al.* Hepatitis C Virus p7 is Critical for Capsid Assembly and Envelopment. *PLoS Pathog* 2013; **9**. DOI:10.1371/journal.ppat.1003355.
- 41 Wozniak AL, Griffin S, Rowlands D, *et al.* Intracellular Proton Conductance of the Hepatitis C Virus p7 Protein and Its Contribution to Infectious Virus Production. *PLOS Pathog* 2010; **6**: 1–17.
- 42 Tabata K, Neufeldt CJ, Bartenschlager R. Hepatitis C virus replication. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2020; **10**. DOI:10.1101/cshperspect.a037093.
- 43 Le Guillou-Guillemette H, Vallet S, Gaudy-Graffin C, *et al.* Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007; **13**: 2416–26.
- 44 Forns X, Purcell RH, Bukh J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends Microbiol* 1999; **7**: 402–10.
- 45 Di Lorenzo C, Angus AGN, Patel AH. Hepatitis C virus evasion mechanisms from neutralizing antibodies. *Viruses* 2011; **3**: 2280–300.
- 46 Sarrazin C. Treatment failure with DAA therapy: Importance of resistance. *J Hepatol* 2021; **74**: 1472–82.
- 47 Felmler DJ, Hafirassou ML, Lefevre M, Baumert TF, Schuster C. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. *Viruses* 2013; **5**: 1292–324.
- 48 Lavie M, Dubuisson J. Interplay between hepatitis C virus and lipid metabolism during virus entry and assembly. *Biochimie* 2017; **141**: 62–9.
- 49 Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Köchel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* 1992; **181**: 293–300.
- 50 André P, Komurian-Pradel F, Deforges S, *et al.* Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 2002; **76**: 6919–28.
- 51 Wrensch F, Crouchet E, Ligat G, *et al.* Hepatitis C Virus (HCV)–Apolipoprotein Interactions

- and Immune Evasion and Their Impact on HCV Vaccine Design. *Front Immunol* 2018; **9**: 1436.
- 52 Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; **282**: 938–41.
- 53 Fénéant L, Levy S, Cocquerel L. CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. *Viruses* 2014; **6**: 535–72.
- 54 Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, *et al.* Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 1992; **258**: 135–40.
- 55 Sacks-Davis R, group on behalf of the I study, Grebely J, *et al.* Hepatitis C Virus Reinfection and Spontaneous Clearance of Reinfection—the InC3 Study. *J Infect Dis* 2015; **212**: 1407–19.
- 56 Osburn WO, Snider AE, Wells BL, *et al.* Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses. *Hepatology* 2014; **59**: 2140–51.
- 57 Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, *et al.* HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003; **302**: 659–62.
- 58 Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, *et al.* Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999; **10**: 439–49.
- 59 Hernandez MD, Sherman KE. HIV/hepatitis C coinfection natural history and disease progression. *Curr Opin HIV AIDS* 2011; **6**: 478–82.
- 60 Law M. Antibody Responses in Hepatitis C Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2021; **11**. DOI:10.1101/cshperspect.a036962.
- 61 Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, *et al.* Analysis of a Successful Immune Response against Hepatitis C Virus. *Immunity* 1999; **10**: 439–49.
- 62 Semmo N, Lucas M, Krashias G, Lauer G. To the editor : Maintenance of HCV-specific T-cell responses in antibody-deficient patients a decade after early therapy To the editor : Complete regression of cutaneous lesions of refractory Ph  $\chi$ . ALL after 4 weeks of treatment. 2015; **107**: 4570–2.
- 63 Christie JM, Healey CJ, Watson J, *et al.* Clinical outcome of hypogammaglobulinaemic patients following outbreak of acute hepatitis C: 2 year follow up. *Clin Exp Immunol* 1997; **110**: 4–8.
- 64 Zibert A, Meisel H, Kraas W, Schulz A, Jung G, Roggendorf M. Early antibody response against hypervariable region 1 is associated with acute self-limiting infections of hepatitis C virus. *Hepatology* 1997; **25**: 1245–9.
- 65 U.S. National Library of Medicine at National Institutes of Health. Information on Clinical Trials and Human Research Studies. Abgerufen am 24.02.2024: Suchwörter ‘Hepatitis C’ und ‘Vaccine’.
- 66 Neumann-Haefelin C, Thimme R. Adaptive immune responses in hepatitis C virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; **369**: 243–62.
- 67 Page K, Melia MT, Veenhuis RT, *et al.* Randomized Trial of a Vaccine Regimen to Prevent Chronic HCV Infection. *N Engl J Med* 2021; **384**: 541–9.

- 68 Choo QL, Kuo G, Ralston R, *et al.* Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 1294–8.
- 69 Meunier J-C, Gottwein JM, Houghton M, *et al.* Vaccine-Induced Cross-Genotype Reactive Neutralizing Antibodies Against Hepatitis C Virus. *J Infect Dis* 2011; **204**: 1186–90.
- 70 Frey S, Vesikari T, Szymczakiewicz-Multanowska A, *et al.* Clinical efficacy of cell culture–derived and egg-derived inactivated subunit influenza vaccines in healthy adults. *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am* 2010; **51**: 997–1004.
- 71 Stamataki Z, Coates S, Abrignani S, Houghton M, McKeating JA. Immunization of human volunteers with hepatitis C virus envelope glycoproteins elicits antibodies that cross-neutralize heterologous virus strains. *J Infect Dis* 2011; **204**: 811–3.
- 72 Drane D, Maraskovsky E, Gibson R, *et al.* Priming of CD4+ and CD8+ T cell responses using a HCV core ISCOMATRIX vaccine: a phase I study in healthy volunteers. *Hum Vaccin* 2009; **5**: 151–7.
- 73 El-Awady MK, El Gendy M, Waked I, *et al.*: Immunogenicity and safety of HCV E1E2 peptide vaccine in chronically HCV-infected patients who did not respond to interferon based therapy. *Vaccine* 2013; published online Aug. DOI:10.1016/j.vaccine.2013.07.074.
- 74 Firbas C, Jilma B, Tauber E, *et al.* Immunogenicity and safety of a novel therapeutic hepatitis C virus (HCV) peptide vaccine: a randomized, placebo controlled trial for dose optimization in 128 healthy subjects. *Vaccine* 2006; **24**: 4343–53.
- 75 Klade CS, Wedemeyer H, Berg T, *et al.* Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with the peptide vaccine IC41. *Gastroenterology* 2008; **134**: 1385–95.
- 76 Schlaphoff V, Klade CS, Jilma B, *et al.* Functional and phenotypic characterization of peptide-vaccine-induced HCV-specific CD8+ T cells in healthy individuals and chronic hepatitis C patients. *Vaccine* 2007; **25**: 6793–806.
- 77 Klade CS, Schuller E, Boehm T, von Gabain A, Manns MP. Sustained viral load reduction in treatment-naïve HCV genotype 1 infected patients after therapeutic peptide vaccination. *Vaccine* 2012; **30**: 2943–50.
- 78 Folgori A, Capone S, Ruggeri L, *et al.* A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med* 2006; **12**: 190–7.
- 79 Barnes E, Folgori A, Capone S, *et al.* Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Sci Transl Med* 2012; **4**: 115ra1.
- 80 Habersetzer F, Honnet G, Bain C, *et al.* A poxvirus vaccine is safe, induces T-cell responses, and decreases viral load in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; **141**: 890–4.
- 81 Di Bisceglie AM, Janczewska–Kazek E, Habersetzer F, *et al.* Efficacy of Immunotherapy With TG4040, Peg-Interferon, and Ribavirin in a Phase 2 Study of Patients With Chronic HCV Infection. *Gastroenterology* 2014; **147**: 119-131.e3.
- 82 Kelly C, Swadling L, Capone S, *et al.* Chronic hepatitis C viral infection subverts vaccine-induced T-cell immunity in humans. *Hepatology* 2016; **63**: 1455–70.

- 83 Swadling L, Capone S, Antrobus RD, *et al.* A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory. *Sci Transl Med* 2014; **6**: 261ra153 LP-261ra153.
- 84 Forns X, Payette PJ, Ma X, *et al.* Vaccination of chimpanzees with plasmid DNA encoding the hepatitis C virus (HCV) envelope E2 protein modified the infection after challenge with homologous monoclonal HCV. *Hepatology* 2000; **32**: 618–25.
- 85 Alvarez-Lajonchere L, Shoukry NH, Grá B, *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**: 156–67.
- 86 Elmowalid GA, Qiao M, Jeong S-H, *et al.* Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 8427–32.
- 87 Baumert TF, Fauvelle C, Chen DY, Lauer GM. A prophylactic hepatitis C virus vaccine: A distant peak still worth climbing. *J Hepatol* 2014; **61**: S34–44.
- 88 Corti D, Lanzavecchia A. Broadly Neutralizing Antiviral Antibodies. *Annu Rev Immunol* 2013; **31**: 705–42.
- 89 Burton DR. Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 706–13.
- 90 Prentoe J, Janitzek CM, Velázquez-Moctezuma R, *et al.* Two-component vaccine consisting of virus-like particles displaying hepatitis C virus envelope protein 2 oligomers. *NPJ Vaccines*. 2022; **7**. DOI:10.1038/s41541-022-00570-1.
- 91 Kinchen VJ, Cox AL, Bailey JR. Can Broadly Neutralizing Monoclonal Antibodies Lead to a Hepatitis C Virus Vaccine? *Trends Microbiol* 2018; **26**: 854–64.
- 92 Crank MC, Ruckwardt TJ, Chen M, *et al.* A proof of concept for structure-based vaccine design targeting RSV in humans. *Science (80- )* 2019; **365**: 505–9.
- 93 Lohmann V, Bartenschlager R. On the history of hepatitis C virus cell culture systems. *J Med Chem* 2014; **57**: 1627–42.
- 94 Burm R, Collignon L, Mesalam AA, Meuleman P. Animal models to study hepatitis C virus infection. *Front Immunol* 2018; **9**. DOI:10.3389/fimmu.2018.01032.
- 95 Kinchen VJ, Cox AL, Bailey JR. Can Broadly Neutralizing Monoclonal Antibodies Lead to a Hepatitis C Virus Vaccine? *Trends Microbiol*. 2018; **26**: 854–64.
- 96 Ströh LJ, Krey T. HCV glycoprotein structure and implications for b-cell vaccine development. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; **21**: 1–20.
- 97 Deleersnyder V, Pillez A, Wychowski C, *et al.* Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol* 1997; **71**: 697–704.
- 98 Bartosch B, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 2006; **348**: 1–12.
- 99 Kong L, Giang E, Nieuwsma T, *et al.* Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science* 2013; **342**: 1090–4.

- 100 Torrents de la Peña A, Sliepen K, Eshun-Wilson L, *et al.* Structure of the hepatitis C virus E1E2 glycoprotein complex. *Science* 2022; **378**: 263–9.
- 101 Ströh LJ, Krey T. Structural insights into hepatitis C virus neutralization. *Curr Opin Virol* 2023; **60**: 101316.
- 102 Helle F, Vieyres G, Elkrief L, *et al.* Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J Virol* 2010; **84**: 11905–15.
- 103 Tzarum N, Wilson IA, Law M. The neutralizing face of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *Front Immunol* 2018; **9**: 1–8.
- 104 Prentoe J, Bukh J. Hypervariable Region 1 in Envelope Protein 2 of Hepatitis C Virus: A Linchpin in Neutralizing Antibody Evasion and Viral Entry. *Front Immunol* 2018; **9**: 2146.
- 105 Bankwitz D, Steinmann E, Bitzegeio J, *et al.* Hepatitis C Virus Hypervariable Region 1 Modulates Receptor Interactions, Conceals the CD81 Binding Site, and Protects Conserved Neutralizing Epitopes. *J Virol* 2010; **84**: 5751–63.
- 106 Prentoe J, Velázquez-Moctezuma R, Fong SKH, Law M, Bukh J. Hypervariable region 1 shielding of hepatitis C virus is a main contributor to genotypic differences in neutralization sensitivity. *Hepatology* 2016; **64**: 1881–92.
- 107 Kong L, Giang E, Nieusma T, *et al.* Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science (80- )* 2013; **342**: 1090–4.
- 108 Kumar A, Hossain RA, Yost SA, *et al.* Structural insights into hepatitis C virus receptor binding and entry. *Nature* 2021; **598**: 521–5.
- 109 Ströh LJ, Krey T. HCV Glycoprotein Structure and Implications for B-Cell Vaccine Development. *Int J Mol Sci* 2020; **21**. DOI:10.3390/ijms21186781.
- 110 Chen F, Tzarum N, Lin X, *et al.* Functional convergence of a germline-encoded neutralizing antibody response in rhesus macaques immunized with HCV envelope glycoproteins. *Immunity* 2021; **54**: 781-796.e4.
- 111 Flyak AI, Ruiz S, Colbert MD, *et al.* HCV Broadly Neutralizing Antibodies Use a CDRH3 Disulfide Motif to Recognize an E2 Glycoprotein Site that Can Be Targeted for Vaccine Design. *Cell Host Microbe* 2018; **24**: 703-716.e3.
- 112 Sliepen K, Radi L, Capella-pujol J, *et al.* Induction of cross-neutralizing antibodies by a permuted hepatitis C virus glycoprotein nanoparticle vaccine candidate. 2022. DOI:10.1038/s41467-022-34961-8.
- 113 Keck Z, Wang W, Wang Y, *et al.* Cooperativity in Virus Neutralization by Human Monoclonal Antibodies to Two Adjacent Regions Located at the Amino Terminus of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein. *J Virol* 2013; **87**: 37–51.
- 114 Broering TJ, Garrity KA, Boatright NK, *et al.* Identification and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies directed against the E2 envelope glycoprotein of hepatitis C virus. *J Virol* 2009; **83**: 12473–82.
- 115 Clayton RF, Owsianka A, Aitken J, Graham S, Bhella D, Patel AH. Analysis of Antigenicity and

- Topology of E2 Glycoprotein Present on Recombinant Hepatitis C Virus-Like Particles. *J Virol* 2002; **76**: 7672–82.
- 116 Bailey JR, Flyak AI, Cohen VJ, *et al.* Broadly neutralizing antibodies with few somatic mutations and hepatitis C virus clearance. *JCI insight* 2017; **2**: e92872.
- 117 Law M, Maruyama T, Lewis J, *et al.* Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 2008; **14**: 25–7.
- 118 Keck Z yong, Xia J, Wang Y, *et al.* Human monoclonal antibodies to a novel cluster of conformational epitopes on HCV E2 with resistance to neutralization escape in a genotype 2a isolate. *PLoS Pathog* 2012; **8**. DOI:10.1371/journal.ppat.1002653.
- 119 Law M, Kong L, Stanfield RL, *et al.* Structural basis of hepatitis C virus neutralization by broadly neutralizing antibody HCV1. *Proc Natl Acad Sci* 2012; **109**: 9499–504.
- 120 Law M, Maruyama T, Lewis J, *et al.* Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med* 2008; **14**: 25–7.
- 121 Giang E, Dorner M, Prentoe JC, *et al.* Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: 6205–10.
- 122 Pestka JM, Zeisel MB, Bläser E, *et al.* Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 6025–30.
- 123 Osburn WO, Fisher BE, Dowd KA, *et al.* Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology* 2010; **138**: 315–24.
- 124 Walker MR, Leung P, Eltahla AA, *et al.* Clearance of hepatitis C virus is associated with early and potent but narrowly-directed, Envelope-specific antibodies. *Sci Rep* 2019; **9**: 13300.
- 125 De Jong YP, Dorner M, Mommersteeg MC, *et al.* Broadly neutralizing antibodies abrogate established hepatitis C virus infection. *Sci Transl Med* 2014; **6**: 254ra129.
- 126 Merat SJ, Bru C, van de Berg D, *et al.* Cross-genotype AR3-specific neutralizing antibodies confer long-term protection in injecting drug users after HCV clearance. *J Hepatol* 2019; **71**: 14–24.
- 127 Colbert MD, Flyak AI, Ogega CO, *et al.* Broadly Neutralizing Antibodies Targeting New Sites of Vulnerability in Hepatitis C Virus E1E2. *J Virol* 2019; **93**: e02070-18.
- 128 Olbrich A, Wardemann H, Böhm S, *et al.* Repertoire and Neutralizing Activity of Antibodies Against Hepatitis C Virus E2 Peptide in Patients With Spontaneous Resolution of Hepatitis C. *J Infect Dis* 2019; **220**: 1209–18.
- 129 Gieselmann L, Kreer C, Ercanoglu MS, *et al.* Effective high-throughput isolation of fully human antibodies targeting infectious pathogens. *Nat Protoc* 2021; : 1–33.
- 130 Blach S, Alghamdi AS, Fahad K, *et al.* Global change in hepatitis C virus prevalence and cascade of care between 2015 and 2020: a modelling study. *lancet Gastroenterol Hepatol* 2022; **7**: 396–415.

- 131 Waked I, Esmat G, Elsharkawy A, *et al.* Special Report Screening and Treatment Program to Eliminate Hepatitis C in Egypt. *Nejm* 2020.
- 132 Rki RK. 28 Epidemiologisches 2021 Bulletin. 2021.
- 133 Robert Koch Institut. 31 Epidemiologisches 2023 Bulletin Welt-Hepatitis-Tag : Hepatitis B. 2023.
- 134 European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report for 2019. Stockholm. ECDC; 2021. 2021; : 1–8.
- 135 Centers for Disease Control and Prevention. 2019 Viral Hepatitis Surveillance Report. 2021. <https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/SurveillanceRpts.htm>.
- 136 Klein F, Mouquet H, Dosenovic P, Scheid JF, Scharf L, Nussenzweig MC. Antibodies in HIV-1 vaccine development and therapy. *Science (80- )* 2013; **341**: 1199–204.
- 137 Burton DR, Poignard P, Stanfield RL, Wilson IA. Broadly neutralizing antibodies present new prospects to counter highly antigenically diverse viruses. *Science (80- )* 2012; **337**: 183–6.
- 138 Ehrhardt SA, Zehner M, Krähling V, *et al.* Polyclonal and convergent antibody response to Ebola virus vaccine rVSV-ZEBOV. *Nat Med* 2019; **25**: 1589–600.
- 139 Kinchen VJ, Zahid MN, Flyak AI, *et al.* Broadly Neutralizing Antibody Mediated Clearance of Human Hepatitis C Virus Infection. *Cell Host Microbe* 2018; **24**: 717-730.e5.
- 140 Kreer C, Zehner M, Weber T, *et al.* Longitudinal Isolation of Potent Near-Germline SARS-CoV-2-Neutralizing Antibodies from COVID-19 Patients. *Cell* 2020; **182**: 843-854.e12.
- 141 Liu L, Wang P, Nair MS, *et al.* Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature* 2020; **584**: 450–6.
- 142 Pinto D, Park YJ, Beltramello M, *et al.* Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature* 2020; **583**: 290–5.
- 143 Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, *et al.* Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 2009; **458**: 636–40.
- 144 Schommers P, Gruell H, Abernathy ME, *et al.* Restriction of HIV-1 Escape by a Highly Broad and Potent Neutralizing Antibody. *Cell* 2020; **180**: 471-489.e22.
- 145 Suryadevara N, Shrihari S, Gilchuk P, *et al.* Neutralizing and protective human monoclonal antibodies recognizing the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 spike protein. *Cell* 2021; **184**: 2316-2331.e15.
- 146 Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, *et al.* Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 9294–9.
- 147 Wakita T, Pietschmann T, Kato T, *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; **11**: 791–6.
- 148 Underwood AP, Walker MR, Brasher NA, *et al.* Understanding the Determinants of BnAb Induction in Acute HCV Infection. *Viruses* 2018; **10**. DOI:10.3390/v10110659.

- 149 Gobran ST, Ancuta P, Shoukry NH. A Tale of Two Viruses: Immunological Insights Into HCV/HIV Coinfection. *Front Immunol* 2021; **12**: 726419.
- 150 Gobran ST, Ancuta P, Shoukry NH. A Tale of Two Viruses: Immunological Insights Into HCV/HIV Coinfection. *Front Immunol* 2021; **12**: 1–18.
- 151 Bankwitz D, Bahai A, Labuhn M, *et al.* Hepatitis C reference viruses highlight potent antibody responses and diverse viral functional interactions with neutralising antibodies. *Gut* 2021; **70**: 1734–45.
- 152 Chen F, Tzarum N, Wilson IA, Law M. V H 1-69 antiviral broadly neutralizing antibodies: genetics, structures, and relevance to rational vaccine design. *Curr. Opin. Virol.* 2019; **34**: 149–59.
- 153 Tzarum N, Giang E, Kong L, *et al.* Genetic and structural insights into broad neutralization of hepatitis C virus by human V H 1-69 antibodies. *Sci Adv* 2019; **5**. DOI:10.1126/sciadv.aav1882.
- 154 Chen F, Nagy K, Chavez D, *et al.* Antibody Responses to Immunization With HCV Envelope Glycoproteins as a Baseline for B-Cell–Based Vaccine Development. *Gastroenterology* 2020; **158**: 1058-1071.e6.
- 155 Escolano A, Steichen JM, Dosenovic P, *et al.* Sequential Immunization Elicits Broadly Neutralizing Anti-HIV-1 Antibodies in Ig Knockin Mice. *Cell* 2016; **166**: 1445-1458.e12.
- 156 Huang H, Sun F, Owen DM, *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.
- 157 Fauvelle C, Felmlee DJ, Crouchet E, *et al.* Apolipoprotein E Mediates Evasion From Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies. *Gastroenterology* 2016; **150**: 206-217.e4.
- 158 Kinchen VJ, Bailey JR. Defining Breadth of Hepatitis C Virus Neutralization. *Front Immunol* 2018; **9**: 1703.
- 159 El-Diwany R, Cohen VJ, Mankowski MC, *et al.* Extra-epitopic hepatitis C virus polymorphisms confer resistance to broadly neutralizing antibodies by modulating binding to scavenger receptor B1. *PLOS Pathog* 2017; **13**: e1006235.
- 160 Sok D, van Gils MJ, Pauthner M, *et al.* Recombinant HIV envelope trimer selects for quaternary-dependent antibodies targeting the trimer apex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**: 17624–9.
- 161 Mouquet H, Scharf L, Euler Z, *et al.* Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: E3268-77.
- 162 Shi X, Jarvis DL. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system. *Curr Drug Targets* 2007; **8**: 1116–25.
- 163 Walski T, De Schutter K, Van Damme EJM, Smaghe G. Diversity and functions of protein glycosylation in insects. *Insect Biochem Mol Biol* 2017; **83**: 21–34.
- 164 Li D, von Schaewen M, Wang X, *et al.* Altered Glycosylation Patterns Increase Immunogenicity of a Subunit Hepatitis C Virus Vaccine, Inducing Neutralizing Antibodies Which Confer Protection in Mice. *J Virol* 2016; **90**: 10486–98.

- 165 A. UR, Ruixue W, E. SJ, *et al.* Antigenicity and Immunogenicity of Differentially Glycosylated Hepatitis C Virus E2 Envelope Proteins Expressed in Mammalian and Insect Cells. *J Virol* 2021; **93**: e01403-18.
- 166 Priddy FH, Lewis DJM, Gelderblom HC, *et al.* Adeno-associated virus vectored immunoprophylaxis to prevent HIV in healthy adults: a phase 1 randomised controlled trial. *lancet HIV* 2019; **6**: e230–9.

## 4.5 Publikationen

Gieselmann, L., Kreer, C., Ercanoglu, M.S., Lehnen, N., Zehner, M., Schommers, P., **Potthoff, J.**, Gruell, H., and Klein, F. (2021). Effective high-throughput isolation of fully human antibodies targeting infectious pathogens. *Nat. Protoc.* 16, 3639–3671.

Weber T\*, **Potthoff J\***, Bizu S, Labuhn M, Dold L, Schoofs T, Horning M, Ercanoglu MS, Kreer C, Gieselmann L, Vanshylla K, Langhans B, Janicki H, Ströh LJ, Knops E, Nierhoff D, Spengler U, Kaiser R, Bjorkman PJ, Krey T, Bankwitz D, Pfeifer N, Pietschmann T, Flyak AI, Klein F. Analysis of antibodies from HCV elite neutralizers identifies genetic determinants of broad neutralization. *Immunity.* 2022 Feb 8;55(2):341-354.e7.

\*Gleichwertige Beiträge