



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
Programa de Biociencias Moleculares



**Aumento de la inmunogenicidad de una vacuna  
contra la hepatitis C (MVA-HCV) basada en el Virus  
Vaccinia Modificado de Ankara (MVA)**

María Quirós Marín

Madrid, 2019

Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Aumento de la inmunogenicidad de una vacuna  
contra la hepatitis C (MVA-HCV) basada en el Virus  
Vaccinia Modificado de Ankara (MVA)**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **María Quirós Marín**, licenciada  
en Biología, para optar al Grado de Doctora en Biología Molecular por la  
Universidad Autónoma de Madrid

Directores de Tesis:

**Mariano Esteban Rodríguez**

**Juan Francisco García Arriaza**

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

Madrid, 2019

*“Si puedes soñarlo, puedes hacerlo”*  
(Walt Disney)

*“If you get tired, learn to rest, not to quit”*  
(Banksy)

*“El futuro es de aquellos que creen en la belleza de sus sueños”*  
(Eleanor Roosevelt)

*A todas las mujeres.*

*Especialmente a mi madre.*

## Agradecimientos

Cinco años de trabajo resumidos en 59.880 palabras que han formado 2.824 párrafos y, cuando me dispongo a escribir los agradecimientos, me doy cuenta de que tengo tanto que agradecer y a tantas personas que no sé si soy capaz de hacerlo. Pero si algo me ha enseñado este trabajo es que puedo lograr cualquier cosa si me la propongo, y que el método científico ayuda a resolver problemas, por lo que, como buen trabajo de investigación, aquí queda aplicado:

**Observación:** Observo que nada de esto habría sido posible sin mis dos directores de tesis: Mariano Esteban y Juan García. Mariano, gracias por confiar en mí desde el momento en que me viste por primera vez en esa entrevista, cuando yo era casi un bebé, que me concediste para hacer el trabajo fin de máster. Me has acompañado en esta etapa de crecimiento personal y profesional, y me has guiado y dirigido con cariño hasta culminarla con esta tesis doctoral. Gracias por todo lo que me has enseñado y por abrirme las puertas hacia un futuro profesional que, sin duda, no existiría si no fuera por ti.

Juan, gracias por estos 1950 días de trabajo duro y codo con codo en los que me has enseñado el valor de la perseverancia. Gracias por tus siempre buenos ánimos, buenas palabras, y por tus grandes esfuerzos. De ti me llevo las mejores lecciones: me has enseñado que no hay nada que no pueda conseguir con esfuerzo y dedicación. Me has enseñado cómo investigar y cómo afrontar los desafíos, y siempre has dado la cara por mí. Gracias por no solo guiarme y dirigir mi tesis, sino por guiarme y ayudarme también en mis retos personales. Gracias por creer en mí.

**Planteamiento de preguntas:** Me pregunto qué habría hecho sin mis compañeros de laboratorio, que se han convertido en mi familia madrileña. Patri, mi hermanita, has sido mi punto de apoyo tantísimas veces. Este camino juntas me ha enseñado que las cosas del día a día, cuando se comparten con alguien como tú, siempre son más llevaderas. Siempre dispuesta a ayudarme, y a venir conmigo al fin del mundo (o a Sun Moon Lake, en su defecto) si hiciera falta. Gracias por tus consejos y cariño, eres una gran compañera de pasillo, de fatigas, de tesis, de proyectos y de viajes. Gracias por ser mi amiga.

Adri, mi otro hermanito, gracias por tu paciencia y tu calma. Gracias por tantos cafelillos y noches de Space Monkeys, o partidas de LoL. Gracias por las charlas en cultivos, por esperarme e ir al Cercanías conmigo, ¡siempre te dejas liar! Gracias por ser compañero y amigo.

Bea y Carmen, gracias por enseñarme de ciencia y de la vida, y por ser un referente para mí en ambas. Gracias por entenderme, por escucharme y por ayudarme siempre (dentro y fuera del laboratorio). Me habéis visto crecer, me habéis cuidado y me habéis enseñado mucho. Sé que soy afortunada de haber podido compartir con vosotras estos cinco años, y no sigo porque me pongo tontilla. De verdad, gracias por todo.

Cristina, demasiadas cosas que no puedo resumir. Gracias por todo tu apoyo, por nuestras largas charlas, por compartir conmigo tantas cosas que sé que no compartes con cualquiera. Gracias por confiar en mí, por ser mi amiga. Gracias por echarme una mano en tantas cosillas del día a día, ¡eran tantas que hasta me daba vergüenza pedirte! Te debo mucho.

Liliana, Ernesto y Suresh, gracias por enseñarme tantísimo, incluso cuando acudía a vosotros con las preguntas más extrañas, vosotros siempre teníais algún consejo para ayudarme. Se os echa de menos en el laboratorio, dejáis huella por donde pasáis. Chogui, gracias también por ayudarme siempre con las células, da gusto ver a alguien siempre cantando y feliz.

Gracias a Esteban Veiga, por confiar en mí y escucharme. Gracias a Raquel, a Jesús y a Arantxa, por ser tan buenos compañeros. Os deseo muchísimo éxito, vais a llegar lejos, lo sé. Gracias a Alba, ¡por ser tan buena patito!

**Generación de hipótesis:** Sin duda, la hipótesis es que, si no hubiera sido lo suficientemente afortunada de coincidir en tiempo y en espacio con ciertas personas, tanto dentro como fuera del CNB, mi vida desde que me vine a Madrid no habría sido tan bonita. Y con ciertas personas me refiero a mis amigos. En especial a Laura. Ella es increíble y yo tengo la suerte de haber podido vivir con ella para ver de primera mano cómo triunfa. Ella sí que es un regalo, alguien que te cambia a mejor, que nunca te deja sola, que suma. Una persona que cree en las cosas buenas, y en la gente buena, como ella. Que te mimas, te hace valiente, te ayuda. Alguien que te hace ver lo mejor de ti, y te lo demuestra. Pequeña, sin ti, nada habría sido posible. Vales más de lo que te imaginas. GRACIAS.

Gracias a mi Elenilla por regalarme tantos mejores momentos de la semana (desayunos), gracias por los viajes y tantos planes juntas. ¡Te queda poco, tú puedes!

Gracias a Jose del 114, por los cafés y los trayectos en bus, y esas largas charlas sobre la vida. Tengo muchas ganas de verte volar y hacer cosas grandes, tú ya me entiendes. Gracias a Iván del animalario, a Socorro, a Carol y Santa, a Eli, Liliana y Lolo, a Dani, y a todas las personas que han sumado en mi trayectoria en este centro, que son muchas.

No me olvido de todos aquellos que, fuera del CNB, también me han ayudado. Diva, gracias por tantas aventuras. Los mejores momentos de Madrid siempre eran contigo. Gracias por todos los días, por todas las noches, por tantos viajes. Ojalá estuvieras aquí conmigo, para seguir inventando y soñando juntas. Iván, mi mejicano preferido, no me olvido de ti y sueño con que algún día podamos volver al 2014, y quedarnos ahí para siempre. Gracias a los dos por quererme tanto, ¡yo a vosotros quiero más!

Anxo y Lucho, gracias por tantas noches, y por hacer que quedar con gente rara fuera tan divertido. Gracias a Iván, por hacerme la estancia tan agradable; eres un tesoro, no cambies nunca. Gracias a Raúl y a sus padres, vuestro amor y apoyo siempre ha significado mucho para mí.

Gracias también a las grandes mujeres que hicieron del 2017, el mejor año de mis años en Madrid. Gracias a mis Mujeres Líderes que tanto me han enseñado. Gracias por quererme y por todo vuestro cariño, sois mi ejemplo a seguir, sois grandes. En especial, gracias a Marta, por ponernos a todas juntas y por ayudarme tantísimo. Algún día, Marta, te lo devolveré, lo prometo.

Gracias a Rubén, por ser un pilar básico en mi vida. Soy afortunada de tenerte y, aunque sabes que no creo en el destino, sólo le pido que algún día nos ponga juntos en la misma ciudad, porque lo necesito, te necesito cerca.

**Conducir un experimento, obtener resultados y conclusiones:** Todo en la vida es un experimento, y esta tesis no podría ser menos. Cinco años de decisiones, resultados y conclusiones. Y mi conclusión final es que no habría podido hacer nada de esto si no hubiera sido por el apoyo incondicional de mi familia:

Firstly, I would to thank Dehan, for being the reason why I never give up. You taught me that anything is possible, and that there are no “Impossibles”. You are the best partner any could have and I am so grateful that I can keep learning from you and see how you grow up and succeed. I really admire you. Thanks to Jansie, Hannes, Hugo, Corne, and Sunantha, for your unconditional love and support, especially when things were difficult to understand or explain, you always believed in us.

Gracias tita Choni por creer en mí, por apoyarme en todo, por dar ese empujoncito que muchas veces me faltaba. Gracias por tus grandes consejos y tu ayuda. Eres una mujer excepcional y tengo mucha suerte de poder haber aprendido tantísimo de ti. Tu apoyo significa mucho, y ha sido clave durante esta tesis. Gracias a mi abuela, abu, bubu, bu. Gracias por cuidarme y quererme tantísimo, que hasta estando lejos sentía tu cariño. Y gracias a mis otros abuelos, sé que estáis orgullosos de mí, y también siento vuestro amor. Gracias a mis primas, Paula e Irene. Ire, gracias por acompañarme en tantas cosas, te debo muchos viajes. Paula, ¡estamos orgullosísimos de ti! Por supuesto, gracias a mi tito, por cuidarme y quererme como si fuera su hija. De verdad, sois la mejor familia que una puede desear. Esta tesis tiene parte de todos vosotros.

Gracias a mis dos hermanos, por aguantar a una hermana mayor como yo. Gracias por escucharme y entender mis problemas con las células, los experimentos, los ratones, o al menos por hacer como que lo entendáis. Nunca me ha faltado vuestro apoyo, sois unos hermanos increíbles. Gracias por quererme más de lo que merezco, ojalá algún día pueda ayudaros tanto como me habéis ayudado a mí. Os quiero muchísimo. Que el mundo se prepare, que vais vosotros. Y recordad: nunca dejéis de viajar.

Gracias a mi tita Nieves, la flor de mi familia. No hay palabras que describan cuánto te echamos de menos. Gracias por ser nuestra luz de guía.

Me dejo para lo último agradecer a la mujer de mi vida. Ella es un poco especial, porque ni siquiera la ciencia ni el método científico pueden definirla. Para ello, es más justo utilizar poesía. Ella es la mujer que todos necesitamos, y que yo tengo la suerte de tener. Una mujer luchadora, valiente y fuerte, con el poder de cambiar todo lo que toca y hacerlo mejor, más grande. Mujer que sobrevuela donde los demás pisamos, que te llena y abre tus ojos para enseñarte que el éxito en la vida, es estar enamorada de la misma. Mujer que nunca falla, y siempre arropa. Un corazón donde cabe más amor que el que nadie nunca puede recibir. Un alma que te acompaña, que te hace volar y llegar lejos. Un brillo que deslumbra. Un milagro de la vida. Quererte me hace dicha. Mamá, esta tesis es para ti.

## Resumen

El virus de la hepatitis C (HCV) es un virus hepatotrópico transmitido por la sangre que pertenece a la familia *Flaviviridae* y es el agente etiológico de la hepatitis C, la principal causa de cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Tras la infección, la mayoría (75%) de los individuos desarrollará una infección crónica, mientras que solo una minoría (25%) podrá eliminar el virus de forma espontánea. Los parámetros que correlacionan con protección aún no están bien definidos y, a pesar de la alta efectividad de los nuevos antivirales de acción directa, que pueden llegar a curar a más del 95% de las personas infectadas, la infección por el HCV sigue siendo un problema de salud pública importante y no existe una vacuna disponible.

Durante los últimos 30 años de investigación del HCV, varias aproximaciones vacunales contra el HCV se han desarrollado y probado en ensayos preclínicos y clínicos. Entre ellos, se ha descrito un candidato vacunal contra el HCV basado en la cepa altamente atenuada de vaccinia MVA (Virus Vaccinia Modificado de Ankara), llamado MVA-HCV, que generó respuestas amplias y polifuncionales de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV en ratones inmunizados. Sin embargo, se necesitan vacunas más eficientes y optimizadas frente al HCV.

En el presente trabajo se exploraron varias estrategias vacunales para mejorar la inmunogenicidad del candidato vacunal MVA-HCV. Por un lado, se generaron dos nuevos candidatos vacunales basados en MVA con el objetivo de mejorar la respuesta del interferón (IFN) tipo I inducida por MVA-HCV. El primero, MVA-HCV  $\Delta$ C6L, contiene una delección del gen C6L del virus vaccinia, que es un inhibidor de IFN tipo I. El segundo, MVA-HCVmut, contiene una mutación puntual de aminoácido en la proteína NS3, que elimina su actividad inmunosupresora de IFN. Ambos candidatos vacunales se generaron con éxito y fueron inmunogénicos en ratones inmunizados, aunque ninguno de ellos mejoró significativamente las respuestas inmunitarias contra el HCV, en comparación con MVA-HCV.

Además, se generaron cuatro nuevos candidatos vacunales basados en replicones de ADN llamados DREP y dos nuevos candidatos vacunales basados en proteínas E2 recombinantes, que se caracterizaron *in vitro* e *in vivo* en combinación con MVA-HCV. Con el régimen DREP/MVA, se obtuvieron respuestas inmunes celulares específicas frente al HCV potentes, amplias, polifuncionales y duraderas, mientras que con el régimen E2/E2 se obtuvieron niveles altos de anticuerpos contra la proteína E2 del HCV en ratones inmunizados. Con el régimen MVA/E2 se consiguió un balance de ambas respuestas. Estos hallazgos revelan que la combinación de nuevas vacunas basadas en DREP y proteína E2 con MVA-HCV son formas efectivas de potenciar las respuestas inmunes humoral y celular frente al HCV, estableciendo estrategias vacunales prometedoras contra la hepatitis C.



## Abstract

Hepatitis C virus (HCV) is a blood-borne hepatotropic virus that belongs to the family *Flaviviridae* and is the etiological agent of hepatitis C, the major cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Upon infection, the majority (75%) of individuals will develop chronic infection while only a minority (25%) will be able to spontaneously clear the virus. The correlates of protection are still not well defined, and despite the high efficacy of the newly approved direct-acting antivirals, which can cure more than 95% of people, HCV infection still remains a major public health and there is no a vaccine available.

During the last 30 years of HCV research, several approaches of vaccines against HCV have been developed and tested in preclinical and clinical trials. Among them, it has been described a HCV vaccine candidate based on the highly attenuated vaccinia virus strain MVA (Modified Vaccinia Virus Ankara), termed MVA-HCV, which elicited broad and polyfunctional HCV-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses, in immunized mice. However, more efficient and optimized vaccines against HCV are needed.

In this work, several vaccine strategies were explored to enhance the immunogenicity of the MVA-HCV vaccine candidate. On the one hand, two new MVA-based vaccines candidates were generated with the aim of improving the type I interferon (IFN) response elicited by MVA-HCV. The first one, MVA-HCV  $\Delta$ C6L, contains a deletion of the vaccinia virus *C6L* gene, which is a type I IFN inhibitor. The second one, MVA-HCVmut, contains a point aminoacid mutation in NS3 protein that abolishes its immunosuppressive IFN activity. Both vaccine candidates were successfully generated and were immunogenic in immunized mice, although none of them significantly improved the immune responses against HCV, in comparison to MVA-HCV.

In addition, four novel DREP-based replicon vaccine candidates and two novel E2 protein-based vaccine candidates were generated and characterized *in vitro* and *in vivo* in combination with MVA-HCV. With DREP/MVA regimen, potent, broad, polyfunctional and durable HCV-specific T cellular immune responses were elicited, while high levels of antibodies against HCV E2 protein were obtained with E2/E2 vaccination in immunized mice. The MVA/E2 regimen induced a balance of both responses. These findings reveal that the combination of novel DREP-based HCV and E2 protein vaccines with MVA-HCV are effective ways to potentiate the HCV-specific T cellular and humoral immune responses against HCV, establishing promising vaccine strategies against hepatitis C.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS</b> .....	21
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	27
<b>1.1. Hepatitis C</b> .....	29
1.1.1. Enfermedad.....	29
1.1.2. Virus de la hepatitis C.....	30
1.1.3. Tratamiento antiviral.....	33
1.1.4. Vacunas .....	35
<b>1.2. Poxvirus</b> .....	41
1.2.1. Características genómicas del VACV .....	41
1.2.2. Estructura, morfología y ciclo infectivo.....	41
1.2.3. Virus Vaccinia Modificado de Ankara (MVA) .....	44
<b>1.3. Estrategias para aumentar la inmunogenicidad de candidatos vacunales basados en el MVA</b> .....	47
1.3.1. Optimización del vector MVA .....	47
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	51
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	55
<b>3.1. Materiales</b> .....	57
3.1.1. Células .....	57
3.1.2. Medios de cultivo .....	57
3.1.3. Bacterias.....	58
3.1.4. Virus.....	58
3.1.5. Plásmidos .....	58
3.1.6. Ratones.....	64
<b>3.2. Reactivos</b> .....	64
3.2.1. Oligonucleótidos .....	64
3.2.2. Péptidos y proteínas comerciales .....	66
3.2.3. Anticuerpos .....	66
3.2.4. Tampones.....	69
<b>3.3. Métodos</b> .....	69
3.3.1. Técnicas de manipulación de ADN .....	69
3.3.2. Técnicas de manipulación de proteínas.....	72
3.3.3. Técnicas de manipulación de virus.....	75

3.3.4. Técnicas inmunológicas <i>in vitro</i> .....	79
3.3.5. Técnicas inmunológicas <i>in vivo</i> .....	81
3.3.6. Análisis estadístico .....	84
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>87</b>
<b>4.1. Diseño, generación y caracterización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de un candidato vacunal MVA-HCV que contenga la delección del gen C6L del MVA (MVA-HCV <math>\Delta</math>C6L).....</b>	<b>89</b>
4.1.1. Generación del virus recombinante de delección MVA-HCV $\Delta$ C6L .....	89
4.1.2. El gen C6L del MVA no es esencial para el crecimiento de MVA-HCV .....	91
4.1.3. MVA-HCV y MVA-HCV $\Delta$ C6L disminuyen la expresión de genes involucrados en la inmunidad innata .....	91
4.1.4. Un análisis de <i>microarrays</i> revela que MVA-HCV y MVA-HCV $\Delta$ C6L producen una severa reducción en la expresión de diferentes genes celulares.....	92
4.1.5. MVA-HCV y MVA-HCV $\Delta$ C6L producen un reclutamiento celular diferente a MVA-WT en la cavidad peritoneal de ratones infectados .....	94
4.1.6. MVA-HCV y MVA-HCV $\Delta$ C6L inducen una respuesta inmune celular adaptativa específica frente al HCV .....	95
4.1.7. MVA-HCV y MVA-HCV $\Delta$ C6L inducen niveles similares de anticuerpos frente a la proteína E2 del HCV .....	98
4.1.8. MVA-HCV y MVA-HCV $\Delta$ C6L inducen una respuesta inmune celular de memoria específica frente al HCV .....	98
4.1.9. MVA-HCV y MVA-HCV $\Delta$ C6L inducen niveles similares de células T CD8 <sup>+</sup> con fenotipo efector de memoria específicas frente al HCV.....	100
<b>4.2. Diseño, generación y caracterización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de un candidato vacunal MVA-HCV que contenga una mutación en la proteína NS3 del HCV (MVA-HCVmut) .....</b>	<b>101</b>
4.2.1. La mutación puntual S139A en NS3 es suficiente para revertir la inhibición de IFN- $\beta$ en células transfectadas.....	101
4.2.2. Generación del virus recombinante MVA-HCVmut .....	103
4.2.3. La mutación S139A en NS3, presente en MVA-HCVmut, no afecta al crecimiento de MVA-HCV.....	105
4.2.4. MVA-HCVmut incrementa los niveles de expresión de IFN- $\beta$ en macrófagos infectados, en comparación con MVA-HCV .....	105
4.2.5. MVA-HCV y MVA-HCVmut inducen una similar respuesta inmune celular adaptativa específica frente al HCV .....	106
4.2.6. MVA-HCV y MVA-HCVmut inducen niveles similares de anticuerpos frente a la proteína E2 del HCV .....	109
4.2.7. MVA-HCV y MVA-HCVmut inducen semejantes respuestas inmunes celulares de memoria específicas frente al HCV .....	109
4.2.8. MVA-HCV y MVA-HCVmut inducen células T CD8 <sup>+</sup> con fenotipo efector de memoria específicas frente al HCV.....	111

4.3. Diseño, generación y caracterización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de nuevos candidatos vacunales basados en replicones DREP (DREP-HCV y DREP-e-HCV) para combinar en protocolos prime/boost con MVA-HCV .....	112
4.3.1. Generación de nuevas vacunas frente al HCV basadas en vectores DREP que expresan antígenos del HCV .....	112
4.3.2. Inducción <i>in vitro</i> por parte de los vectores DREP de proteínas relacionadas con apoptosis .....	114
4.3.3. La inmunización con DREP-HCV y DREP-e-HCV seguida de MVA-HCV induce una respuesta inmune celular adaptativa específica frente al HCV potente, amplia y polifuncional.....	115
4.3.4. La inmunización combinada con DREP-HCV ó DREP-e-HCV seguida de MVA-HCV induce mayores niveles de anticuerpos frente a la proteína E2 del HCV que MVA-HCV/MVA-HCV .....	119
4.3.5. La inmunización con DREP-HCV y DREP-e-HCV seguida de MVA-HCV induce una respuesta inmune celular de memoria específica frente al HCV potente, amplia y polifuncional.....	120
4.3.6. La inmunización en ratones con DREP-HCV y DREP-e-HCV seguida de MVA-HCV indujo altos niveles de células T CD4 <sup>+</sup> y T CD8 <sup>+</sup> con fenotipo efector de memoria específicas frente al HCV .....	122
4.4. Diseño, generación y caracterización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de nuevos candidatos vacunales de naturaleza proteica (E2 ΔMPER y E2 CL ΔMPER) para combinar en protocolos prime/boost con MVA-HCV .....	125
4.4.1. Diseño de diferentes proteínas recombinantes E2 del HCV .....	125
4.4.2. Las proteínas recombinantes E2 se secretan al medio y aquellas con un menor número de cisteínas forman agregados de bajo peso molecular en geles nativos .....	126
4.4.3. Las proteínas recombinantes E2 secretadas son reconocidas por el anticuerpo neutralizante de amplio espectro AT12-009.....	127
4.4.4. Las proteínas E2 ΔMPER y E2 CL ΔMPER se purifican diferencialmente por columna, obteniéndose rendimientos satisfactorios .....	128
4.4.5. Las distintas fracciones obtenidas contienen proteínas E2 de distinto peso molecular .....	129
4.4.6. La técnica de dispersión dinámica de luz confirma los resultados de cromatografía de exclusión por tamaño.....	131
4.4.7. Las fracciones 10+11 de E2 ΔMPER y 44+45 de E2 CL ΔMPER contienen proteínas E2 reconocidas por anticuerpos neutralizantes de amplio espectro y por el receptor del HCV CD81 .....	132
4.4.8. La inmunización con las diferentes proteínas E2 recombinantes induce una respuesta inmune celular adaptativa específica frente al HCV .....	133
4.4.9. E2 ΔMPER induce niveles superiores de anticuerpos frente a la proteína E2 del HCV que E2 CL ΔMPER en fase adaptativa.....	138
4.4.10. E2 ΔMPER induce anticuerpos con reactividad cruzada frente a otros genotipos del HCV .....	140

4.4.11. La inmunización con las diferentes proteínas E2 recombinantes induce una respuesta inmune celular de memoria específica frente al HCV .....	141
4.4.12. E2 ΔMPER induce niveles superiores de anticuerpos frente a la proteína E2 del HCV que E2 CL ΔMPER en fase de memoria .....	144
4.4.13. La inmunización con las diferentes proteínas E2 recombinantes induce células T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> con fenotipo efector de memoria específicas frente al HCV .....	145
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	147
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	165
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	169
<b>8. ANEXOS</b> .....	195

# ABREVIATURAS

# ABREVIATURAS

µg – Microgramo

µl – Microlitro

## A

a.C – Antes de Cristo

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ADNc – ADN complementario

ANOVA – Análisis de la varianza

APC – Aloficocianina

APC-Cy7 – Aloficocianina-cianina 7

ARN – Ácido ribonucleico

ARNm – ARN mensajero

## B

BFA – Brefeldina A

## C

CEF – Fibroblastos embrionarios de pollo

Célula NK – Célula *Natural Killer*

Célula NKT – Célula *Natural Killer T*

Célula TCM – Célula T de memoria central

Célula TE – Célula T efectora

Célula TEM – Célula T de memoria efectora

CEV – Virión envuelto asociado a la célula

CL – Bajo número de cisteínas

CMV – Citomegalovirus

CNB – Centro Nacional de Biotecnología

## D

DAB – 3,3' tetrahidrocloruro de diaminobencidina

DC – Célula dendrítica

DF-1 – Fibroblastos inmortalizados de pollo

DLS – Dispersión dinámica de luz

DMEM – Medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco

Dr/a. – Doctor/a

DsRed2 – Proteína roja fluorescente, *Discosoma*

DREP – Plásmido de ADN autoreplicativo o replicón

DTT – Ditioneitol

## E

E2A – Péptido autocatalítico 2A del virus de la rinitis equina A

ELISA – Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EV – Virión envuelto

## F

F2A – Péptido autocatalítico 2A del virus de la fiebre aftosa

FCS – Suero fetal de ternera  
FDR – Tasa de falsos descubrimientos  
FITC – Isotiocianato de fluoresceína  
FPLC – Cromatografía líquida de la proteína rápida

## G

GFP – Proteína verde fluorescente, *Aequorea victoria*  
GM-CSF – Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos  
GNL – Lectina de *Galanthus Nivalis*

## H

HAV – Virus de la hepatitis A  
HBV – Virus de la hepatitis B  
HCV – Virus de la hepatitis C  
HEK-293 – Células embrionarias humanas de riñón inmortalizadas  
HIST – Histona  
HIV – Virus de la inmunodeficiencia humana  
HLA – Sistema del antígeno leucocitario humano  
hpi – Horas post-infección  
HPRT – Hipoxantina fosforribosiltransferasa  
HRP – Peroxidasa de rábano picante  
HVR – Región altamente variable

## I

i.m. – Intramuscular  
i.p. – Intraperitoneal  
ICS – Marcaje intracelular de citoquinas  
IEV – Virión envuelto intracelular  
IFIT1 – Gen inducido por interferón con repeticiones tetratricopéptido 1  
IFIT2 – Gen inducido por interferón con repeticiones tetratricopéptido 2  
IFIT3 – Gen inducido por interferón con repeticiones tetratricopéptido 3  
IFN – Interferón  
IFN- $\alpha$  – Interferón alfa  
IFN- $\beta$  – Interferón beta  
IFN- $\gamma$  – Interferón gamma  
IgG – Inmunoglobulina G  
IgG1 – Inmunoglobulina G subtipo 1  
IgG2c – Inmunoglobulina G subtipo 2c  
IgG3 – Inmunoglobulina G subtipo 3  
IL – Interleuquina

## J

Jak-STAT – Proteínas Janus quinasas-transductores de la señal y activadores de la transcripción

## K

kDa – KiloDalton  
kpb – Kilo pares de bases



## L

L – Izquierda  
l – Litro  
LacZ – Gen codificante de la  $\beta$ -galactosidasa  
LB – Medio Luria-Bertani

## M

MAVS – Proteína de señalización antiviral mitocondrial  
MDI – Multiplicidad de infección  
mg – Miligramo  
MHC – Complejo mayor de histocompatibilidad  
min – Minuto  
ml – Mililitro  
mM – Milimolar  
moDCs – Células dendríticas derivadas de monocitos  
MOPS – Ácido 3-morfolino-4-il-propano-1-sulfónico  
MPER – Región externa próxima a la membrana  
MV – Virión maduro  
MVA – Virus Vaccinia Modificado de Ankara

## N

N.C. – No codificante  
ng – Nanogramo  
nm – Nanómetro

## O

OASL – 2'-5'-Oligoadenilato sintetasa  
OMS – Organización Mundial de la Salud

## P

P1 – Stock de virus recombinante inicial  
P2 – Stock de virus recombinante de trabajo  
P2A – Péptido autocatalítico 2A del virus Teschovirus porcino-1  
P3 – Stock de virus recombinante purificado  
pb – Par de bases  
PBMCs – Células mononucleares de sangre periférica  
PBS – Tampón fosfato salino  
PCR – Reacción en cadena de la polimerasa  
PE – Ficoeritrina  
pE/L – Promotor viral sintético temprano/tardío  
PE-Cy7 – Ficoeritrina-cianina 7  
PMA – Forbol-12-miristato-13-acetato  
PMAIP1 – Proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetato  
PRR – Receptores de reconocimiento de patrones celulares

## R

R – Derecha  
RE – Retículo Endoplasmático  
rpm – Revoluciones por minuto

RPMI – Medio Roswell Park Memorial Institute  
RT – Transcriptasa reversa  
RT-PCR – Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

## S

SDS – Dodecil sulfato sódico  
SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico  
SEC – Cromatografía por exclusión de tamaño  
seg – Segundo  
SFV – Virus del bosque Semliki  
STING – Proteína estimuladora de genes de interferón  
SP – Promotor subgenómico

## T

T2A – Péptido autocatalítico 2A del virus *Thosea asigna*  
TB – Medio *Terrific Broth*  
TBK1 – Proteín quinasa serina/treonina 1  
TBS – Tampon salino de Tris base  
TFEB – Factor de transcripción EB  
THP-1 – Células monocíticas humanas procedentes de un paciente con leucemia monocítica  
TK – Timidina quinasa  
TK-L – Flanco izquierdo del gen TK  
TK-R – Flanco derecho del gen TK  
TMD – Dominio transmembrana  
TNF – Factor de necrosis tumoral  
TNF- $\alpha$  – Factor de necrosis tumoral alfa  
TRIF – Dominio TIR que contiene un adaptador inducible por IFN

## U

U.A. – Unidades arbitrarias  
UFP – Unidad formadora de placa  
URL – Unidad relativa de luz

## V

V – Voltios  
VACV – Virus Vaccinia

## W

WB – Western Blot  
WR – Cepa de virus vaccinia *Western Reserve*  
WT – Cepa salvaje

## X

X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## Z

ZC3HAVI – Proteína antiviral de dedos de Cinc

# 1. INTRODUCCIÓN

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Hepatitis C

Desde el siglo VIII a.C. y a lo largo de la historia el ser humano se ha referido en miles de ocasiones a una enfermedad que produce ictericia en humanos, pero los agentes causantes de la misma se desconocían. Finalmente, en el año 1963 se descubrió el virus de la hepatitis B (HBV), y en 1973 el virus de la hepatitis A (HAV) y, desde entonces, los científicos pudieron detectar ambos virus y diagnosticar las hepatitis causadas por ellos [1]. Sin embargo, en 1974 Prince y colaboradores, del Centro de Sangre de Nueva York, describieron la presencia de otro agente infeccioso que causaba hepatitis muchos años después de una transfusión sanguínea y que no era ni el HAV ni el HBV y que era el agente causante de la mayoría de las hepatitis post-transfusión (71% de los casos) [2]. Poco después, Feinstone y colaboradores describieron un agente infeccioso similar [3], que desde entonces empezó a llamarse “virus de la hepatitis no A-no B” [4–8]. Entre 1978 y 1984 se desarrollaron unos 30 análisis diferentes para detectar el agente causante de las hepatitis no A-no B, pero ninguno era suficientemente sensible, específico ni reproducible [8]. Finalmente, en 1989 el grupo del Dr. Michael Houghton, en Canadá, identificó mediante clonaje molecular el virus de la hepatitis C (HCV; del inglés *Hepatitis C virus*) como el agente causal de dicha enfermedad [9].

### 1.1.1. Enfermedad

La hepatitis C es la enfermedad causada por el HCV, un virus que infecta exclusivamente a humanos y chimpancés. En 2015 más de 71 millones de personas en el mundo vivían con hepatitis C crónica, con 400.000 muertes anuales debidas a enfermedades relacionadas con la infección por el HCV [10]. El HCV es el principal causante de cirrosis hepática y hepatocarcinoma, las causas más frecuentes de trasplante hepático en América, Europa y Japón [11]. La transmisión del HCV es por contacto directo con sangre contaminada, aunque también se ha descrito que en menor medida puede haber contagio de madre a hijo y por relaciones sexuales sin protección [12–14]. Antes de conocerse el agente etiológico de la enfermedad, el virus se dispersaba a una gran velocidad entre la población debido a la reutilización de agujas mal esterilizadas y a las transfusiones sanguíneas que se realizaban sin chequear la presencia del virus. Cuando estos controles se establecieron a principios de los años 90 y las condiciones higiénicas en hospitales mejoraron, se pudo reducir considerablemente el número de nuevas infecciones diarias. Sin embargo, actualmente, la enfermedad es un problema de salud global que es particularmente prevalente en países en vías de desarrollo debido a la falta de recursos y

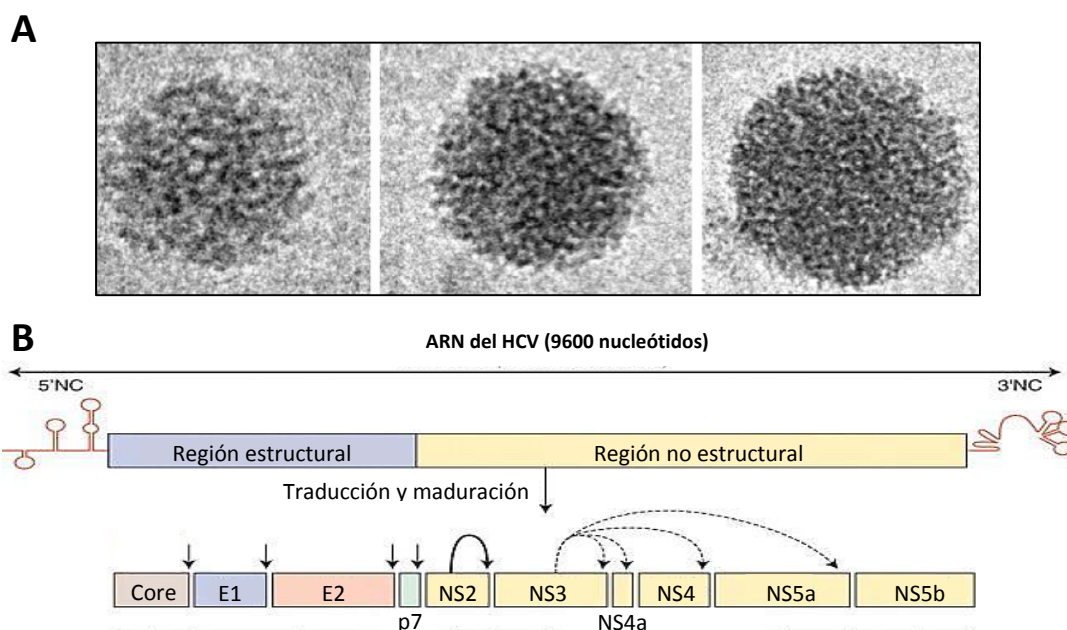
en países desarrollados entre la población de consumidores de drogas de administración intravenosa, los cuales están aumentando en número durante los últimos años [15].

Tras la infección por el HCV, la enfermedad puede cursar de 2 formas distintas dependiendo del fondo genético, la raza y el sexo [16–18]. Por un lado, en el 20-30% de los casos el paciente resuelve la infección espontáneamente, normalmente durante los primeros 6 meses de infección, periodo durante el cual se padecen síntomas de enfermedad leves e inespecíficos. Por otro lado, en alrededor del 70% de los casos, tras esta fase aguda de infección, el virus finalmente vence al sistema inmune y la enfermedad progresa hacia un estadio crónico. El diagnóstico de esta etapa se basa en la presencia del virus en sangre durante más de 6 meses [19]. El resultado de esta etapa crónica es altamente variable, ya que puede englobar desde una ausencia total de enfermedad hepática hasta una severa inflamación en el hígado que en algunos casos derivará a cirrosis hepática y hepatocarcinoma [20,21]. La gravedad de esta etapa crónica es muy variable entre individuos y normalmente tarda décadas en manifestarse. Algunos factores que aumentan la gravedad de la enfermedad son la coinfección del HCV con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), la obesidad, el alcoholismo y la enfermedad renal o la fibrosis hepática [22], mientras que algunos factores asociados con la resolución espontánea de la enfermedad son la raza (en blancos es más probable que en negros) [23], la edad (jóvenes) [24], el género (mujeres sobre hombres) [25], los polimorfismos de interleuquina 28B (IL-28B) [26–29], los niveles de IL-12 [30,31] y algunos alelos del sistema del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I y II [32,33].

### **1.1.2. Virus de la hepatitis C**

El HCV es un virus envuelto de entre 40 y 60 nm de diámetro que pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Hepacivirus* (**Figura 1A**). Su genoma de 9600 nucleótidos está en forma de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, y se compone de 2 regiones no codificantes en los extremos 5' y 3', implicadas en la replicación y traducción del virus, y una gran región codificante central que da lugar a una poliproteína de 3000 aminoácidos. Esta poliproteína es traducida y posteriormente procesada por proteasas celulares y virales. Comenzando desde el extremo N-terminal, las proteasas celulares procesan la poliproteína viral liberando las proteínas Core, E1, E2 y p7. A continuación, se libera la proteína NS2 que es una autoproteasa y finalmente la proteína NS3 junto a su cofactor NS4a terminan de procesar la poliproteína generando las proteínas NS4b, NS5a y NS5b [22,34] (**Figura 1B**). La superficie del virus está constituida por una envoltura lipídica donde se encuentran las glicoproteínas E1 y E2, que están encargadas de los primeros pasos del ciclo infectivo del HCV. Debajo de la bicapa lipídica se encuentra la nucleocápsida viral formada por la proteína Core, y dentro de ésta se localiza el

genoma del virus. Las funciones más destacadas de las diferentes proteínas estructurales (Core, E1, E2 y p7) y no estructurales (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b) del HCV se indican en la **Tabla 1**.



**Figura 1. Virus de la hepatitis C. (A)** Criomicroscopía electrónica del HCV. Imágenes de partículas virales del HCV a un aumento de 78,000X y representativas de 3 tamaños (50–60, 61–70 y >71 nm). Obtenidas por Catanese y colaboradores [35]. **(B)** Esquema del genoma del HCV y del procesamiento de la poliproteína viral. Se indica el genoma de ARN del HCV, así como el procesamiento de la poliproteína en las diferentes proteínas estructurales y no estructurales maduras. Las flechas rectas presentes entre las proteínas Core, E1, E2, p7 y NS2 indican el corte por proteasas celulares. Las flechas curvas indican los cortes realizados por NS2 (flecha continua) y NS3 (flechas discontinuas). NC: No codificante. Adaptado de [36].

Proteína	Funciones más destacadas
<b>Core</b>	Unión al ARN y formación de la nucleocápsida viral.
<b>E1</b>	Glicoproteína, chaperona de E2.
<b>E2</b>	Glicoproteína, unión a receptores celulares, se asocia con E1. Principal diana de anticuerpos.
<b>p7</b>	Canal iónico, viroporina involucrada en la formación del virus.
<b>NS2</b>	Autoproteasa, componente de la proteasa NS2-NS3.
<b>NS3</b>	Dominio N-terminal con actividad proteasa. Dominio C-terminal NTPasa y helicasa. Potente inhibidor de la respuesta de interferón (IFN).
<b>NS4a</b>	Cofactor de NS3.
<b>NS4b</b>	Forma estructuras de membrana.
<b>NS5a</b>	Fosfoproteína. Proteína de unión al ARN.
<b>NS5b</b>	ARN polimerasa dependiente de ARN.

**Tabla 1. Proteínas del HCV y sus funciones más importantes.** Adaptado de [12,22,37].

El ciclo de replicación del virus ocurre principalmente en el citoplasma de las células hepáticas, y el ensamblaje y la liberación de las partículas virales se llevan a cabo a través de los

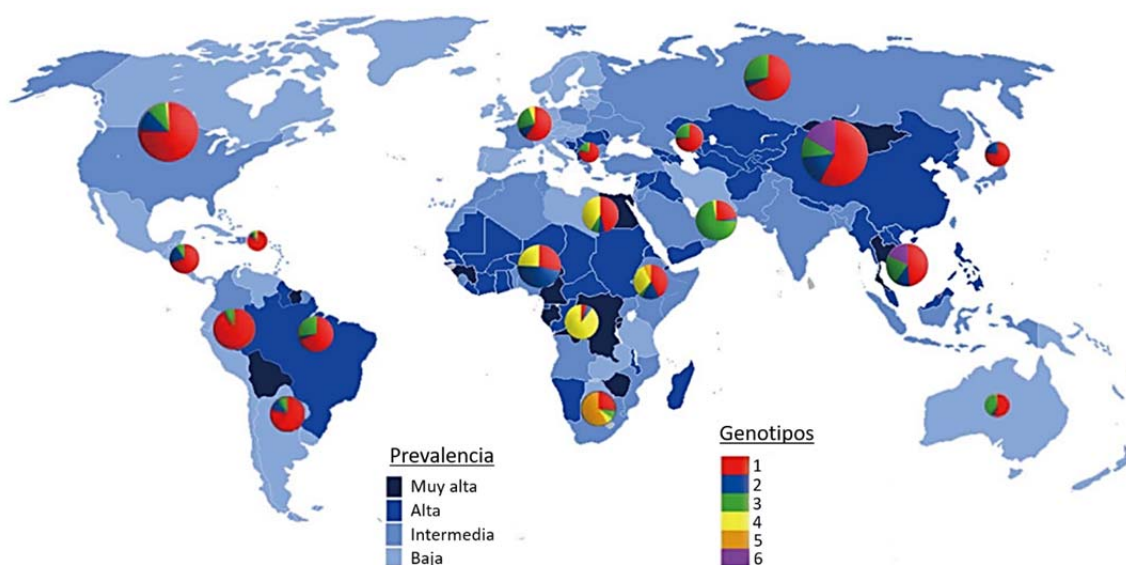
mecanismos secretores de lipoproteínas [4,38]. También se ha descrito la presencia del HCV en otras células, como células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), células dendríticas (DCs) o células del sistema nervioso central [39–42]. El virus utiliza diferentes receptores celulares para entrar en la célula, entre ellos el CD81, el receptor secuestrador de clase B y tipo I, las claudinas de tipo I y las ocludinas [43,44]. En sangre, el HCV se asocia a lipoproteínas de baja y muy baja densidad adoptando formas lipovirales cuyos receptores respectivos también se encuentran en los hepatocitos [45,46].

A diferencia del HIV, el HCV no se integra en el genoma humano, y a diferencia del HBV, el HCV no forma minicromosomas virales que establezcan una infección persistente [47]. Sin embargo, el HCV es bastante eficiente estableciendo una infección crónica, evadiendo de una manera muy efectiva al sistema inmune [48,49].

El HCV es capaz de causar enfermedad crónica en aproximadamente el 70% de los casos sin que el sistema inmune pueda contrarrestarlo [4]. Además, su replicación es llevada a cabo por una ARN polimerasa dependiente de ARN (proteína NS5b) que carece de actividad correctora de errores de lectura, y que genera en promedio 1 mutación por cada ciclo de replicación, lo que la convierte en una de las ARN polimerasas virales con mayor tasa de mutación ( $10^{-4}$  sustituciones por ronda de replicación) [50], y es la responsable de la elevada variabilidad del HCV (10 veces más variable que el HIV) [20,51–53]. Debido a esto, podemos encontrar hasta 7 genotipos distintos del HCV (1-7), con unas diferencias en la secuencia de nucleótidos del genoma de hasta el 30%. Asimismo, dentro de cada genotipo existen varios subtipos (por ejemplo, el genotipo 1 incluye los subtipos 1a y 1b) y una gran variedad de aislados (hasta 67 en total) que difieren en un 15% entre ellos. La distribución de los genotipos no es homogénea, ya que algunos son epidémicos (como el 1a, 2a, 2b y 3a), mientras que otros son endémicos y su distribución se encuentra limitada a ciertas regiones, como por ejemplo el genotipo 5 que se encuentra principalmente en Sudáfrica (**Figura 2**). El genotipo más común es el 1, responsable del 46.2% de los casos de hepatitis C, seguido del genotipo 3 (30.2%) [18]. Toda esta elevada variabilidad genómica, sumado a su alta capacidad de replicación con una producción de  $10^{12}$  viriones por día [54], hace que el HCV se encuentre dentro de su huésped como una población muy heterogénea de genomas muy relacionados entre sí, con una homología superior al 98%, y que se denominan cuasiespecies [55–57].

La variabilidad genética del HCV no es equitativa a lo largo de su genoma, sino que se concentra principalmente en 3 regiones altamente variables denominadas HVR1, HVR2 y HVR3 (del inglés, *Highly Variable Region*) y que se localizan en el gen que codifica la proteína E2 de la envoltura [58]. Esta variabilidad tiene importantes consecuencias en el curso de la infección, siendo mayor en la fase aguda donde el virus se replica con una alta tasa, duplicando su número

cada día y generando una población altamente heterogénea que facilita el escape del virus ante la presión del sistema inmune tanto celular como humoral, lo que conlleva el establecimiento de una infección crónica donde las células T presentan un fenotipo exhausto y el virus es menos variable [59,60]. Una respuesta inmune celular o humoral débil, dirigida contra pocos epítomos, o con células defectuosas en su capacidad de proliferación o secreción de citoquinas probablemente conducirá a la fase crónica de la enfermedad [61–63]. Por tanto, la inducción y/o mantenimiento de células T específicas o anticuerpos frente al virus podría representar un enfoque terapéutico prometedor.



**Figura 2. Distribución y prevalencia del HCV.** Mapa mundial indicando la distribución de los genotipos 1-6 del HCV junto a la prevalencia en los distintos países. Adaptado de [64].

### 1.1.3. Tratamiento antiviral

Tras más de 30 años de estudios y esfuerzos por entender el HCV y la enfermedad causada por éste, se han aprobado finalmente medicamentos antivirales altamente efectivos que curan más del 95% de las infecciones. Previo al desarrollo de los mismos, la terapia estándar para el tratamiento de la hepatitis C era la combinación de interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) pegilado y ribavirina, pero no eran del todo efectivos y su administración conllevaba graves efectos secundarios [65]. Sin embargo, desde el año 2011 se han ido aprobando diferentes tipos de fármacos antivirales que combaten muy efectivamente la infección por el HCV tras 8-12 semanas de tratamiento por vía oral, consiguiéndose niveles indetectables de ARN viral tras el tratamiento. Además, estos medicamentos funcionan en personas con cirrosis hepática avanzada y con daño renal, siendo bien tolerados y sin apenas efectos secundarios [66,67]. Por otro lado, el tratamiento antiviral



reduce las tasas de morbilidad y mortalidad debidas a las secuelas de la infección, mejorando así la calidad de vida de los pacientes curados [68–70].

Estos medicamentos antivirales incluyen principalmente inhibidores de la proteasa NS3/4a, de la fosfoproteína NS5a y de la polimerasa NS5b, y se administran mediante diferentes combinaciones dependiendo de la situación de cada paciente y del genotipo con el que está infectado. Los distintos genotipos presentan diferencias en patogénesis y, por tanto, en la respuesta frente a la terapia antiviral [37], aunque los antivirales más recientes ya tienen un espectro pangénotípico, siendo efectivos frente a todos los genotipos del HCV [66].

Tras la prometedora oleada de estos nuevos antivirales de acción directa y su alta eficacia en pacientes en distintos estadios de la infección, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto el año 2030 como fecha para reducir en un 90% las nuevas infecciones por el HCV [71]. Sin embargo, los tratamientos antivirales no siempre funcionan y están lejos de ser la solución definitiva al HCV por varios motivos. La primera razón es que no curan al 100% de las personas infectadas, existiendo pacientes donde surgen virus mutantes resistentes a los diferentes antivirales y que en un futuro podrían representar las cepas virales más prevalentes [72,73]. La segunda razón es que la infección por el HCV es silenciosa y no presenta síntomas, por lo que sólo se diagnostican el 50% de las personas infectadas, y en muchos casos el diagnóstico y tratamiento ocurre cuando ya hay un gran daño hepático y severas complicaciones derivadas de la infección crónica [74]. A esto se suma que los grupos de personas de alto riesgo (población en países subdesarrollados y usuarios de drogas por vía intravenosa) normalmente no acuden al médico, continuando infectando a otras personas y contribuyendo a la propagación de la infección. Tercero, el tratamiento con estos antivirales es costoso, y solo una pequeña proporción de las personas infectadas tienen acceso al mismo, siendo imposible en países en vías de desarrollo donde hay una alta prevalencia del HCV [75]. Cuarto, los antivirales no protegen frente a reinfecciones por el HCV, especialmente comunes en personas que usan drogas inyectables [76]. Quinto, la eliminación del virus no significa que no haya riesgo de sufrir cáncer hepático, siendo el HCV una de las principales causas de trasplantes de hígado [77]. Por último, estos tratamientos no son aptos para niños menores de 12 años y en la población pediátrica hay más de 11 millones de personas infectadas por el HCV [66,78].

Por tanto, el HCV está lejos de ser erradicado, y su prevalencia y contagio lejos de ser controlados. En la historia de la humanidad, ninguna enfermedad infecciosa ha sido curada con tratamiento antiviral, mientras que esto sí ha sido posible con una vacuna. De esta forma, la única solución para erradicar el problema de salud mundial que representa el HCV es el desarrollo de una vacuna profiláctica o terapéutica efectiva.

#### 1.1.4. Vacunas

En un 30% de las personas infectadas por el HCV el sistema inmune es capaz de vencer la infección y eliminar el virus del organismo [20], demostrándose, por tanto, que la generación de una vacuna contra el HCV capaz de estimular el sistema inmune y de controlar la infección viral sería una aproximación totalmente factible. Estudios en chimpancés y humanos han mostrado claras evidencias de una respuesta inmune protectora frente al virus tras una segunda infección o tras la administración de distintos candidatos vacunales [79–81]. Además, se ha demostrado que tras resolver una primera infección por el HCV hay más probabilidades de vencer subsecuentes infecciones [81–86]. Sin embargo, pese a los grandes esfuerzos realizados y a los numerosos ensayos preclínicos y clínicos llevados a cabo, aún no se ha conseguido una vacuna efectiva contra el HCV.

Actualmente, se sabe que una vacuna frente al HCV debe generar una potente respuesta inmune celular, tanto de células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, ya que chimpancés que habían eliminado satisfactoriamente una primera infección con el HCV fueron incapaces de controlar una segunda infección tras la depleción de ambos tipos celulares, a diferencia de aquellos chimpancés en los que no hubo depleción [87,88]. Además, la pérdida de avidéz por el antígeno por parte de las células T CD4<sup>+</sup> dio lugar a un defecto en mantener una alta magnitud de células T CD8<sup>+</sup>, por lo que ambas poblaciones deben estar presentes y ser funcionales.

Una de las principales dificultades a las que se enfrenta el sistema inmune cuando combate el HCV es su elevada variabilidad genética. Por lo tanto, la respuesta inmune celular debe ser amplia, es decir, estar dirigida frente a varias proteínas del HCV para evitar el escape mutacional por parte del virus, y reconocer diferentes genotipos, para que sea una respuesta universal [53]. En individuos que resolvieron la infección se encontraron células T CD4<sup>+</sup> reactivas frente a 14 epítomos distintos del HCV [89] y en chimpancés que también resolvieron la infección se encontraron células T CD8<sup>+</sup> que reconocían hasta 9 epítomos distintos [90].

Adicionalmente, una vacuna eficaz debe generar una respuesta inmune celular polifuncional, es decir, que tanto las células T CD4<sup>+</sup> como las CD8<sup>+</sup> sean capaces de secretar al mismo tiempo varias citoquinas, sobre todo IFN- $\gamma$ , IL-2 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) [53,81,85], y de tener una alta capacidad proliferativa y de degranulación (liberación de granzimas y perforina) [53]. De hecho, una respuesta inmune celular débil, poco amplia y disfuncional es una marca distintiva de infecciones crónicas [91–93].

Por último, para que una vacuna frente al HCV pueda proteger de futuras infecciones, la respuesta inmune debe ser capaz de generar células de memoria [87], siendo un marcador de

pronóstico de resolución espontánea la presencia temprana de células T CD8<sup>+</sup> que expresen altos niveles de CD127 [94,95].

Las típicas vacunas antivirales, como la del HBV, se basan en la generación de anticuerpos que proveen inmunidad frente a reinfecciones [20]. Sin embargo, el papel de los anticuerpos en la eliminación del HCV es objeto de controversia. Por un lado, se ha descrito que chimpancés y humanos son capaces de eliminar el virus sin la presencia de anticuerpos detectables en sangre [96,97], y pacientes con deficiencia de anticuerpos (hipogammaglobulinemia) también pudieron eliminar el virus [98]. Sin embargo, algunos estudios avalan la importancia de la respuesta inmune humoral en la infección frente al HCV, habiéndose detectado y aislado anticuerpos neutralizantes, principalmente frente a la proteína E2, en pacientes que resolvieron la infección [99–102].

Por otro lado, la respuesta inmune innata también parece jugar un papel clave en la respuesta antiviral frente al HCV. De hecho, varias proteínas del HCV tienen una potente actividad inhibitoria del sistema inmune innato, en particular la proteína NS3, la cual bloquea muy eficientemente la respuesta del IFN y la función de las células NK (del inglés, *Natural Killer*) [49,103,104]. Las células NK son especialmente abundantes en el hígado y posiblemente juegan un papel fundamental en el resultado de la infección. Se ha descrito que la presencia de células NK que expresan el marcador de activación Nkp30 correlaciona con protección, sugiriendo que la activación de las células NK y la citotoxicidad que éstas ejercen sobre los hepatocitos infectados producen la liberación de antígenos del HCV al medio que llegan a los ganglios linfáticos donde se presentarán a las DCs [22,105]. Las DCs, por su parte, son consideradas el principal nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa. Sin embargo, la respuesta innata es más difícil de incluir en las vacunas, ya que es inespecífica, pero puede potenciarse con el uso de adyuvantes o moléculas estimuladoras del sistema inmune innato.

En resumen, para que una vacuna frente al HCV sea eficaz debe activar los distintos componentes del sistema inmune descritos anteriormente, obteniéndose así un efecto sinérgico entre ellos. Además, debe ser barata, estable, fácil de fabricar, transportar, almacenar y efectiva a largo plazo para que sea capaz de prevenir las reinfecciones.

Las principales limitaciones que existen en el desarrollo de vacunas frente al HCV son:

- 1. Alta diversidad genómica:** Dificulta el diseño de una vacuna universal frente a los diferentes genotipos del HCV [20,106].
- 2. Carencia de un modelo animal y un sistema de cultivo *in vitro* apropiados:** El HCV solo infecta a humanos y chimpancés. Gran parte del conocimiento que tenemos hoy en día sobre el HCV y la infección por este virus procede de experimentos realizados en chimpancés. Sin embargo, hoy en día la experimentación con ellos está prohibida por

razones éticas [107]. Aunque se han desarrollado varios modelos de infección *in vitro* e *in vivo* (sobre todo en modelos de ratones humanizados), todos presentan importantes limitaciones que dificultan el estudio del ciclo de replicación del HCV y de la respuesta inmune natural frente al mismo [21]. Además, es éticamente difícil la obtención de biopsias de hígados en pacientes, pues es una técnica muy invasiva y poco práctica que ha sido poco a poco sustituida por otras técnicas menos invasivas [20,22].

**3. Dificultades en encontrar pacientes y programas de diagnóstico adecuados:** Existe una gran dificultad para encontrar y estudiar pacientes en estadios tempranos de la infección dada la asintomatología de la enfermedad durante las primeras décadas de infección. Por otro lado, hay dificultad para establecer programas de diagnóstico efectivos debido a la existencia de “grupos de alto riesgo invisibles”, que son generalmente personas drogadictas, que no suelen acudir al médico. Un estudio reciente afirma que de toda la población infectada por el HCV en países desarrollados, solo el 34% de los pacientes son relativamente fáciles de diagnosticar y seguir durante el curso de la infección [108,109].

**4. Falta de conocimiento de los parámetros del sistema inmune que correlacionan con protección y gran complejidad de la respuesta inmune frente al HCV:** Todavía no se sabe con precisión qué parámetros exactos previenen a unas personas de la infección crónica y a otras no [15,110].

**5. Falta de conocimiento y de una estructura cristalográfica completa de la proteína E2:** La glicoproteína E2 de la envoltura del HCV es una proteína transmembrana de tipo I que está considerada la principal diana de anticuerpos y, por tanto, ha sido el foco de grandes esfuerzos para diseñar una vacuna profiláctica frente al HCV [102,111]. Keck y colaboradores describieron por primera vez la presencia de 3 dominios inmunogénicos en E2, similares a los dominios estructurales de otras glicoproteínas de flavivirus [112–114]. Estos dominios, designados A, B y C, fueron determinados basándose en la unión de anticuerpos monoclonales aislados de humanos, y posteriormente se expandieron para incluir los dominios antigénicos D y E [115,116]. Además, en esta proteína se encuentran las regiones hipervariables HVR1, HVR2 y HVR3, donde HVR1 (que comprende desde los residuos 384 a 409 [117]) es el motivo inmunodominante frente al cual surgen la mayoría de las mutaciones de escape durante el curso de la infección [99,111,118,119]. Además de la gran variabilidad dentro de esta región, también hay un alto grado de flexibilidad estructural dentro de la proteína, que produce la generación de un elevado número de anticuerpos no neutralizantes [120]. Por último, E2 presenta una cara no neutralizante y se oculta bajo una capa de glicanos y lipoproteínas de sangre (sobre todo la apolipoproteína E)

que la hacen inaccesible a anticuerpos. Igualmente, el virus puede transmitirse de célula a célula sin pasar por el medio extracelular [16], pasando desapercibido para los anticuerpos.

La información estructural de la proteína E2 del HCV y de sus regiones antigénicas de interés aún queda por dilucidar. Hasta el momento, solo hay descritas 2 estructuras de alta resolución [121,122], que se obtuvieron a partir de la cristalización de la proteína truncada tanto en el extremo N- como C-terminal. Por tanto, aunque estas estructuras han proporcionado información valiosa, en realidad representan una proteína E2 que está parcialmente glicosilada, que ha sido truncada en ambos extremos y con importantes modificaciones en su región HVR2, que es necesaria para el correcto plegamiento de E2 [123]. Además, estos datos estructurales no incluyen la proteína E1. E2 requiere de E1 para su correcto plegamiento [16,124], y viceversa, aunque algunos estudios sugieren que el ectodominio de E2 podría comportarse como una unidad con plegamiento independiente [125]. E1 es otra glicoproteína de membrana de tipo I cuya expresión, procesamiento y plegamiento ocurren a la par de E2 [126–129]. La función y estructura de E1 tampoco están bien definidas [130], aunque se sabe que tiene un papel importante en la fusión viral [131–133] y es antigénica [134,135]. Los modelos actuales muestran que E1 es una chaperona que ayuda en el plegamiento y en la funcionalidad de E2 [126,136], presentándose ambas en membrana como heterodímeros o trímeros de heterodímeros [137,138] y asociados a complejos lipoproteicos [35,139,140]. Todo esto dificulta el diseño de vacunas dirigidas a la formación de anticuerpos frente a zonas conservadas de E2 o de antivirales que eviten la entrada del virus en la célula.

**6. Falta de financiación:** Debido al desarrollo de los nuevos antivirales, muchas fundaciones, gobiernos y entidades públicas y privadas no consideran necesaria la continuidad de la investigación en hepatitis C, por lo que se han hecho graves recortes en financiación. Por ejemplo, las muertes producidas por el HCV superan a las del HIV desde hace décadas, pero la financiación conjunta para hepatitis B y C es menos del 5% de la financiación dedicada al HIV/SIDA [15,20]. Además, solo una pequeña parte de este dinero está dedicado a estudios inmunológicos, lo que dificulta la generación de vacunas frente al virus [20].

Aunque hasta la fecha se hayan evaluado en fase clínica múltiples candidatos y combinaciones vacunales frente al HCV con fines profilácticos y/o terapéuticos, solo unos pocos de ellos han progresado a fase II (**Figura 3**). En ellos se han seguido principalmente dos estrategias: la primera de ellas consiste en estimular la generación de una respuesta inmune celular frente a las proteínas no estructurales del HCV. Dentro de ésta, destaca un ensayo clínico

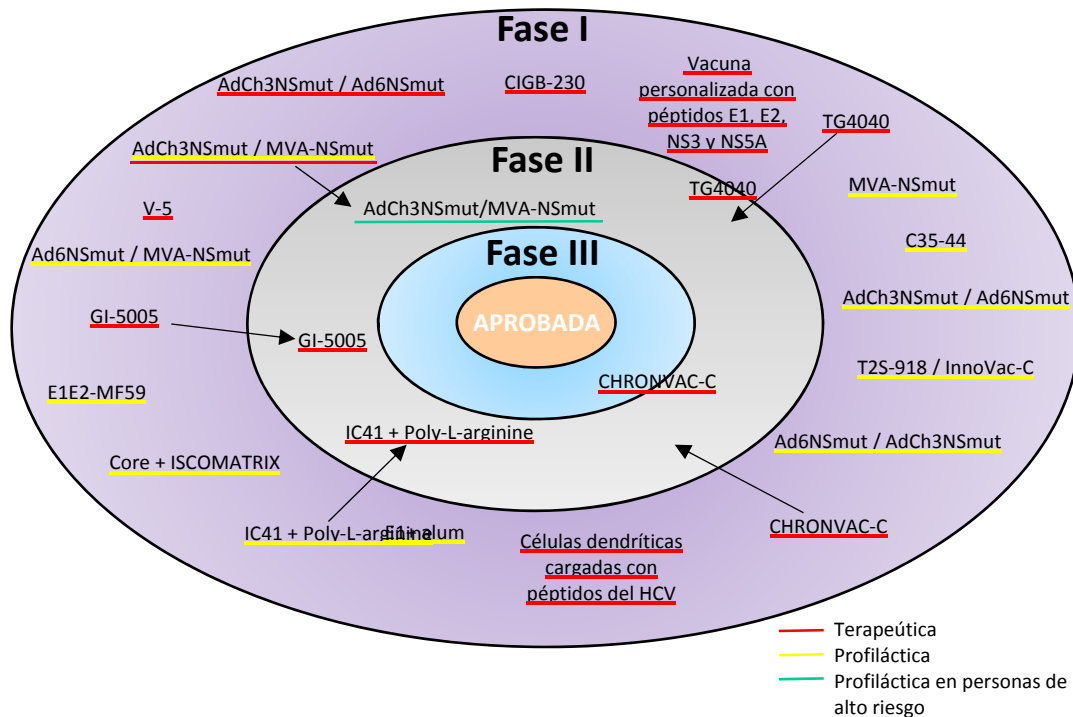
profiláctico de fase II (número de referencia: NCT01436357) que finalizó en agosto del 2018 y donde se evaluó la vacunación con una primera dosis (*prime*) con un vector adenoviral que expresa las proteínas NS3, NS4 y NS5 del genotipo 1b del HCV (AdCh3NSmut1), seguida de una segunda dosis (*boost*) con un vector poxviral Virus Vaccinia Modificado de Ankara (MVA, del inglés *Modified Vaccinia Virus Ankara*) que expresa las mismas proteínas (MVA-NSmut). Los resultados de este ensayo clínico proporcionarán la primera prueba de la eficacia de esta vacuna contra la exposición al HCV en situación real, ya que se está realizando en personas con alto riesgo de contraer el virus. Sin embargo, este régimen (AdCh3NSmut1/MVA-NSmut) que demostró previamente ser altamente inmunogénico en voluntarios sanos [141] no funcionó como vacuna terapéutica ya que no se pudo revertir el fenotipo exhausto de las células T en pacientes con hepatitis C crónica (ensayo NCT01296451) [142].

Otro vector basado en MVA que ha sido evaluado en fase II es el TG4040, que consiste en un MVA que codifica las proteínas NS3, NS4 y NS5b del genotipo 1b del HCV (ensayo NCT01055821). Los resultados mostraron que un 64.2% de los pacientes vacunados con TG4040 generaron una respuesta inmune celular específica frente al HCV y alcanzaron respuesta virológica temprana completa, es decir, una caída de la carga viral a un nivel indetectable, respecto a aquellos que sólo recibieron tratamiento antiviral (45.9%) [143].

ChronVac-C® es un vector de ADN que expresa las proteínas NS3 y NS4a del genotipo 1a del HCV y que no generó diferencias en individuos vacunados y no vacunados al administrarlo en dos dosis.

La segunda estrategia utilizada está centrada en la estimulación de la respuesta inmune humoral, generando anticuerpos frente a las proteínas estructurales del HCV. Dentro de ésta, destaca el ensayo clínico de fase I en el que se vacunaron voluntarios sanos con las glicoproteínas purificadas E1 y E2 del genotipo 1a del HCV junto al adyuvante MF59 (ensayo NCT00500747). Con esta estrategia se han detectado anticuerpos neutralizantes y de amplio espectro (reactivos frente a distintos genotipos del HCV) pero una débil respuesta inmune celular de células T CD4<sup>+</sup> específicas frente a las glicoproteínas [144–148].

Otros candidatos vacunales dirigidos a generar respuesta humoral que han avanzado hasta fase II son IC41 [149], un multiepítipo sintético que no mostró efectividad en pacientes crónicos, y GI-5005, una proteína de fusión Core-NS3, que mejoró en un 10% la respuesta virológica sostenida en pacientes vacunados, es decir, carga viral no detectable seis meses tras el tratamiento [150].



**Figura 3. Ensayos clínicos de candidatos vacunales frente al HCV.** Diagrama de los distintos ensayos clínicos de fase I y II realizados hasta la fecha y que emplean diferentes candidatos y estrategias vacunales frente al HCV.

Dado que aún no existe una vacuna eficaz para prevenir y/o controlar la infección por el HCV, y tras haberse probado diferentes estrategias con vacunas de ADN, vectores virales, péptidos y proteínas recombinantes, así como inmunoterapia (Figura 3), se necesitan nuevas estrategias que combinen respuestas inmunes celular ( $CD4^+$  y  $CD8^+$ ) y humoral (anticuerpos) dirigidas frente a varias proteínas del virus y efectivas frente a varios genotipos del HCV.

Dentro de los diferentes vectores vacunales más prometedores, destacan aquellos basados en Poxvirus.

## 1.2. Poxvirus

La familia *Poxviridae* incluye virus cuyo genoma es ADN de doble cadena, de entre 130 y 360 kpb y que replican en el citoplasma de las células que infectan [151,152]. La familia *Poxviridae* se divide en 2 subfamilias: *Chordopoxvirinae* y *Entomopoxvirinae*. Dentro de la subfamilia *Chordopoxvirinae*, en el género *Orthopoxvirus*, se encuentra el virus Vaccinia (VACV), considerado el virus prototípico de la familia *Poxviridae* [153].

### 1.2.1. Características genómicas del VACV

El VACV contiene un genoma de ADN de doble cadena, superenrollado, de unos 200 kpb [154–156]. En las zonas codificantes próximas a los extremos 5' y 3' del genoma se encuentran genes no esenciales implicados en la interacción virus-huésped, siendo ésta la zona más variable entre las diferentes cepas de virus [157–159]. Además, los extremos 5' y 3' contienen repeticiones en tándem que forman una horquilla cerrada covalentemente [155]. En la zona central del genoma se encuentra una gran región altamente conservada que contiene genes que codifican proteínas con funciones esenciales en el ciclo viral [157–159].

La nomenclatura utilizada para nombrar los distintos genes del VACV se basa en la digestión de su genoma por la enzima *HindIII*, que da lugar a varios fragmentos de diferente tamaño. Cada gen se nombra con una letra dependiendo de en qué fragmento se encuentra tras la digestión, seguido de un número según en qué posición se localiza dicho gen en ese fragmento, y finalmente se añade la letra L o R según la dirección de su transcripción: izquierda (L) o derecha (R) [159].

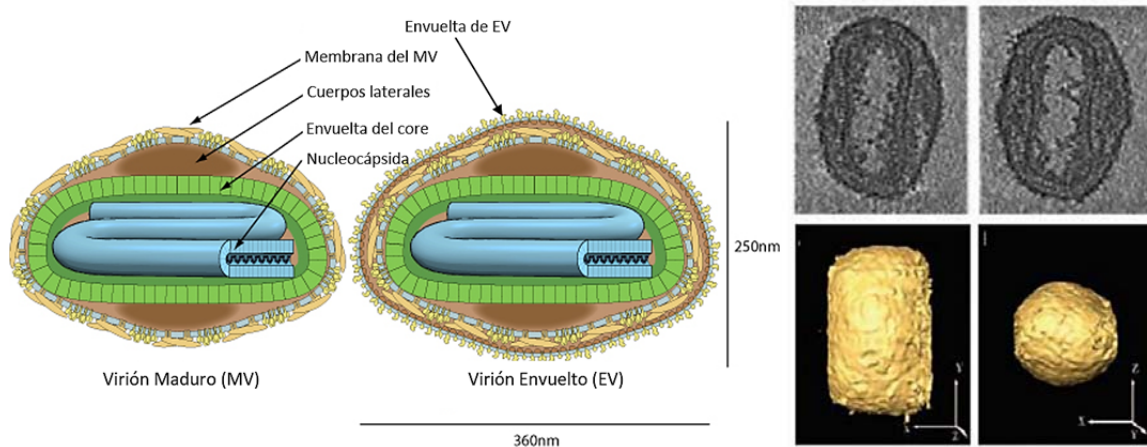
### 1.2.2. Estructura, morfología y ciclo infectivo

El VACV tiene unas dimensiones aproximadas de 360 x 270 x 250 nm y una forma de ladrillo [160]. Durante su ciclo infectivo, que ocurre íntegramente en el citoplasma de distintos tipos de células, se pueden distinguir 2 tipos de virus: virión maduro intracelular (MV, del inglés *Mature virion*) y virión con envuelta extracelular (EV, del inglés *Enveloped virion*) [152,161] (**Figura 4**). El MV presenta una capa exterior de 8 nm adyacente a la membrana lipídica, mientras que el EV presenta además una membrana extra procedente de la red del trans-Golgi celular donde se encuentran proteínas virales y celulares ausentes en el MV [153,161]. Alrededor del núcleo del virión se encuentra una estructura porosa de 18 nm de grosor y que da acceso al *core*, donde se localizan las proteínas virales estructurales, el ADN y las enzimas asociadas al mismo. Entre la capa exterior y el *core* se encuentran 2 cuerpos laterales de material heterogéneo [160,162,163]. El MV es altamente estable y posiblemente está implicado en la infección entre



distintos hospedadores, mientras que el EV es menos estable y está implicado en la infección dentro del mismo hospedador [164].

Se han descrito también otras partículas intermediarias, como el virión envuelto intracelular (IEV, del inglés *Intracellular enveloped virion*), que es un MV que ha adquirido una envuelta adicional en su paso por el aparato de Golgi, y el virión envuelto asociado a la célula (CEV, del inglés *Cell-associated enveloped virion*), que es un IEV preparado para su liberación al medio extracelular como EV o preparado para infectar células adyacentes mediante la polimerización de colas de actina en forma de CEV [152]. La morfología del MV con mayor resolución ha sido definida por criomicroscopía electrónica y difracción de rayos X [160].



**Figura 4. Estructura de las partículas infecciosas de Poxvirus.** Izquierda: Estructura y tamaño del virión maduro (MV) intracelular y del virión envuelto (EV) extracelular del VACV. Adaptado de ©ViralZone 2016, *Swiss Institute of Bioinformatics*. Derecha: Secciones de criomicroscopía electrónica (arriba) y representación volumétrica (abajo) de un MV del VACV utilizando reconstrucción tomográfica [160].

El ciclo viral completo del VACV se puede dividir en 4 fases (**Figura 5**):

**1. Entrada:** La entrada del virus puede ser por fusión directa con la membrana plasmática o por macropinocitosis [164]. En el proceso de fusión participan 11-12 proteínas virales que forman el complejo de entrada por fusión, ayudadas por otras proteínas asociadas a membrana tanto virales como celulares [153,164]. Además, el virus puede transmitirse de célula a célula sin pasar por el medio extracelular, a través de colas de actina.

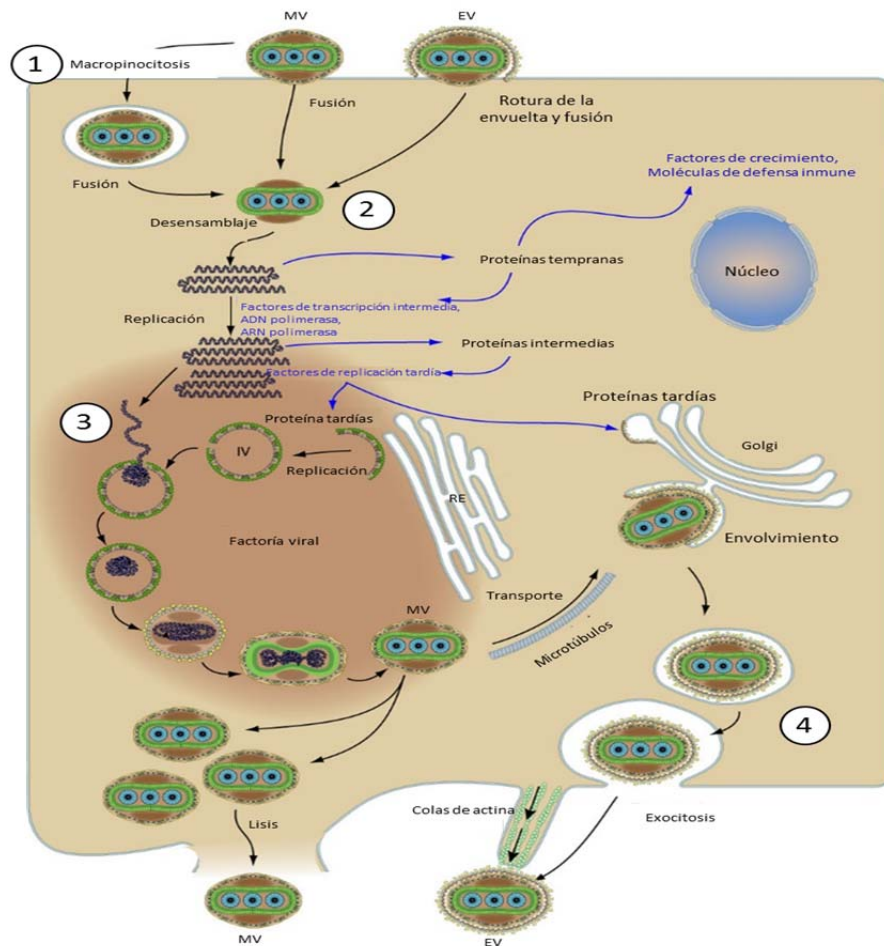
**2. Desensamblaje:** Una vez dentro de la célula, si el virus entró por fusión, se procede al transporte del mismo mediado por microtúbulos hacia unas estructuras llamadas factorías virales [165], donde se llevará a cabo el desensamblaje que comienza con la pérdida de lípidos y proteínas del virión [166]. En el caso de que la entrada viral fuera por macropinocitosis, el virus es liberado de los endosomas acidificados previo a su transporte hacia las factorías virales [164].

**3. Expresión génica y replicación del genoma:** Los genes del virus se agrupan según su momento de expresión en genes tempranos, intermedios o tardíos [159,167–169], lo cual depende de los factores de transcripción virales y del tipo de promotor de cada gen. La transcripción temprana incluye la mitad del genoma y se inicia por las proteínas y factores de transcripción que venían incorporados en el *core* del virus y conlleva la expresión de la maquinaria para la transcripción intermedia y la expresión de proteínas implicadas en la modulación de la respuesta antiviral [153]. Durante la fase intermedia ocurre la replicación del genoma en las factorías virales [154,154] y la expresión de factores de transcripción para la fase tardía, en la cual se sintetizan las proteínas estructurales, factores de virulencia y enzimas que serán incorporadas en los nuevos viriones [170,171].

**4. Formación de progenie viral:** En esta etapa se forman los viriones MV y EV a partir de los viriones inmaduros. El *core* se condensa y se forman los MVs, que se acumulan en el citoplasma hasta que la célula es lisada y se liberan en forma de MVs. Un pequeño porcentaje de MVs son transportados hasta el trans-Golgi, donde se convierten en IEVs al ser rodeados por una segunda membrana y a continuación son transportados por microtúbulos a la membrana plasmática con la que se fusionan y se liberan al medio extracelular en forma de EV o se propagan mediante colas de actina a células adyacentes [153,172,173].

El VACV es especialmente relevante en el campo de las vacunas, ya que se utilizó como vacuna contra la viruela, la primera y única enfermedad infecciosa humana que ha podido ser erradicada a través de un programa de vacunación. Como consecuencia, el VACV es el virus más estudiado de la familia *Poxviridae*, siendo además el primer virus animal en ser visualizado por microscopía electrónica, en ser crecido en células de cultivo y en ser purificado [159]. Debido a características tales como su flexibilidad genómica que le permite acomodar hasta 25 kpb de ADN exógeno sin afectar su viabilidad, su estabilidad y facilidad de producción así como su inmunogenicidad, el VACV ha sido utilizado como candidato vacunal idóneo contra multitud de enfermedades infecciosas, habiéndose evaluado en numerosas ocasiones en ensayos clínicos, y con varias vacunas licenciadas en veterinaria basadas en el mismo [174,175].

Dentro del VACV, destaca la cepa atenuada denominada MVA.



**Figura 5. Ciclo infeccioso del VACV.** En el esquema se muestra el ciclo completo de infección del VACV, que se encuentra dividido en: entrada (1), desensamblaje (2), transcripción y replicación (3), y morfogénesis y salida de la progenie viral (4). En la figura se muestran los viriones maduros (MV) y los viriones extracelulares (EV). RE: Retículo endoplásmico. Adaptado de ©ViralZone 2016, Swiss Institute of Bioinformatics.

### 1.2.3. Virus Vaccinia Modificado de Ankara (MVA)

El MVA deriva del VACV corioalantoide de Ankara, una cepa turca de vacuna frente a la viruela, tras más de 570 pases en fibroblastos embrionarios de pollo [176]. Como consecuencia de estos pases, el MVA perdió grandes fragmentos de su genoma (alrededor de 30 kpb), convirtiéndose en un virus altamente atenuado en células de mamífero al perder su capacidad replicativa en ellas [177–179].

El MVA ha sido utilizado como vector vacunal en numerosos ensayos preclínicos y clínicos frente a diferentes enfermedades, ya que posee una serie de características que lo hacen idóneo como candidato vacunal [175,178,180]:

- 1. Seguridad:** Tras varios ensayos de fase I en humanos se ha comprobado que es un vector seguro ya que no replica en células de mamífero y puede ser utilizado sin que esto conlleve reacciones secundarias. De hecho, el MVA fue inoculado en 120.000 personas

inmunosuprimidas entre los años 1968-1980 en Alemania durante el programa de vacunación frente a la viruela sin describirse ningún efecto adverso [176,181].

**2. Estabilidad:** El MVA es altamente estable genéticamente y permite introducir grandes fragmentos (hasta 25 kpb) de genes exógenos como antígenos de interés [182]. Además, es capaz de expresar altos niveles de estas proteínas heterólogas.

**3. Generación y producción:** Es fácil de manipular, producir, almacenar, transportar, y es estable con el paso del tiempo.

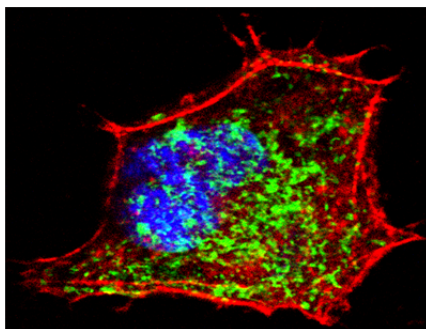
**4. Inmunogenicidad:** Es muy inmunogénico e induce respuestas inmunes potentes tanto celulares como humorales frente al propio vector y frente a los genes de interés introducidos en su genoma.

El presente trabajo se centra en la aplicación de distintas estrategias vacunales con el objetivo de intentar aumentar la inmunogenicidad inducida por un candidato vacunal frente al HCV basado en el MVA (denominado MVA-HCV), el cual fue previamente descrito [183].

#### 1.2.3.1. MVA-HCV

El virus recombinante MVA-HCV fue generado previamente en el laboratorio como candidato vacunal frente a hepatitis C [183]. A diferencia de otras vacunas frente al HCV, MVA-HCV fue diseñado para expresar tanto las proteínas estructurales como no estructurales del HCV (genotipo 1a, cepa H77), y por ello contiene insertado en el locus de la timidina quinasa (TK) del MVA los genes que codifican para las proteínas Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a y los primeros 201 aminoácidos de la proteína NS5b. Al no haberse incluido más del 70% de la proteína NS5b (la ARN polimerasa viral) ni las regiones no codificantes de los extremos 5' y 3', MVA-HCV tiene un perfil totalmente seguro que no permite la formación del HCV completo.

En células infectadas, MVA-HCV procesa y expresa eficientemente todos los antígenos del HCV (**Figura 6**), formando agregados membranosos en el citoplasma de las mismas. Debido a que las proteínas del HCV son inmunosupresoras, en macrófagos humanos (células THP-1) y células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs) infectadas con MVA-HCV la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata disminuye en comparación con células infectadas con la cepa salvaje del virus MVA (MVA-WT) [183].



**Figura 6. Expresión de proteínas del HCV en una célula infectada con MVA-HCV.** Imagen de microscopía confocal de una célula HeLa humana infectada con MVA-HCV. En rojo se muestra la  $\beta$ -actina, en azul el núcleo y en verde las proteínas del HCV detectadas empleando un anticuerpo policlonal humano procedente de un paciente infectado por HCV.

Cuando MVA-HCV es inoculado en ratones en régimen homólogo (MVA-HCV/MVA-HCV) se genera una respuesta inmune de células T  $CD8^+$  citotóxica y polifuncional (produciendo  $IFN-\gamma$ , IL-2 y  $TNF-\alpha$  y expresando CD107a), dirigida principalmente frente a las proteínas p7+NS2 y NS3. Esta respuesta se logra potenciar y diversificar empleando un régimen heterólogo que combina vectores de ADN que codifican las proteínas virales Core, E1, E2 y NS3 en una primera dosis con MVA-HCV en una segunda dosis, obteniéndose así respuestas de células T  $CD4^+$  dirigidas frente a las proteínas E1, E2 y Core y células T  $CD8^+$  frente a p7+NS2 y NS3 [183].

El presente trabajo se centra en el desarrollo y caracterización de nuevas vacunas y estrategias vacunales frente al HCV que permitan aumentar y expandir la respuesta inmune inducida por MVA-HCV, ya que, aunque MVA-HCV es inmunogénico, no se ha descrito respuesta inmune humoral generada por el mismo y la respuesta T  $CD4^+$  detectada es de baja magnitud (menos del 0.5% de las células T  $CD4^+$  producen citoquinas frente al HCV).

### 1.3. Estrategias para aumentar la inmunogenicidad de candidatos vacunales basados en el MVA

A pesar de que en múltiples estudios se ha demostrado que el MVA es altamente inmunogénico, existen diversas estrategias dirigidas a mejorar y optimizar la respuesta inmune producida por los recombinantes de MVA [184]. Estas estrategias se pueden clasificar en los siguientes 3 grupos:

#### 1.3.1. Optimización del vector MVA

Este grupo de estrategias engloba todas aquellas aproximaciones dirigidas a modificar el genoma del MVA para hacerlo más inmunogénico. Incluye la delección de genes inmunomoduladores presentes aún en el genoma de MVA y/o la inserción de moléculas inmunoestimuladoras, así como el uso de promotores que favorezcan altos niveles de expresión del antígeno heterólogo durante todo el ciclo de replicación viral.

#### 1.3.2. Optimización del antígeno heterólogo expresado por el MVA

En este grupo se encuentran todas las mejoras que puedan realizarse a nivel de expresión, transcripción y/o traducción de los genes exógenos; así como la optimización de los mismos para la obtención de la respuesta inmune deseada. Incluye la optimización del procesamiento, secreción, localización, solubilidad, estructura cuaternaria y mejora de la actividad biológica de las proteínas heterólogas expresadas.

#### 1.3.3. Mejora del protocolo de vacunación y combinación con otras vacunas

Por lo general, para que una vacuna sea eficaz se necesita más de una inmunización de la misma. Este proceso se denomina protocolo *prime/boost*, siendo la primera dosis denominada *prime* y las sucesivas dosis posteriores son denominadas *boost* (o dosis de recuerdo). Tradicionalmente, las vacunas se han administrado varias veces a lo largo de un periodo determinado de tiempo, por ejemplo, la vacuna triple vírica (frente a difteria, tétanos y tos ferina) es administrada hasta 5 veces en los primeros 6 años de vida [185]. Cuando una misma vacuna se administra varias veces, se denomina protocolo homólogo de inmunización. La combinación de 2 o más vacunas de diferente naturaleza (basadas en distintas plataformas, como vectores de ADN, proteínas o vectores recombinantes) pero que expresan los mismos antígenos o antígenos relacionados, se denomina protocolo heterólogo de inmunización, y generalmente induce respuestas inmunes superiores en magnitud y calidad a las inducidas por el protocolo homólogo [186,187]. Numerosos estudios demuestran que la vacunación con MVA

es especialmente efectiva cuando se aplica como *boost* tras otro candidato vacunal de distinta naturaleza al MVA. Algunos ejemplos de candidatos vacunales que se han probado en combinación con MVA son vectores de ADN, proteínas recombinantes y otros vectores virales como los adenovirus [183,188–190]. Además, también se han realizado numerosos estudios combinando MVA con otros elementos (ya sean inmunógenos o moléculas adyuvantes) demostrando su efecto sinérgico y positivo. Algunos ejemplos de esto son la inoculación conjunta de MVA con proteína o MVA con adyuvantes de distinta naturaleza [191,192].

En el presente trabajo se han desarrollado y estudiado algunas de las estrategias mencionadas anteriormente con el objetivo de obtener potentes respuestas inmunes celulares y humorales frente al HCV:

**1- Optimización del vector MVA:** Se llevó a cabo la delección del gen *C6L* del MVA en el genoma del vector MVA-HCV. Este gen codifica para una proteína que inhibe la respuesta del IFN tipo I y que no es esencial para la replicación del virus. Estudios previos han demostrado que la delección del gen *C6L* del genoma de un candidato vacunal frente al HIV/SIDA, llamado MVA-B, indujo una mayor magnitud de respuestas celulares específicas, tanto de células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> [193,194].

**2- Optimización del antígeno heterólogo expresado por el MVA:** Dado que MVA-HCV expresa casi todas las proteínas del HCV y que muchas de éstas tienen una actividad inmunosupresora, en el presente trabajo se llevó a cabo la generación de un nuevo candidato vacunal frente al HCV, llamado MVA-HCVmut, que contiene una mutación puntual en la proteína NS3 del HCV, que actúa como un potente inhibidor del IFN tipo I [195,196]. Esta sola mutación, que consiste en un cambio de Serina a Alanina en la posición 139 (S139A) ha sido descrita como suficiente para eliminar la actividad catalítica de NS3, incluyendo su efecto inhibitorio sobre el IFN [197].

**3- Mejora del protocolo de vacunación y combinación con otras vacunas:** En el presente trabajo se han generado 2 nuevos candidatos vacunales frente al HCV para combinarlos con MVA-HCV en protocolos de inmunización *prime/boost*. Uno de ellos está basado en la plataforma de replicones DREP (del inglés, *DNA-launched self-amplifying RNA replicon*) y el otro consiste en nuevas variantes de proteína E2 purificada.

Los replicones DREP son plásmidos desnudos de ADN basados en el genoma de los alfavirus. La peculiaridad que presentan es que, una vez que se transfectan en las células, se producirán nuevas copias de ARN del plásmido, convirtiéndolo en una molécula ARN recombinante autoamplificante o replicón [198]. Esto es debido a que codifican una replicasa del virus del bosque Semliki (SFV) que amplifica el replicón de ARN generando moléculas de ARN de doble cadena que, además, estimularán varios receptores de

reconocimiento de patrones celulares (PRR) [199]. La estimulación de los PRRs produce la inducción de IFN tipo I y desencadena una potente apoptosis que, en el caso de una vacuna, tiene un efecto adjuvante [200,201]. Además, se ha descrito que los vectores DREP pueden optimizarse con la adición de un potenciador de la traducción o *enhancer* colocado en la misma pauta de lectura aguas arriba de los antígenos heterólogos. Este *enhancer* proporciona una expresión aumentada del antígeno y una mejora de las respuestas inmunes humorales específicas frente al mismo [202,203]. Por lo tanto, debido a todas estas características, los replicones DREP expresan altos niveles de genes heterólogos de manera transitoria e inducen mayores respuestas inmunes específicas frente al antígeno *in vivo* que las vacunas de ADN convencionales [198,204–207], siendo un vector atractivo para el desarrollo de vacunas [208].

El segundo candidato vacunal fue generado durante la estancia en el grupo colaborador del Profesor Rogier Sanders, en el Centro Médico Académico de Ámsterdam (Holanda), y consiste en 2 versiones diferentes de la proteína E2 del HCV (genotipo 1a, aislado H77). Ambas proteínas son solubles y se secretan al medio extracelular al carecer del dominio transmembrana (TMD, del inglés *Transmembrane domain*) junto con la región externa próxima a la membrana (MPER, del inglés *Membrane-proximal external region*) y se diferencian en que una de ellas (E2  $\Delta$ MPER CL, del inglés *Cystein low*) carece de 8 cisteínas que han sido sustituidas por alaninas, mientras que la otra no (E2  $\Delta$ MPER), lo cual hace que se presente en forma de oligómeros de bajo peso molecular.

La presente tesis persigue caracterizar inmunológicamente, tanto *in vitro* como *in vivo*, los diferentes candidatos vacunales generados frente al HCV, genotipo 1a, cepa H77, con el fin de obtener respuestas inmunes específicas frente al HCV que sean potentes en magnitud, amplias, polifuncionales y duraderas. Por un lado, la respuesta inmune celular se estudiará en esplenocitos obtenidos de los bazo de ratones inmunizados tanto durante la fase adaptativa, es decir, en el pico de respuesta que ocurre alrededor de 10 días tras la vacunación, como durante la fase de memoria, es decir, tras la fase de contracción de la respuesta inmune, y analizada 53 días después de la última inmunización. La calidad de la respuesta inducida se evaluará mediante el análisis de la magnitud, amplitud y polifuncionalidad junto con la presencia de células con fenotipo de memoria específicas frente al HCV. Por otro lado, la respuesta inmune humoral se evaluará determinando los niveles de anticuerpos frente al HCV presentes en el suero de los ratones vacunados, y posteriormente se analizará la reactividad cruzada de los mismos frente a otros genotipos del HCV y la distribución de los isotipos IgG1, IgG2c e IgG3.



## 2. OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

La presente tesis tiene como objetivo desarrollar candidatos vacunales contra el virus de la hepatitis C (HCV) y establecer protocolos óptimos de vacunación, aplicando diferentes estrategias para obtener potentes respuestas inmunes celulares (T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) y humorales frente al HCV, tomando como base el candidato vacunal MVA-HCV previamente generado en el laboratorio.

Para ello, se proponen los siguientes objetivos:

- 1) Diseño, generación y caracterización *in vitro* e *in vivo* de un candidato vacunal MVA-HCV que contenga la delección del gen C6L del MVA (MVA-HCV  $\Delta$ C6L).
- 2) Diseño, generación y caracterización *in vitro* e *in vivo* de un candidato vacunal MVA-HCV que contenga una mutación en la proteína NS3 del HCV (MVA-HCVmut).
- 3) Diseño, generación y caracterización *in vitro* e *in vivo* de nuevos candidatos vacunales basados en replicones DREP (DREP-HCV y DREP-e-HCV) para combinar en protocolos *prime/boost* con MVA-HCV.
- 4) Diseño, generación y caracterización *in vitro* e *in vivo* de nuevos candidatos vacunales de naturaleza proteica (E2  $\Delta$ MPER y E2 CL  $\Delta$ MPER) para combinar en protocolos *prime/boost* con MVA-HCV.

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Células

En el presente trabajo se han utilizado las siguientes células:

- **DF-1**: Fibroblastos inmortalizados de pollo (ATCC® CRL-12203™).
- **CEF**: Cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo (*Gallus gallus*) obtenidos a partir de embriones tras 11 días de incubación (MSD, Salamanca).
- **HEK-293T**: Células embrionarias humanas de riñón inmortalizadas (ATCC® CRL-3216™).
- **HEK-293F**: Células embrionarias humanas de riñón inmortalizadas derivadas de HEK-293T; crecimiento en suspensión (Gibco).
- **THP-1**: Células monocíticas humanas procedentes de un paciente con leucemia monocítica (ATCC® TIB-202™).
- **moDCs**: Células dendríticas humanas derivadas de monocitos obtenidas a partir de sangre de donantes sanos.
- **esplenocitos de ratón**: Células primarias obtenidas a partir de los bazos de ratones inmunizados.

#### 3.1.2. Medios de cultivo

Para las células DF-1, CEF y HEK-293T se utilizó el medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) complementado con aminoácidos no esenciales (1X, Sigma) y L-Glutamina (2 mM, Merck) y con 10% de suero fetal de ternera (FCS) (Gibco).

Para THP-1, moDCs y los esplenocitos de ratón se utilizó el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (Gibco) complementado con HEPES pH 7.4 (10 mM, Merck),  $\beta$ -mercaptoetanol (10  $\mu$ M, Sigma), L-glutamina (2 mM, Merck) y 10% FCS.

Para las células HEK-293F se usó el medio de expresión FreeStyle™ (Life Technologies).

El medio Opti-MEM (Gibco) se utilizó como medio de cultivo transitorio durante las transfecciones con plásmidos.

El medio de infección consistió en DMEM-2% FCS y se añadió tras el periodo inicial de adsorción del virus durante 1 hora en DMEM sin suero y posterior retirada del mismo. El medio de infección sólido se utilizó para seleccionar las placas de los virus recombinantes y consistió en una proporción 1:1 de DMEM 2X-4% FCS y agarosa 1.9% (Conda) previamente fundida.

Todas las células fueron mantenidas en un incubador humidificado a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.1.3. Bacterias

Las cepas bacterianas utilizadas para las transformaciones y crecimiento de los plásmidos fueron electrocompetentes DH10B de *Escherichia coli* (New England Biolabs) y quimiocompetentes DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (CNB). Las bacterias se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) (CNB) [209] o Terrific Broth (TB) (VWR) en presencia de ampicilina (100  $\mu$ g/ml, Merck) o kanamicina (100  $\mu$ g/ml, Merck).

### 3.1.4. Virus

Todos los VACV recombinantes utilizados en este trabajo derivan del virus vaccinia modificado de Ankara o *modified vaccinia virus Ankara* (MVA) cedido por el Dr. Gerd Sutter del Instituto de Virología Molecular de Múnich (Alemania). Los diferentes antígenos heterólogos fueron insertados en el locus TK viral (gen *J2R*) y se encuentran bajo el control del promotor viral sintético temprano/tardío (pE/L). En la **Tabla 2** se muestran los distintos virus MVA generados en este estudio. Además de estos virus MVA, también se utilizó el virus Sendai, cepa Cantell, cedido por la Dra. Dolores Rodríguez (CNB).

Virus	Antígeno insertado	Gen deletado	Referencia
MVA-WT	-	-	[176]
MVA-PS-GFP	Proteína verde fluorescente (GFP) ( <i>Aquorea victoria</i> )	<i>J2R</i>	[210]
MVA-HCV	Genes del HCV, genotipo 1a, cepa H77	<i>J2R</i>	[183]
MVA-HCV $\Delta$ C6L	Genes del HCV, genotipo 1a, cepa H77	<i>J2R</i> , <i>C6L</i>	[211]
MVA-HCVmut	Genes del HCV, genotipo 1a, cepa H77 con NS3 mutada (S139A) y péptidos 2A entre NS3, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b	<i>J2R</i>	-

**Tabla 2.** VACV recombinantes utilizados en este estudio.

### 3.1.5. Plásmidos

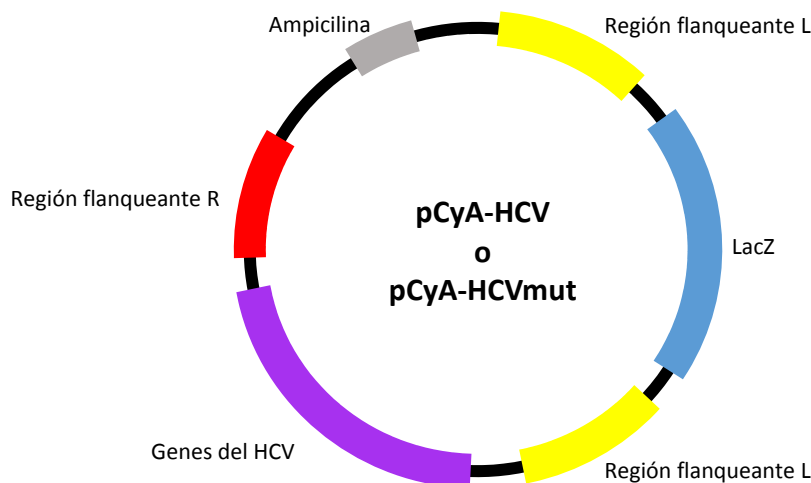
#### - Plásmidos de transferencia empleados para generar los virus MVA recombinantes

La estrategia seguida para generar los diferentes virus MVA recombinantes se basa en procesos de recombinación homóloga que ocurren dentro de la célula entre un plásmido de transferencia y el genoma viral. Para que ocurra este proceso, los plásmidos de transferencia deben contener diferentes elementos dependiendo de si van a dirigir la inserción de antígenos o la delección de genes en el MVA.

En el caso de plásmidos que van a dirigir la inserción de antígenos, contienen (**Figura 7**):

- Regiones flanqueantes a la zona de inserción deseada: Son secuencias que incluyen las regiones izquierda (L) y derecha (R) del gen TK de MVA y que se va a sustituir por nuestro antígeno de interés y las cuales conducirán los fenómenos de recombinación dentro de la célula.
- Antígenos de interés: Se encuentran entre las regiones flanqueantes L y R. De esta manera, como consecuencia de la recombinación, los antígenos de interés junto a un gen marcador de selección se insertarán en el genoma viral.
- Gen marcador de selección en cultivo celular: Se encuentra adyacente a los antígenos de interés, dentro de las regiones flanqueantes. Entre los antígenos de interés y el gen marcador se encuentra repetida otra zona de recombinación (región flanqueante L) que dará lugar a la posterior eliminación del gen marcador, produciéndose así virus recombinantes que contienen únicamente el antígeno de interés. En este trabajo se utilizó el gen marcador LacZ ( $\beta$ -galactosidasa) para seleccionar en cultivo celular los virus recombinantes intermedios que forman placas de lisis azules.
- Gen de selección en cultivo bacteriano: Para clonar y crecer los plásmidos, éstos contienen el gen de resistencia a ampicilina ( $\beta$ -Lactamasa) para seleccionar las bacterias transformadas con el mismo.

A continuación, se muestra un esquema de los diferentes elementos contenidos en estos plásmidos:



**Figura 7. Esquema representativo de los plásmidos de transferencia pCyA-HCV y pCyA-HCVmut.** Dentro de los antígenos del HCV clonados se incluyeron los genes del HCV desde Core hasta NS5b. L: izquierda; R: derecha.

Los plásmidos utilizados en este trabajo para generar virus MVA recombinantes fueron:

- pCyA-HCV: Vector empleado para generar el virus MVA-HCV. Los antígenos de interés son el genoma casi completo del HCV (Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b);

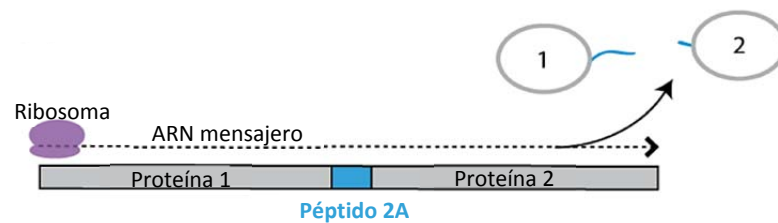
genotipo 1a, cepa H77), exceptuando la parte C-terminal de la proteína NS5b y las regiones no codificantes de los extremos. Las regiones flanqueantes son los extremos del locus TK del MVA, donde se dirigirá la inserción. Este plásmido fue generado y descrito previamente [183].

- pCyA-HCVmut: Vector empleado para generar el virus MVA-HCVmut. Los antígenos de interés son el genoma casi completo del HCV (Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b; genotipo 1a, cepa H77), exceptuando la parte C-terminal de la proteína NS5b y las regiones no codificantes de los extremos. Este plásmido es similar al pCyA-HCV con la excepción de que la proteína NS3 del HCV contiene una mutación puntual (S139A) y las proteínas NS4a, NS4b, NS5a y NS5b contienen en su región N-terminal una secuencia de péptidos autocatalíticos llamados péptidos 2A, que proceden de distintos virus de la familia de los Picornavirus (**Tabla 3**).

<b>Péptido 2A</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Localización en pCyA-HCVmut</b>	<b>Eficiencia de ruptura [212]</b>
<b>P2A</b>	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	<i>Porcine teschovirus-1</i>	Entre NS3-NS4a	100%
<b>T2A</b>	EGRGSLTTCGDVEENPGP	<i>Thosea asigna virus</i>	Entre NS4a-NS4b	90-97%
<b>E2A</b>	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	<i>Equine rhinitis A virus</i>	Entre NS4b-NS5a y NS5a-NS5b	99-100%

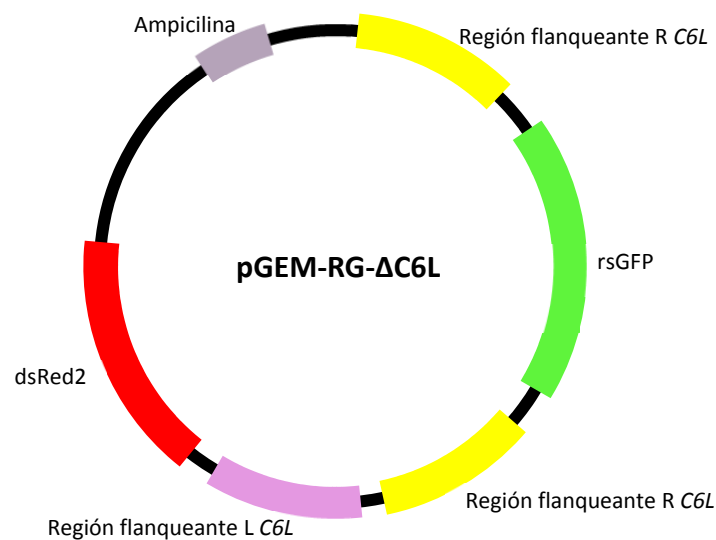
**Tabla 3. Secuencias peptídicas de los diferentes péptidos 2A.** La autocatálisis ocurre entre los aminoácidos G y P del extremo C-terminal del mismo.

Además, en el extremo N-terminal de estos péptidos se añadió la secuencia G-S-G para aumentar la eficiencia de la autocatálisis, la cual ocurre antes del último aminoácido (Prolina) [212]. De esta forma, los péptidos 2A producen una escisión estequiométrica de las diferentes proteínas codificadas [213] (**Figura 8**). Para generar este plásmido, se mandó a sintetizar a GeneArt (Invitrogen) la secuencia GSG-P2A-NS4a mientras que el resto de los péptidos 2A se introdujeron con los oligonucleótidos utilizados para generar el vector usando la estrategia Gibson Assembly (ver oligonucleótidos en **Tabla 5**).



**Figura 8. Traducción mediada por péptidos 2A.** Sistema de expresión policistónica para la coexpresión heteróloga de 2 o más proteínas situadas en tándem bajo un mismo promotor y marco de lectura. Se incluye una secuencia peptídica 2A viral entre las secuencias codificantes de Proteína 1 y Proteína 2 para inducir la "omisión de ribosoma" durante la traducción que conduce a la liberación cotraduccional de las 2 proteínas con una relación estequiométrica de 1:1. Adaptado de [213].

En el caso de plásmidos que van a dirigir la deleción de genes del MVA, en el presente trabajo se utilizó el plásmido pGEM-RG-ΔC6L, empleado para generar el virus MVA-HCV ΔC6L (**Figura 9**). Dirige la deleción del gen *C6L* del MVA (MVA019L) por recombinación homóloga. Este plásmido contiene 2 flancos derechos y uno izquierdo del gen *C6L* y los genes marcadores *dsRed2* y *rsGFP*, que nos permitirán seleccionar virus intermediarios Red2/GFP positivos, que serán eliminados posteriormente por recombinación homóloga para obtener finalmente el virus recombinante deseado. Este plásmido fue generado y descrito previamente [193].



**Figura 9. Esquema representativo del plásmido de transferencia pGEM-RG-ΔC6L.** L: izquierda; R: derecha.

#### - Plásmidos pcDNA

El plásmido pcDNA3.0(+) (Invitrogen) es un plásmido de expresión en células de mamíferos que contiene resistencia a ampicilina y kanamicina y un sitio de clonación múltiple tras un promotor de citomegalovirus (CMV). A partir de éste, se generó el plásmido pcDNA-NS3, que expresa la proteína NS3 del HCV, genotipo 1a, aislado H77, previamente descrito en [183]. Para



este estudio se generó el plásmido pcDNA-NS3mut, que contiene la mutación S139A en la proteína NS3. Todos estos plásmidos fueron empleados en experimentos *in vitro* y en las inmunizaciones en ratones.

#### - Plásmidos DREP

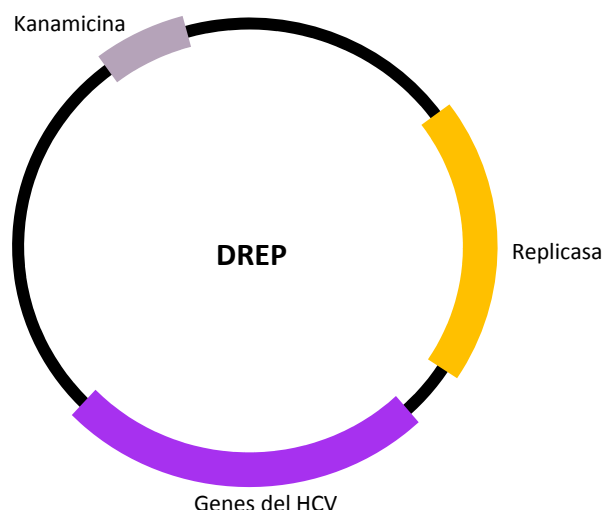
Los plásmidos DREP y DREP-e fueron cedidos por los Drs. Peter Liljeström y Karl Ljungberg del Instituto Karolinska de Estocolmo (Suecia). A partir de los mismos, se generaron los siguientes plásmidos DREP que expresan genes del HCV de genotipo 1a, cepa H77 (**Tabla 4**):

Plásmido DREP	Inserto del HCV
DREP-C-E1-E2	Genes Core, E1 y E2 del HCV
DREP-e-C-E1-E2	Genes Core, E1 y E2 del HCV Contiene un <i>enhancer</i> (e) translacional previo a los genes del HCV
DREP-p7-NS2-NS3	Genes p7, NS2 y NS3 del HCV
DREP-e-p7-NS2-NS3	Genes p7, NS2 y NS3 del HCV Contiene un <i>enhancer</i> (e) translacional previo a los genes del HCV

**Tabla 4. Plásmidos DREP generados en este estudio.**

Los plásmidos DREP contienen los siguientes elementos (**Figura 10**):

- Gen de selección en cultivo bacteriano: Para clonar y crecer los plásmidos, éstos contienen el gen de resistencia a kanamicina para seleccionar las bacterias transformadas con el mismo.
- Antígenos de interés: Expresados bajo un promotor subgenómico (SP) 26S del SFV. En este estudio se clonaron los genes del HCV descritos anteriormente (**Tabla 4**).
- Replicasa: Es una proteína del grupo de virus Alfavirus, expresada bajo un promotor de CMV.
- Potenciador de la traducción o *enhancer* (e): Los plásmidos denominados DREP-e contienen la secuencia de un *enhancer*, previamente descrito como un potenciador de la expresión de la proteína y de la respuesta humoral [202,203]. Consiste en los primeros 103 aminoácidos de la cápsida del SFV seguidos de un péptido autocatalítico F2A (perteneciente al virus de la fiebre aftosa). La secuencia completa del mismo se coloca aguas arriba y en la misma pauta de lectura que la proteína de interés (en este caso, Core o p7), y es la siguiente: 5'-NYIPTQTFYGRWRPRPAARPWPLQATPVAPVVNFDLLKLAGDVESNG-3'.



**Figura 10. Esquema representativo de los plásmidos DREP.** Dentro de los antígenos del HCV clonados se incluyeron los genes Core-E1-E2 o p7-NS2-NS3.

#### - Plásmidos empleados para la caracterización y purificación de proteínas recombinantes E2 del HCV

Se trata de plásmidos de expresión en células de mamífero denominados pPPI4, descritos previamente por Binley y colaboradores [214]. Los plásmidos utilizados para expresar diferentes variantes de la proteína soluble E2 del HCV fueron generados y cedidos por los Drs. Kwinten Sliepen y Rogier Sanders del Centro Médico Académico de Ámsterdam (Holanda) y contienen los siguientes elementos:

- Gen de selección en cultivo bacteriano: Para clonar y crecer los plásmidos, éstos contienen el gen de resistencia a ampicilina.
- Proteínas E2 del HCV, genotipo 1a, cepa H77: Estas proteínas recombinantes contienen en el extremo C-terminal una secuencia conectora o linker que une la proteína E2 con la secuencia de Strep-TagII (W-S-H-P-Q-F-E-K). Dichas proteínas E2 recombinantes generadas carecen de la región MPER, que consiste en una zona altamente hidrofóbica que fue eliminada de la secuencia para evitar la formación de micelas en el sobrenadante de células transfectadas.

#### - Otros plásmidos

Para analizar la capacidad inhibitoria del IFN por parte de la proteína NS3 del HCV y del mutante de NS3 (S139A) generado se utilizaron los siguientes plásmidos cedidos por el Dr. Pablo Gastaminza (CNB): pLucTER (pIFN- $\beta$ -Luc), plásmido con el gen marcador de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) controlado por la región promotora completa del gen de IFN- $\beta$  [215]; y pRL-null, plásmido de expresión del gen reportero de la luciferasa de Renilla (*Renilla*

*reniformis*) conducido por el promotor mínimo TATA box (Promega). Este segundo plásmido fue utilizado como control para normalizar la eficiencia de transfección.

Para estudiar la reactividad cruzada de los anticuerpos presentes en sueros de ratones inmunizados, se utilizaron diferentes plásmidos de expresión en mamíferos (pCMV) que codifican las proteínas Core-E1-E2 de los genotipos 1a, 2a, 3a, 4a, 5 y 6 del HCV, y que fueron cedidos por el Dr. Pablo Gastaminza (CNB).

### 3.1.6. Ratones

Todos los ratones utilizados en este trabajo fueron hembras de la cepa C57BL/6J0laHsd (Envigo), de entre 6-8 semanas de edad al inicio del experimento.

La utilización de animales en el presente trabajo se llevó a cabo de acuerdo al Real Decreto RD53/2013 y los procedimientos de trabajo han sido aprobados por el comité de ética de experimentación animal del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) y la Comunidad de Madrid (número de proyecto: PROEX 331/14).

## 3.2. Reactivos

### 3.2.1. Oligonucleótidos

En la siguiente tabla se muestran los distintos oligonucleótidos utilizados para procesos de clonación, secuenciación y generación de virus recombinantes, así como los usados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar contaminación con micoplasma.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')
<b>Oligonucleótidos utilizados para amplificar y secuenciar genes del HCV en MVA</b>	
TK-L	TGATTAGTTTGATGCGATTC
TK-R	TGTCCTTGATACGGCAG
Core-F	ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACC
Core-R	GGCTGAAGCGGGCACAGTCAGGC
Coreint1-R	CGAGGTTGCGACCGCTCGGAAGTCTTCC
E1-F	CTGGACGACGCAAGACTGCAATTGTTT
E1-R	CGCGTCGACGCCGGCAAATAGCAGCAGC
E1new-F	TACCAAGTGCGCAATTCCTCGGGGC
E2-F	GAAACCCACGTCACCGGGGAAGTGCCGG
E2-R	CGCCTCCGCTTGGGATATGAGTAACATC
E2int-F	TACACCATATTCAAAGTCAGGATGTACG
NS2-F	GACACGGAGGTGGCCGCGTCGTGTGGC
NS2int-F	CTCAACGTCCGGGGGGGGCGCGATGCCG
NS3-F	GCGCCCATCACGGCGTACGCCCAGC
NS3-R	CGTGACGACCTCCAGGTCGGCCGACATGC
NS3int1-F	GTGGACCAAGACCTTGTGGGCTGGCCCG
NS3int2-F	TGGGCATCGGCACTGTCTTGACCAAGC
NS3int3-F	AATTTTGGGAGGGCGTCTTTACGGGC
NS4b-F	TTCAAGCAGAAGGCCCTCGGCCTCCTGC

NS4bint-F	ATTCATCAGTGGGATAACAATACTTGGC
NS5-F	TCCCGGGGAACCATGTTTCCCCACGC
NS5int1-F	GGTTCCTGGCTAAGGGACATCTGGG
NS5int2-F	CCAACCATGACTCCCCTGACGCCGAGC
NS5int3-R	GGCTTTTTCCACGTCTCTACTAGCGGGGGG
NS5int4-F	TTTGACAGACTGCAAGTTCTGGACAGCC
NS5int5-R	CAGTTGTGGCATGAGCTTGGCTTTCAGCC
<b>Oligonucleótidos utilizados para clonar y secuenciar genes del HCV en vectores DREP</b>	
DREP-univ-F	CCGCTTTCGAACCTAGGAGCTTAATTCCG
DREP-univ-R	CCGCGGGATCGACTAGTGAACCTCGAGTTCCC
DREP-ye-R	GCCATCCGAGTGGACGTGCGTC
DREP-e-Rev	GGGCCAGGGTTGGACTCGACGTCTCCC
DREP-CE2-F	GTTCACTAGTCGATCCCGCGGATGAGCACGAATCCTAAACC
DREP-e-CE2-F	GAGTCCAACCCTGGGCCAGCACGAATCCTAAACC
DREP-CE2-R	GCTCCTAGGTTCGAAAGCGGTCACGCCTCCGCTTGGG
DREP-p7NS3-F	GTTCACTAGTCGATCCCGCGGATGGCTTTGGAGAACCCTCG
DREP-e-p7NS3-F	GAGTCCAACCCTGGGCCGCTTTGGAGAACC
DREP-p7NS3-R	GCTCCTAGGTTCGAAAGCGGTCACGTGACGACCTCCAGGTCCG
<b>Oligonucleótidos utilizados para mutar NS3</b>	
pcDNA3-NS3Mut-F	CTACTTGAAAGGCTCCGCGGGGGTCCGCTG
pcDNA3-NS3Mut-R	CAGCGGACCCCCGCGGAGCCTTCAAGTAG
<b>Oligonucleótidos utilizados para clonar y secuenciar genes del HCVmut<sup>a</sup></b>	
GB-pCyA-R	GCGCGCCTTGTCTAGATTCTCCCGGGTAGCTAGTTAATTA
GB-NS5b-F	TACGCTTTGTTGAAACTCGCTGGCGATGTTGAAAGTAACCCCGTCTTC AATGTCTTATTCTGG
GB-E/L-Core	TCTAGACAAGGCGCGCCAAAAATTGAAATTTTATT
GB-NS2-R	GCGTACGCCGTGATGGGCGCCAGCAACCTCCACCCCTTGG
GB-NS4b-F	GTCTGCTAACATGCGGTGACGTGAGGAGAATCCTGGACCTTCTCAGCA CTTACCGTACATCG
GB-NS4b-R	CGAGTTTCAACAAAGCGTAGTTAGTACATTGGCCGGAGCCGCATGGAGT GGTACACTCC
GB-NS5a-F	CGCTTTGTTGAAACTCGCTGGCGATGTTGAAAGTAACCCCGTCTTCCG GTTCTGGCTAAGG
GB-NS5a-R	GTTTCAACAAAGCGTAGTTAGTACATTGGCCGGAGCCGCAGCACACGAC ATCTTCCGTGTCG
GB-NS3-F	AAGGGGTGGAGGTTGCTGGCGCCATCACGGCGTACG
GB-NS4a-R	TCACCGCATGTTAGCAGACTTCTCTGCCCTCGCCGGAGCCGCACTCTTCC ATCTCGTCG
NS3toGP2A-NS4a-F	GGTCGTACGGGCAGCGGCCACCAAC
pcDNA3toGP2A-NS4a-R	GCCGTTACTAGTGGATCCTCAGCACTCTTCCATCTCGTCGA
pcDNA3-F	GGATCCACTAGTAACGGCCGCC
pcDNA3-R	GGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTGG
pcDNAtoNS3-F	TTGGTACCGAGCTCGGATCCATGGCGCCCATCACGG
GP2AtoNS3-R	TGGCGCCGCTGCCCGTGACGACCTCCAGGTCCGGC
<b>Oligonucleótidos utilizados para confirmar la delección del gen C6L</b>	
RFC6L-AatII-F	CTCGTCGACGTCCGACCAATCTGGGC
LFC6L-BamHI-R	GTTGTTGGATCCATTGGTAGATGACG
<b>Oligonucleótidos utilizados para comprobar contaminación con micoplasma</b>	
MycA	GGCGAARGGGTGAGTAACACG

<b>MycB</b>	CGGATAACGCTTGCGACCTATG
<b>Oligonucleótidos utilizados para la realización de RT-PCRs</b>	
<b>IFN-β sentido</b>	GATTCATCTAGCACTGGCTGG
<b>IFN-β antisentido</b>	CTTCAGGTAATGCAGAATCC
<b>IFIT1 sentido</b>	TTGCCTGGATGTATTACCAC
<b>IFIT1 antisentido</b>	GCTTCTTGCAAATGTTCTCC
<b>IFIT2 sentido</b>	ACAAGGCCATCCACCACTTTAT
<b>IFIT2 antisentido</b>	CCCAGCAATTCAGGTGTTAACA
<b>TNF-α sentido</b>	CACCACTTCGAAACCTGGGA
<b>TNF-α antisentido</b>	CACTTCACTGTGCAGGCCAC
<b>HPRT sentido</b>	GAACGTCTTGCTCGAGATGTG
<b>HPRT antisentido</b>	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATT

**Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.** <sup>a</sup> En este apartado sólo se muestran aquellos oligonucleótidos distintos y adicionales al apartado “Oligonucleótidos utilizados para amplificar y secuenciar genes del HCV en MVA”.

### 3.2.2. Péptidos y proteínas comerciales

Los péptidos del HCV utilizados para la estimulación de los esplenocitos en los ensayos *ex vivo* son del genotipo 1a, cepa H77, y fueron obtenidos de BEI Resources (Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas, Institutos Nacionales de Salud, Estados Unidos). Los péptidos tienen una longitud de entre 15 y 18 aminoácidos y una región de solapamiento con el péptido siguiente de 11 aminoácidos, cubriendo todas las regiones antigénicas de las proteínas del HCV incluidas en los vectores utilizados en este estudio. Cada péptido se resuspendió siguiendo las recomendaciones del fabricante y fueron agrupados por proteínas: Core (28 péptidos), E1 (29 péptidos), E2 (56 péptidos), p7 (8 péptidos), NS2 (32 péptidos), NS3 (98 péptidos), NS4 formado por NS4a (7 péptidos) más NS4b (40 péptidos), y NS5 formado por NS5a (71 péptidos) más NS5b (91 péptidos). Todos los grupos de péptidos se dejaron a una concentración final de 1 mg/ml.

La proteína E2 utilizada en los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) corresponde también al genotipo 1a, cepa H77. Fue adquirida en Sino Biological y se utilizó a una concentración de 2 µg/ml.

### 3.2.3. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este estudio se resumen en la siguiente tabla:

<b>Anticuerpo</b>	<b>Características</b>	<b>Procedencia</b>
<b>Anticuerpos primarios</b>		
<b>Conejo α WR</b>	Anticuerpo policlonal frente a las proteínas de la cepa Western Reserve (WR) del VACV	Centro Nacional de Biotecnología
<b>Conejo α E3</b>	Anticuerpo policlonal frente a la proteína de 28 kDa (E3) del VACV	Cedido por el Dr. B. Jacobs y el Dr. B. Moss

Humano $\alpha$ HCV	Anticuerpo policlonal frente a todas las proteínas del HCV	Cedido por el Dr. Rafael Fernández Muñoz
Ratón $\alpha$ Core	Anticuerpo monoclonal frente a la proteína Core del HCV, genotipo 1a	ThermoFisher Scientific
Humano $\alpha$ E2 AP33	Anticuerpo monoclonal frente a la proteína E2 del HCV	Cedido por el Dr. Rogier Sanders
Humano $\alpha$ E2 AT12-009	Anticuerpo monoclonal frente a la proteína E2 del HCV	[216]
Humano $\alpha$ E2 AT12-011	Anticuerpo monoclonal frente a la proteína E2 del HCV	[216]
Ratón $\alpha$ E2 H84.26	Anticuerpo monoclonal frente a la proteína E2 del HCV	Cedido por el Dr. Rogier Sanders
Humano $\alpha$ CD81.LeL	Anticuerpo monoclonal quimérico fusionado a una parte (LeL, del inglés, <i>large extracellular loop</i> ) del receptor celular CD81	Cedido por el Dr. Rogier Sanders
Ratón $\alpha$ E1	Anticuerpo monoclonal frente a la proteína E1 del HCV, genotipo 1a	Abcam
Cabra $\alpha$ E2	Anticuerpo monoclonal frente a la proteína E2 del HCV, genotipo 1a	Abcam
Ratón $\alpha$ NS3	Anticuerpo monoclonal frente a la proteína NS3 del HCV, genotipo 1a	Santa Cruz
Ratón $\alpha$ NS5a	Anticuerpo monoclonal frente a la proteína NS5a del HCV, genotipo 1a	Abcam
Ratón $\alpha$ $\beta$ -actina	Anticuerpo monoclonal frente a la proteína celular $\beta$ -actina	Cell Signalling
Conejo $\alpha$ P-PKR	Anticuerpo monoclonal frente a la proteína PKR fosforilada en Treonina 446	Abcam
Ratón $\alpha$ PKR	Anticuerpo monoclonal frente a la proteína PKR	Santa Cruz
Ratón $\alpha$ P-eIF2 $\alpha$	Anticuerpo monoclonal frente a la proteína eIF2 $\alpha$ fosforilada en Serina 52	ThermoFisher Scientific
Ratón $\alpha$ eIF2 $\alpha$	Anticuerpo monoclonal frente a la proteína eIF2 $\alpha$	Santa Cruz
Ratón $\alpha$ StrepTag	Anticuerpo monoclonal frente a la secuencia de aminoácidos NWSHPQFEK de la estreptavidina	Gen Script
Cabra $\alpha$ IgG de ratón	Anticuerpo policlonal frente a IgG total de ratón	Southern Biotechnology
Cabra $\alpha$ IgG1 de ratón	Anticuerpo policlonal frente al subtipo IgG1 de ratón	Southern Biotechnology
Cabra $\alpha$ IgG2a de ratón	Anticuerpo policlonal frente al subtipo IgG2a de ratón	Southern Biotechnology
Cabra $\alpha$ IgG2c de ratón	Anticuerpo policlonal frente al subtipo IgG2c de ratón	Invitrogen
Cabra $\alpha$ IgG3 de ratón	Anticuerpo policlonal frente al subtipo IgG3 de ratón	Southern Biotechnology
<b>Anticuerpos secundarios</b>		
Cabra $\alpha$ IgG de ratón-HRP	Anticuerpo policlonal frente a IgG de ratón conjugado con peroxidasa	Merck
Ratón $\alpha$ IgG de cabra-	Anticuerpo policlonal frente a IgG de cabra	Merck

HRP	conjugado con peroxidasa	
Cabra $\alpha$ IgG de conejo-HRP	Anticuerpo policlonal frente a IgG de conejo conjugado con peroxidasa	Merck
Cabra $\alpha$ IgG de humano-HRP	Anticuerpo policlonal frente a IgG de humano conjugado con peroxidasa	Merck
<b>Anticuerpos conjugados (citometría de flujo)</b>		
Hámster $\alpha$ CD3e ratón-PE-CF594	Anticuerpo monoclonal frente a CD3 conjugado con PE-CF594, clon 145-2C11	BD Biosciences
Rata $\alpha$ CD4 de ratón-APC-Cy7	Anticuerpo monoclonal frente a CD4 conjugado con aloficocianina-Cy7, clon GK1.5	BD Biosciences
Rata $\alpha$ CD8a de ratón-V500	Anticuerpo monoclonal frente a CD8 conjugado con V500, clon 53-6.7	BD Biosciences
Rata $\alpha$ CD62L de ratón-Alexa700	Anticuerpo monoclonal frente a CD62L conjugado con Alexa Fluor 700, clon MEL-14	BD Biosciences
Rata $\alpha$ CD127 de ratón-PerCPCy5.5	Anticuerpo monoclonal frente a CD127 conjugado con PerCPCianina5.5, clon A7R34	BD Biosciences
Rata $\alpha$ IL-2 de ratón-APC	Anticuerpo monoclonal frente a IL-2 conjugado con aloficocianina, clon JES6-5H4	BD Biosciences
Rata $\alpha$ IFN- $\gamma$ de ratón-PECy7	Anticuerpo monoclonal frente a IFN- $\gamma$ conjugado con ficoeritrina-cianina 7, clon XMG1.2	BD Biosciences
Rata $\alpha$ TNF- $\alpha$ de ratón-PE	Anticuerpo monoclonal frente a TNF- $\alpha$ conjugado con ficoeritrina, clon MP6-XT22	eBioscience
Rata $\alpha$ CD107a de ratón-FITC	Anticuerpo monoclonal frente a CD107 conjugado con isotiocianato de fluoresceína, clon 1D4B	BD Biosciences
Hámster $\alpha$ CD11c de ratón-FITC	Anticuerpo monoclonal frente a CD11c conjugado con isotiocianato de fluoresceína, clon HL3	BD Biosciences
Rata $\alpha$ Ly6G de ratón-PE	Anticuerpo monoclonal frente a Ly6G conjugado con ficoeritrina, clon 1A8	BD Biosciences
Rata $\alpha$ CD11b de ratón-PECy7	Anticuerpo monoclonal frente a CD11b conjugado con ficoeritrina-cianina 7, clon M1/10	BioLegend
Rata $\alpha$ F4/80 de ratón-APC	Anticuerpo monoclonal frente a F4/80 conjugado con aloficocianina, clon BM8	eBioscience
Rata $\alpha$ CD19 de ratón-APC-Cy7	Anticuerpo monoclonal frente a CD19 conjugado con aloficocianina-Cy7, clon ID3	BD Biosciences
Estreptavidina-eFluor 450	Fluorocromo eFluor 450 conjugado con estreptavidina que se une a anticuerpos primarios biotinilados	eBiosciences
Rata $\alpha$ CD45 de ratón-Violeta brillante 570	Anticuerpo monoclonal frente a CD45 conjugado con Violeta brillante 570, clon 30F11	BioLegend
Rata $\alpha$ CD4 de ratón-PE	Anticuerpo monoclonal frente a CD4 conjugado con ficoeritrina, clon GK1.5	Beckman Coulter
Rata $\alpha$ CD8a de ratón-PECy7	Anticuerpo monoclonal frente a CD8 conjugado con ficoeritrina-cianina 7, clon 53-6.7	BioLegend
Rata $\alpha$ NKP46 de ratón-	Anticuerpo monoclonal frente a NKP46	BioLegend

APC	conjugado con aloficocianina, clon 29A1.4	
Rata $\alpha$ CD3 de ratón-APC-Cy7	Anticuerpo monoclonal frente a CD3 conjugado con aloficocianina-Cy7, clon 17A2	BioLegend
Rata $\alpha$ CD16/CD32 de ratón (Fc block)	Anticuerpo monoclonal frente a CD16 y CD32, clon 2.46	BD Biosciences

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo.

### 3.2.4. Tampones

En el presente trabajo se han utilizado los siguientes tampones:

- **PBS (1X)**: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  8 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM.
- **PBS-staining**: PBS 1X, BSA 0.5%, FCS 1%, azida sódica 0.0065% y EDTA 2 mM.
- **Tampón IB**: PBS 1X, FCS 2% y EDTA 2mM.
- **Tampón de carga de ADN**: Xylen-cyanol 0.25%, glicerol 30% y azul de bromofenol 0.25%.
- **Tampón Proteinasa K**: Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM y SDS 1%.
- **Tampón de carga (Laemmli 1X)**: Tris-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.012%.
- **Tampón de electroforesis para SDS-PAGE**: Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%.
- **Tampón de transferencia para SDS-PAGE**: Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8.3.
- **TBE**: Tris-Borato 90 mM pH 8.3 y EDTA 2 mM.
- **TBS**: Tris Base 0.5 M pH 8.4 y NaCl 9%.
- **BXT**: Tris-HCl 100 mM pH 8, 150 mM NaCl, 1mM EDTA y 50 mM biotina.
- **Tampón W**: Tris-HCl 100 mM pH 8, 150 mM NaCl y 1mM EDTA.
- **Tampón RBS**: Tris-HCl 10 mM pH 7.8, NaCl 10 mM y  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM.

## 3.3. Métodos

### 3.3.1. Técnicas de manipulación de ADN

Las técnicas de manipulación de ADN empleadas se han llevado a cabo según la metodología descrita en el libro *Molecular cloning: a laboratory manual* [209].

#### 3.3.1.1. Purificación de ácidos nucleicos

##### - Purificación de ADN plasmídico a partir de un cultivo de bacterias

Para la extracción del ADN plasmídico de un cultivo de bacterias, éstas fueron crecidas en LB o TB (en el caso de los replicones DREP) y posteriormente se extrajo el ADN mediante los kits Plasmid *mini/maxi/endo-free mega* (Qiagen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.



#### - Purificación de ADN genómico de células infectadas en cultivo

Esta técnica se utilizó para obtener el ADN viral y celular y comprobar la pureza de los virus recombinantes. Para ello, las células infectadas se recogieron cuando se observó efecto citopático y se centrifugaron a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos (min) a temperatura ambiente. El sobrenadante se retiró, el precipitado se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH 8 y se añadió proteinasa K (200 µg/ml, Roche) en su tampón correspondiente. Tras 1 hora de incubación a 55°C, se añadió RNAsa A (40 µg/ml, PanReac AppliChem) y se incubó 30 min a 37°C. A continuación, se añadió NaCl saturado y se mezcló invirtiendo el tubo. Después se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se mezcló con isopropanol en una proporción 1:0.7 para precipitar el ADN. La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y el precipitado se lavó con etanol al 75%, centrifugándose de nuevo a 13000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, el sobrenadante se retiró cuidadosamente y se dejó secar el ADN precipitado a temperatura ambiente tras lo cual se resuspendió en agua destilada estéril.

#### - Purificación de fragmentos de ADN

La purificación de ADN procedente de geles de agarosa o reacciones de PCR se llevó a cabo con el kit Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### - Purificación de ARN

La purificación de ARN de los cultivos celulares para realizar RT-PCRs se llevó a cabo usando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La purificación de ARN de los cultivos celulares para realizar microarrays se llevó a cabo usando TRIzol® (ThermoFisher Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La concentración de ADN, ARN y de proteína purificada se midió en todos los casos usando NanoDrop (ThermoFisher Scientific). En el caso de proteína, se tuvo siempre en cuenta el coeficiente de extinción de la misma.

#### **3.3.1.2. Geles de Agarosa**

Para visualizar los distintos fragmentos de ADN se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1% (Conda), utilizando 1% SYBR Safe (Invitrogen) como agente intercalante.

#### **3.3.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La técnica PCR se utilizó para amplificar fragmentos de ADN para su posterior clonación o para la comprobación de la inserción/delección de genes en el genoma del MVA o en ADN plásmídico. La polimerasa utilizada fue la Phusion® High Fidelity (NewEngland Biolabs) con sus

correspondientes tampones y reactivos y siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cantidad de ADN molde fue 10 ng, los oligonucleótidos se añadieron a una concentración de 0.4  $\mu$ M por reacción y los desoxinucleótidos trifosfato a 0.2 mM (Roche Diagnostics GmbH). La temperatura empleada para el anillamiento se eligió en función de los oligonucleótidos y el tiempo de extensión empleado dependió de la longitud del fragmento a amplificar. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Veriti™ 96-well (Applied Biosystems).

#### **3.3.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)**

Para llevar a cabo las RT-PCRs se utilizó 1  $\mu$ g de ARN total de células infectadas y se llevó a cabo su conversión a ADNc (RT) con el kit *Reverse Transcription* (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. A continuación, se llevó a cabo una PCR en condiciones estándar utilizando SYBR Green (Applied Biosystems) y los correspondientes oligonucleótidos sobre una placa de 96 pocillos (M96) (MicroAmp Optical, Applied Biosystems) en el aparato de 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

#### **3.3.1.5. Clonación y generación de plásmidos**

Todos los procesos de clonación se llevaron a cabo con la técnica y el kit de Gibson® Assembly (NewEngland Biolabs) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Resumidamente, tanto el vector como el inserto fueron amplificados por PCR utilizando oligonucleótidos solapantes (alrededor de 20 pb). A continuación, se comprobaron las amplificaciones en un gel de agarosa y, en caso de ser correctas, se procedió a incubar el producto de PCR con la enzima DpnI (NewEngland Biolabs) durante 1 hora a 37°C. Después, se purificó el ADN amplificado y digerido y se resuspendió en agua destilada estéril. Una vez medida la concentración de ADN del vector y del inserto, se continuó con la reacción de Gibson® durante 1 hora a 50°C. Finalmente, bacterias electrocompetentes DH10B de *Escherichia coli* fueron transformadas, crecidas durante 1 hora en LB sin antibiótico, añadidas en placas de Petri con LB-Agar con el antibiótico correspondiente e incubadas durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se seleccionaron varias colonias y se comprobó si eran positivas o no mediante la extracción de su ADN plasmídico siguiendo el protocolo mencionado anteriormente (apartado 3.3.1.1) y posterior PCR.

#### **3.3.1.6. Transfección transitoria de células en cultivo**

Para transfectar células en cultivo y comprobar la correcta expresión de las proteínas codificadas por los plásmidos, células HEK-293T fueron cultivadas hasta un 65% de confluencia, y se transfectaron con el plásmido correspondiente utilizando el reactivo PEI Max (1  $\mu$ g/ $\mu$ l,

Polysciences) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La mezcla ADN-PEIMax fue añadida al medio DMEM-10% FCS en el que se habían sembrado las células previamente.

Para transfectar células en cultivo posteriormente a la infección con virus MVA, células DF-1 se cultivaron hasta un 80-90% de confluencia en placas p60, se infectaron con virus MVA y tras 1 hora de adsorción se transfectaron con 15 µg del plásmido de transferencia correspondiente utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. A continuación, las células se incubaron durante 5 horas en medio Opti-MEM sin suero, y posteriormente se lavaron con Opti-MEM dos veces y se añadió medio de infección.

### **3.3.1.7. Microarrays**

El ensayo de microarrays se realizó sobre células moDCs infectadas con virus MVA. Tras obtener las moDCs (apartado 3.3.4.1), éstas fueron infectadas a una multiplicidad de infección (MDI) de 1 unidad formadora de placa (UFP)/célula con los virus correspondientes. Tras 6 horas, las células se recogieron, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4°C y el ARN se extrajo usando TRIzol.

Posteriormente, los microarrays fueron realizados por el servicio de genómica del CNB utilizando arrays de Agilent de 1 color 4x44K (G2519F\_026652, Agilent Technologies) y partiendo de una cantidad de ARN de 4.5 µg. Una vez hibridados, los arrays fueron escaneados con una resolución de 3 mm con el escáner de Agilent (G2565BA, Agilent Technologies), y las imágenes fueron analizadas con el programa de Agilent. El fondo obtenido fue corregido y las muestras fueron normalizadas utilizando LIMMA, como se describe en [217,218]. Una vez obtenidos los resultados de expresión génica, éstos fueron analizados mediante la herramienta online FIESTA VIEWER (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA/index.php>), proporcionada por el CNB y utilizando como parámetros de filtro FDR (del inglés, *False Discovery Rate*)  $\text{Prod} < 0.05$  (para el análisis de los distintos virus frente al *Mock*) y  $p \text{ value Limma} < 0.5$  (para la tabla de comparación entre virus MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta\text{C6L}$ ). En ambos casos se cribó también por niveles de expresión (*fold change*)  $\geq 2$  ó  $\leq -2$ . Los métodos de esta técnica están escritos detalladamente en [211].

## **3.3.2. Técnicas de manipulación de proteínas**

### **3.3.2.1. Determinación de la cantidad total de proteína de extractos de células**

Para estimar la cantidad de proteína total presente en extractos de células HEK-293T transfectadas con los distintos plásmidos que expresan diferentes proteínas del HCV, se recogieron las células a 36 horas post-transfección y se lavaron 2 veces con PBS 1X frío. A continuación, se procedió a lisarlas utilizando el tampón RBS ( $60 \times 10^6$  cells/ml) durante 15 min

en hielo. Posteriormente, se añadió NP-40 (Merck) al 5%, diluido en RBS, y se volvió a dejar 15 min en hielo. Después, los extractos se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min a 4°C y se obtuvo el sobrenadante donde se encuentran las proteínas, que se transfirió a un eppendorf nuevo. A continuación, se realizó una última centrifugación a 10000 rpm durante 10 min a 4°C y se obtuvo el sobrenadante. Por último, se procedió a cuantificar la cantidad total de proteína utilizando el kit de BCA (ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los extractos de proteína se almacenaron a -70°C.

### **3.3.2.2. Análisis de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) e inmunodetección en membrana (Western blot)**

Las muestras de células infectadas o transfectadas fueron recogidas, centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y el precipitado fue resuspendido en Laemmli 1X- $\beta$ -mercaptoetanol. A continuación, las muestras fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 8 o 10 % en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) y fueron separadas mediante electroforesis monodimensional (100 V, 90 min aproximadamente, temperatura ambiente) en condiciones desnaturizantes (calentándolas previamente a 90°C durante 10 min), según el protocolo descrito en el libro de *Molecular cloning: a laboratory manual* [209].

En el caso de las células transfectadas con los plásmidos codificantes para las distintas proteínas E2 solubles generadas, se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4°C para separarlos de las células que pudieran estar presentes. A continuación, se realizaron ensayos de inmunodetección en membrana o *Western blot* (WB) en condiciones desnaturizantes reductoras (añadiendo a las muestras ditioneitol (DTT) (ThermoFisher Scientific) y calentándolas a 90°C durante 10 min) o desnaturizantes no reductoras (sin DTT) y se cargaron en geles comerciales (4-12% Tris-Glycine NOVEX®, Invitrogen). A continuación, las proteínas presentes en las muestras fueron separadas por electroforesis monodimensional (200 V, 30 min aproximadamente, 4°C).

Una vez terminada la electroforesis, los geles SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare) siguiendo el protocolo de sistema húmedo recomendado por el fabricante (Mini Trans-Blot® Cell, Bio-Rad) y con el tampón de transferencia anteriormente descrito en el apartado 3.2.4. El gel y la membrana de nitrocelulosa, previamente hidratada, se colocaron entre dos papeles Whatman-3MM® (GE Healthcare) también hidratados. La transferencia se realizó a una intensidad de corriente de 100 V durante 50 min. Una vez acabada, se comprobó la presencia de proteínas tiñendo la membrana con el colorante reversible Rojo Ponceau (Sigma).

A continuación, la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con 5% de leche desnatada en polvo disuelta en TBS/PBS-Tween-20 0.05% (Sigma) durante 1 hora en agitación suave a temperatura ambiente. Después, se añadió el anticuerpo primario diluido en el medio de bloqueo y se dejó hasta el día siguiente en agitación a 4°C. Al día siguiente, las membranas se lavaron 2 veces con TBS/PBS-Tween-20 0.05% y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario (diluido en el medio de bloqueo) en agitación a temperatura ambiente. Después, las membranas se lavaron 4 veces con TBS/PBS-Tween-20 0.05% y se revelaron con el sistema luminol ECL<sup>®</sup> (Amersham), exponiendo una película autoradiográfica Carestream Kodak BioMax XAR (Kodak) o directamente en el aparato ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad).

Los geles realizados con proteínas purificadas fueron observados tras la tinción con azul Coomassie del gel.

### **3.3.2.3. Análisis de proteínas en geles nativos**

Para comprobar la formación de complejos proteicos por parte de las proteínas E2 diseñadas y producidas, se llevaron a cabo geles nativos (4-12% Bis Tris Gel NuPage™, Invitrogen). Para ello, los sobrenadantes de las células transfectadas durante 48 horas con los distintos plásmidos se cargaron en geles nativos previa mezcla con Ácido Morfolino Propano Sulfónico (MOPS) (Merck). La electroforesis se realizó utilizando tampones de Ánodo y Cátodo (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante y el WB se llevó a cabo tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

Los geles nativos realizados con proteínas purificadas fueron teñidos utilizando el kit *Colloidal Blue Staining* (Life Technologies).

### **3.3.2.4. Producción, purificación y cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) de proteínas**

Una vez seleccionadas las proteínas solubles E2 con las características deseadas, se procedió a su producción a gran escala para purificarlas y separarlas en fracciones de distinto tamaño. Para ello,  $0.8-1.2 \times 10^6$  células HEK-293F/ml se transfectaron con PEI<sub>max</sub> y 300 µg de plásmido correspondiente y se dejaron creciendo en agitación a 125 rpm en un incubador a 37°C y 8% de CO<sub>2</sub> en medio FreeStyle durante 6 días. Transcurrido este tiempo, se procedió a obtener los sobrenadantes que contienen la proteína soluble producida mediante el protocolo descrito previamente en [219]. Resumidamente, los sobrenadantes fueron centrifugados para separarlos de las células y posteriormente se filtraron (filtros Steritops de 0.22 µm de poro; Millipore) aplicando vacío y manteniendo en todo momento la temperatura a 4°C. A continuación, a los sobrenadantes filtrados se le añadieron 50 ml de tampón W 10X (tampón de lavado) y 2 ml de Biolock (Iba) y se incubaron en hielo durante 15 min. Posteriormente, se

añadieron a columnas Strep-Tactin® XT (Iba) previamente tratadas siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los sobrenadantes se pasaron dejando gotear a una velocidad media de 0.5-1 ml/min y a 4°C hasta que todo el sobrenadante pasó por la columna. Debido a que estas columnas tienen afinidad específica para StrepTagII, las proteínas de interés quedan retenidas por las mismas y el resto de elementos del sobrenadante atraviesan la columna y son posteriormente desechados. A continuación, las columnas fueron lavadas varias veces con tampón W 1X y se procedió a eluir la proteína con 12 ml del tampón BXT (Iba). Las columnas fueron regeneradas siguiendo las recomendaciones del fabricante y las proteínas fueron concentradas usando columnas Vivaspin6 10 kDa (Sartorius) manteniéndolas en el tampón final 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl.

A continuación, se realizó la técnica de cromatografía líquida de la proteína rápida (FPLC) (columna Superdex™200 10/300 GL, Gelifesciences; máquina NGC Chromatography system, Bio-Rad) utilizando la proteína concentrada que se separó en diferentes fracciones según su tamaño y que fueron congeladas a -70°C en 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl para su posterior utilización.

### **3.3.2.5. Dispersión dinámica de luz (DLS)**

Para la caracterización del tamaño de las fracciones de las proteínas solubles E2 seleccionadas para las inmunizaciones en ratones, se utilizó la técnica DLS con el aparato Dynapro Nanostar (Wyatt Technologies) con 10 adquisiciones cada 5 segundos. Para ello, 2.5 µg de cada fracción se colocaron en cubetas para medir el tamaño de las partículas por DLS, y cada medición se tomó por duplicado. El radio hidrodinámico se calculó utilizando el programa Dynamics Analysis, asumiendo modelo esférico, tal y como se describe en [219].

### **3.3.3. Técnicas de manipulación de virus**

#### **3.3.3.1. Infecciones virales**

Todos los virus fueron mantenidos a -80°C y descongelados a 37°C en baño previo a su utilización. Una vez descongelados, se agitaron con vórtex y se sonicaron con un programa de 3 ciclos de 10 segundos de sonicación y 10 segundos de pausa (Sonicador Misonix Incorporated S-3000, Cole-Parmer). Tras la sonicación, se agitaron con vórtex de nuevo y se procedió a preparar el inóculo de virus con la MDI deseada. Las infecciones se llevaron a cabo durante 1 hora (hora de adsorción del virus) a 37°C, tras la cual el inóculo fue retirado y se añadió el medio de infección en el cual se mantendrán las células el tiempo de infección deseado.

### 3.3.3.2. Generación de VACV recombinantes

En el presente trabajo se generaron 2 VACV recombinantes, uno de inserción (MVA-HCVmut) y otro de delección (MVA-HCV  $\Delta$ C6L). La generación de ambos virus se realizó en células DF-1.

Para la generación de MVA-HCVmut, se utilizó MVA-PS-GFP como virus parental, previamente descrito [210], el cual expresa la proteína GFP desde el locus TK, lo cual facilita la generación de recombinantes a partir del mismo, puesto que las distintas placas de lisis generadas por los virus recombinantes intermediarios pueden visualizarse fácilmente por la presencia/ausencia de fluorescencia. La monocapa de células DF-1 cultivadas en placas p60 (Nunc) al 80-90% de confluencia fue infectada a una MDI de 0.01 UFP/célula con el virus MVA-PS-GFP. Tras 1 hora de infección, se retiró el inóculo, se lavó 2 veces con Opti-MEM y se añadió el medio de transfección, que contiene Opti-MEM, 15  $\mu$ l de lipofectamina 2000 y 15  $\mu$ g del plásmido de transferencia pCyA-HCVmut, previa incubación de los mismos durante 20 min a temperatura ambiente para la formación de los complejos ADN-liposomas. Las células fueron incubadas con el medio de transfección durante 5 horas, posteriormente se lavaron 2 veces con Opti-MEM y se mantuvieron en medio de infección DMEM-2% FCS. Tras 3 días, cuando se observó efecto citopático, se recogieron las células, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en 500  $\mu$ l de DMEM sin suero. A continuación, las células fueron congeladas (a  $-70^{\circ}\text{C}$ ) y descongeladas (a  $37^{\circ}\text{C}$ ) 3 veces agitando con vórtex entre cada ciclo de congelación-descongelación con el fin de lisarlas y liberar el virus al sobrenadante, el cual fue obtenido tras centrifugar 1500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Después, el virus fue sonificado y agitado con vórtex y se utilizó para infectar monocapas confluentes de células crecidas en placas de 6 pocillos (M6) (Nunc) a diferentes diluciones seriadas (desde  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) en DMEM sin suero. Tras 1 hora de infección, se retiró el inóculo y se sustituyó por 3 ml de medio de infección sólido consistente en una mezcla de Agarosa 1.9% (previamente fundida) con medio DMEM-2X-4% FCS en una proporción 1:1. Tras 48 horas de infección, se añadió 1 ml de la mezcla 1:1 de Agarosa 1.9%-DMEM-2X-4% FCS y 1.2 mg/ml del sustrato X-Gal (Merck) para visualizar las placas de lisis producidas por los virus que hubieran incorporado el inserto de interés junto al gen LacZ. Tras 24 horas, se seleccionaron las placas que habían desarrollado color azul y que estuvieran más aisladas de otras placas de lisis que contuvieran GFP (procedente del virus parental). Las placas de lisis seleccionadas fueron obtenidas con una pipeta Pasteur de vidrio de 150 mm (Deltalab) y se añadieron a 500  $\mu$ l de DMEM sin suero. Tras 3 ciclos de congelación-agitación con vórtex-descongelación y sonicación, estas placas fueron utilizadas como inóculo para infectar monocapas de células confluentes en placas de 24 pocillos

(M24) (Nunc) en medio de infección. Estas infecciones se mantuvieron hasta que se observó efecto citopático, momento en el que se recogieron, como se ha descrito anteriormente, y se volvieron a utilizar como inóculo para infectar nuevas monocapas de células confluentes en placas M24. Una vez observado efecto citopático, estas células fueron recogidas y lisadas para análisis por WB y PCR. Para WB se utilizó el anticuerpo policlonal frente al HCV previamente descrito en **Tabla 6**, y para PCR se utilizaron los oligonucleótidos TK-L y TK-R, que amplifican todo el genoma del HCV insertado en el locus TK del MVA. Una vez confirmada la expresión y la pureza de las distintas placas, se seleccionó una de ellas y se utilizó como inóculo para infectar monocapas de células confluentes en placas M6 a diluciones desde  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ . Todo este proceso se llevó a cabo 3 veces seleccionando placas azules, y otras 3 veces más seleccionando placas sin color (ni azul, ni GFP), aislando y purificando el virus final deseado, el cual ha perdido por recombinación homóloga el gen marcador LacZ.

Para la generación de MVA-HCV  $\Delta C6L$ , se partió del virus MVA-HCV previamente descrito [183]. El proceso de generación de este virus recombinante de delección es similar al de inserción, pero usando el plásmido de transferencia pGEM-RG- $\Delta C6L$  que dirigirá la delección del gen *C6L*. Inicialmente se generarán virus intermediarios que se seleccionarán por su expresión de GFP y Red2, que posteriormente se perderán por un nuevo proceso de recombinación dando lugar a los virus recombinantes finales. Las células infectadas con las distintas placas se recogieron y utilizaron para purificar ADN genómico y llevar a cabo una PCR con los oligonucleótidos indicados en la **Tabla 5** y comprobar la ausencia del gen *C6L* y la pureza de la placa. También se analizaron por WB para comprobar que los virus mantenían y expresaban correctamente las proteínas del HCV.

En el presente trabajo se distinguen 3 tipos de stocks virales. El stock inicial o P1, consiste en el virus recombinante generado, el cual procede de monocapas de células infectadas con la placa final y recogidas tras observar efecto citopático. Una vez comprobado por WB la expresión de los antígenos del HCV insertados y la pureza del virus recombinante por PCR, se utilizó para generar el stock de trabajo o P2. Para ello, se infectaron a una MDI de 0.05 UFP/célula 5 placas p150 (Nunc) de células CEF confluentes, las cuales se recogieron cuando se observó efecto citopático. El stock P2 fue utilizado en todos los experimentos de caracterización del virus *in vitro*. Por último, para los ensayos *in vivo*, se generó el stock purificado o P3 a partir del stock P2 (ver a continuación en el apartado de purificación de virus).

### 3.3.3.3. Caracterización de VACV recombinantes

#### - Titulación de virus



Para la titulación de los virus se han empleado las técnicas previamente descritas en *Preparation of Cell Cultures and Vaccinia Virus Stocks* [220].

La titulación de los virus MVA se realizó en células DF-1 confluentes sembradas en placas M6. Se realizaron diluciones seriadas de los virus en DMEM sin suero y se añadieron a la monocapa de células por duplicado. Tras 30-35 horas de infección, las monocapas celulares fueron fijadas con metanol:acetona en proporción 1:1 durante 3 min. A continuación, se realizó un inmunomarcaje para detectar y contabilizar las placas de lisis formadas por los virus. Los anticuerpos utilizados para el inmunomarcaje fueron Conejo  $\alpha$  WR como anticuerpo primario y Cabra  $\alpha$  Conejo-HRP como anticuerpo secundario, ambos diluidos 1/1000 en PBS 1X-3%FCS e incubados sobre la monocapa celular durante 1-2 horas. Tras incubar con el anticuerpo secundario y lavar la monocapa, se añadió 1 mg/ml de DAB (Merck), NiSO<sub>4</sub> 3% y peróxido de hidrógeno 30% (Merck) en PBS para revelar las placas y cuantificarlas. Tras contar las placas de lisis, el título se refirió como UFP/ml.

#### - Cinética de crecimiento viral

Para evaluar la capacidad de replicación de los distintos VACV recombinantes y analizar si la inserción de los antígenos del HCV o la delección del gen *C6L* afecta a la capacidad de replicación de los mismos, monocapas de células fueron infectadas a una MDI de 0.01 UFP/célula con cada virus. Tras 1 hora de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió a la monocapa medio de infección DMEM-2% FCS. A continuación, las células fueron recogidas a distintos tiempos post-infección (0, 24, 48 y 72 horas), sometidas a 3 ciclos de congelación-agitación con vórtex-descongelación y mantenidas a -70°C hasta su titulación. Por último, los virus fueron sonicados y titulados utilizando el procedimiento descrito en el apartado anterior.

#### - Purificación de virus

Para los ensayos *in vivo* se utilizaron stocks de virus purificado (stock P3) según el método descrito inicialmente por Joklik [221] y modificado por Esteban [222]. Brevemente, 30 placas p150 de células CEF confluentes se infectaron a una MDI de 0.01 UFP/célula con el stock P2. Una vez se observó efecto citopático, las células se recogieron y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4°C y el precipitado se lavó con PBS y fue resuspendido en tampón Tris-HCl 10 mM pH 9. A continuación, las células infectadas fueron lisadas mediante 3 ciclos de sonicación-agitación con vórtex-centrifugación para liberar las partículas virales al sobrenadante, el cual se centrifugó durante 1 hora a 20000 rpm a 4°C en rotor SW28 (Beckman) sobre un colchón de sacarosa al 36% en Tris-HCl 10 mM pH 9. El precipitado obtenido se resuspendió en Tris-HCl 10 mM pH 9 y se centrifugó sobre otro colchón de sacarosa en las mismas condiciones. Por último, el precipitado obtenido en esta segunda centrifugación fue resuspendido en Tris-HCl 10 mM pH 9, alicuotado y congelado a -70°C hasta su utilización.

Los virus purificados se titularon por duplicado y se comprobó la ausencia de contaminación por bacterias (placas de agar LB), hongos (placas de agar sangre, Oxoid) y micoplasma (a través de una PCR específica para micoplasma). Todos los stocks P3 fueron comprobados por PCR y WB previamente a su utilización en los ensayos *in vivo*.

### 3.3.4. Técnicas inmunológicas *in vitro*

#### 3.3.4.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mediante Ficoll

Para obtener las moDCs, bolsas de sangre periférica de pacientes sanos fueron obtenidas del centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid. La sangre se mezcló en una proporción 1:3 con Ficoll (Ficoll Paque Plus, GE Healthcare) y a continuación se centrifugó a 2100 rpm durante 20 min a 18-26°C sin freno. Después, se extrajeron con una pipeta los PBMCs, que se localizan formando una capa entre la fase de plasma (la más superficial) y el Ficoll. Una vez obtenidos los PBMCs, se lavaron 2 veces con PBS 1X atemperado centrifugando a 1700 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se procedió al aislamiento de monocitos usando el kit Dynabeads® Untouched™ Human Monocytes (Invitrogen) y el imán Dynal (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Cuando los monocitos fueron aislados, se resuspendieron en medio de diferenciación (RPMI-10%FCS, IL-4 0.1 mg/ml y factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) 0.1 mg/ml) y se mantuvieron 7 días en el incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Al séptimo día, se recogieron las moDCs, se contaron y se prepararon para su posterior infección.

#### 3.3.4.2. Ensayo para determinar la inhibición o inducción celular de IFN

Este ensayo se realizó para comprobar que la proteína NS3mut (mutación puntual S139A) codificada por el plásmido pcDNA-NS3mut es inactiva y, por tanto, no inhibe la respuesta del IFN en células transfectadas con el mismo. Primero, células HEK-293T crecidas hasta un 60% de confluencia fueron transfectadas con lipofectamina utilizando distintas concentraciones de pcDNA-NS3 o pcDNA-NS3mut, completando hasta 600 ng con pcDNA3.0(+), y 30 ng de pRL-null + 100 ng de pLucTER por pocillo. Tras 24 horas de transfección, las células fueron infectadas con el virus Sendai (previa titulación del mismo para establecer la dilución idónea para inducir IFN- $\beta$ ) incubándose durante 24 horas más. Por último, se procedió a medir las unidades relativas de luz (URL) de los lisados celulares con el kit Dual-Glo® Luciferase Assay (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando el buffer de lisado pasivo 1X (Promega). La lectura de renilla y luciferasa se llevó a cabo con el aparato Orion II Microplate Luminometer (Titertek Berthold), y en el análisis se relativizaron las unidades obtenidas de luciferasa con las de renilla para normalizar la eficiencia de transfección.

### **3.3.4.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)**

En el presente trabajo se realizaron 2 tipos de ELISAs:

#### **- Determinación de los niveles de anticuerpos en los sueros de ratones inmunizados**

Se utilizaron placas de 96 pocillos (MaxiSorp, ThermoFisher Scientific) que se cubrieron con 2 µg/ml de la proteína HCV E2 (Sino Biological) o con 50 µg/ml de proteína total (medida con el Kit BCA) en el caso de extractos de células HEK-293T transfectadas con los distintos plásmidos que codifican proteínas Core-E1-E2 de diferentes genotipos del HCV y se incubaron a 4°C durante la noche. Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con PBS 1X-Tween20 0.05% y se bloquearon con PBS 1X-leche 5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadieron diluciones seriadas de los sueros de los ratones inmunizados en PBS 1X-Tween20 0.01%-leche 1% y se incubaron las placas durante 1 hora y 30 min a temperatura ambiente. A continuación, las placas fueron lavadas 3 veces y se añadió el anticuerpo secundario Cabra α ratón-HRP diluido 1:1000 en PBS 1X-Tween20 0.01%-leche 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se lavaron las placas y se revelaron utilizando TMB (Life Technologies). La reacción colorimétrica se paró con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M y la medición de la densidad óptica se realizó a 450 nm en el aparato Ez Read 400 (Biochron).

#### **- Caracterización de las distintas proteínas recombinantes E2 producidas**

En este caso, se utilizó la técnica de ELISA para estudiar las distintas afinidades de las proteínas HCV E2 producidas en este estudio frente a distintos anticuerpos. En primer lugar, células HEK-293T fueron transfectadas con 5 µg de los distintos plásmidos siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.1.6. Tras 48 horas de transfección, los sobrenadantes fueron recogidos y mantenidos en hielo hasta a su utilización. El día previo al ELISA, placas de 96 pocillos (96-Well Half Area Microplates, MICROLON™ Greiner Bio-One) fueron cubiertas con lectina de Galanthus Nivalis (GNL) (Vector Laboratories) a una concentración de 20 µg/ml. Al día siguiente, las placas se lavaron con TBS y se bloquearon con caseína 2% (ThermoFisher Scientific) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron nuevamente y se añadió 100 µl de los distintos sobrenadantes, que se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron 2 veces con TBS y se añadieron los siguientes anticuerpos primarios diluidos en 2% caseína: StrepTagII: 1 µg/ml, AT12-009: 3 µg/ml, AT12-011: 3 µg/ml, AP33: 0.5 µg/ml, HC84.26: 10 µg/ml y CD81-LeL: 3 µg/ml). Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces con TBS y se añadieron los distintos anticuerpos secundarios (cabra α IgG de ratón o humano-HRP) incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, las placas fueron lavadas 4 veces con TBS 1X-Tween20 0.05%, 1 vez con TBS 1X y se revelaron de la misma manera que en el

apartado anterior. En el caso de las fracciones de proteína purificada, las placas de ELISA se cubrieron con la proteína a una concentración de 1 µg/ml.

#### 3.3.4.4. Análisis de respuesta innata *in vitro*

Para estudiar la capacidad de los distintos VACV recombinantes de estimular la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata, células THP-1 diferenciadas a macrófagos con 0.1 µg/ml de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Merck) y moDCs procedentes de sangre de donantes sanos fueron infectadas a una MDI de 5 UFP/célula para THP-1 y 0.3 o 1 UFP/célula en el caso de moDCs. Tras 6 horas de infección, las células fueron recogidas, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4°C y se procedió a extraer su ARN siguiendo el protocolo descrito previamente en el apartado 3.3.1.1 de técnicas de purificación de ácidos nucleicos. A continuación, se realizaron diferentes RT-PCRs utilizando los oligonucleótidos descritos en la **Tabla 5**, para determinar los niveles de IFN-β, de los genes inducidos por interferón con repeticiones tetratricopéptido 1 y 2 (IFIT1, IFIT2) y de TNF-α. Para el análisis de los resultados, los valores obtenidos fueron relativizados al valor del gen endógeno hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT) y al valor de las células sin infectar correspondiente para cada muestra y se representan como unidades arbitrarias (U.A.).

#### 3.3.5. Técnicas inmunológicas *in vivo*

##### 3.3.5.1. Protocolos de inmunización

Para los ensayos de análisis de poblaciones celulares en respuesta inmune innata y los ensayos de reclutamiento, se utilizaron 5 ratones por grupo. Para los ensayos de respuesta inmune adaptativa y de memoria, se utilizaron 8 ó 10 ratones por grupo, que fueron inmunizados dos veces (protocolo *prime/boost*) con un intervalo de 2 semanas. A los 10 días *post-boost*, la mitad de los ratones de cada grupo fueron sacrificados y los bazos fueron extraídos y procesados con el fin de estudiar la respuesta inmune adaptativa celular y humoral. Los ratones restantes se mantuvieron vivos hasta 53 días después del *boost*, cuando fueron sacrificados y los bazos fueron extraídos y procesados con el fin de estudiar la respuesta inmune de memoria celular y humoral.

Todas las inmunizaciones se realizaron en PBS libre de endotoxina (Gibco). La inoculación de VACV recombinantes se realizó por vía intraperitoneal (i.p.) y se utilizó una jeringa de 1 ml y 25G (BD Tuberculin), inoculándose 1 x 10<sup>7</sup> UFP de virus en 200 µl de PBS. Las inmunizaciones de los vectores DREP se realizaron intramuscularmente (i.m.) en los tríceps de ambas patas traseras con una jeringa de insulina BD Micro-Fine (30G) x 8 mm (BD Biosciences) inoculándose un total de 100 µg de ADN (diluido en PBS, volumen final de 100 µl) por ratón dividido en 50 µl/pata. Las

inmunizaciones de proteína se hicieron por vía i.m. con 10 µg de proteína por ratón en un total de 50 µl de PBS con adyuvante, el cual contenía ODN 1826 (Invivogen), 2% Alhydrogel (Invivogen) y una cantidad equivalente (1:1) de *Sigma adjuvant Oil* (Merck). El método de eutanasia utilizado fue en cámara de CO<sub>2</sub>.

### 3.3.5.2. Análisis de poblaciones celulares en respuesta inmune innata

Para estudiar las poblaciones celulares del sistema inmune que migran hacia la cavidad peritoneal del ratón tras la inoculación de los diferentes virus, se inocularon  $1 \times 10^7$  UFP/ratón por vía i.p. Tras 6, 24 y 48 horas, los animales fueron sacrificados y se les realizó un lavado peritoneal inyectando 6 ml de PBS 1X-2% FCS con una aguja de 25G (BD Tuberculin) y masajeando la cavidad peritoneal durante unos segundos. A continuación, se recogió el exudado peritoneal con jeringa y aguja de 21G (BD Microlance 3) y se anotó el volumen recuperado.

Los lavados peritoneales fueron procesados individualmente. Primero, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4°C y el precipitado de células se resuspendió en 500 µl de PBS-*staining*. Las células se contaron, anotando el número de células viables en cada muestra y a continuación, se repartieron 200 µl y 200 µl en 2 pocillos de una placa M96 (Nunc) de fondo en "V" y se lavaron una vez más con PBS-*staining*. Después, se añadió *Fc Block* a una dilución 1:250 en PBS-*staining* para bloquear los receptores Fc y se incubó 15 min a 4°C en oscuridad. Las células se lavaron de nuevo y se procedió a incubarlas con 50 µl de los anticuerpos marcadores de superficie específicos correspondientes (ver **Tabla 6**) diluidos según el lote de cada anticuerpo, durante 20 min a 4°C en oscuridad. Por último, las muestras fueron lavadas 2 veces y resuspendidas en 200 µl de PBS-*staining* para ser posteriormente analizadas por citometría de flujo utilizando un citómetro Gallios (Beckman Coulter).

Para el análisis de las diferentes poblaciones celulares se tuvo en cuenta los mililitros recuperados de los lavados peritoneales para extrapolar y calcular el número total de cada tipo celular presente en el exudado. Los resultados de citometría se analizaron usando el programa FlowJo (versión 8.8.7). La estrategia de análisis se llevó a cabo seleccionando inicialmente las células positivas para CD45 y posteriormente se seleccionó cada una de las poblaciones utilizando la combinación de marcadores descrita en la siguiente tabla:

Población celular	Marcador
Células dendríticas	CD11c <sup>+</sup> , MHC-II <sup>+</sup>
Neutrófilos	CD11b <sup>+</sup> Ly6G <sup>+</sup>
Macrófagos	F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>
Monocitos	F4/80 inter. CD11b inter.
Células B	CD19 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>
Células T CD8	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>
Células T CD4	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>
Células <i>Natural Killer</i>	NKP46 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>
Células <i>Natural Killer T</i>	NKP46 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup>

**Tabla 7. Marcadores utilizados para la detección de diferentes poblaciones celulares en los lavados peritoneales de ratones inmunizados.** Inter: la población seleccionada presenta niveles intermedios del marcador. <sup>+</sup>: presencia de marcador, <sup>-</sup>: ausencia de marcador.

### 3.3.5.3. Análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo en la respuesta adaptativa y de memoria

Para el estudio de la respuesta celular específica frente al HCV generada por los distintos protocolos de inmunización que incluyen vectores DREP, MVA recombinantes o proteínas E2, se inmunizaron 8 ó 10 ratones por grupo y se sacrificaron 10 y 53 días después de la última inmunización, tal y como se describe en el apartado 3.3.5.1. Tras el sacrificio, los bazo de cada ratón fueron extraídos y procesados para obtener los esplenocitos totales de cada grupo de inmunización siguiendo el protocolo descrito en [194,223]. Estos esplenocitos fueron resuspendidos en medio RPMI-10% FCS-1X monensina (ThermoFisher Scientific)-1  $\mu$ l/ml brefeldina A (BFA) (Protein Transport Inhibitor BD GolgiPlug, BD Biosciences)-1:300 CD107a-FITC. Se añadieron  $4 \times 10^6$  células en pocillos de M96 de fondo en "V" y fueron incubadas durante 6 horas en presencia de 1  $\mu$ g/ml de los péptidos solapantes del HCV. Como control, los esplenocitos se estimularon con 2  $\mu$ l/ml de LAC (del inglés, *Leukocyte Activation Cocktail*, BD Biosciences) y 1X Monensina. Tras 6 horas de estimulación, los esplenocitos se lavaron con tampón IB y se incubaron con *Violet Dye* (0.5  $\mu$ l/ml, Invitrogen) durante 20 min en oscuridad a 4°C para evaluar la viabilidad celular. A continuación, se realizaron 2 lavados con tampón IB y se procedió a incubar los esplenocitos durante 20 min en oscuridad a 4°C con 50  $\mu$ l de los anticuerpos primarios de superficie mostrados en la **Tabla 6** y diluidos según el lote. Posteriormente, los esplenocitos fueron lavados 2 veces y se añadió *Cytofix/Cytoperm* (100  $\mu$ l por pocillo, BD Biosciences) durante 20 min en oscuridad a 4°C para fijar y permeabilizar las células, que se dejaron posteriormente toda la noche a 4°C en oscuridad en tampón IB. Al día siguiente, se hizo un lavado con *Permwash 1X* (BD Biosciences) y se añadieron 25  $\mu$ l de *Fc Block*

diluido 1:100 en *Permwash* 1X durante 5 min a 4°C en oscuridad. A continuación, sobre los 25 µl de *Fc Block* se añadieron 25 µl de los anticuerpos necesarios para el marcaje intracelular de citoquinas (ICS) (**Tabla 6**) a diferentes diluciones en *Permwash* 1X según el lote de cada anticuerpo, incubándose 20 min a 4°C en oscuridad. Por último, se realizaron 2 lavados con *Permwash* 1X y las células se resuspendieron en 200 µl de tampón IB para ser posteriormente analizadas por citometría de flujo en un citómetro Gallios (Beckman Coulter) y mediante el programa FlowJo, seleccionando los linfocitos vivos que expresan CD3 en su superficie, CD4, CD8, CD127 o CD62L, y que secretan las diferentes citoquinas (IFN-γ, TNF-α e IL-2) o expresan el marcador de degranulación CD107a.

#### **3.3.5.4. Análisis de la respuesta inmune humoral**

La respuesta inmune humoral se determinó en los sueros de los ratones inmunizados. Para la obtención de los sueros, se recogió la sangre de los animales después de su sacrificio mediante inyección intracardiaca. En algunos experimentos, a aquellos ratones que se mantuvieron vivos hasta 53 días después de la segunda inmunización, se les extrajo a día 10 tras la segunda inmunización una pequeña muestra de sangre con pinchazo submandibular utilizando una lanceta de 4 mm (Bioseb). Una vez obtenida la sangre, las muestras se mantuvieron a 37°C durante 1 hora y se guardaron a 4°C hasta el día siguiente. Después, se centrifugaron a 3600 rpm durante 20 min a 4°C y se obtuvo el suero que se guardó a -20°C hasta su utilización. Diluciones seriadas de cada suero (o grupos de sueros) fueron utilizadas para medir los niveles de anticuerpos frente a E2 mediante ELISA, tal y como se describe en el apartado 3.3.4.3.

#### **3.3.6. Análisis estadístico**

El análisis estadístico entre 2 grupos distintos se realizó mediante T de *Student* (test no paramétrico, pareado). La significancia estadística de la comparación entre 2 grupos de datos obtenidos en ELISA se determinó utilizando el método de Holm-Sidak, con alfa=5%. El análisis estadístico de los datos para determinar la significancia de las diferencias encontradas entre más de 2 grupos se realizó mediante el test de análisis de la varianza (ANOVA), que en el caso de experimentos de reclutamiento fue ANOVA de 2 vías (tiempo+virus) y de una vía en el caso de ELISAs (protocolo de inmunización); en ambos casos se transformaron los valores a escala logarítmica. Para el análisis estadístico de los datos de citometría de flujo utilizamos una aproximación que corrige la respuesta obtenida en el grupo control de estimulación (RPMI) y al mismo tiempo permite el cálculo de intervalos de confianza y valores de p. Este método ha sido

descrito previamente [223,224]. Los valores p se representan con asteriscos siguiendo el siguiente código: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.005$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .



# 4. RESULTADOS

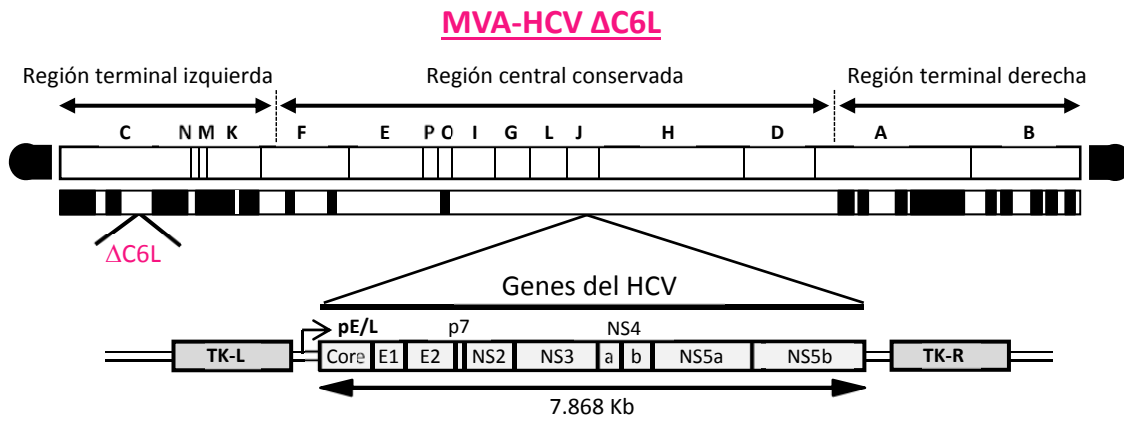
#### 4.1. Diseño, generación y caracterización *in vitro* e *in vivo* de un candidato vacunal MVA-HCV que contenga la delección del gen C6L del MVA (MVA-HCV $\Delta$ C6L)

En el laboratorio hemos descrito previamente la generación de un candidato vacunal frente a hepatitis C, denominado MVA-HCV, basado en el vector poxviral MVA que expresa de forma constitutiva el genoma casi completo del genotipo 1a del HCV, y que indujo una respuesta inmune amplia, polifuncional y duradera frente al HCV, mediada principalmente por células T CD8<sup>+</sup> [183]. Sin embargo, aunque MVA-HCV es inmunogénico, nuevas vacunas optimizadas basadas en MVA-HCV son deseables. Existen diversas estrategias para potenciar la inmunogenicidad de los vectores poxvirales [184]. Una de ellas es la delección de genes inmunosupresores que aún se encuentran presentes en el genoma del MVA, como el gen *C6L*, que codifica un inhibidor de IFN- $\beta$  [193,225]. Se ha descrito anteriormente que la eliminación de este gen en un candidato vacunal para HIV-1 basado en MVA, produjo un aumento de la expresión de IFN- $\beta$  y de genes inducibles por IFN tipo 1 en células inmunes en cultivo e indujo un aumento de la respuesta inmune específica frente a HIV-1, tanto celular como humoral, en ratones inmunizados [193,194]. Por tanto, dada la importancia del IFN en la respuesta antiviral frente al HCV y con el fin de aumentar la magnitud de la respuesta inmune específica frente al mismo, el primer objetivo de este trabajo fue la generación y caracterización *in vitro* de un nuevo candidato vacunal, MVA-HCV  $\Delta$ C6L, que carece del gen *C6L*, y el estudio de su inmunogenicidad *in vivo* en ratones inmunizados mediante protocolos homólogos de inmunización *prime/boost* en comparación con la vacuna parental MVA-HCV.

Los resultados del presente apartado han sido publicados [211] y se adjuntan en los anexos de esta tesis.

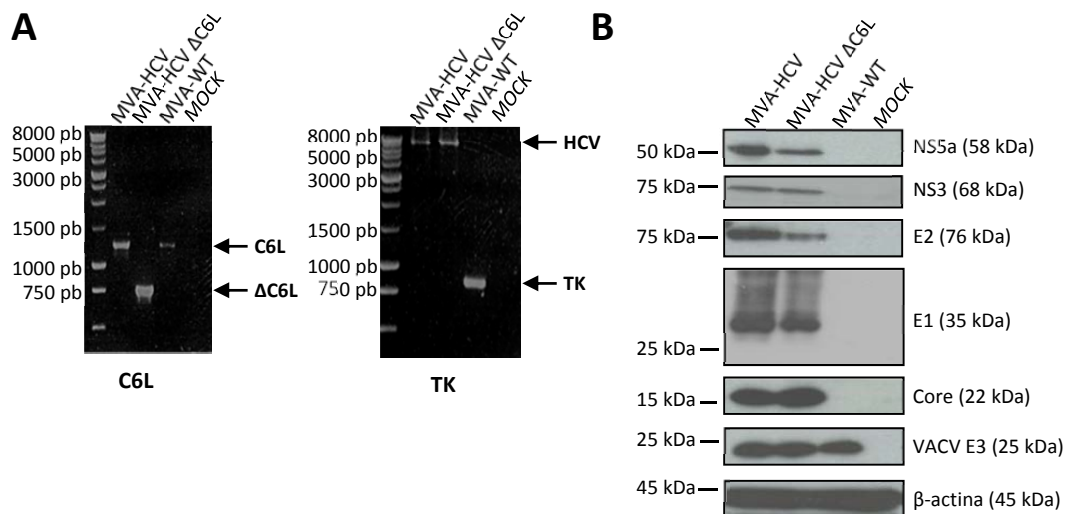
##### 4.1.1. Generación del virus recombinante de delección MVA-HCV $\Delta$ C6L

Para estudiar si el gen *C6L* del VACV puede influir en la inmunogenicidad generada frente a los antígenos del HCV presentes en MVA-HCV, se procedió a la delección del mismo en el genoma de MVA-HCV, generándose el virus recombinante MVA-HCV  $\Delta$ C6L (Figura 11), tal y como se describe en Materiales y Métodos.



**Figura 11. Esquema del genoma del virus MVA-HCV  $\Delta C6L$ .** Al igual que en MVA-HCV, los genes del genotipo 1a del HCV, aislado H77, se encuentran insertados en el locus TK (gen *J2R*) del virus MVA, bajo el promotor sintético temprano/tardío (pE/L). Las diferentes regiones del genoma del MVA se muestran en mayúsculas. El gen *C6L* deleciónado se indica en color magenta. Además de este gen, MVA presenta varios genes deleciónados o fragmentados que le confieren el fenotipo atenuado, mostrándose como rectángulos negros debajo del esquema del genoma. TK-L, flanco izquierdo del gen TK; TK-R, flanco derecho del gen TK.

La correcta generación y pureza del virus recombinante de deleción MVA-HCV  $\Delta C6L$  fueron confirmadas por PCR (**Figura 12A**) tras amplificar el ADN obtenido de células DF-1 sin infectar (*mock*) o infectadas a una MDI de 5 UFP/célula con MVA-WT, MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta C6L$  utilizando oligonucleótidos que hibridan en las zonas flanqueantes del gen *C6L* o del locus TK del MVA (locus de inserción de los genes del HCV) y que están descritos en la **Tabla 5** de Materiales y Métodos. Posteriormente, para confirmar la correcta expresión y el procesamiento de las proteínas del HCV, se obtuvieron extractos de células DF-1 sin infectar (*mock*) o infectadas con MVA-WT, MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta C6L$  a una MDI de 5 UFP/célula y se analizó la expresión de las proteínas del HCV mediante WB. Tal y como se muestra en la **Figura 12B**, el virus MVA-HCV  $\Delta C6L$  expresa y procesa correctamente todas las proteínas del HCV.

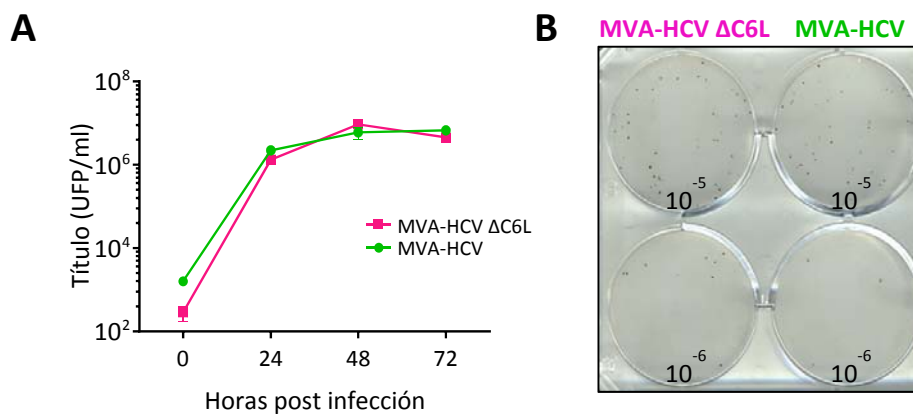


**Figura 12. Deleción del gen *C6L* y correcta expresión de las proteínas del HCV por parte del virus MVA-HCV  $\Delta C6L$ .** Células DF-1 se infectaron con los distintos virus a una MDI de 5 UFP/célula y se

recogieron tras 24 horas post-infección (hpi) para extraer su ADN o procesar para WB. **(A)** Análisis de PCR. Los oligonucleótidos utilizados hibridan en las regiones flanqueantes del gen *C6L* y el gen TK (locus de inserción de los genes del HCV) y se utilizaron para confirmar la correcta generación del virus MVA-HCV  $\Delta C6L$ . **(B)** Expresión por WB de las proteínas del HCV en MVA-HCV  $\Delta C6L$  y MVA-HCV.

#### 4.1.2. El gen *C6L* del MVA no es esencial para el crecimiento de MVA-HCV

Se ha descrito previamente que MVA-HCV y MVA-WT crecen de manera similar en cultivo celular [183]. Para confirmar si la delección del gen *C6L* del MVA no afecta a la capacidad replicativa de MVA-HCV, se infectaron células DF-1 con MVA-HCV o MVA-HCV  $\Delta C6L$  y se recogieron a distintos tiempos post-infección para comparar sus cinéticas de crecimiento. Tal y como se muestra en la **Figura 13**, ambos virus replican de manera similar, por lo que la delección de *C6L* no afecta a la capacidad infectiva del virus ni a su replicación en condiciones permisivas, demostrando que la proteína C6 del MVA no es esencial para la replicación de MVA-HCV.

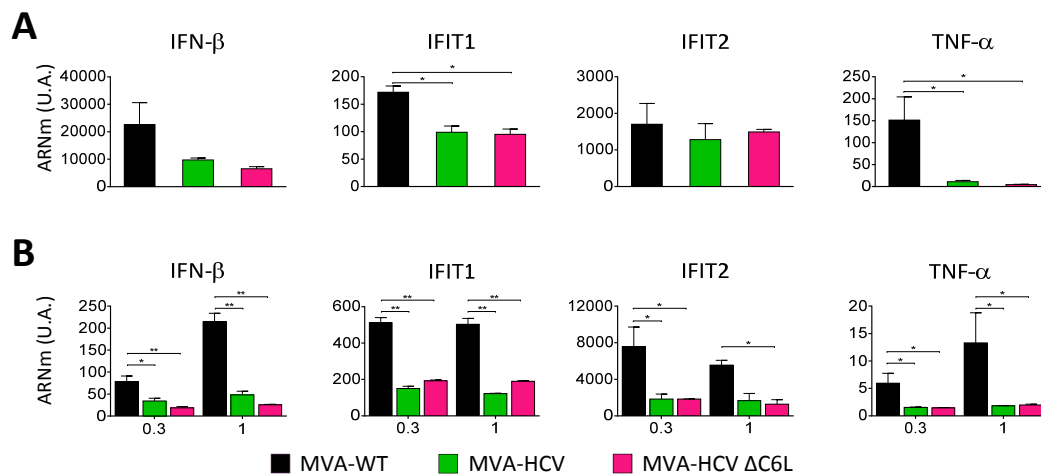


**Figura 13. Cinéticas de crecimiento de MVA-HCV  $\Delta C6L$  y MVA-HCV.** Células DF-1 fueron infectadas con ambos virus a una MDI de 0.01 UFP/célula. A 0, 24, 48 y 72 hpi se recogieron las células y los títulos virales en los lisados celulares se determinaron mediante inmunomarcaje de placa con anticuerpos anti-VACV. **(A)** Curvas de crecimiento de ambos virus. Se representa la media y desviación estándar de 2 experimentos independientes. UFP: Unidad formadora de placa. **(B)** Ejemplo de inmunomarcaje en células crecidas en pocillos de placa M6 e infectadas con las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  de ambos virus y fijadas a 48 hpi.

#### 4.1.3. MVA-HCV y MVA-HCV $\Delta C6L$ disminuyen la expresión de genes involucrados en la inmunidad innata

Se ha descrito previamente que en células infectadas con MVA-HCV se produce una reducción de la expresión de varios genes implicados en la inmunidad innata, principalmente genes de la ruta del IFN, en comparación con células infectadas con MVA-WT [183]. Por tanto, para examinar si la delección del gen *C6L* del MVA, que codifica para un inhibidor de IFN tipo 1,

puede afectar a la respuesta inmune innata inducida por MVA-HCV produciendo un aumento de la producción de IFN y de genes regulados por IFN, se infectaron macrófagos THP-1 (**Figura 14A**) y células moDCs (**Figura 14B**) humanas con MVA-WT, MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L a una MDI de 5 ó 0.3 y 1 UFP/célula, respectivamente. A las 6 horas post-infección, se extrajo el ARN y se analizó mediante RT-PCR a tiempo real la expresión de IFN- $\beta$ , de genes inducidos por IFN (IFIT1 e IFIT2) y de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ . Los resultados obtenidos muestran que, en comparación con MVA-WT, los virus MVA recombinantes que expresan las proteínas del HCV disminuyen de manera similar la expresión de los genes de IFN- $\beta$ , IFIT1, IFIT2 y TNF- $\alpha$  en ambos tipos celulares, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L.

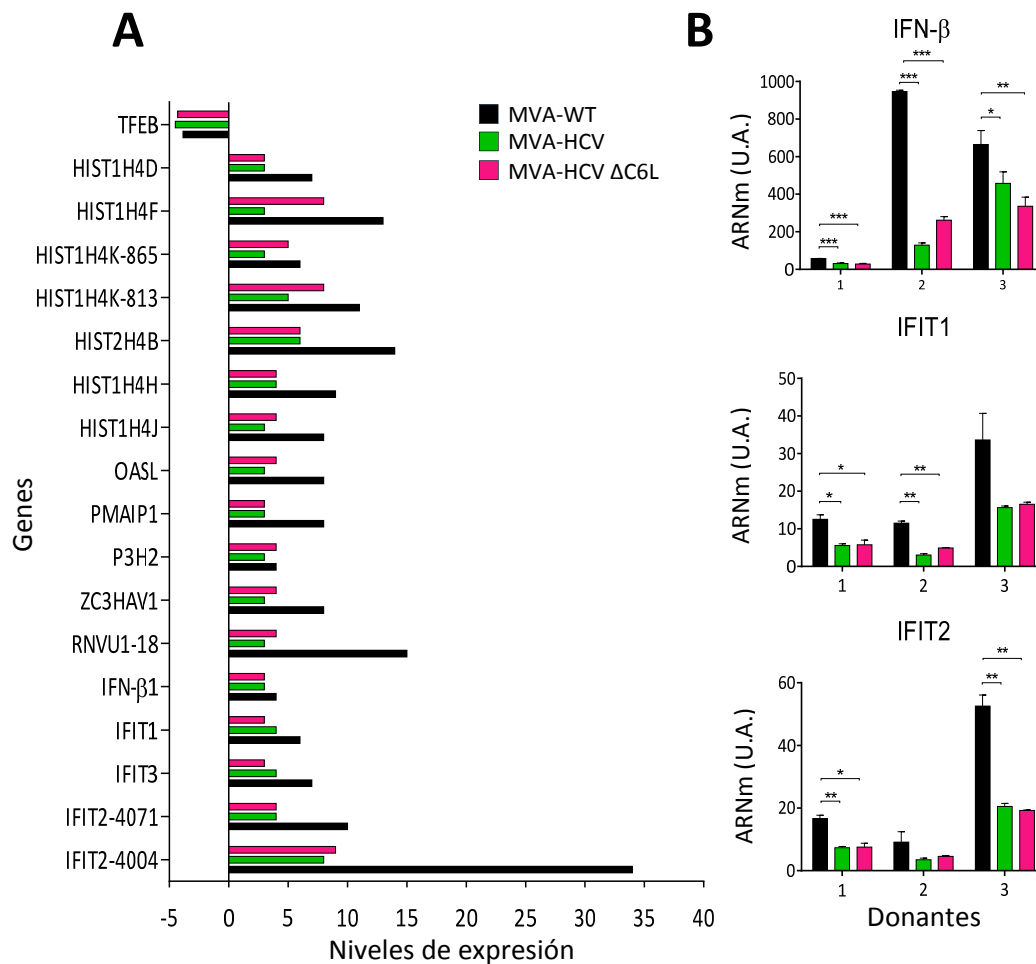


**Figura 14. Expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata en células humanas infectadas con MVA-HCV o MVA-HCV  $\Delta$ C6L.** Células THP-1 (**A**) y moDCs (**B**) humanas fueron dejadas sin infectar (*mock*) o infectadas con MVA-WT, MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L a una MDI de 5 UFP/célula (**A**) y 0.3 ó 1 UFP/célula (**B**) durante 6 horas. Los niveles de expresión de ARNm de los distintos genes estudiados (IFN- $\beta$ , IFIT1, IFIT2 y TNF- $\alpha$ ) se analizaron por RT-PCR y se relativizaron con el gen endógeno HPRT, no influido por la infección. U.A: Unidades arbitrarias. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L con MVA-WT (\* p <0.05, \*\* p <0.005). Se representa la media y la desviación estándar de muestras por duplicado de un experimento representativo de 2 ensayos independientes. Los valores del *mock* fueron restados a su correspondiente muestra para relativizar.

#### 4.1.4. Un análisis de *microarrays* revela que MVA-HCV y MVA-HCV $\Delta$ C6L producen una severa reducción en la expresión de diferentes genes celulares

Con el objetivo de estudiar el impacto que produce la expresión de los genes del HCV por parte de los virus MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L en la expresión de genes celulares, se realizó un análisis de *microarrays* en moDCs humanas obtenidas de 3 donantes distintos e infectadas con los diferentes virus a una MDI de 1 UFP/célula durante 6 horas. Tras el análisis realizado

utilizando como parámetros de filtro FDR y un valor de  $p < 0.05$ , con diferencias de expresión  $\geq 2$  ó  $\leq -2$ , los resultados mostraron que 17 genes celulares experimentaron un aumento significativo de sus niveles de expresión debido a la infección por MVA-WT, MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta C6L$ , mientras que sólo se observó disminución en los niveles de expresión en comparación con células sin infectar para un solo gen (TFEB) (Figura 15A). Los genes cuyos niveles de expresión se ven aumentados como consecuencia de la infección se agrupan en las siguientes categorías: genes relacionados con la respuesta de IFN (OASL, ZC3HAV1, IFN- $\beta$ 1, IFIT1, IFIT2 e IFIT3), genes involucrados en apoptosis (PMAIP1) e histonas (HIST1H4D, HIST1H4F, HIST1H4H, HIST1H4J, HIST1H4K, y HIST2H4B). Además, el aumento de los niveles de expresión de estos genes inducidos por la infección con MVA-WT fue mayor que el inducido por los virus MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta C6L$  (Figura 15A).



**Figura 15. Análisis de *microarrays* en moDCs infectadas con los distintos virus a una MDI de 1 UFP/célula durante 6 horas. (A)** Los genes celulares expresados diferencialmente fueron evaluados mediante la forma no paramétrica de algoritmo *RankProd* disponible como paquete *RankProd* en el Bioconductor. Los resultados representan la media obtenida de 3 donantes de sangre independientes. **(B)** Validación del análisis de *microarrays* mediante RT-PCR a tiempo real de 3 genes representativos: IFN- $\beta$ , IFIT1 e IFIT2. U.A.: Unidades arbitrarias. Los valores de  $p$

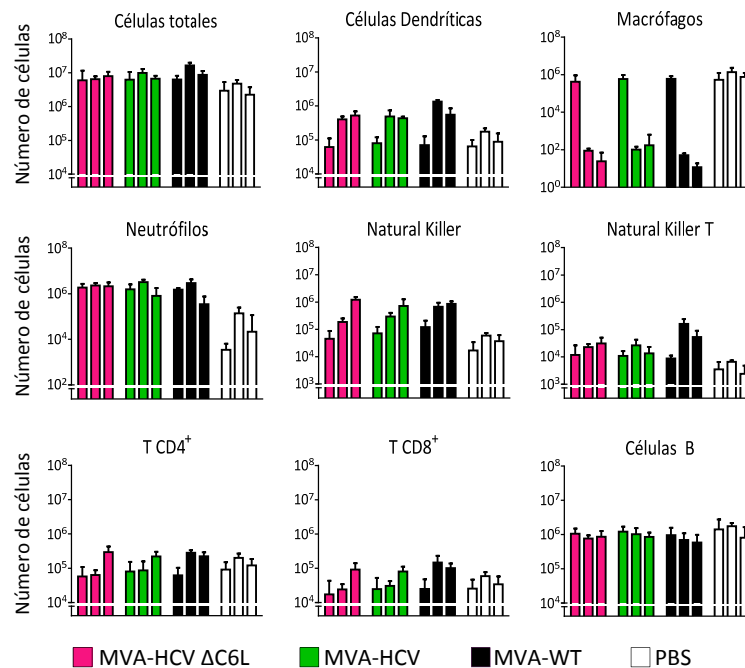
indican diferencias significativas comparando MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L con MVA-WT (\* p <0.05, \*\* p <0.005, \*\*\* p <0.001).

Para validar los datos obtenidos en los microarrays, se utilizó el mismo ADNc para realizar PCR cuantitativa a tiempo real de 3 genes celulares representativos (IFN- $\beta$ , IFIT1 e IFIT2) (**Figura 15B**), confirmándose el efecto inhibitorio de las proteínas del HCV sobre la expresión de dichos genes, en comparación con MVA-WT y las no diferencias entre MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L.

#### **4.1.5. MVA-HCV y MVA-HCV $\Delta$ C6L producen un reclutamiento celular diferente a MVA-WT en la cavidad peritoneal de ratones infectados**

Tal y como se ha descrito en la introducción, la respuesta celular innata juega un papel importante en la infección por el HCV. Además, en el apartado anterior se determinó que la infección por MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L modula la expresión de diferentes genes celulares involucrados en respuesta a IFN. Por tanto, a continuación, se procedió a estudiar *in vivo* el reclutamiento de distintas poblaciones celulares, principalmente relacionadas con la respuesta innata, en la cavidad peritoneal de ratones inoculados con los distintos virus. Para ello, 5 ratones C57BL/6 por grupo fueron inoculados i.p. con los diferentes virus ( $1 \times 10^7$  UFP/ratón), y tras 6, 24 y 48 hpi se realizaron lavados peritoneales para obtener las células que habían migrado al sitio de infección. Dichas células fueron marcadas, analizadas mediante citometría de flujo y los resultados obtenidos son representados como el número absoluto de las diferentes poblaciones de células inmunes (**Figura 16**).

Los resultados mostraron que tras la inoculación con los diferentes virus se produjo un gran reclutamiento de células inmunitarias al sitio de infección (aproximadamente  $10^7$  células). La mayoría de los macrófagos abandonaron la cavidad peritoneal tras 24 hpi, mientras que las células DCs, NKs, NKTs y neutrófilos fueron altamente reclutados a las 24 y 48 hpi en ratones infectados con MVA-WT, MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L en comparación con aquellos inoculados con PBS. Sin embargo, a 24 hpi la magnitud del reclutamiento de células DCs, NKs, NKTs, T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> fue menor en ratones inoculados con MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L en comparación con MVA-WT, una vez más debido probablemente al efecto inhibitorio que presentan los genes del HCV sobre el sistema inmune.



**Figura 16. Reclutamiento de células inmunes a la cavidad peritoneal de ratones inmunizados.**

Cinco ratones C57BL/6 por grupo fueron inoculados i.p. con MVA-WT, MVA-HCV, MVA-HCV  $\Delta$ C6L o PBS y a 6, 24 y 48 hpi (primera, segunda y tercera barra de cada grupo, respectivamente) se procedió a hacer lavados peritoneales para estudiar el reclutamiento de células al sitio de inoculación en cada ratón individual. En el eje Y se muestra el logaritmo del número absoluto de las células analizadas por citometría.

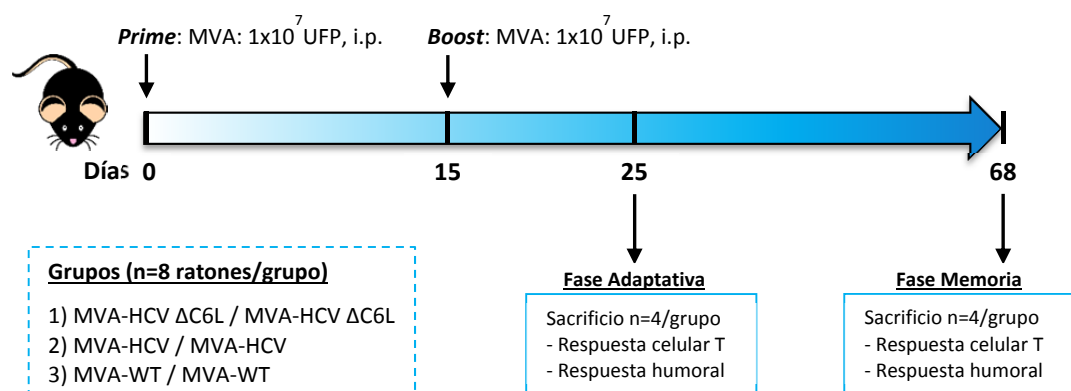
La comparación entre MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L demostró un comportamiento similar de ambos virus, aunque observamos diferencias en el reclutamiento de neutrófilos respecto al tiempo ya que mientras que en MVA-HCV  $\Delta$ C6L el número de neutrófilos se mantiene constante en los 3 tiempos analizados, en el caso de MVA-HCV varía, con una disminución a 48 hpi.

#### 4.1.6. MVA-HCV y MVA-HCV $\Delta$ C6L inducen una respuesta inmune celular adaptativa específica frente al HCV

Para definir si la delección en el genoma de MVA-HCV del gen *C6L* del MVA, que codifica un inhibidor de IFN- $\beta$ , pudiera tener un impacto *in vivo* en la respuesta inmune adaptativa contra los antígenos del HCV, primero analizamos la respuesta de las células T específicas frente al HCV generada por MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L en ratones inmunizados con 2 inoculaciones de cada vector viral (protocolo homólogo de inmunización *prime/boost*) (Figura 17). Por tanto, se inmunizaron 8 ratones C57BL/6 por grupo con los virus MVA-WT, MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L, tal y como se describe en Materiales y Métodos y la mitad de ellos ( $n=4$ ) se sacrificaron el día 10 después del *boost* para medir mediante ICS la respuesta inmune adaptativa de células T específicas frente al HCV. Los esplenocitos de cada grupo de inmunización se estimularon *ex vivo* con un panel de grupos de péptidos que cubren la poliproteína completa de la cepa H77 del HCV



(genotipo 1a) y, tras 6 horas de estimulación, las células se marcaron con anticuerpos específicos para identificar poblaciones de células T ( $CD4^+$  y  $CD8^+$ ) y células respondedoras (que expresan CD107a en la superficie de las células T como un marcador indirecto de citotoxicidad y/o que producen las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2).

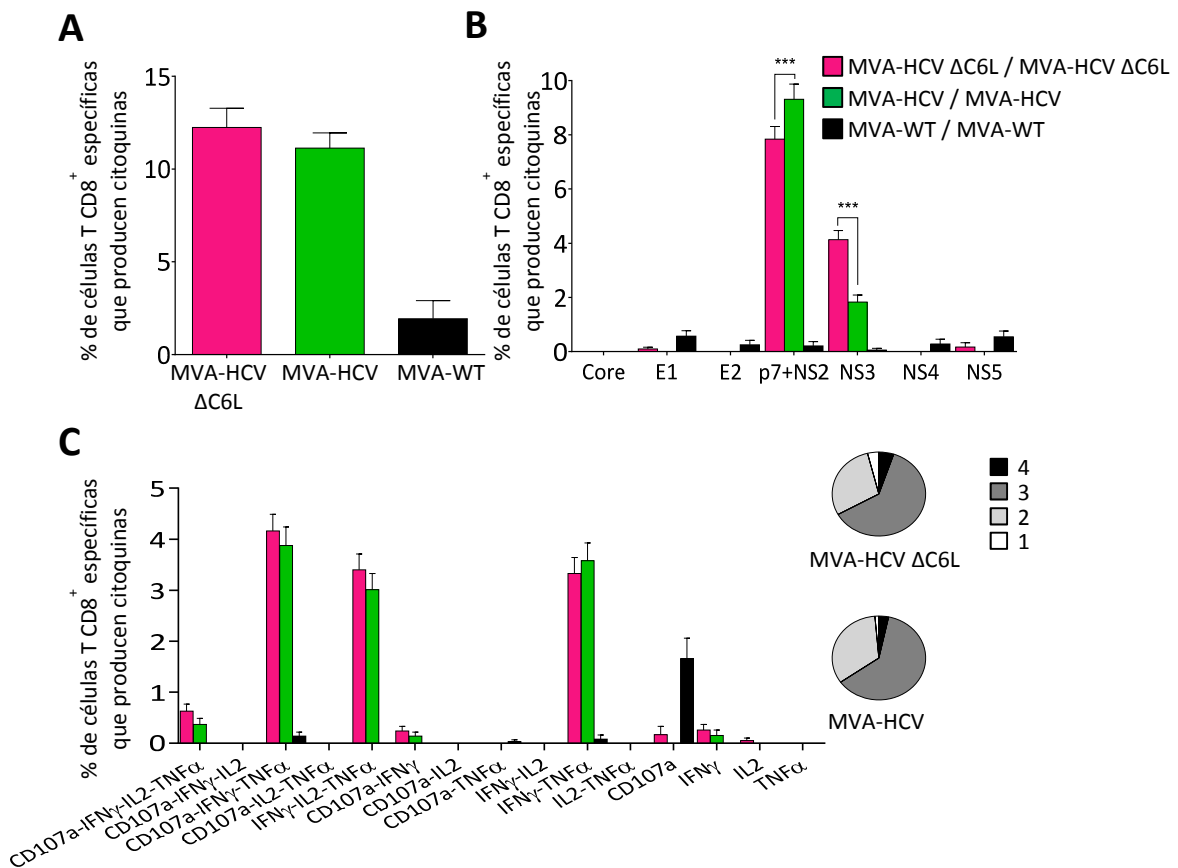


**Figura 17. Esquema del protocolo de inmunización utilizado.** Se inocularon 8 ratones C57BL/6 por grupo a 0 y 15 días (*prime/boost*) con los diferentes candidatos vacunales indicados. A 10 días tras el *boost* (día 25) se sacrificaron la mitad de los ratones (n=4) para obtener sus bazo y sangre y estudiar la respuesta inmune celular y humoral adaptativa frente al HCV, respectivamente. A 53 días tras el *boost* (día 68), el resto de ratones (n=4) se sacrificaron y se obtuvieron los bazo y la sangre para estudiar la respuesta inmune celular y humoral de memoria frente al HCV, respectivamente. UFP: Unidades formadoras de placa; i.p: intraperitoneal.

Los resultados mostraron que la respuesta inmune frente al HCV generada por MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L fue principalmente mediada por células T  $CD8^+$  (determinadas como la suma de células productoras de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2, y/o expresando el marcador de desgranulación CD107a) específicas frente a los distintos péptidos del HCV (Core + E1 + E2 + p7-NS2 + NS3 + NS4 + NS5). Esta respuesta fue alta y similar en ratones inmunizados con MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L (**Figura 18A**). No se encontraron células T  $CD4^+$  específicas frente al HCV.

El análisis del perfil de esta respuesta inmune de células T  $CD8^+$  mostró que fue dirigida preferentemente contra las proteínas p7 + NS2 y, en menor medida, frente a NS3 en ambos grupos de inmunización (**Figura 18B**). MVA-HCV indujo respuestas frente a p7 + NS2 significativamente más altas que MVA-HCV  $\Delta$ C6L, mientras que MVA-HCV  $\Delta$ C6L indujo respuestas frente a NS3 significativamente mayores que MVA-HCV (**Figura 18B**). La calidad de la respuesta inmune de las células T  $CD8^+$  se analizó midiendo el patrón de producción de citoquinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2) más su potencial citotóxico (desgranulación basada indirectamente en la expresión de CD107a). Como se muestra en la **Figura 18C** las respuestas generadas por MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L fueron similares y altamente polifuncionales, con

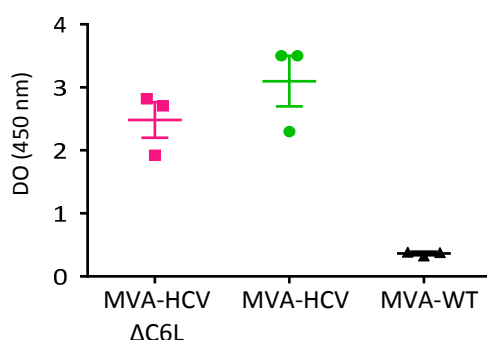
alrededor del 60% y el 5% de las células T CD8<sup>+</sup> teniendo 3 (CD107a + IFN-γ + TNF-α y IFN-γ + IL-2 + TNF-α) y 4 funciones (CD107a + IFN-γ + IL-2 + TNF-α), respectivamente.



**Figura 18. Respuesta inmune adaptativa de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV en ratones inmunizados.** Esplenocitos de ratones inmunizados (n=4) se obtuvieron 10 días después del boost, y las respuestas inmunes de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente a grupos de péptidos del HCV se analizaron por ICS, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar MVA-HCV/MVA-HCV con MVA-HCV ΔC6L/MVA-HCV ΔC6L (\*\*\*, p < 0.001). **(A) Magnitud total** de la respuesta inmune adaptativa de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV. En el eje Y se muestra el porcentaje medido como la suma de células T específicas frente a todos los antígenos del HCV que expresan CD107a y/o que producen IFN-γ y/o TNF-α y/o IL-2. **(B) Amplitud** de la respuesta inmune adaptativa de células T CD8<sup>+</sup> mostrada como el porcentaje de células específicas frente a Core, E1, E2, p7+NS2, NS3, NS4 o NS5 que expresan CD107a y/o que producen IFN-γ y/o TNF-α y/o IL-2. **(C) Polifuncionalidad** de la respuesta inmune adaptativa de células T CD8<sup>+</sup> dirigidas contra todos los antígenos del HCV. Las respuestas se dividen en función de la producción combinada de CD107a, IFN-γ, TNF-α y/o IL-2 por los distintos grupos de inmunización, y se agrupan teniendo en cuenta el número de funciones (una, dos, tres, o cuatro, diagramas de círculos).

#### 4.1.7. MVA-HCV y MVA-HCV $\Delta$ C6L inducen niveles similares de anticuerpos frente a la proteína E2 del HCV

A continuación, se analizó la respuesta inmune humoral inducida por MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L, cuantificando, mediante ELISA, los niveles totales de anticuerpos IgG frente a la proteína E2 del HCV (cepa H77) en sueros obtenidos de ratones individuales 10 y 53 días después del *boost* (Figura 17). Ambos grupos de inmunización generaron niveles similares de anticuerpos contra E2, aunque la respuesta humoral inducida no fue muy elevada, y sólo se detectaron anticuerpos 10 días después del *boost* (Figura 19).

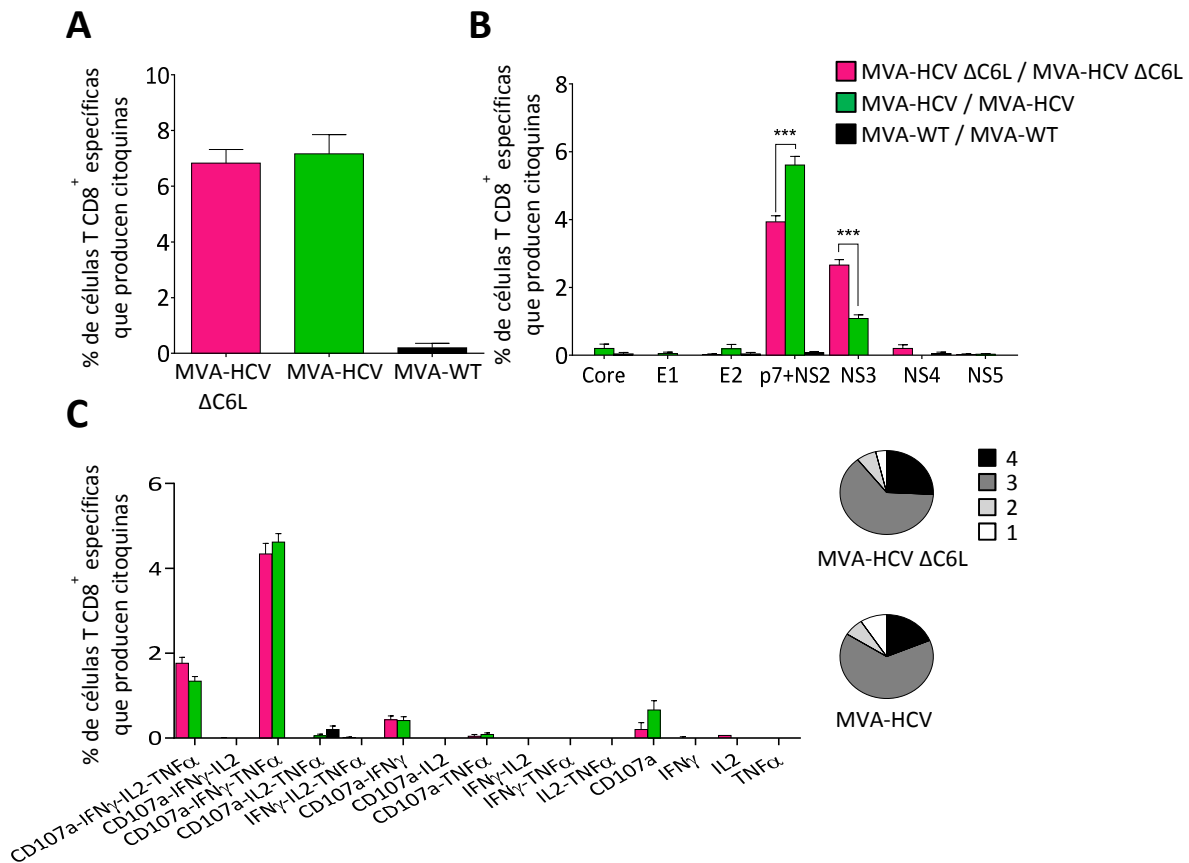


**Figura 19. Respuesta humoral específica frente a la proteína E2 del HCV.** Obtenida a partir de sueros de ratones inmunizados (n=3) tras 10 días después del *boost*. Los sueros de cada ratón se trataron por individual a una dilución 1/50 para medir los anticuerpos anti-E2 por ELISA. DO: densidad óptica.

#### 4.1.8. MVA-HCV y MVA-HCV $\Delta$ C6L inducen una respuesta inmune celular de memoria específica frente al HCV

Para estudiar las respuestas inmunes de memoria de células T específicas frente al HCV inducidas por MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L, 4 ratones de cada grupo de inmunización se sacrificaron 53 días después del *boost* y se estimuló *ex vivo* cada grupo de esplenocitos con un panel de grupos de péptidos del HCV, de manera similar al protocolo de respuesta inmune adaptativa descrito anteriormente y en Materiales y Métodos.

La magnitud de la respuesta inmune celular de memoria específica frente al HCV fue, al igual que en la fase adaptativa, mediada principalmente por células T CD8<sup>+</sup>, sin encontrarse respuesta celular mediada por células T CD4<sup>+</sup> (Figura 20A).



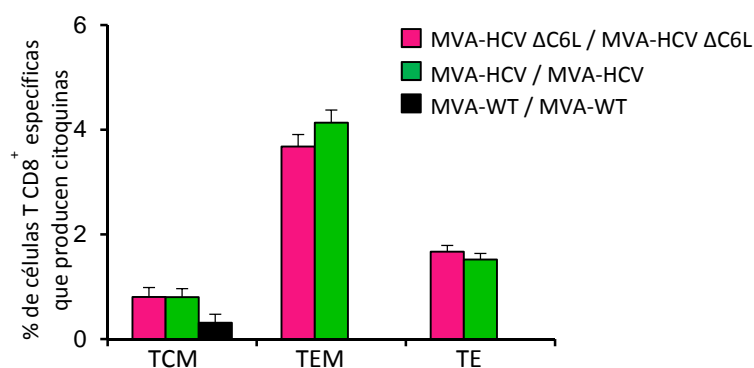
**Figura 20. Respuesta inmune de memoria de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV en ratones inmunizados.** Esplenocitos de ratones inmunizados (n=4) se obtuvieron 53 días después del boost, y las respuestas inmunes de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente a grupos de péptidos del HCV se analizaron por ICS, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar MVA-HCV/MVA-HCV con MVA-HCV ΔC6L/MVA-HCV ΔC6L (\*\*\*, p < 0.001). **(A)** Magnitud total de la respuesta inmune de memoria de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV. En el eje Y se muestra el porcentaje medido como la suma de células T específicas frente a todos los antígenos del HCV que expresan CD107a y/o que producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2. **(B)** Amplitud de la respuesta inmune de memoria de células T CD8<sup>+</sup> mostrada como el porcentaje de células específicas frente a Core, E1, E2, p7+NS2, NS3, NS4 o NS5 que expresan CD107a y/o que producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2. **(C)** Polifuncionalidad de la respuesta inmune adaptativa de células T CD8<sup>+</sup> dirigidas frente a todos los antígenos del HCV. Las respuestas se dividen en función de la producción combinada de CD107a, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2 por los distintos grupos de inmunización, y se agrupan teniendo en cuenta el número de funciones (una, dos, tres, o cuatro, diagramas de círculos).

Esta respuesta celular T CD8<sup>+</sup> fue alta y similar en ratones inmunizados con MVA-HCV y MVA-HCV ΔC6L (Figura 20A), y dirigida principalmente contra las proteínas p7 + NS2, y luego frente a NS3 (Figura 20B). Al igual que en la fase adaptativa, MVA-HCV indujo respuestas inmunes de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente a p7 + NS2 significativamente más altas que MVA-HCV ΔC6L, y lo contrario ocurrió con la respuesta específica frente a NS3 (Figura 20B).

El análisis de la calidad de la respuesta inmune celular de memoria mostró que MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L generaron células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV que son altamente polifuncionales, con alrededor del 65% y 23% de las células con 3 y 4 funciones, respectivamente (Figura 20C, diagrama de círculos). Las células que producen CD107a + IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-2 y CD107a + IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  fueron las células más abundantes en ambos grupos (Figura 20C, gráfica de barras).

#### 4.1.9. MVA-HCV y MVA-HCV $\Delta$ C6L inducen niveles similares de células T CD8<sup>+</sup> con fenotipo efector de memoria específicas frente al HCV

Por último, 53 días después del *boost* se examinó el fenotipo de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria específicas frente a todas las proteínas del HCV al medir la expresión de los marcadores de superficie CD127 y CD62L, que permiten la definición de diferentes subpoblaciones de células de memoria: células T de memoria central (TCM, CD127<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>), células T de memoria efectora (TEM, CD127<sup>+</sup>/CD62L<sup>-</sup>), y células T efectoras (TE, CD127<sup>-</sup>/CD62L<sup>-</sup>) (Figura 21). Los resultados mostraron que las inmunizaciones con MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta$ C6L generaron un alto porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> de memoria específicas frente al HCV, principalmente del fenotipo TEM, y de magnitud similar en ambos grupos de inmunización (Figura 21).



**Figura 21. Perfil fenotípico de la respuesta inmune de células T CD8<sup>+</sup> de memoria específicas frente al HCV en ratones inmunizados.** Esplenocitos de ratones inmunizados (n=4) se obtuvieron 53 días después del *boost* y las respuestas inmunes de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente a grupos de péptidos del HCV se analizaron por ICS, tal y como se describe en Materiales y Métodos. El eje Y indica el porcentaje de células T de memoria central (TCM; CD127<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>), células T de memoria efectora (TEM; CD127<sup>+</sup>, CD62L<sup>-</sup>) y células T efectoras (TE; CD127<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>) CD8<sup>+</sup> específicas frente a todos los grupos de péptidos del HCV y que expresan CD107a y/o IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2 (respuesta total).

## 4.2. Diseño, generación y caracterización *in vitro* e *in vivo* de un candidato vacunal MVA-HCV que contenga una mutación en la proteína NS3 del HCV (MVA-HCVmut).

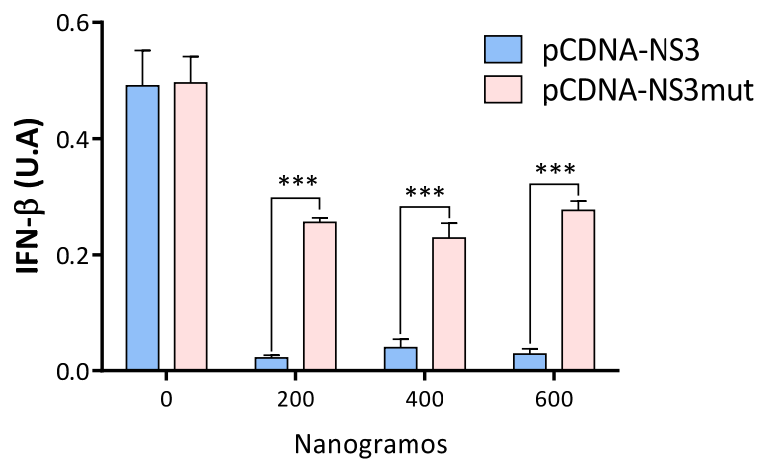
El genoma del HCV codifica proteínas que tienen un papel fundamental en el ciclo de replicación del virus, pero que también son potentes inhibidores de la respuesta inmune del hospedador [226,227]. Un ejemplo de estas proteínas inhibidoras es la proteína NS3, una proteína multifuncional con un dominio serín-proteasa ubicado en el extremo N-terminal y un dominio nucleósido trifosfatasa (NTPasa)/ARN helicasa ubicado en la parte C-terminal [228]. El papel funcional de NS3 en el ciclo de replicación del HCV es terminar de procesar, gracias a su actividad proteasa, la parte final de la poliproteína del HCV (desde NS3 a NS5), pero a su vez es capaz de inhibir la respuesta del IFN- $\beta$  al unirse y proteolizar las proteínas de señalización antiviral mitocondrial MAVS (del inglés *Mitochondrial antiviral-signaling protein*), y TRIF (del inglés, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ) modificando su localización y por tanto suprimiendo la inducción de IFN tipo I [195,196].

Como se ha mencionado en la introducción, una estrategia para aumentar la inmunogenicidad de los candidatos vacunales basados en el MVA es la optimización del antígeno heterólogo que expresan. En este caso, MVA-HCV expresa varias proteínas del HCV con actividad inmunosupresora. Por tanto, dada la importancia del IFN en la respuesta antiviral frente al HCV en el presente apartado se propuso la modificación de la proteína NS3, una de las proteínas con mayor actividad inhibitoria de la respuesta inmune mediada por IFN tipo I, con el fin de aumentar la respuesta inmune específica frente al HCV inducida por MVA-HCV. Para ello, se generó un nuevo candidato vacunal, MVA-HCVmut, que contiene una mutación puntual (S139A) en el dominio catalítico de NS3, para hacerla inactiva y, por tanto, evitar su actividad inmunosupresora, y se estudió su inmunogenicidad *in vivo* en ratones inmunizados mediante protocolos homólogos de inmunización *prime/boost* en comparación con la vacuna parental MVA-HCV.

### 4.2.1. La mutación puntual S139A en NS3 es suficiente para revertir la inhibición de IFN- $\beta$ en células transfectadas

Previo a la generación del virus MVA-HCVmut, se procedió a confirmar los resultados descritos previamente en la bibliografía, que afirman que una sola mutación en el dominio catalítico de NS3 (cambio de la Serina en la posición 139 por Alanina, S139A) es suficiente para suprimir su actividad proteasa y su inhibición de IFN- $\beta$  [197]. Para ello, se utilizó un plásmido de

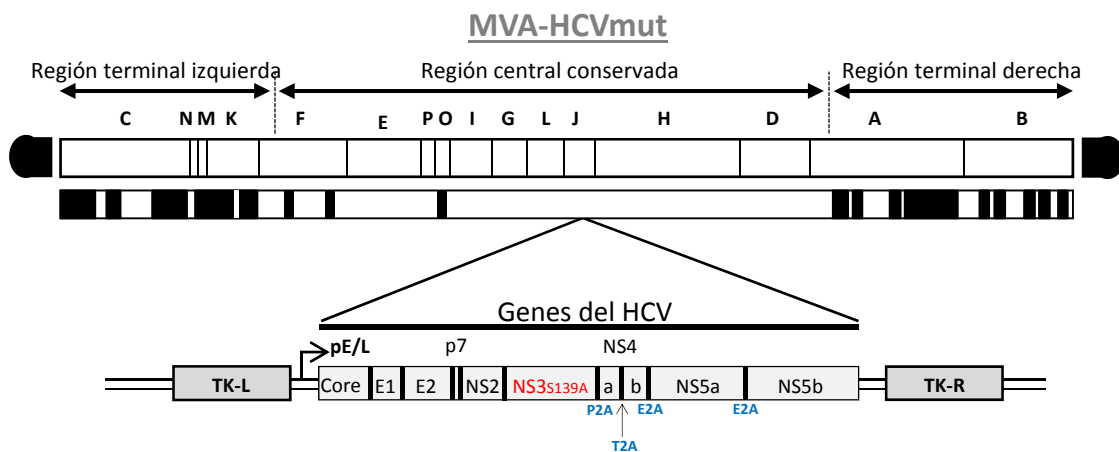
expresión en células de mamíferos que expresa la proteína NS3 del HCV, pcDNA-NS3, sobre el cual se procedió a introducir por mutagénesis dirigida dicha mutación S139A, utilizando los oligonucleótidos descritos en la **Tabla 5** de Materiales y Métodos, para generar el plásmido pcDNA-NS3mut. Cabe destacar que esta mutación no tiene efecto en la actividad helicasa de NS3, y ha sido previamente descrita en la bibliografía como una aproximación adecuada para la generación de vacunas frente al HCV [197]. Los resultados mostraron que cuando células HEK-293T fueron transfectadas con pcDNA-NS3mut e infectadas a las 24 h post-transfección con el virus Sendai, utilizado como agente inductor de IFN- $\beta$ , se rescata la producción de IFN- $\beta$  de forma significativa, sin alcanzar los niveles observados en las células sin transfectar y estimuladas con el virus Sendai, mientras que en la transfección con pcDNA-NS3 ocurre una inhibición significativa de IFN- $\beta$ , confirmando los resultados previamente descritos [197] (**Figura 22**).



**Figura 22. Expresión de IFN- $\beta$  en células HEK-293T transfectadas con pcDNA-NS3 o pcDNA-NS3mut.** Reversión de la inhibición de IFN- $\beta$  por parte del pcDNA que codifica la proteína NS3 con la mutación S139A (pcDNA-NS3mut) en comparación con el que expresa la proteína NS3 salvaje (pcDNA-NS3). En el eje X se representan las distintas cantidades en nanogramos (ng) de los plásmidos utilizados. La cantidad total transfectada fue, en todos los casos, de 730 ng, de los cuales 100 ng son del plásmido pLucTer, 30 ng del plásmido Renilla pRL-null y diferentes cantidades de los plásmidos pcDNA-NS3 o pcDNA-NS3mut (mostradas en la gráfica), siempre completando hasta 600 ng con pcDNA vacío. Los datos fueron analizados relativizando las unidades medidas de Renilla con las de Luciferasa. U.A: unidades arbitrarias. Se muestran las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar pcDNA-NS3 con pcDNA-NS3mut (\*\*\*, p <0.001).

#### 4.2.2. Generación del virus recombinante MVA-HCVmut

Una vez confirmado que la mutación S139A inhibe la función inmunosupresora de NS3, se procedió a generar el nuevo virus recombinante MVA-HCVmut, que contiene dicha mutación (Figura 23). Para ello, se diseñó un inserto del HCV ligeramente distinto al de MVA-HCV, ya que al suprimir la actividad catalítica de NS3, la poliproteína del HCV quedaría sin procesar entre NS3 y NS5, pues es precisamente NS3 la encargada de proteolizar esta parte final de la poliproteína. Para evitar esto, se insertaron pequeñas secuencias de péptidos virales autocatalíticos entre las proteínas NS3 y NS4a, NS4a y NS4b, NS4b y NS5a, y NS5a y NS5b. Estos péptidos, que proceden de distintos virus, se denominan “péptidos 2A” (Tabla 3 de Materiales y Métodos) y permiten la expresión individual de múltiples proteínas colocadas en un solo marco de lectura debido a que provocan una ruptura en la cadena peptídica que nace del ribosoma, en concreto entre los aminoácidos prolina (P) y glicina (G), asegurando una traducción estequiométrica de todas las proteínas presentes entre las secuencias de péptidos 2A [212,213,229].

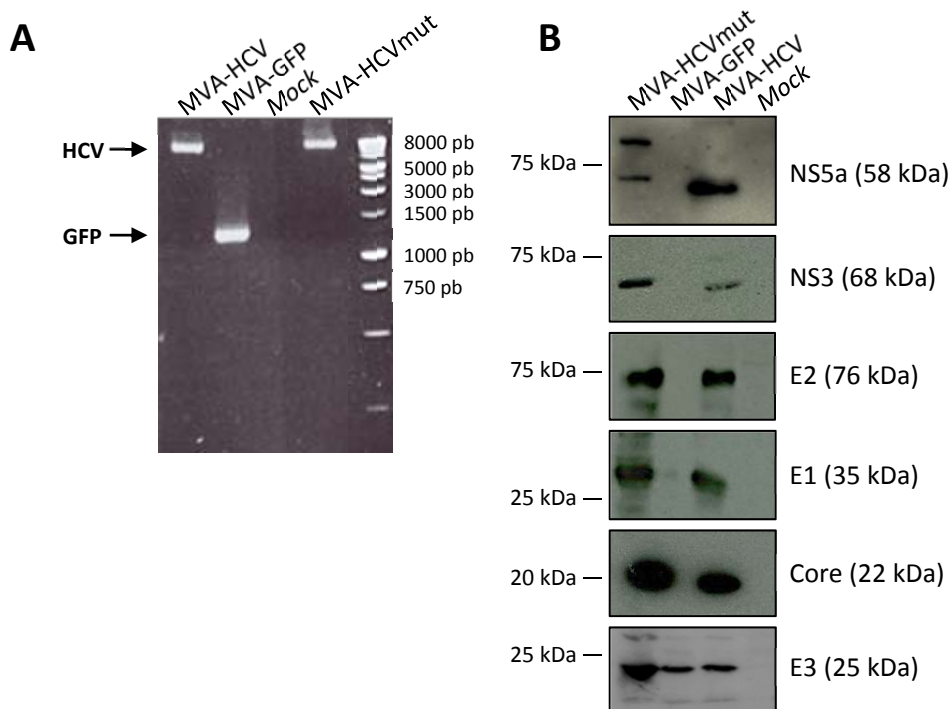


**Figura 23. Esquema del genoma del virus MVA-HCVmut.** Al igual que en MVA-HCV, los genes del HCV del genotipo 1a, aislado H77, se encuentran insertados en el locus TK (gen *J2R*) del virus MVA, bajo el promotor sintético temprano/tardío (pE/L). MVA-HCVmut presenta una mutación puntual en NS3 (S139A) y distintas secuencias de péptidos 2A colocados entre las proteínas NS3 y NS4a, NS4a y NS4b, NS4b y NS5a, y NS5a y NS5b. Las diferentes regiones del genoma del MVA se muestran en mayúsculas. Debajo del genoma se muestran como rectángulos negros los genes del MVA delecionados o fragmentados como consecuencia de sus pases en cultivo. TK-L, flanco izquierdo del gen TK; TK-R, flanco derecho del gen TK. Los péptidos 2A se señalan en color azul: P2A: péptido procedente del teschovirus porcino-1; T2A: péptido procedente del virus *Thosea asigna* y E2A: péptido procedente del virus de la rinitis equina A.

De esta forma, se procedió a la generación del virus MVA-HCVmut mediante la inserción del genoma casi completo del genotipo 1a del HCV, en el locus TK del virus parental MVA-GFP, tal y como se describe en Materiales y Métodos. El inserto contiene los genes Core, E1, E2, p7, NS2, NS3 mutado (mutación S139A), NS4a, NS4b, NS5a y parte de NS5b. Entre NS3 y NS4a se insertó un péptido 2A P2A, entre NS4a y NS4b el péptido T2A, y entre NS4b y NS5a y entre NS5a y NS5b



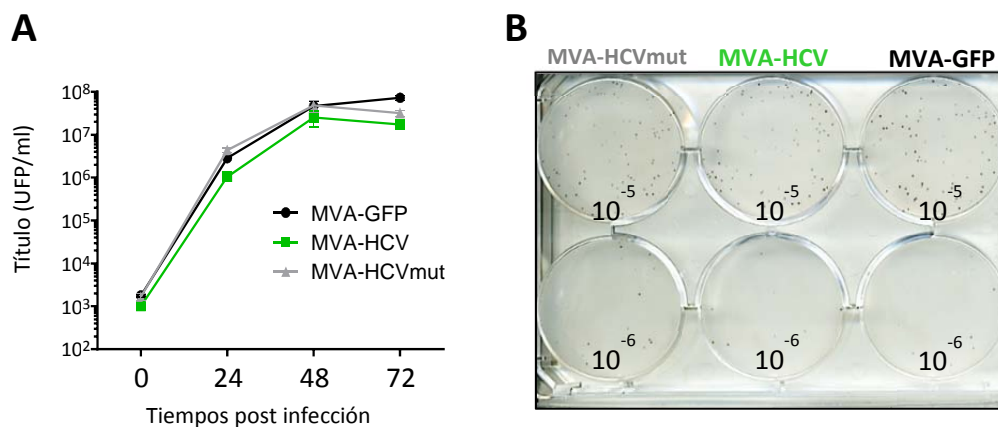
el péptido E2A (**Figura 23**). La correcta generación y la pureza del virus recombinante MVA-HCVmut fueron confirmadas por PCR (**Figura 24A**) tras amplificar el ADN obtenido de células DF-1 sin infectar (*Mock*) e infectadas a una MDI de 5 UFP/célula con el virus parental MVA-GFP, MVA-HCV y MVA-HCVmut utilizando oligonucleótidos que hibridan en las zonas flanqueantes del locus TK del MVA (locus de inserción de los genes del HCV) y que están descritos en la **Tabla 5** de Materiales y Métodos. La inserción de los genes del HCV también se comprobó por secuenciación. Posteriormente, para confirmar la correcta expresión y el procesamiento de las proteínas del HCV en MVA-HCVmut, se obtuvieron extractos de células DF-1 sin infectar (*Mock*) o infectadas con MVA-GFP, MVA-HCV y MVA-HCVmut a una MDI de 5 UFP/célula y se analizaron por WB. Tal y como se muestra en la **Figura 24B**, el virus MVA-HCVmut expresa correctamente las proteínas estructurales Core, E1 y E2 del HCV, de forma similar a MVA-HCV. Sin embargo, procesa con menor efectividad las proteínas no estructurales en comparación con MVA-HCV, observándose bandas de mayor peso molecular en los WB de NS3 y NS5a, que indicarían que la parte no estructural de la poliproteína no se procesa completamente (**Figura 24B**).



**Figura 24. Comprobación de la correcta presencia y expresión de las proteínas del HCV por parte del virus MVA-HCVmut.** Células DF-1 se infectaron con los distintos virus a una MDI de 5 UFP/célula y se recogieron tras 24 hpi para extraer su ADN o preparar extracto para WB. **(A)** PCR con oligonucleótidos que hibridan en las regiones flanqueantes a la zona de inserción de los genes del HCV (gen TK del MVA) y que se utilizaron para confirmar la correcta generación del virus MVA-HCVmut. **(B)** Expresión por WB de las proteínas del HCV presentes en MVA-HCVmut y MVA-HCV.

#### 4.2.3. La mutación S139A en NS3, presente en MVA-HCVmut, no afecta al crecimiento de MVA-HCV

Se ha descrito previamente que MVA-HCV y MVA-WT crecen de manera similar en cultivo celular [183]. Para confirmar que la presencia del nuevo inserto del HCV en MVA-HCVmut no afecta a su capacidad replicativa, se infectaron células DF-1 con MVA-HCV y MVA-HCVmut (y el virus parental MVA-GFP como control) y se recogieron a distintos tiempos post-infección para comparar sus cinéticas de crecimiento. A continuación, se titularon los virus presentes en los extractos celulares. Tal y como se muestra en la [Figura 25](#), ambos virus replican de manera similar, por lo que el nuevo inserto del HCV no afecta a la capacidad de replicación de MVA-HCVmut.

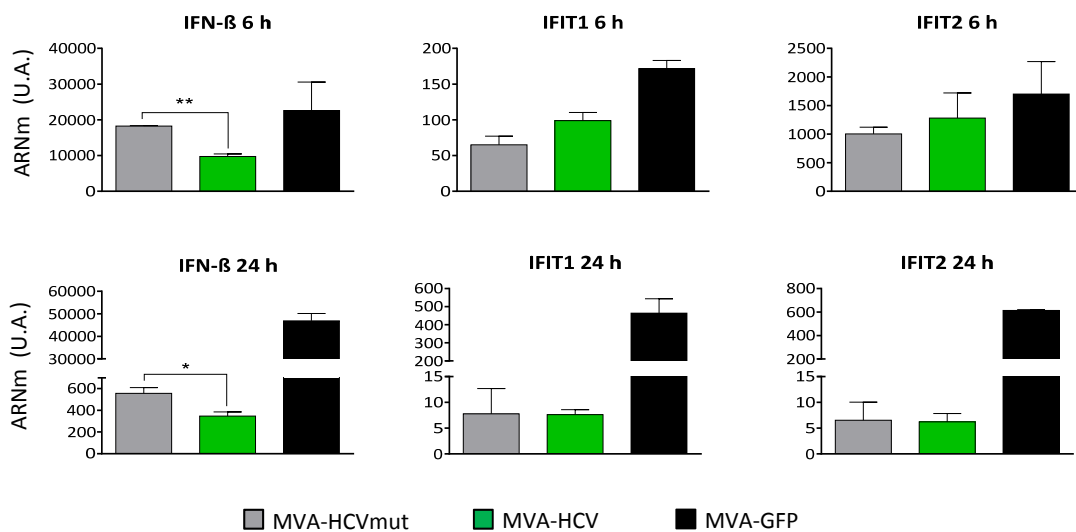


**Figura 25. Cinéticas de crecimiento de MVA-GFP, MVA-HCV y MVA-HCVmut.** Células DF-1 fueron infectadas con los diferentes virus a una MDI de 0.01 UFP/célula. A 0, 24, 48 y 72 hpi se recogieron las células y los títulos virales en los lisados celulares se determinaron mediante inmunomarcaje de placa con anticuerpos anti-VACV. **(A)** Curvas de crecimiento de los distintos virus. Se representa la media y desviación estándar de 2 experimentos independientes. UFP: Unidad formadora de placa. **(B)** Ejemplo de inmunomarcaje en células crecidas en pocillos de placa M6 e infectadas con las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  de cada virus y fijadas a 48 hpi.

#### 4.2.4. MVA-HCVmut incrementa los niveles de expresión de IFN- $\beta$ en macrófagos infectados, en comparación con MVA-HCV

Se ha descrito previamente que en células infectadas con MVA-HCV se produce una reducción de la expresión de varios genes implicados en la inmunidad innata, principalmente genes de la ruta del IFN, en comparación con células infectadas con MVA-WT [183] y que esta inhibición sigue presente a pesar de la delección del gen *C6L* del MVA, tal y como se ha descrito en el apartado anterior. El virus recombinante MVA-HCVmut se diseñó con el objetivo de aumentar los niveles de expresión de IFN- $\beta$ , en comparación con el MVA-HCV. Para

comprobarlo, se infectaron células humanas THP-1 (macrófagos) con MVA-GFP, MVA-HCV y MVA-HCVmut a una MDI de 5 UFP/célula y a las 6 y 24 hpi se extrajo el ARN y se analizó mediante RT-PCR a tiempo real la expresión de IFN- $\beta$ , y de los genes inducidos por IFN (IFIT1 e IFIT2) (**Figura 26**). Los resultados obtenidos muestran que MVA-HCVmut, en comparación con MVA-HCV, produce un aumento significativo de la expresión de IFN- $\beta$ , tanto a 6 como a 24 hpi, pero este aumento no se observa en los niveles de IFIT1 ni IFIT2. Además, los niveles de expresión de IFN- $\beta$ , IFIT1 e IFIT2 inducidos por MVA-HCVmut no consiguieron alcanzar la inducción generada por MVA-GFP, indicando que a pesar de que la mutación en NS3 aumenta los niveles de IFN- $\beta$ , aún se observa una inhibición de los genes de la ruta del IFN.

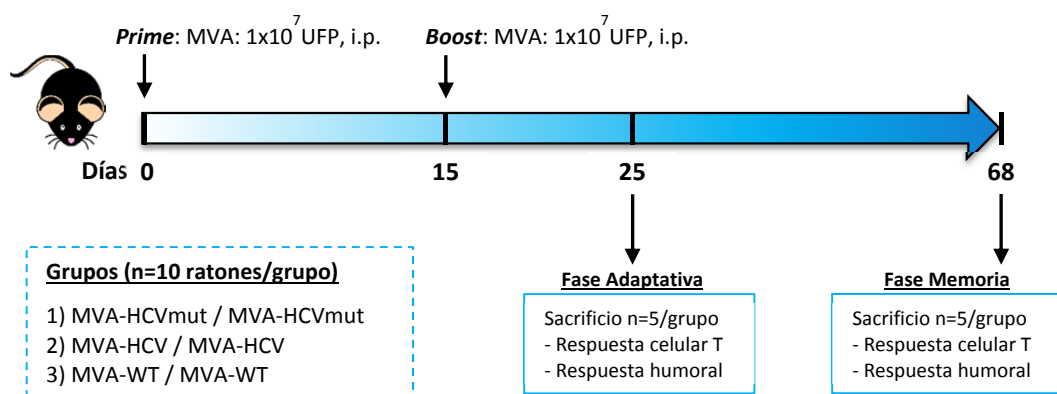


**Figura 26. Expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata en células THP-1 humanas infectadas con MVA-HCV y MVA-HCVmut.** Células THP-1 fueron no infectadas (*Mock*) o infectadas con MVA-GFP, MVA-HCV y MVA-HCVmut a una MDI de 5 UFP/célula durante 6 y 24 horas. Los niveles de expresión de ARNm de cada gen se analizaron por RT-PCR y se relativizaron frente a su respectivo gen endógeno HPRT, no influido por la infección, y se restaron a los niveles obtenidos en el *Mock*. U.A: Unidades arbitrarias. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar MVA-HCV y MVA-HCVmut (\* p < 0.05, \*\* p < 0.005). Se representa la media y desviación estándar de muestras por duplicado de un experimento, y son representativas de 2 experimentos independientes.

#### 4.2.5. MVA-HCV y MVA-HCVmut inducen una similar respuesta inmune celular adaptativa específica frente al HCV

Para comprobar si el aumento de IFN- $\beta$  inducido por MVA-HCVmut en células infectadas podría correlacionarse *in vivo* con un aumento en la respuesta inmune adaptativa contra los antígenos del HCV, primero analizamos la respuesta de las células T específicas frente al HCV generada por MVA-HCV y MVA-HCVmut en ratones inmunizados con 2 inoculaciones de cada

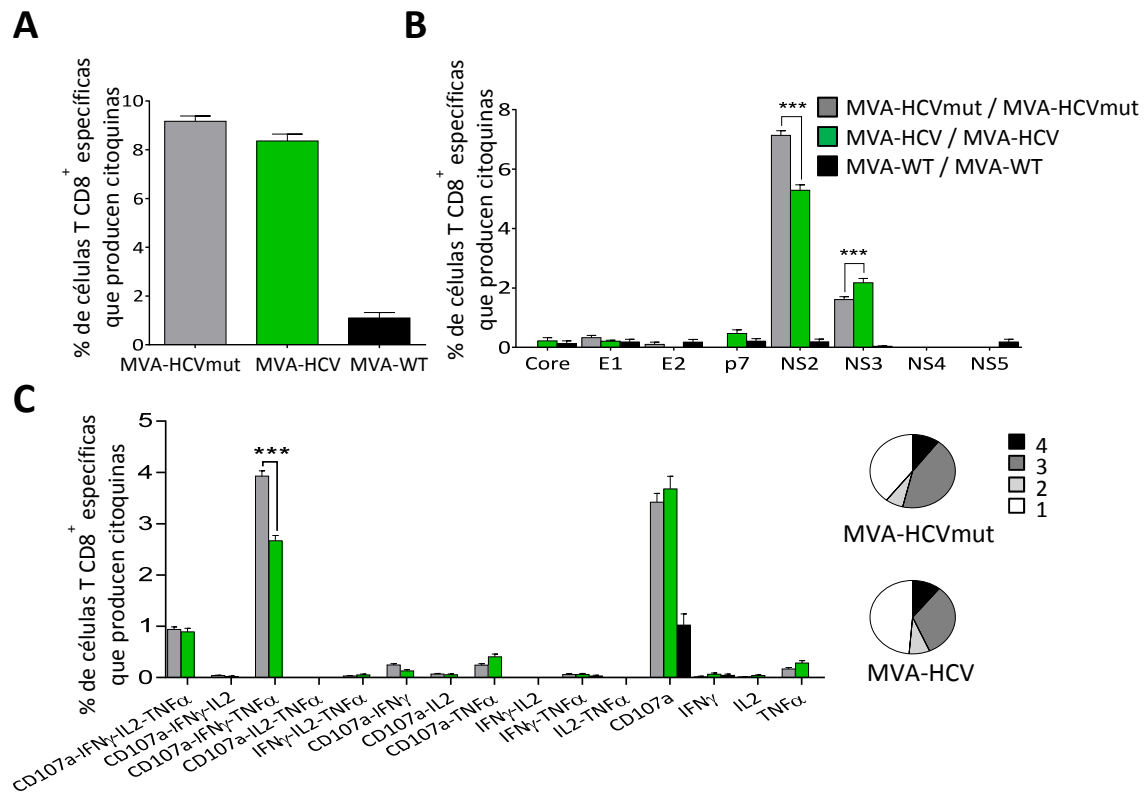
vector viral (protocolo homólogo de inmunización *prime/boost*) (Figura 27). Para ello se inmunizaron 10 ratones C57BL/6 por grupo (MVA-WT, MVA-HCV y MVA-HCVmut), tal y como se describe en Materiales y Métodos, y la mitad de ellos (n=5) se sacrificaron el día 10 después del *boost* para medir por ICS la respuesta inmune adaptativa de células T específicas frente al HCV. Los esplenocitos de cada grupo de inmunización se estimularon *ex vivo* con un panel de grupos de péptidos que cubren la secuencia completa de la cepa H77 del HCV (genotipo 1a) y, tras 6 horas de estimulación, las células se marcaron con anticuerpos específicos para identificar poblaciones de células T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) y células respondedoras (que expresan CD107a en la superficie de las células T como un marcador indirecto de citotoxicidad y/o que producen las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2).



**Figura 27. Esquema del protocolo de inmunización utilizado.** Se inocularon 10 ratones C57BL/6 por grupo a 0 y 15 días (*prime/boost*) con los diferentes candidatos vacunales indicados. A 10 días tras el *boost* (día 25) se sacrificaron la mitad de los ratones (n=5) para obtener sus bazos y sangre y estudiar la respuesta inmune celular y humoral adaptativa frente al HCV, respectivamente. A 53 días tras el *boost* (día 68), el resto de ratones (n=5) se sacrificaron y se obtuvieron los bazos y la sangre para estudiar la respuesta inmune celular y humoral de memoria frente al HCV, respectivamente. UFP: Unidades formadoras de placa; i.p: intraperitoneal.

Los resultados mostraron que la respuesta inmune frente al HCV generada por MVA-HCV y MVA-HCVmut fue mediada principalmente por células T CD8<sup>+</sup> (determinadas como la suma de células productoras de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2, y/o expresando el marcador de desgranulación CD107a) específicas frente a los distintos péptidos del HCV (Core + E1 + E2 + p7 + NS2 + NS3 + NS4 + NS5). Esta respuesta fue alta y similar en ratones inmunizados con MVA-HCV y MVA-HCVmut (Figura 28A). No se observaron células T CD4<sup>+</sup> específicas frente al HCV. El análisis del perfil de esta respuesta inmune de células T CD8<sup>+</sup> mostró que fue dirigida preferentemente contra la proteína NS2 y, en menor medida, frente a NS3 en ambos grupos de inmunización (Figura 28B). Mientras que MVA-HCVmut generó una respuesta significativamente mayor frente a NS2 que MVA-HCV, lo contrario ocurrió con la respuesta inmune específica frente a NS3 (Figura 28B). La calidad de la respuesta inmune de las células T CD8<sup>+</sup> se analizó midiendo el

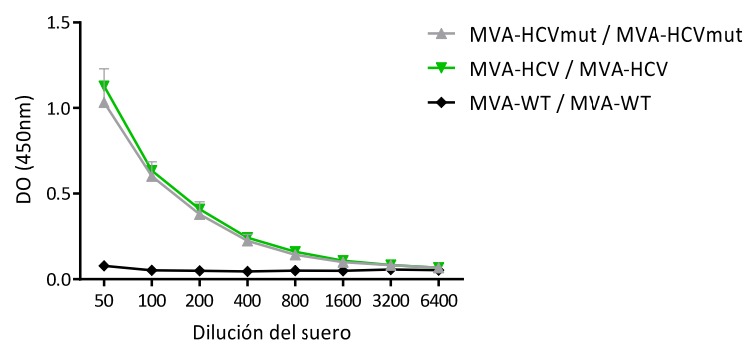
patrón de producción de citoquinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2) más su potencial citotóxico (expresión de CD107a como marcador de desgranulación). Como se muestra en la **Figura 28C**, las respuestas generadas por MVA-HCV y MVA-HCVmut fueron similares y altamente polifuncionales, con células productoras triples (CD107a + IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ) y cuádruples (CD107a + IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-2), pero sin diferencias significativas debido a la mutación de NS3 ni al peor procesamiento de las proteínas no estructurales del HCV en MVA-HCVmut, salvo en las triples productoras, donde MVA-HCVmut si aumenta significativamente respecto a MVA-HCV.



**Figura 28. Respuesta inmune adaptativa de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV en ratones inmunizados.** Esplenocitos de ratones inmunizados (n=5) se obtuvieron 10 días después del *boost*, y las respuestas inmunes de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente a grupos de péptidos del HCV se analizaron por ICS, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar MVA-HCV/MVA-HCV con MVA-HCVmut/MVA-HCVmut (\*\*\*, p < 0.001). **(A)** Magnitud total de la respuesta inmune adaptativa de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV. En el eje Y se muestra el porcentaje medido como la suma de células T específicas frente a todos los antígenos del HCV que expresan CD107a y/o que producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2. **(B)** Amplitud de la respuesta inmune adaptativa de células T CD8<sup>+</sup> mostrada como el porcentaje de células específicas frente a Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4 o NS5 que expresan CD107a y/o que producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2. **(C)** Polifuncionalidad de la respuesta inmune adaptativa de células T CD8<sup>+</sup> dirigidas contra todos los antígenos del HCV. Las respuestas se dividen en función de la producción combinada de CD107a, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2 por los distintos grupos de inmunización, y se agrupan teniendo en cuenta el número de funciones (una, dos, tres, o cuatro, diagramas de círculos).

#### 4.2.6. MVA-HCV y MVA-HCVmut inducen niveles similares de anticuerpos frente a la proteína E2 del HCV

A continuación, se analizó la respuesta inmune humoral inducida por MVA-HCV y MVA-HCVmut, cuantificando, mediante ELISA, los niveles totales de anticuerpos IgG contra la proteína E2 del HCV (cepa H77) en sueros obtenidos de ratones individuales 10 y 53 días después del boost (**Figura 27**). Ambos grupos de inmunización generaron niveles similares de anticuerpos contra E2 en la fase adaptativa, aunque la respuesta humoral inducida no fue muy elevada, y sólo se detectaron anticuerpos 10 días después del boost (**Figura 29**).



**Figura 29. Respuesta humoral específica frente a la proteína E2 del HCV.** Obtenida a partir de sueros de ratones inmunizados (n=5) tras 10 días después del *boost*. Los 5 sueros de cada grupo fueron mezclados y diluidos seriadamente 1:2 para medir los niveles totales de anticuerpos IgG anti-E2 por ELISA. DO: densidad óptica.

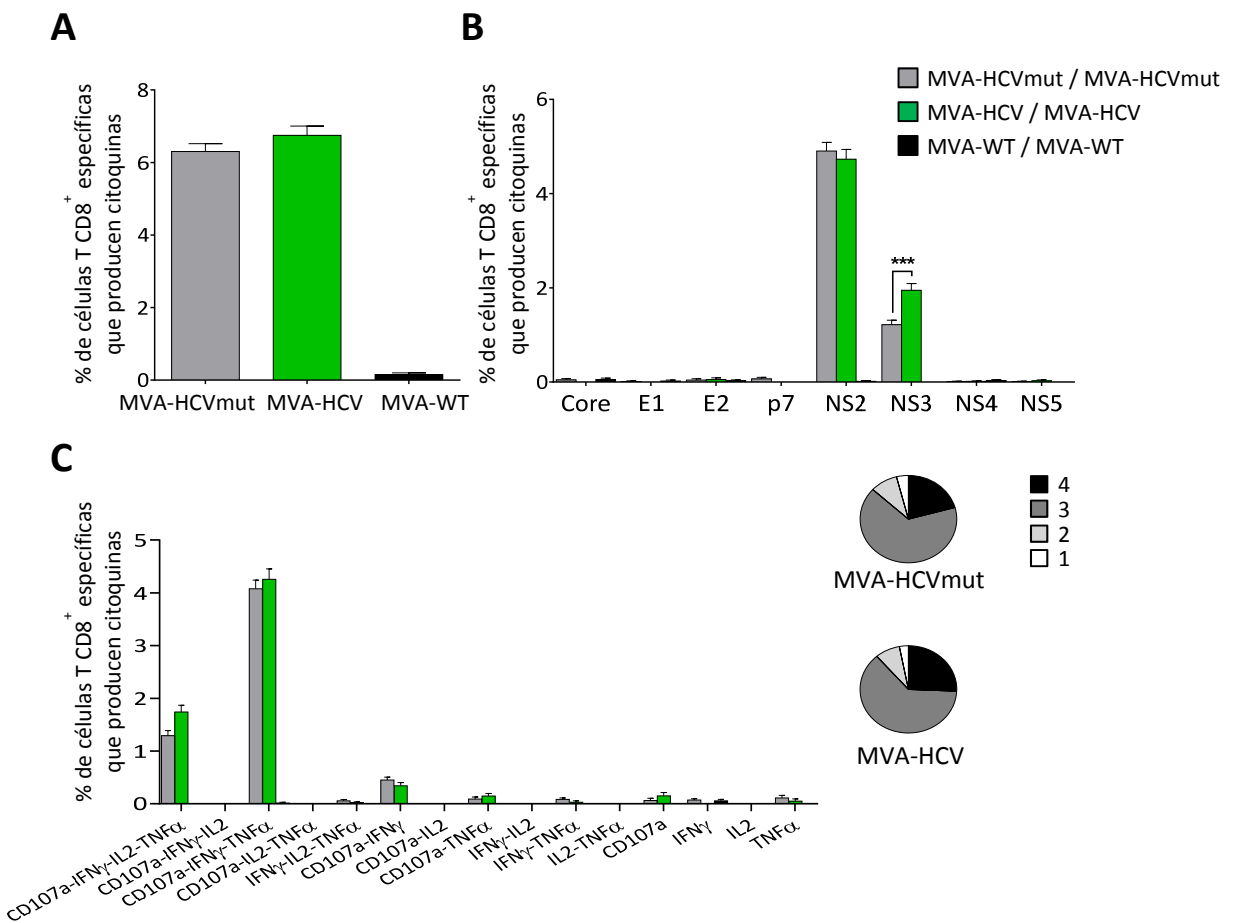
#### 4.2.7. MVA-HCV y MVA-HCVmut inducen semejantes respuestas inmunes celulares de memoria específicas frente al HCV

Para estudiar las respuestas inmunes de memoria de células T específicas frente al HCV inducidas por MVA-HCV y MVA-HCVmut, 5 ratones de cada grupo de inmunización se sacrificaron 53 días después del *boost* y se estimuló *ex vivo* cada grupo de esplenocitos con un panel de grupos de péptidos del HCV, de manera similar al protocolo de respuesta inmune adaptativa descrito anteriormente y en Materiales y Métodos.

La magnitud de la respuesta inmune celular de memoria específica frente al HCV fue, al igual que en la fase adaptativa, mediada principalmente por células T CD8<sup>+</sup>, sin encontrarse respuesta celular mediada por células T CD4<sup>+</sup> (**Figura 30A**). Esta respuesta celular T CD8<sup>+</sup> fue alta y similar en ratones inmunizados con MVA-HCV y MVA-HCVmut (**Figura 30A**), y dirigida principalmente frente a NS2, seguida de NS3, encontrándose diferencias significativas entre

ambos grupos en las células respondedoras frente a NS3, que fueron significativamente mayores en MVA-HCV que en MVA-HCVmut (**Figura 30B**), al igual que en la fase adaptativa.

El análisis de la calidad de la respuesta inmune celular de memoria mostró que MVA-HCV y MVA-HCVmut generaron células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV que son altamente polifuncionales, con alrededor del 65% y 25% de las células con 3 y 4 funciones, respectivamente (**Figura 30C, diagrama de círculos**), pero sin diferencias significativas entre ambos virus. Las células que producen CD107a + IFN-γ + TNF-α + IL-2 y CD107a + IFN-γ + TNF-α fueron las células más abundantes en ambos grupos (**Figura 30C, gráfica de barras**).

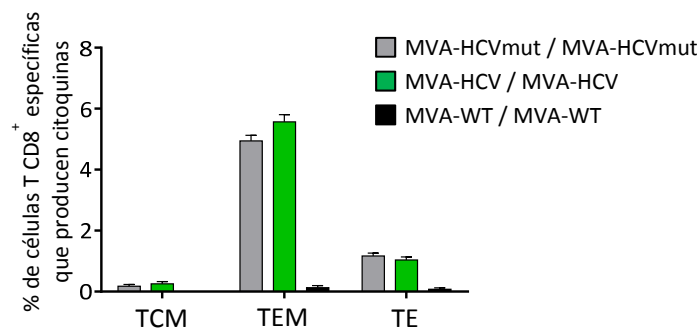


**Figura 30. Respuesta inmune de memoria de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV en ratones inmunizados.** Esplenocitos de ratones inmunizados (n=5) se obtuvieron 10 días después del boost, y las respuestas inmunes de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente a grupos de péptidos del HCV se analizaron por ICS, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar MVA-HCV/MVA-HCV con MVA-HCVmut/MVA-HCVmut (\*\*\*, p < 0.001). **(A)** Magnitud total de la respuesta inmune de memoria de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV. En el eje Y se muestra el porcentaje medido como la suma de células T específicas frente a todos los antígenos del HCV que expresan CD107a y/o que producen IFN-γ y/o TNF-α y/o IL-2. **(B)** Amplitud de la respuesta inmune de memoria de células T CD8<sup>+</sup> mostrada como el porcentaje de células específicas frente a Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4 o NS5 que expresan CD107a y/o que producen IFN-γ y/o TNF-α y/o IL-2. **(C)** Polifuncionalidad de la respuesta inmune adaptativa de células T CD8<sup>+</sup> dirigidas frente a todos los antígenos del HCV. Las

respuestas se dividen en función de la producción combinada de CD107a, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2 por los distintos grupos de inmunización, y se agrupan teniendo en cuenta el número de funciones (una, dos, tres, o cuatro, diagramas de círculos).

#### 4.2.8. MVA-HCV y MVA-HCVmut inducen células T CD8<sup>+</sup> con fenotipo efector de memoria específicas frente al HCV

Finalmente, 53 días después del *boost* se examinó el fenotipo de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria específicas frente al HCV mediante el análisis de los marcadores de superficie CD127 y CD62L, que permiten la definición de las diferentes subpoblaciones de células de memoria, tal y como se indicó en el apartado de resultados anterior. Los resultados mostraron que las inmunizaciones con MVA-HCV y MVA-HCVmut generaron un alto porcentaje de células de memoria T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV, principalmente del fenotipo TEM, y de magnitud similar en ambos grupos de inmunización (Figura 31).



**Figura 31. Perfil fenotípico de la respuesta inmune de células T CD8<sup>+</sup> de memoria específicas frente al HCV en ratones inmunizados.** Esplenocitos de ratones inmunizados (n=5) se obtuvieron 53 días después del *boost* y las respuestas inmunes de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente a grupos de péptidos del HCV se analizaron por ICS, tal y como se describe en Materiales y Métodos. El eje Y indica el porcentaje de células T de memoria central (TCM; CD127<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>), células T de memoria efectora (TEM; CD127<sup>+</sup>, CD62L<sup>-</sup>) y células T efectoras (TE; CD127<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>) CD8<sup>+</sup> específicas frente a todos los grupos de péptidos del HCV y que expresan CD107a y/o IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2 (respuesta total).



### **4.3. Diseño, generación y caracterización *in vitro* e *in vivo* de nuevos candidatos vacunales basados en replicones DREP (DREP-HCV y DREP-e-HCV) para combinar en protocolos prime/boost con MVA-HCV.**

Tal y como se ha descrito en la introducción, los replicones DREP son plásmidos de ADN desnudo autoreplicativos que expresan por un lado la replicasa del SFV y por otro lado antígenos de interés frente a los cuales se quiere generar una respuesta inmune, que será potenciada por el mecanismo de apoptosis que desencadena la actividad de la replicasa. Varios estudios preclínicos en modelos animales han demostrado que el uso de la plataforma DREP como *prime* seguido por un *boost* de MVA induce potentes respuestas inmunitarias específicas frente a varias enfermedades infecciosas, como aquellas causadas por el virus Chikungunya [230–232], el virus Ébola [233] y el HIV-1 [205,206]. Sin embargo, no se han desarrollado vacunas basadas en DREP dirigidas frente al HCV. A través de la colaboración con el laboratorio del Profesor Peter Liljeström del Instituto Karolinska de Estocolmo (Suecia), con el que venimos participando en varios proyectos de la Unión Europea desde hace unos 20 años y siendo el laboratorio que ha desarrollado la tecnología de expresión de genes mediante vectores autoreplicativos de ADN (DREP) y de ARN (RREP), decidimos utilizar dicha tecnología para generar vectores replicativos de ADN expresando antígenos del HCV.

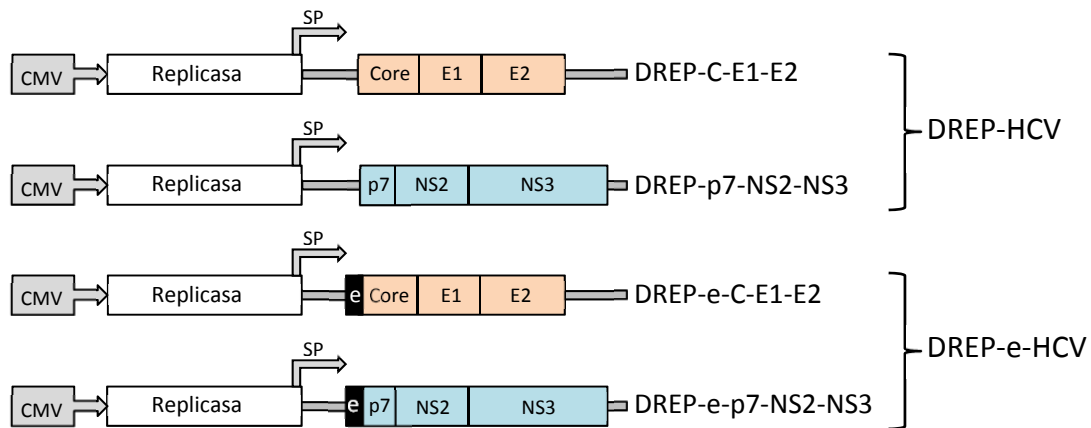
Los objetivos del presente apartado fueron generar y caracterizar *in vitro* nuevos candidatos vacunales frente al HCV basados en vectores DREP expresando genes estructurales y no estructurales del HCV y estudiar su inmunogenicidad *in vivo* en protocolos de inmunización *prime/boost* heterólogos en combinación con el candidato vacunal MVA-HCV, con el fin de aumentar la magnitud y amplitud de la respuesta inmune específica frente al HCV.

Los resultados del presente apartado han sido publicados recientemente [234] y se adjuntan en los anexos de esta tesis.

#### **4.3.1. Generación de nuevas vacunas frente al HCV basadas en vectores DREP que expresan antígenos del HCV**

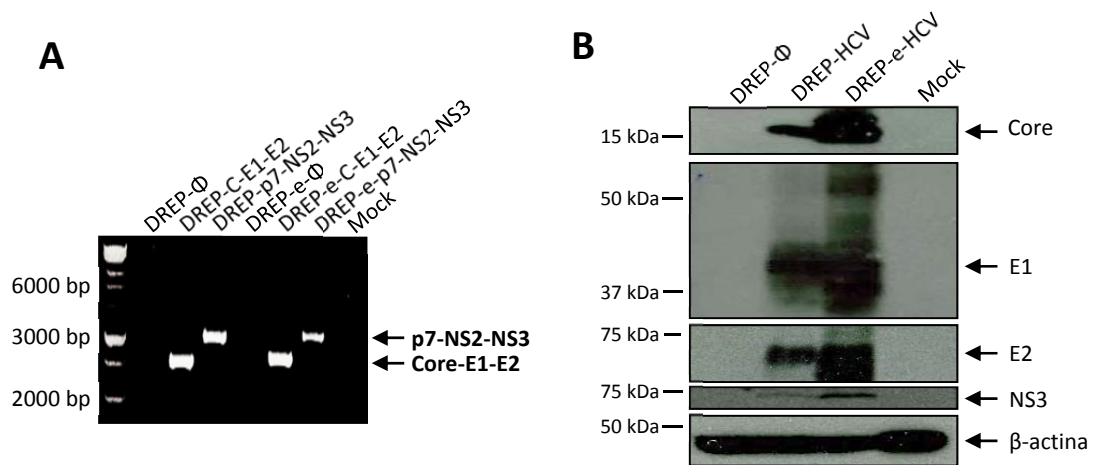
Los vectores DREP generados en este estudio se dividieron en 2 grupos: i) DREP-HCV, consistente en la mezcla de 2 plásmidos DREP, uno que expresa las proteínas estructurales Core, E1 y E2 (llamado DREP-C-E1-E2) y otro que expresa las proteínas p7, NS2 y NS3 (DREP-p7-NS2-NS3) y ii) DREP-e-HCV, consistente en la mezcla de 2 plásmidos DREP que expresan los mismos antígenos del HCV que el grupo anterior (DREP-e-C-E1-E2 y DREP-e-p7-NS2-NS3), pero que

contienen además un elemento *enhancer* (e) o potenciador de la traducción situado en la parte N-terminal de los antígenos del HCV, en la misma pauta de lectura (**Figura 32**). Se ha descrito previamente que este *enhancer* aumenta la expresión de los genes situados aguas abajo del mismo y aumenta la respuesta inmune humoral específica frente a dichos antígenos [202,203].



**Figura 32. Esquema de los 4 nuevos candidatos vacunales frente al HCV basados en plásmidos DREP.** Los distintos plásmidos expresan los genes Core-E1-E2 o p7-NS2-NS3 del HCV. DREP-C-E1-E2 y DREP-p7-NS2-NS3 se mezclaron para formar el candidato vacunal DREP-HCV, mientras que DREP-e-C-E1-E2 y DREP-e-p7-NS2-NS3 se mezclaron para formar el candidato vacunal DREP-e-HCV. CMV: Promotor de citomegalovirus. SP: promotor subgenómico de alfavirus. e: *enhancer*.

La correcta generación de los 4 vectores DREP fue confirmada por PCR (**Figura 33A**) y por secuenciación. Para confirmar que los vectores DREP expresaban y procesaban correctamente las proteínas del HCV que codifican, se transfectaron células HEK-293T con 5 µg totales de DREP-HCV (DREP-C-E1-E2 + DREP-p7-NS2-NS3) y DREP-e-HCV (DREP-e-C-E1-E2 + DREP-e-p7-NS2-NS3), tal y como se describe en Materiales y Métodos, y los extractos celulares se analizaron por WB tras 48 horas post-transfección para detectar las proteínas Core, E1, E2 y NS3 (**Figura 33B**). Los resultados muestran que los candidatos vacunales DREP-HCV y DREP-e-HCV expresan y procesan eficientemente los antígenos del HCV, con las poliproteínas Core-E1-E2 y p7-NS2-NS3 siendo procesadas correctamente dando lugar a las correspondientes proteínas estructurales y no estructurales maduras. Además, la presencia del *enhancer* en los vectores DREP-e-HCV produjo un aumento de los niveles de expresión de Core, E1, E2 y NS3 en comparación con DREP-HCV.

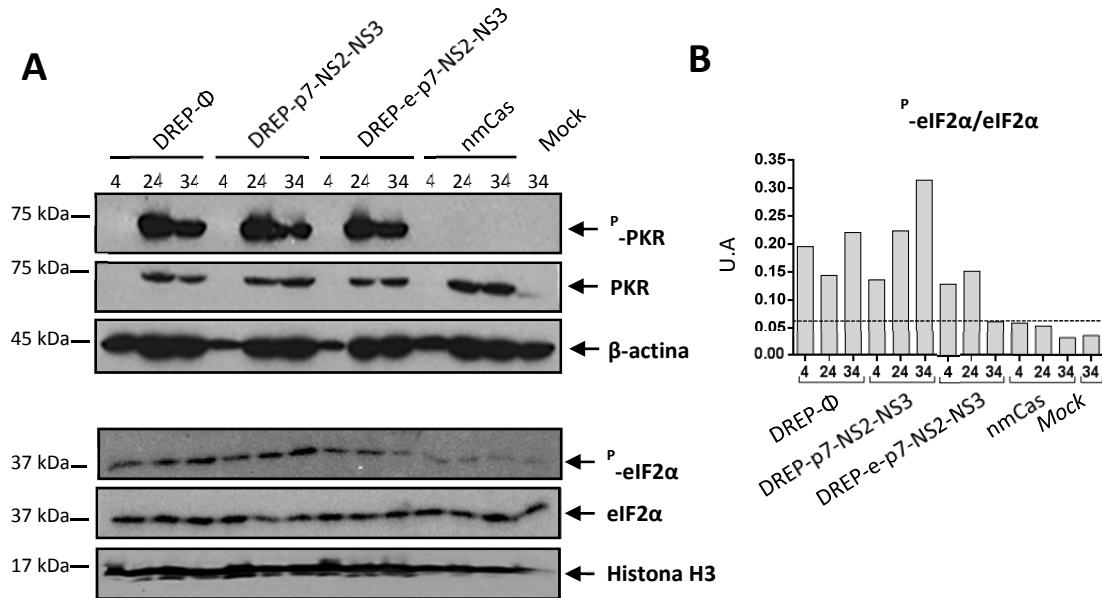


**Figura 33. Comprobación de la presencia de los genes y la expresión de las proteínas del HCV por parte de los plásmidos DREP. (A)** Análisis de PCR de los distintos plásmidos DREP utilizando oligonucleótidos que hibridan en las zonas adyacentes al inserto del HCV. **(B)** Expresión de proteínas del HCV en células HEK-293T sin transfectar (*Mock*) o transfectadas con DREP-HCV (mezcla de DREP-C-E1-E2 + DREP-p7-NS2-NS3), DREP-e-HCV (mezcla de DREP-e-C-E1-E2 + DREP-e-p7-NS2-NS3) o DREP-∅ y DREP-e-∅ vacíos, a 48 horas post-transfección.

#### 4.3.2. Inducción *in vitro* por parte de los vectores DREP de proteínas relacionadas con apoptosis

Una de las ventajas de las vacunas basadas en vectores DREP frente a los plásmidos de ADN convencionales es que promueven apoptosis celular, lo cual tiene un efecto adyuvante, aumentando la respuesta inmune frente a los antígenos que codifican. Esta apoptosis es causa directa de la acción de la replicasa de alfavirus presente en los vectores DREP, la cual genera intermediarios de ARN de doble cadena [235–237]. Por tanto, para confirmar que la inducción de apoptosis debida a la presencia de la replicasa en los vectores DREP no está influenciada por la presencia o ausencia de los antígenos del HCV ni del *enhancer*, se procedió a estudiar los niveles de expresión y fosforilación de las proteínas PKR y eIF2 $\alpha$ , relacionadas con la apoptosis e involucradas en la acción del IFN [238,239]. Para ello, células HEK-293T no transfectadas (*Mock*) o transfectadas durante 4, 24 y 34 horas con los vectores DREP-∅, DREP-p7-NS2-NS3, DREP-e-p7-NS2-NS3 y el plásmido nmCas, que no expresa la replicasa pero tiene un tamaño similar al de los plásmidos DREP y que se usó como control negativo (Figura 34). Los resultados mostraron que los 3 vectores DREP indujeron altos niveles de PKR fosforilada en comparación con células transfectadas con nmCas o células sin transfectar, sin diferencias observables debido a la presencia de los antígenos del HCV o del *enhancer* (Figura 34A, panel superior). Además, los vectores DREP también indujeron mayores niveles de eIF2 $\alpha$  fosforilada que los correspondientes controles (Figura 34A, panel inferior y 34B), con una mayor proporción de eIF2 $\alpha$

fosforilada/eIF2 $\alpha$  total (Figura 34B). Estos resultados confirman que la sola presencia de la replicasa en los distintos vectores DREP es capaz de promover una potente inducción de la apoptosis y demuestran que dicha inducción no se ve alterada por la presencia de los antígenos del HCV ni del *enhancer*.

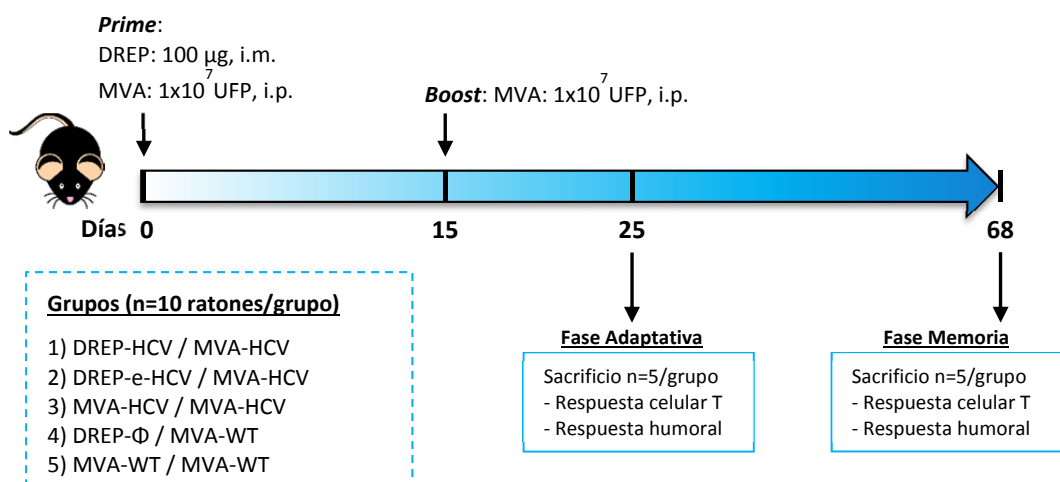


**Figura 34. Inducción *in vitro* de proteínas relacionadas con la apoptosis por parte de los vectores DREP.** Células HEK-293T se dejaron sin transfectar (*Mock*) o se transfectaron con los vectores DREP- $\emptyset$ , DREP-p7-NS2-NS3 o DREP-e-p7-NS2-NS3. El plásmido nmCas, que no contiene el gen de la replicasa de alfavirus, se utilizó como control negativo. A las 4, 24 y 34 horas después de la transfección, las células se recogieron y se prepararon para WB. (A) Detección de la presencia de las proteínas PKR y eIF2 $\alpha$  totales y fosforiladas. Se utilizaron anticuerpos anti- $\beta$ -actina y anti-histona H3 como controles de carga. (B) Cuantificación de la proporción eIF2 $\alpha$  fosforilada/eIF2 $\alpha$  total. Se analizaron las bandas de WB de eIF2 $\alpha$  fosforilada y eIF2 $\alpha$  total representadas en el panel inferior del panel A utilizando el programa informático Image Lab. La línea punteada representa el nivel umbral de los controles. U.A. Unidades arbitrarias.

#### 4.3.3. La inmunización con DREP-HCV y DREP-e-HCV seguida de MVA-HCV induce una respuesta inmune celular adaptativa específica frente al HCV potente, amplia y polifuncional

Ha sido ampliamente descrito que el uso en modelos animales de un protocolo de inmunización *prime/boost* heterólogo DREP/MVA induce una mayor respuesta inmune específica frente a varias enfermedades infecciosas que las combinaciones homólogas DREP/DREP ó MVA/MVA [205,206,230,231,233]. Por lo tanto, con el objetivo de mejorar las respuestas inmunes específicas frente a los antígenos del HCV generadas por el candidato vacunal MVA-HCV y descritas anteriormente [183,211] y en los apartados anteriores de

Resultados, y para evaluar si el *enhancer* puede aumentar las mismas, se inmunizaron ratones con un régimen heterólogo *prime/boost* que incluye los vectores DREP-HCV o DREP-e-HCV como *prime* seguidos de un *boost* de MVA-HCV (DREP-HCV/MVA-HCV y DREP-e-HCV/MVA-HCV, respectivamente) y se compararon los resultados obtenidos con aquellos de ratones inmunizados con el régimen homólogo MVA-HCV/MVA-HCV (Figura 35). Como controles se utilizaron los grupos DREP-∅/MVA-WT y MVA-WT/MVA-WT. A 10 días después del boost la mitad de los ratones (n=5) se sacrificaron para medir las respuestas inmunes adaptativas de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV mediante ICS, como se ha descrito en Materiales y Métodos y en los apartados anteriores de Resultados.



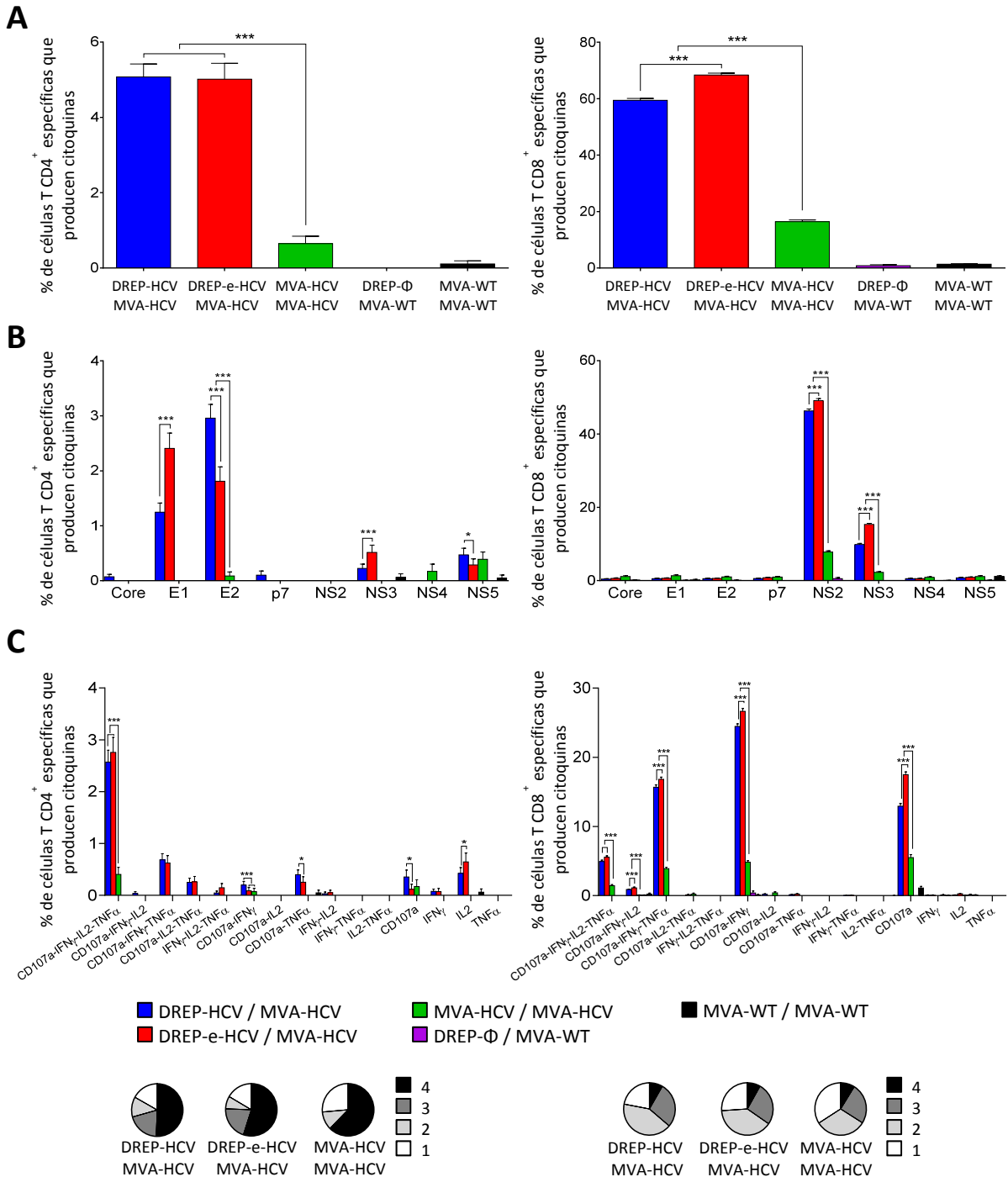
**Figura 35. Esquema del protocolo de inmunización utilizado.** Se inocularon 10 ratones C57BL/6 por grupo a 0 y 15 días (*prime/boost*) con los diferentes candidatos vacunales indicados. A 10 días tras el *boost* (día 25) se sacrificaron la mitad de los ratones (n=5) para obtener sus bazo y sangre y estudiar la respuesta inmune celular y humoral adaptativa frente al HCV, respectivamente. Además, se sangraron de la mejilla el resto de ratones (n=5) para estudiar la respuesta inmune humoral. A 53 días tras el *boost* (día 68), el resto de ratones (n=5) se sacrificaron y se obtuvieron los bazo y la sangre para estudiar la respuesta inmune celular y humoral de memoria frente al HCV, respectivamente. UFP: Unidades formadoras de placa; i.m: intramuscular; i.p: intraperitoneal.

La magnitud total de la respuesta inmune adaptativa de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV fue significativamente más potente en ratones inmunizados con DREP-HCV/MVA-HCV y DREP-e-HCV/MVA-HCV que en ratones que recibieron MVA-HCV/MVA-HCV, tanto en células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> (7.8 y 4 veces de incremento, respectivamente) (Figura 36A). En todos los grupos inmunizados con vacunas frente al HCV, la respuesta fue mediada principalmente por células T CD8<sup>+</sup>, alcanzándose niveles especialmente altos en aquellos ratones inmunizados con DREP-HCV/MVA-HCV y DREP-e-HCV/MVA-HCV, donde alrededor del 60-70% de las células T CD8<sup>+</sup> son específicas frente al HCV (Figura 36A, panel derecho). El régimen DREP-e-HCV/MVA-

HCV generó respuestas de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV significativamente más altas que DREP-HCV/MVA-HCV, demostrándose por primera vez el efecto positivo del uso del *enhancer* en la mejora de la respuesta inmune celular (**Figura 36A, panel derecho**).

En cuanto a la amplitud de la respuesta obtenida, la mayoría de las células T CD4<sup>+</sup> específicas frente al HCV en ambos grupos DREP/MVA-HCV se dirigieron preferentemente frente a las proteínas E1 y E2 del HCV y, en menor medida, hacia NS3 y NS5, mientras que éstas fueron menores y se dirigieron principalmente contra NS5 en el grupo de inmunización MVA-HCV/MVA-HCV. DREP-e-HCV/MVA-HCV indujo una mayor respuesta de células T CD4<sup>+</sup> específicas frente a E1 que DREP-HCV/MVA-HCV, mientras que DREP-HCV/MVA-HCV indujo más células T CD4<sup>+</sup> específicas frente a E2 que DREP-e-HCV/MVA-HCV (**Figura 36B, panel izquierdo**). Con respecto a la respuesta inmune de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV, en todos los grupos inmunizados con las vacunas, las respuestas se dirigieron principalmente contra NS2, seguido de NS3, siendo DREP-e-HCV/MVA-HCV el grupo que indujo una magnitud significativamente mayor frente a ambos antígenos en comparación con DREP-HCV/ MVA-HCV y MVA-HCV/MVA-HCV, siendo este último el que produjo los niveles más bajos (**Figura 36B, panel derecho**).

Por último, dado que una disfunción en la producción de citoquinas y en el potencial citotóxico por parte de las células T se ha asociado con fallo en controlar la infección por el HCV [53], se procedió a evaluar la calidad de la respuesta inmune celular mediada por células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV analizando el perfil de citoquinas producidas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2) y/o su potencial citotóxico (CD107a) (**Figura 36C**). Las respuestas inmunes de células T CD4<sup>+</sup> específicas frente al HCV fueron similares y altamente polifuncionales en los animales inmunizados con DREP-HCV/MVA-HCV y DREP-e-HCV/MVA-HCV, teniendo la mayoría de las células T CD4<sup>+</sup> 4 funciones (CD107a + IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-2) (**Figura 36C, panel izquierdo**). MVA-HCV/MVA-HCV indujo un perfil polifuncional similar, pero las magnitudes de todas las poblaciones celulares activadas fueron significativamente más bajas. Por otro lado, la respuesta inmune celular mediada por células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV también fue altamente polifuncional, con una producción mayoritaria de CD107a + IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-2; seguida de CD107a + IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ , CD107a + IFN- $\gamma$  y CD107a en todos los grupos inmunizados con vacunas contra el HCV, siendo en todos los casos el grupo de inmunización DREP-e-HCV/MVA-HCV el que indujo la mayor magnitud (**Figura 36C, panel derecho**).

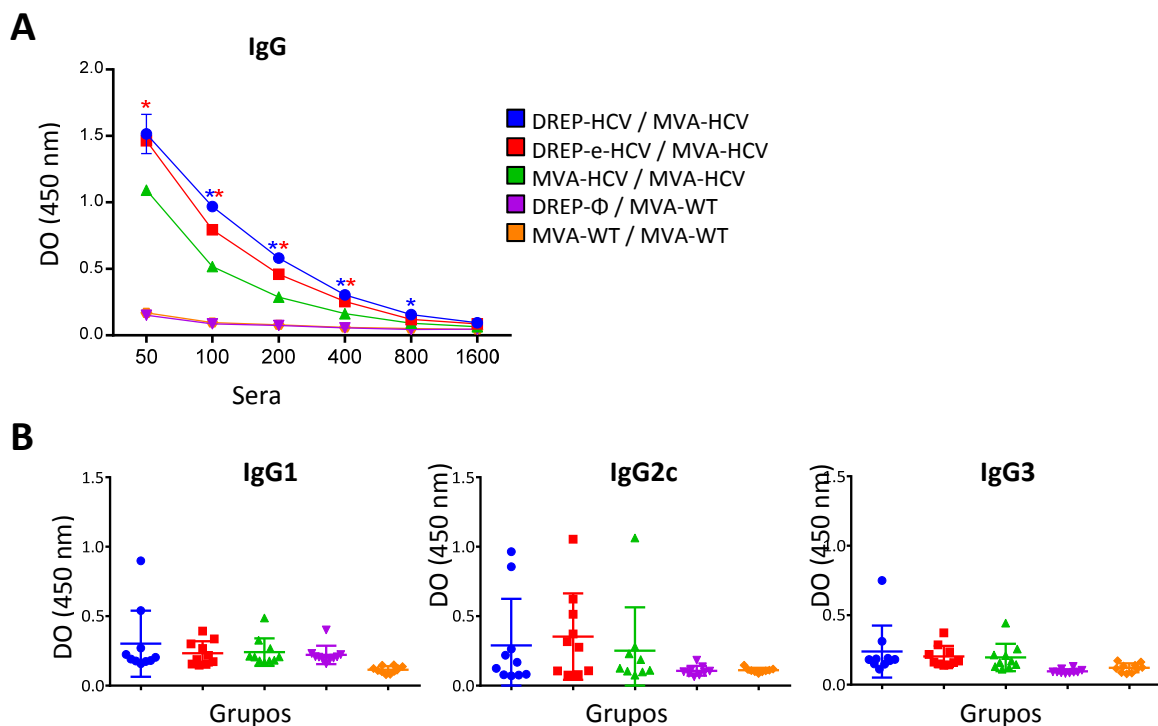


**Figura 36. Respuesta inmune adaptativa de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV en ratones inmunizados.** Esplenocitos de ratones inmunizados (n=5) se obtuvieron 10 días después del *boost*, y las respuestas inmunes de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente a grupos de péptidos del genotipo 1a del HCV se analizaron por ICS, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar DREP-HCV/MVA-HCV, DREP-e-HCV/MVA-HCV y MVA-HCV/MVA-HCV (\*, p < 0.05; \*\*\*, p < 0.001). **(A)** Magnitud total de la respuesta inmune adaptativa de células T CD4<sup>+</sup> (panel izquierdo) y T CD8<sup>+</sup> (panel derecho) específicas frente al HCV. En el eje Y se muestra el porcentaje medido como la suma de células T específicas frente a todos los antígenos del HCV que expresan CD107a y/o que producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2. **(B)** Amplitud de la respuesta inmune adaptativa de células T CD4<sup>+</sup> (panel izquierdo) y T CD8<sup>+</sup> (panel derecho) mostrada como el porcentaje de células específicas frente a Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4 o NS5 que expresan CD107a y/o que producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$

y/o IL-2. **(C)** Polifuncionalidad de la respuesta inmune adaptativa de células T CD4<sup>+</sup> (panel izquierdo) y T CD8<sup>+</sup> (panel derecho) dirigidas frente a todos los antígenos del HCV. Las respuestas se dividen en función de la producción combinada de CD107a, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2 por los distintos grupos de inmunización, y se agrupan teniendo en cuenta el número de funciones (una, dos, tres, o cuatro, diagramas de círculos).

#### 4.3.4. La inmunización combinada con DREP-HCV ó DREP-e-HCV seguida de MVA-HCV induce mayores niveles de anticuerpos frente a la proteína E2 del HCV que MVA-HCV/MVA-HCV

A continuación, se procedió a estudiar la respuesta humoral frente al HCV inducida por los diferentes grupos de inmunización midiendo por ELISA, en grupos de sueros combinados obtenidos de ratones a 10 y 53 días tras el *boost*, los niveles totales de anticuerpos IgG frente a la proteína E2 del HCV (**Figura 37**). Los resultados mostraron que los grupos inmunizados con vacunas frente al HCV indujeron anticuerpos frente a E2, aunque los niveles no fueron muy elevados, y sólo se detectaron anticuerpos a 10 días después del *boost*.



**Figura 37. Respuesta humoral específica frente a la proteína E2 del HCV.** Obtenida a partir de sueros de ratones inmunizados (n=10) tras 10 días después del *boost*. DO: densidad óptica. **(A)** Los 10 sueros de cada grupo fueron mezclados y diluidos seriadamente 1:2 para medir los niveles totales de anticuerpos IgG anti-E2 por ELISA. Los valores de p vienen indicados como asteriscos del color del correspondiente grupo en comparación con el grupo MVA-HCV/MVA-HCV (\*, p < 0.05). **(B)** Los sueros de cada ratón se trataron por individual a una dilución 1/50 para medir los anticuerpos anti-E2 de diferentes isotipos (IgG1, IgG2c e IgG3) por ELISA.



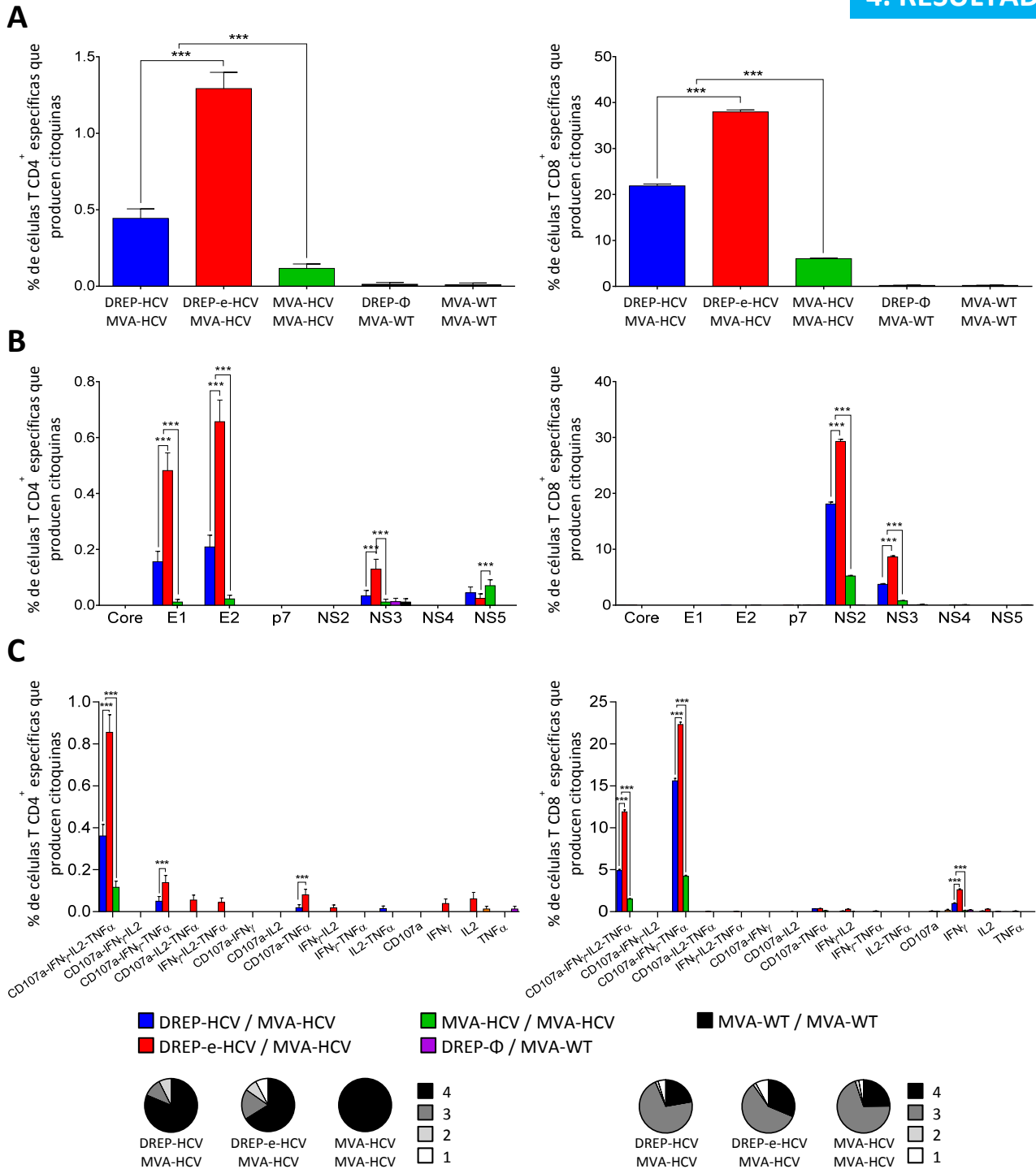
Se observó que las inmunizaciones heterólogas DREP/MVA-HCV generaron mayores niveles de anticuerpos en comparación con MVA-HCV/MVA-HCV, y sin diferencias significativas entre DREP-HCV/MVA-HCV y DREP-e-HCV/MVA-HCV (**Figura 37A**). El análisis de los distintos isotipos de IgG (IgG1, IgG2c o IgG3), aunque permite observar los distintos isotipos en algunos ratones, no permitió concluir si la respuesta es Th1 o Th2 debido a los bajos niveles de anticuerpos obtenidos (**Figura 37B**).

#### **4.3.5. La inmunización con DREP-HCV y DREP-e-HCV seguida de MVA-HCV induce una respuesta inmune celular de memoria específica frente al HCV potente, amplia y polifuncional**

A continuación, a 53 días después del *boost* se analizó la respuesta inmune de memoria de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV inducidas en ratones inmunizados con DREP-HCV/MVA-HCV, DREP-e-HCV/MVA-HCV y MVA-HCV/MVA-HCV (n=5 por grupo) (**Figura 35**).

La magnitud total de la respuesta inmune de memoria de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV fue, de nuevo, significativamente mayor en ratones inmunizados con DREP-HCV/MVA-HCV y DREP-e-HCV/MVA-HCV que en ratones inmunizados con MVA-HCV/MVA-HCV (con un aumento de 8 y 5 veces, respectivamente); siendo nuevamente DREP-e-HCV/MVA-HCV el grupo más inmunogénico (**Figura 38A**). De nuevo, todos los grupos inmunizados con vacunas contra el HCV generaron una mayor inducción de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV.

La amplitud de esta respuesta inmune inducida por los diferentes grupos de inmunización fue, en el caso de las células T CD4<sup>+</sup>, y al igual que en la fase adaptativa, principalmente dirigida frente a E2 y E1 y, en menor medida hacia NS3 y NS5 en ambos grupos de inmunización DREP/MVA-HCV, mientras que fue de menor magnitud y frente a NS5 en el grupo de inmunización MVA-HCV/MVA-HCV (**Figura 38B, panel izquierdo**). Además, DREP-e-HCV/MVA-HCV generó respuestas de células T CD4<sup>+</sup> específicas frente a E1, E2 y NS3 significativamente mayores que DREP-HCV/MVA-HCV (**Figura 38B, panel izquierdo**). Con respecto a la amplitud de la respuesta inmune de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV, y de manera similar a la fase adaptativa, todos los grupos inmunizados con vacunas contra el HCV indujeron respuestas principalmente dirigidas frente a NS2 y NS3, siendo DREP-e-HCV/MVA-HCV el que induce una magnitud significativamente mayor contra ambos antígenos que DREP-HCV/MVA-HCV, y siendo MVA-HCV/MVA-HCV el que indujo los niveles más bajos (**Figura 38B, panel derecho**).



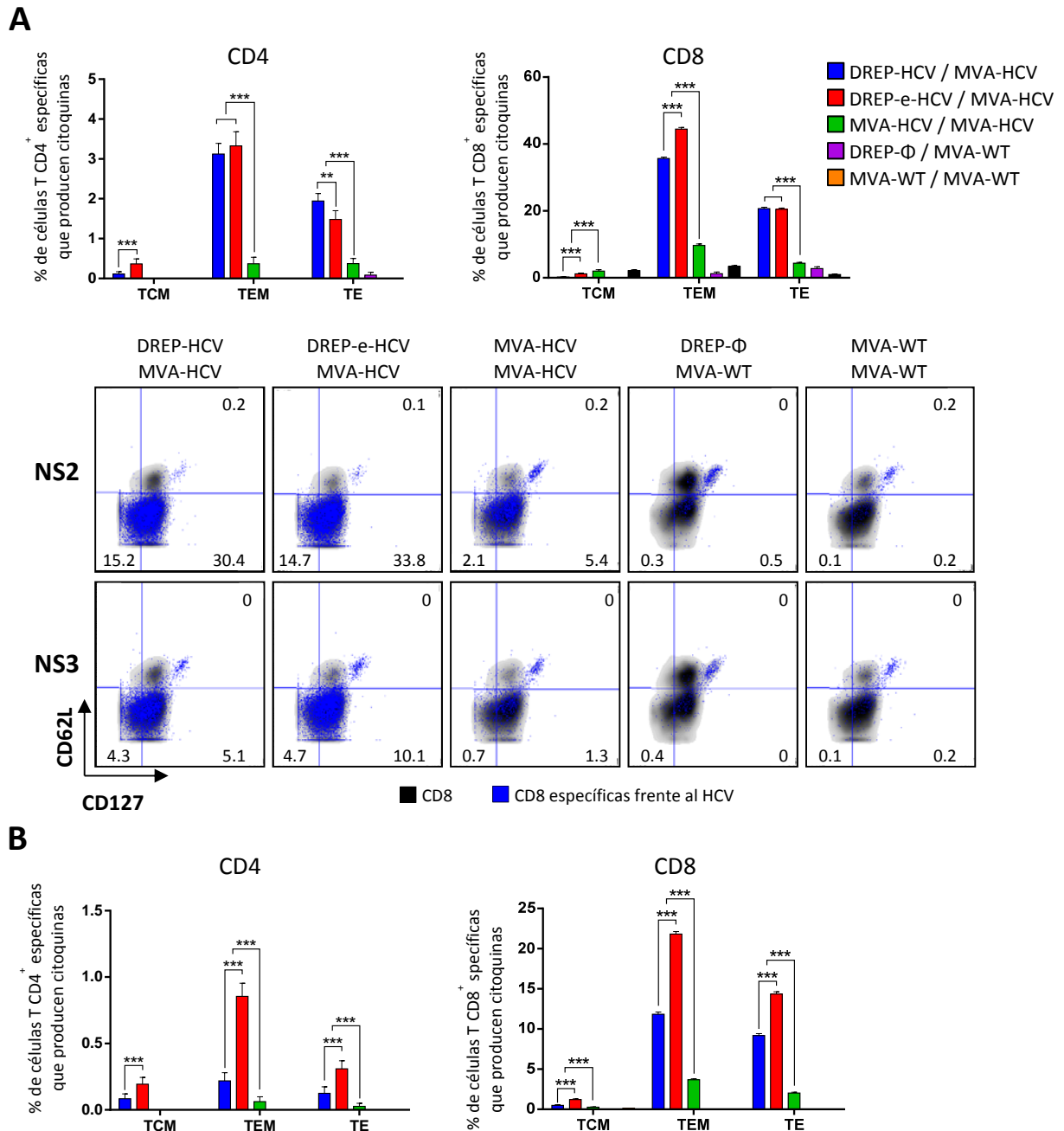
**Figura 38. Respuesta inmune de memoria de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV en ratones inmunizados.** Esplenocitos de ratones inmunizados (n=5) se obtuvieron 53 días después del *boost*, y las respuestas inmunes de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente a grupos de péptidos del genotipo 1a del HCV se analizaron por ICS, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar DREP-HCV/MVA-HCV, DREP-e-HCV/MVA-HCV y MVA-HCV/MVA-HCV (\*\*\*, p < 0.001). **(A)** Magnitud total de la respuesta inmune de memoria de células T CD4<sup>+</sup> (panel izquierdo) y T CD8<sup>+</sup> (panel derecho) específicas frente al HCV. En el eje Y se muestra el porcentaje medido como la suma de células T específicas frente a todos los antígenos del HCV que expresan CD107a y/o que producen IFN-γ y/o TNF-α y/o IL-2. **(B)** Amplitud de la respuesta inmune de memoria de células T CD4<sup>+</sup> (panel izquierdo) y T CD8<sup>+</sup> (panel derecho) mostrada como el porcentaje de células específicas frente a Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4 o NS5 que expresan CD107a y/o que producen IFN-γ y/o TNF-α y/o IL-2. **(C)**

Polifuncionalidad de la respuesta inmune de memoria de células T CD4<sup>+</sup> (panel izquierdo) y T CD8<sup>+</sup> (panel derecho) dirigidas frente a todos los antígenos del HCV. Las respuestas se dividen en función de la producción combinada de CD107a, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2 por los distintos grupos de inmunización, y se agrupan teniendo en cuenta el número de funciones (una, dos, tres, o cuatro, diagramas de círculos).

El análisis de la polifuncionalidad mostró que, de manera similar a la fase adaptativa, la respuesta inmune de células T CD4<sup>+</sup> específicas frente al HCV fue altamente polifuncional en animales inmunizados con DREP-HCV/MVA-HCV y DREP-e-HCV/MVA-HCV, con células T CD4<sup>+</sup> con 4 funciones que producen 3 citoquinas y expresan el marcador CD107a de desgranulación (IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-2 + CD107a) y con DREP-e-HCV/MVA-HCV siendo el grupo más inmunogénico (**Figura 38C, panel izquierdo**). MVA-HCV/MVA-HCV también indujo un perfil altamente polifuncional, pero las magnitudes para todas las poblaciones de células fueron significativamente menores. Con respecto a las células T CD8<sup>+</sup>, la polifuncionalidad de la respuesta inmune de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV fue alta en todos los grupos inmunizados con vacunas contra el HCV, con la mayoría de las células T CD8<sup>+</sup> teniendo 3 (CD107a + IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$ ) o 4 funciones (CD107a + IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-2), y con el grupo de inmunización DREP-e-HCV/MVA-HCV induciendo las mayores magnitudes para todas las poblaciones celulares (**Figura 38C, panel derecho**).

#### **4.3.6. La inmunización en ratones con DREP-HCV y DREP-e-HCV seguida de MVA-HCV indujo altos niveles de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> con fenotipo efector de memoria específicas frente al HCV**

A continuación, analizamos el fenotipo de memoria de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente a todos los péptidos del HCV inducidas por los diferentes regímenes de vacunación, tal y como se ha descrito en apartados anteriores. Los resultados mostraron que, en todos los grupos de inmunización, la mayor parte de la respuesta en la fase adaptativa (**Figura 39A**) y de memoria (**Figura 39B**) estaba formada por células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> efectoras de memoria (TEM) (CD127<sup>+</sup>, CD62L<sup>-</sup>), seguidas de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> efectoras (TE) (CD127<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>). Los grupos de inmunización DREP/MVA-HCV indujeron respuestas más altas que MVA-HCV/MVA-HCV, siendo DREP-e-HCV/MVA-HCV el protocolo que generó la mayor magnitud en todas estas poblaciones tanto en la fase adaptativa como la de memoria, excepto en las células T CD4<sup>+</sup> de la fase adaptativa, donde DREP-HCV/MVA-HCV indujo niveles más altos de células CD4<sup>+</sup> TE y niveles similares de células TEM que DREP-e-HCV/MVA-HCV.



**Figura 39. Perfil fenotípico de la respuesta inmune de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV en la fase adaptativa (A) y memoria (B) en ratones inmunizados.** Esplenocitos de ratones inmunizados (n=5) se obtuvieron 10 (A) y 53 (B) días después del *boost* y las respuestas inmunes de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente a grupos de péptidos del HCV se analizaron por ICS, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar DREP-HCV/MVA-HCV, DREP-e-HCV/MVA-HCV y MVA-HCV/MVA-HCV (\*\*, p < 0.005; \*\*\*, p < 0.001). (A) Porcentajes de células T CD4<sup>+</sup> (panel izquierdo) y CD8<sup>+</sup> (panel derecho) de memoria central (TCM; CD127<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>), de memoria efectora (TEM; CD127<sup>+</sup>, CD62L<sup>-</sup>) y efectoras (TE; CD127<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>) que expresan CD107a y/o producen IFN-γ y/o TNF-α y/o IL-2 frente a todos los grupos de péptidos del HCV (respuesta total), en la fase adaptativa. Debajo de los gráficos, se incluyen paneles representativos de la respuesta frente a NS2 (arriba) y NS3 (abajo), donde las densidades de población en negro corresponden a células T CD8<sup>+</sup> que expresan CD127 y/o CD62L y los puntos en azul representan células T CD8<sup>+</sup> específicas frente a NS2 o NS3, con sus porcentajes indicados. (B) Porcentajes de células T CD4<sup>+</sup> (panel izquierdo) y CD8<sup>+</sup> (panel derecho)

específicas frente al HCV, en fase de memoria, con fenotipo TCM, TEM o TE y que expresan CD107a y/o producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL- 2 frente a todos los grupos de péptidos del HCV.

#### 4.4. Diseño, generación y caracterización *in vitro* e *in vivo* de nuevos candidatos vacunales de naturaleza proteica (E2 $\Delta$ MPER y E2 CL $\Delta$ MPER) para combinar en protocolos *prime/boost* con MVA-HCV

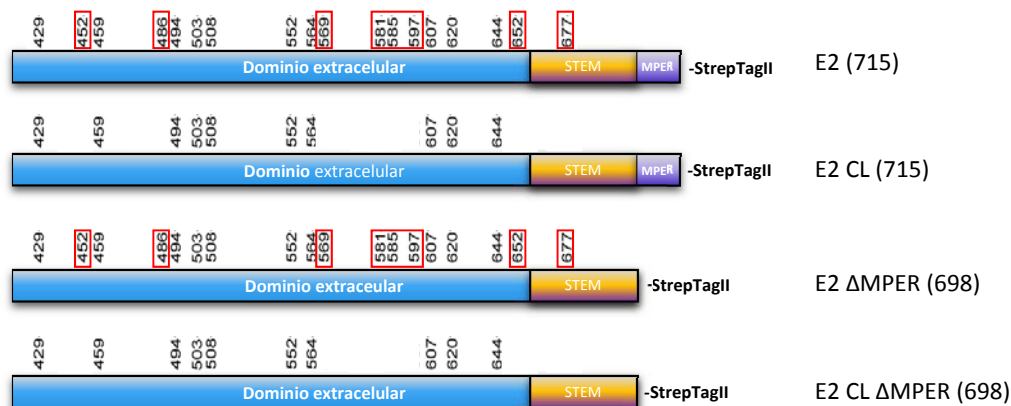
Se ha demostrado que el desarrollo de anticuerpos neutralizantes durante la fase aguda de la infección por el HCV correlaciona con la eliminación del virus [240]. A pesar de las potentes respuestas celulares producidas con el protocolo de inmunización DREP/MVA-HCV (ver apartado anterior), la respuesta inmune humoral aún presenta niveles bajos de anticuerpos. Por lo tanto, para estimular la misma, en el presente apartado se diseñaron y purificaron diferentes proteínas recombinantes E2, con el fin de caracterizarlas *in vitro* y seleccionar aquellas que presentaran las mejores propiedades para su posterior inmunización *in vivo* en combinación con MVA-HCV y el posterior estudio de los anticuerpos generados frente al HCV, así como de la respuesta inmune celular.

##### 4.4.1. Diseño de diferentes proteínas recombinantes E2 del HCV

En la secuencia de la proteína E2 existen 18 cisteínas que están extremadamente conservadas en todos los genotipos del HCV, indicando que posiblemente tengan un papel esencial en la estructura y/o función de la proteína. Sin embargo, estas cisteínas forman una red heterogénea y desconocida de puentes disulfuro que limita la correcta visualización de sus estructuras.

Con el objetivo de producir proteínas recombinantes E2 del HCV (genotipo 1a, aislado H77) se diseñaron plásmidos de expresión en células de mamíferos que codifican diferentes versiones de ésta, mostrados en la [Figura 40](#). Primero, se clonó la proteína E2 salvaje a la cual, para hacerla soluble, se le delecionó el dominio transmembrana (aminoácidos 716-746), generando la proteína E2 715. A continuación, fijándonos en las 2 únicas estructuras cristalizadas que hay descritas en la bibliografía [121,122] y basándonos en el manuscrito de Drummer y colaboradores [241], se eligieron y sustituyeron por alaninas 8 de las 18 cisteínas (C452A, C486A, C569A, C581A, C585A, C597A, C652A, C677A) dando lugar a una nueva proteína recombinante llamada E2 CL (del inglés, *cystein low*). Por último, se eliminó de ambas proteínas la región MPER (aminoácidos 699-715), que es una región cercana al dominio transmembrana muy rica en aminoácidos hidrofóbicos, por lo que las proteínas que la tengan pueden formar micelas disminuyendo su solubilidad, tal y como se ha descrito para otras proteínas, como la gp140 del HIV-1 [242]. Su eliminación dio lugar a 2 nuevos constructos de E2 698, denominados E2  $\Delta$ MPER y E2 CL  $\Delta$ MPER. Por último, en todos los casos se mantuvo la región *stem*

(aminoácidos 675-698) que es una región flexible de la proteína que conecta la zona transmembrana con el dominio extracelular [243] y que es necesaria para la dimerización con E1 [244].

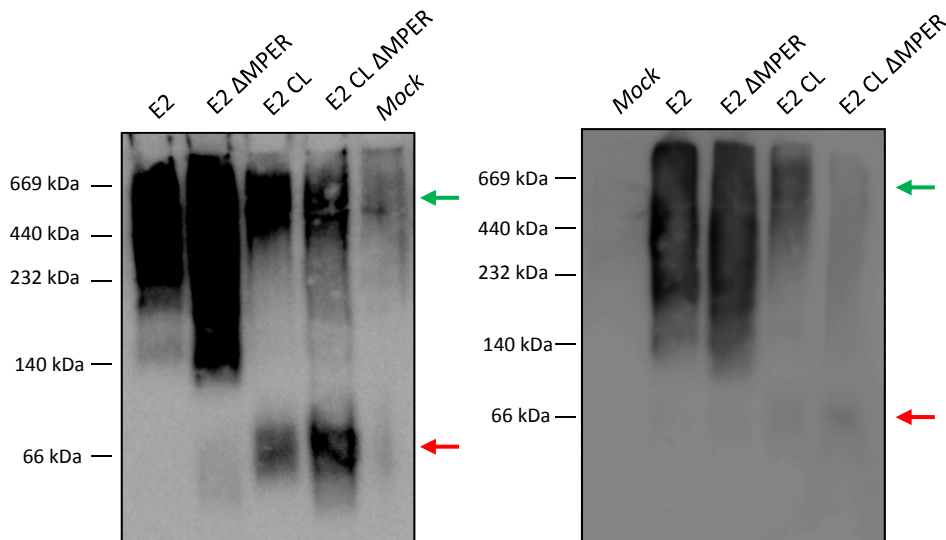


**Figura 40. Esquemas representativos de las distintas proteínas E2 diseñadas.** En azul se muestra la región del dominio extracelular (aminoácidos 384-661) y en amarillo la región *stem* (aminoácidos 675-698). Los números indicados sobre las proteínas se refieren a la posición de las cisteínas presentes en ellas, y aquellos números contenidos dentro de un rectángulo rojo indican la posición de las cisteínas ausentes y sustituidas por alaninas en las proteínas E2 CL. En morado se muestra la región MPER, deletada en las proteínas E2 ΔMPER y E2 CL ΔMPER. Por último, se añadió una secuencia pequeña conectora o *linker* (GSGSGGRSG) que une la proteína E2 con la secuencia de StrepTagII, utilizada para purificar las proteínas a través de columna y para detectarlas mediante ELISA.

#### 4.4.2. Las proteínas recombinantes E2 se secretan al medio y aquellas con un menor número de cisteínas forman agregados de bajo peso molecular en geles nativos

Tras clonar los diferentes diseños de proteínas recombinantes E2 en plásmidos de expresión de células de mamíferos, se transfectaron células HEK-293T y, tras 48 horas, se recogieron los sobrenadantes que se prepararon para WB nativo (Figura 41), tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos.

Los resultados muestran que todas las proteínas se producen y secretan al sobrenadante. Además, aquellas proteínas E2 que presentan todas las cisteínas forman agregados de elevado peso molecular, mientras las proteínas E2 CL, con un menor número de cisteínas, además de agregados de alto peso molecular también se presentan en forma de oligómeros de menor peso molecular (Figura 41).

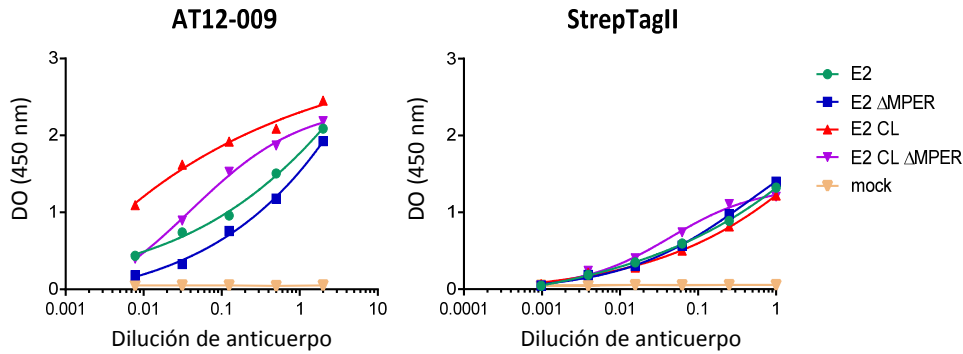


**Figura 41. Geles nativos con las proteínas E2 secretadas al sobrenadante de células transfectadas.** El gel de la izquierda fue reaccionado con un anticuerpo anti-StrepTagII y el de la derecha con un anticuerpo anti-E2 llamado AP33. Las flechas verdes indican los agregados de elevado peso molecular y las rojas indican las proteínas monoméricas.

#### 4.4.3. Las proteínas recombinantes E2 secretadas son reconocidas por el anticuerpo neutralizante de amplio espectro AT12-009

Para estudiar las propiedades antigénicas de las proteínas E2 generadas y poder dilucidar si mantienen un correcto plegamiento, se cubrieron placas de ELISA, previamente tratadas con Lectina (GNL), con los sobrenadantes de células transfectadas con los diferentes plásmidos expresando proteínas E2 recombinantes, tal y como como se describe en Materiales y Métodos. Como anticuerpo primario anti-HCV se utilizó el anticuerpo AT12-009, el cual presenta uno los mejores perfiles de neutralización de amplio espectro (que reconoce varios genotipos del HCV) [216], y como control de carga de proteína se utilizó el anticuerpo anti-StrepTagII. Los resultados mostraron que todas las proteínas son reconocidas por el anticuerpo AT12-009, aunque las que contienen la región MPER presentan mejor unión que las que lo tienen deletado. Importantemente, aquellas que poseen un menor número de cisteínas (E2 CL y E2 CL ΔMPER) presentan más unión al anticuerpo neutralizante AT12-009 que las que poseen un mayor número de cisteínas (Figura 42), siendo E2 CL la que mayor afinidad posee.





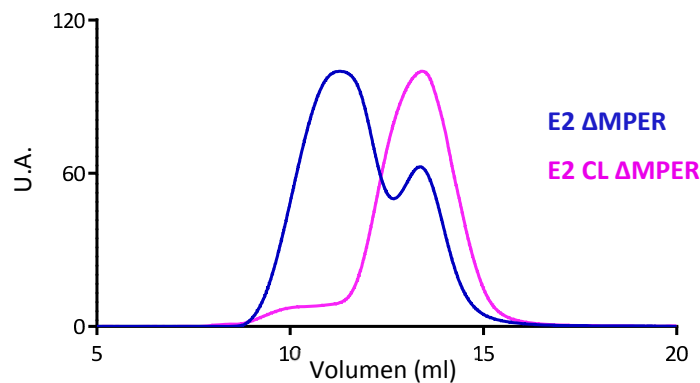
**Figura 42. Reactividad de las proteínas E2 secretadas frente al anticuerpo AT12-009 (anti-E2) y a StrepTagII.** Placas de ELISA se cubrieron con los sobrenadantes procedentes de células HEK-293T transfectadas con plásmidos expresando las distintas proteínas y a continuación se reaccionaron con diluciones seriadas del anticuerpo neutralizante anti-HCV de amplio espectro AT12-009. Como control de carga de proteína se utilizó un anticuerpo anti-StrepTagII. DO: densidad óptica.

#### 4.4.4. Las proteínas E2 $\Delta$ MPER y E2 CL $\Delta$ MPER se purifican diferencialmente por columna, obteniéndose rendimientos satisfactorios

A continuación, se procedió a la producción a mayor escala y posterior purificación de las proteínas E2  $\Delta$ MPER (forma agregados de alto peso molecular) y E2 CL  $\Delta$ MPER (forma oligómeros), con el objetivo de obtener extractos purificados y concentrados que puedan caracterizarse *in vitro* y posteriormente poder ser utilizados para inmunizar ratones y estudiar sus propiedades antigénicas. La razón por la que se eligieron estas proteínas y no sus correspondientes versiones con la región MPER es porque ésta es una región hidrofóbica que puede provocar la formación de micelas o agregados no fisiológicos al encontrarse en la zona C-terminal de las proteínas y dificultar su producción y purificación.

Por tanto, se transfectaron 0.5 y 1 litros de células HEK-293F con E2  $\Delta$ MPER y E2 CL  $\Delta$ MPER, respectivamente, y los cultivos se dejaron crecer durante 6 días. Los sobrenadantes fueron recogidos, filtrados y pasados por columnas que retienen proteínas con StrepTagII, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Una vez obtenidas las proteínas, se procedió a concentrarlas obteniendo una cantidad total de 4.37 mg de E2  $\Delta$ MPER y 4.05 mg de E2 CL  $\Delta$ MPER. A continuación, se realizó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, del inglés *Size Exclusion Chromatography*) para obtener distintas fracciones de las proteínas. Los resultados mostraron que, en concordancia con lo observado en los WBs nativos (Figura 41), E2  $\Delta$ MPER forma agregados de mayor peso molecular, que aparecen antes en las fracciones tras pasarla por SEC,

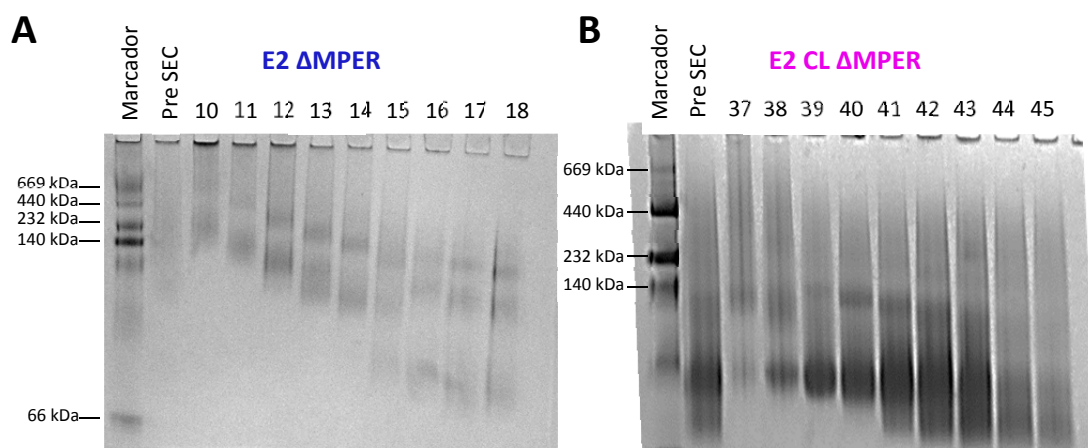
mientras que E2 CL  $\Delta$ MPER aparece en fracciones más tardías debido a su menor peso molecular (Figura 43).



**Figura 43. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de las proteínas E2  $\Delta$ MPER y E2 CL  $\Delta$ MPER.** Tras obtener las proteínas de los sobrenadantes de células transfectadas, se procedió a concentrarlas y a fraccionarlas por tamaño. U.A.: Unidades arbitrarias. Datos normalizados.

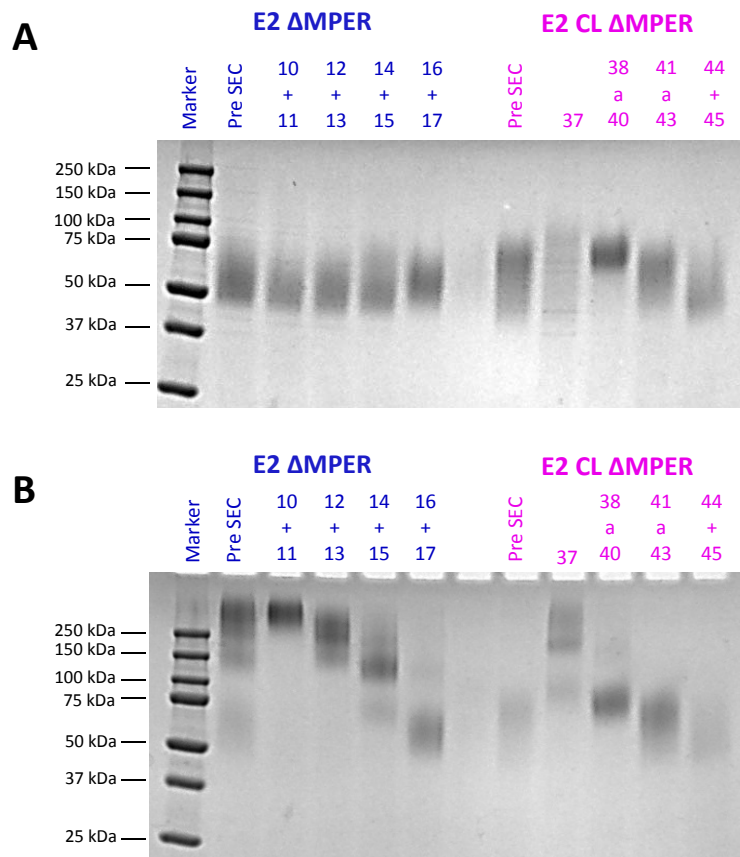
#### 4.4.5. Las distintas fracciones obtenidas contienen proteínas E2 de distinto peso molecular

Para confirmar los resultados de SEC, se realizaron WBs en condiciones nativas, cargando 5  $\mu$ g de cada fracción de proteína obtenida por SEC. Los resultados de los WBs muestran que, en condiciones nativas (Figura 44), cada fracción está formada por moléculas de proteína E2 de distinto tamaño, que van de mayor (primeras fracciones) a menor tamaño (últimas fracciones) confirmando la mayor proporción de agregados en E2  $\Delta$ MPER (Figura 44A) y de monómeros en E2 CL  $\Delta$ MPER (Figura 44B).



**Figura 44. Geles nativos de las fracciones de proteínas obtenidas por SEC.** 5  $\mu$ g de proteína fueron cargados en geles nativos y visualizados con azul de Coomassie. El carril PreSEC corresponde a una muestra tomada antes de realizar SEC, y que por tanto contiene una mezcla de todas las fracciones. Los números sobre los carriles indican las fracciones analizadas.

A continuación, se decidió agrupar las fracciones que contenían proteínas de peso molecular similar y se realizaron WBs en condiciones desnaturalizantes y/o reductoras para caracterizar en detalle las propiedades de las mismas y estudiar el efecto de los puentes de disulfuro (**Figura 45**). Los resultados mostraron que, mientras que en condiciones reductoras y desnaturalizantes todas las fracciones de E2  $\Delta$ MPER se encuentran en un peso molecular similar, las de E2 CL  $\Delta$ MPER muestra un rango más variado de tamaños dentro de las fracciones, aunque todas entre 50 y 75 kDa (**Figura 45A**). Respecto al patrón de bandas de las proteínas contenidas en cada grupo de fracciones en condiciones desnaturalizantes pero no reductoras, se observa que las fracciones de E2  $\Delta$ MPER contienen formas moleculares de elevado peso molecular (entre más de 250 kDa y 100 kDa) salvo la fracción 16+17 que representa las proteínas de menor peso molecular (50 kDa), mientras que la mayoría de las fracciones de E2 CL  $\Delta$ MPER muestran un patrón de bandas de menor peso molecular (entre 75 y 50 kDa), excepto la fracción 37 que es la de mayor peso molecular (150 kDa) (**Figura 45B**).

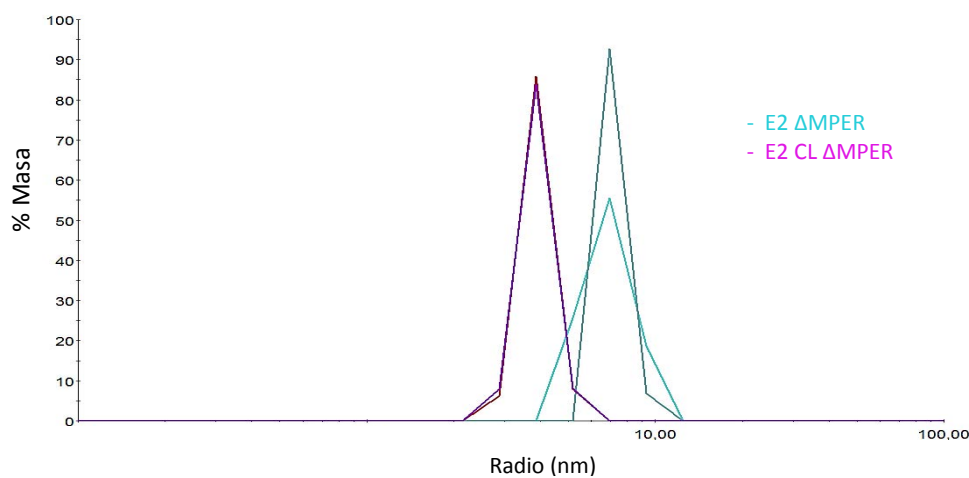


**Figura 45. Geles desnaturalizantes en condiciones reductoras (A) y no reductoras (B) de las fracciones de proteína obtenidas por SEC.** Las fracciones obtenidas tras SEC se agruparon según pesos moleculares similares, y 5  $\mu$ g de cada grupo de proteína se cargaron en geles nativos y fueron visualizadas con azul de Coomassie. El carril Pre SEC corresponde a una muestra tomada antes de realizar SEC, y que por tanto contiene una mezcla de todas las fracciones.

Finalmente, en el caso de E2  $\Delta$ MPER, se eligieron las fracciones 10 y 11, que contienen las proteínas de mayor peso molecular, y las fracciones 44 y 45 de E2 CL  $\Delta$ MPER, que contienen las proteínas de menor peso molecular, para su caracterización en detalle *in vitro* y las posteriores inmunizaciones *in vivo*. El objetivo de escoger estas fracciones es, por un lado, estimular la respuesta humoral frente a la proteína E2 del HCV, y por otro lado caracterizar las propiedades antigénicas *in vitro* e *in vivo* de dicha proteína cuando se encuentra en distintas formas de agregados moleculares.

#### 4.4.6. La técnica de dispersión dinámica de luz confirma los resultados de cromatografía de exclusión por tamaño

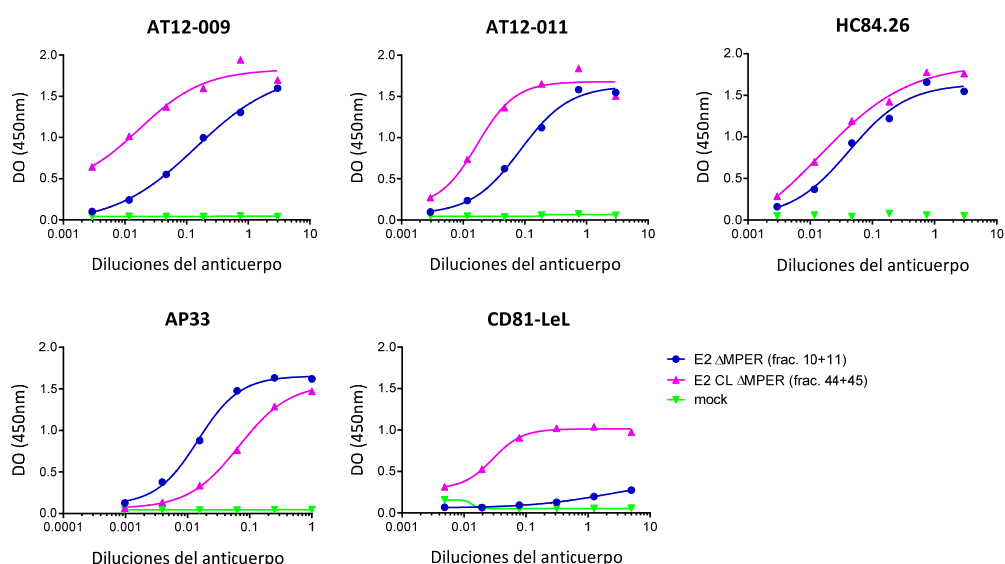
Para confirmar que las fracciones elegidas en el apartado anterior contienen proteína de alto y bajo peso molecular (E2  $\Delta$ MPER y E2 CL  $\Delta$ MPER, respectivamente), se utilizaron 2.5  $\mu$ g de cada fracción para medir la dispersión de luz que refleja y estimar el radio de las partículas. Los resultados confirmaron que E2  $\Delta$ MPER forma agregados de mayor radio (unos 7 nm) que E2 CL  $\Delta$ MPER (3 nm aproximadamente) (Figura 46).



**Figura 46. Dispersión dinámica de luz de las fracciones de proteínas E2  $\Delta$ MPER y E2 CL  $\Delta$ MPER seleccionadas.** Se seleccionaron las fracciones 10+11 de E2  $\Delta$ MPER y 44+45 de E2 CL  $\Delta$ MPER. Se midieron ambas proteínas por duplicado, obteniendo 2 medidas de cada una (cada medida está representada con una línea). nm: nanómetros.

#### 4.4.7. Las fracciones 10+11 de E2 ΔMPER y 44+45 de E2 CL ΔMPER contienen proteínas E2 reconocidas por anticuerpos neutralizantes de amplio espectro y por el receptor del HCV CD81

Un elemento importante en el diseño de proteínas recombinantes para su uso como vacunas es la caracterización de sus propiedades antigénicas. Para ello, se seleccionaron diferentes anticuerpos con distintas características y se realizaron ELISAs para determinar si las proteínas E2 ΔMPER y E2 CL ΔMPER purificadas previamente son reconocidas satisfactoriamente por anticuerpos neutralizantes. AP33 es un anticuerpo neutralizante de amplio espectro que reconoce epítomos lineales dentro de la proteína E2 [245], AT12-009 y AT12-011 reconocen epítomos no lineales, y mientras que AT12-011 reconoce la región antigénica del dominio C, AT12-009 tiene como diana el dominio B de la proteína E2 del HCV. Ambos anticuerpos reconocen genotipos 1a, 1b, 2b, 3a, 4a, 4d, 5 y 6, pero sólo AT12-009 es capaz de neutralizar todos los genotipos, mientras que AT12-011 solo neutraliza 1a, 1b y 2a [216]. HC84.26 es uno de los miembros de la familia de anticuerpos conformacionales (es decir, no lineales) que unen al dominio antigénico D de la proteína E2, siendo éste capaz de neutralizar todos los genotipos del HCV [246,247]. Los resultados mostraron que los anticuerpos conformacionales AT-12009, AT12-011 y HC84.26 reconocen mejor a la proteína E2 CL ΔMPER (forma oligómeros) que a los agregados de E2 ΔMPER. Sin embargo, lo contrario ocurre en el caso del anticuerpo lineal AP33 (Figura 47).



**Figura 47. ELISAs utilizando distintos anticuerpos anti-HCV de amplio espectro y comprobación de unión a CD81.** Placas de ELISA se cubrieron con las fracciones 10+11 de E2 ΔMPER o 44+45 de E2 CL ΔMPER y se reaccionaron con diluciones seriadas de diferentes anticuerpos anti-HCV. Uno de los anticuerpos, CD81-LeL, simula la unión de las distintas proteínas recombinantes al receptor

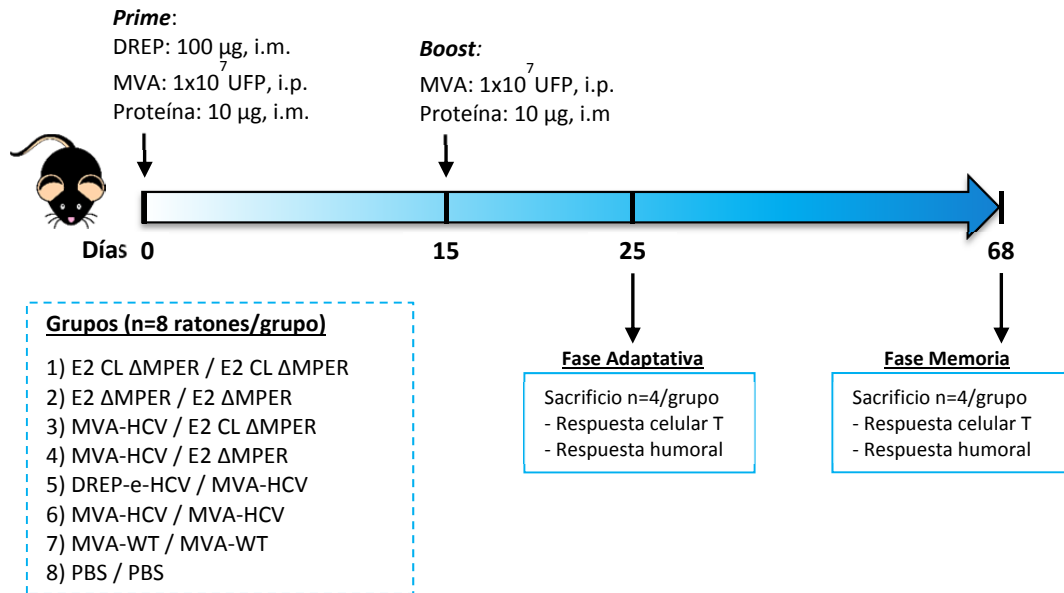
celular del HCV, CD81. *Mock*: Placas sin proteína. DO: Densidad óptica. nm: nanómetros. Frac: fracciones

Por último, para caracterizar si las proteínas E2  $\Delta$ MPER en forma de agregados de elevado peso molecular unen mejor o peor al receptor CD81 (uno de los principales receptores del HCV en hepatocitos) en comparación con la forma monomérica E2 CL  $\Delta$ MPER, se realizaron ELISAs cubriendo con ambas proteínas y reaccionando con un anticuerpo quimera fusionado con el bucle extracelular del receptor CD81-LeL (del inglés, *large extracellular loop*), que presenta el sitio de unión específico de la proteína E2 [248,249]. Los resultados mostraron que, de nuevo, E2 CL  $\Delta$ MPER se une mejor al CD81-LeL que la proteína E2  $\Delta$ MPER (Figura 47).

#### 4.4.8. La inmunización con las diferentes proteínas E2 recombinantes induce una respuesta inmune celular adaptativa específica frente al HCV

Una vez caracterizadas las proteínas E2  $\Delta$ MPER y E2 CL  $\Delta$ MPER y comprobar que difieren en su capacidad de formar agregados, se inocularon en ratones utilizando protocolos *prime/boost* homólogos y heterólogos en combinación con la vacuna MVA-HCV, con el objetivo de potenciar la respuesta humoral dirigida frente a la proteína E2 del HCV.

Por tanto, se inmunizaron 8 ratones C57BL/6 por grupo tal y como se describe en Materiales y Métodos y en la Figura 48, y la mitad de ellos (n=4) se sacrificaron el día 10 después del *boost* para medir mediante ICS la respuesta inmune adaptativa de células T específicas frente al HCV. Se decidió incluir el grupo DREP-e-HCV/MVA-HCV por ser el grupo que induce mejores respuestas celulares y humorales obtenidas hasta el momento y para ser comparado con los nuevos protocolos de inmunización E2/E2 y MVA-HCV/E2. Los esplenocitos de cada grupo se estimularon *ex vivo* con un panel de grupos de péptidos que cubren la secuencia completa de la cepa H77 (genotipo 1a) del HCV y, tras 6 horas de estimulación, las células se marcaron con anticuerpos específicos para identificar poblaciones de células T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) y células respondedoras (que expresan CD107a en la superficie de las células T como un marcador indirecto de citotoxicidad y/o que producen las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2).



**Figura 48. Esquema del protocolo de inmunización utilizado.** Se inocularon 8 ratones C57BL/6 por grupo a 0 y 15 días (*prime/boost*) con los diferentes candidatos vacunales indicados. A 10 días tras el *boost* (día 25) se sacrificaron la mitad de los ratones (n=4) para obtener sus bazo y sangre y estudiar la respuesta inmune adaptativa celular y humoral frente al HCV, respectivamente. Además, se sangraron de la mejilla el resto de ratones (n=4) para estudiar la respuesta inmune humoral. A 53 días tras el *boost* (día 68), el resto de ratones (n=4) se sacrificaron y se obtuvieron los bazo y la sangre para estudiar la respuesta inmune de memoria celular y humoral frente al HCV, respectivamente. UFP: Unidades formadoras de placa; i.m: intramuscular; i.p: intraperitoneal.

Los resultados mostraron que la respuesta inmune de células T CD4<sup>+</sup> en la fase adaptativa frente al HCV generada por los diferentes grupos fue de mayor magnitud en el caso de DREP-e-HCV/MVA-HCV, seguido de los grupos MVA-HCV/E2 CL ΔMPER, MVA-HCV/E2 ΔMPER y E2 ΔMPER/E2 ΔMPER que generaron respuestas similares, mientras que E2 CL ΔMPER/E2 CL ΔMPER y MVA-HCV/MVA-HCV generaron la magnitud más baja de células T CD4<sup>+</sup> (**Figura 49A**). Cabe destacar que la respuesta mostrada en la **Figura 49A** corresponde en el caso de los grupos 3-6, a la suma de respuestas específicas frente a todas las proteínas del HCV, mientras que en el caso de los grupos inmunizados con proteína E2 (1 y 2) sólo es frente a la proteína E2, ya que fue el único inmunógeno que los ratones recibieron. Esto se muestra en la figura con una línea discontinua que separa ambos grupos de inmunizaciones.

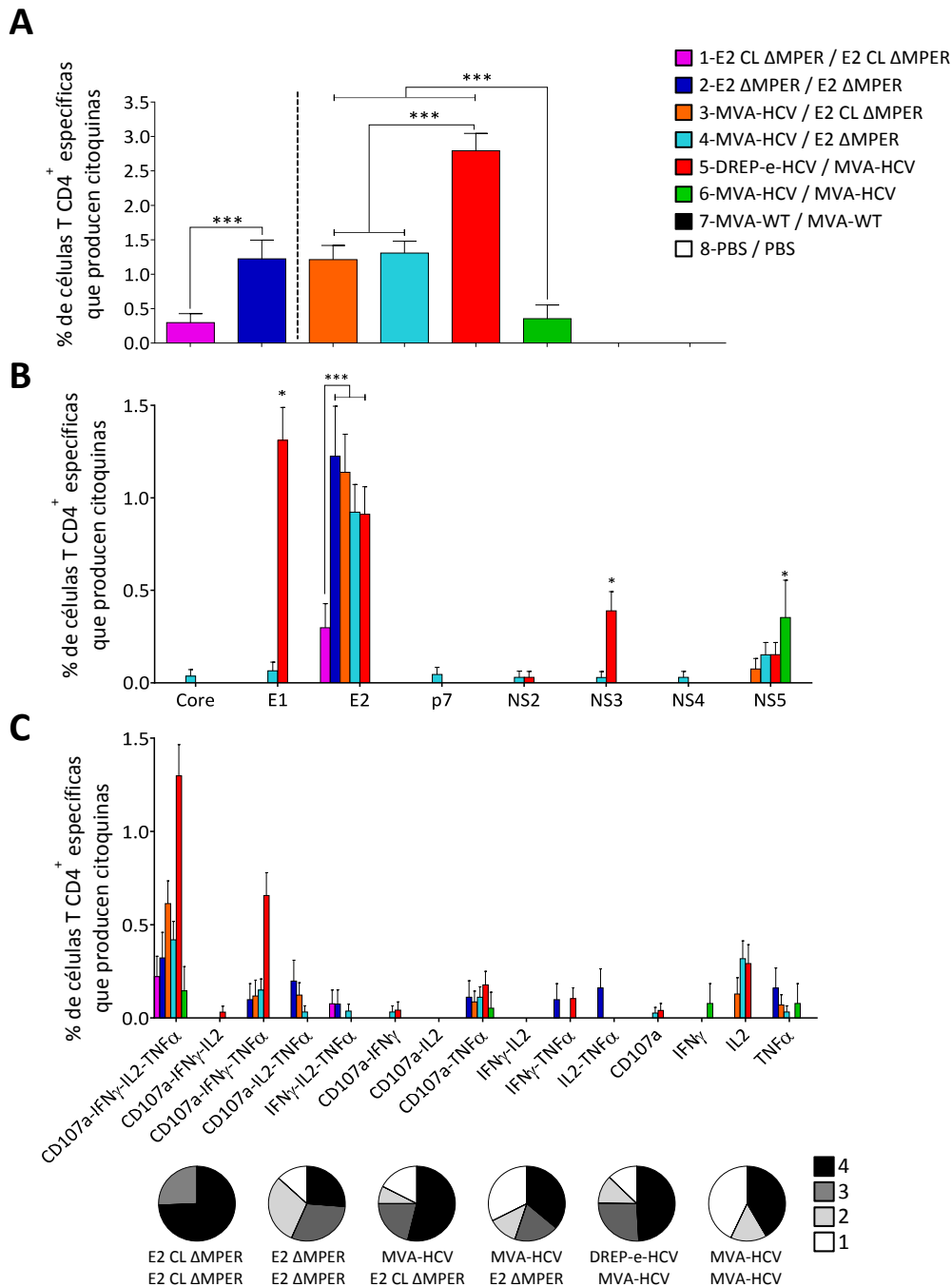
Al diseccionar esta respuesta total en las diferentes proteínas del HCV (**Figura 49B**), observamos que en los grupos inmunizados con proteína E2 (1 y 2) sólo existe respuesta específica frente a la proteína E2, siendo de mayor magnitud en el grupo 2 (E2 ΔMPER/E2 ΔMPER) que en el grupo 1 (E2 CL ΔMPER/E2 CL ΔMPER). Respecto al grupo DREP-e-HCV/MVA-HCV, éste es el único que mantiene una respuesta distribuida principalmente entre E1 y E2, seguido de NS3, mientras que MVA-HCV/MVA-HCV genera una respuesta mínima frente a NS5, confirmando los resultados presentes en los apartados anteriores de Resultados (**Figura 49B**). Los grupos MVA-HCV/E2 sólo presentan respuesta de células T CD4<sup>+</sup> frente a la proteína E2.

Por último, la calidad de la respuesta inmune de las células T CD4<sup>+</sup> generada por los distintos grupos de inmunización se analizó midiendo el patrón de producción de citoquinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2) más su potencial citotóxico (CD107a como marcador de desgranulación). En general, la respuesta generada por todos los grupos de inmunización fue altamente polifuncional, con una mayoría de células produciendo 4 citoquinas (**Figura 49C**).

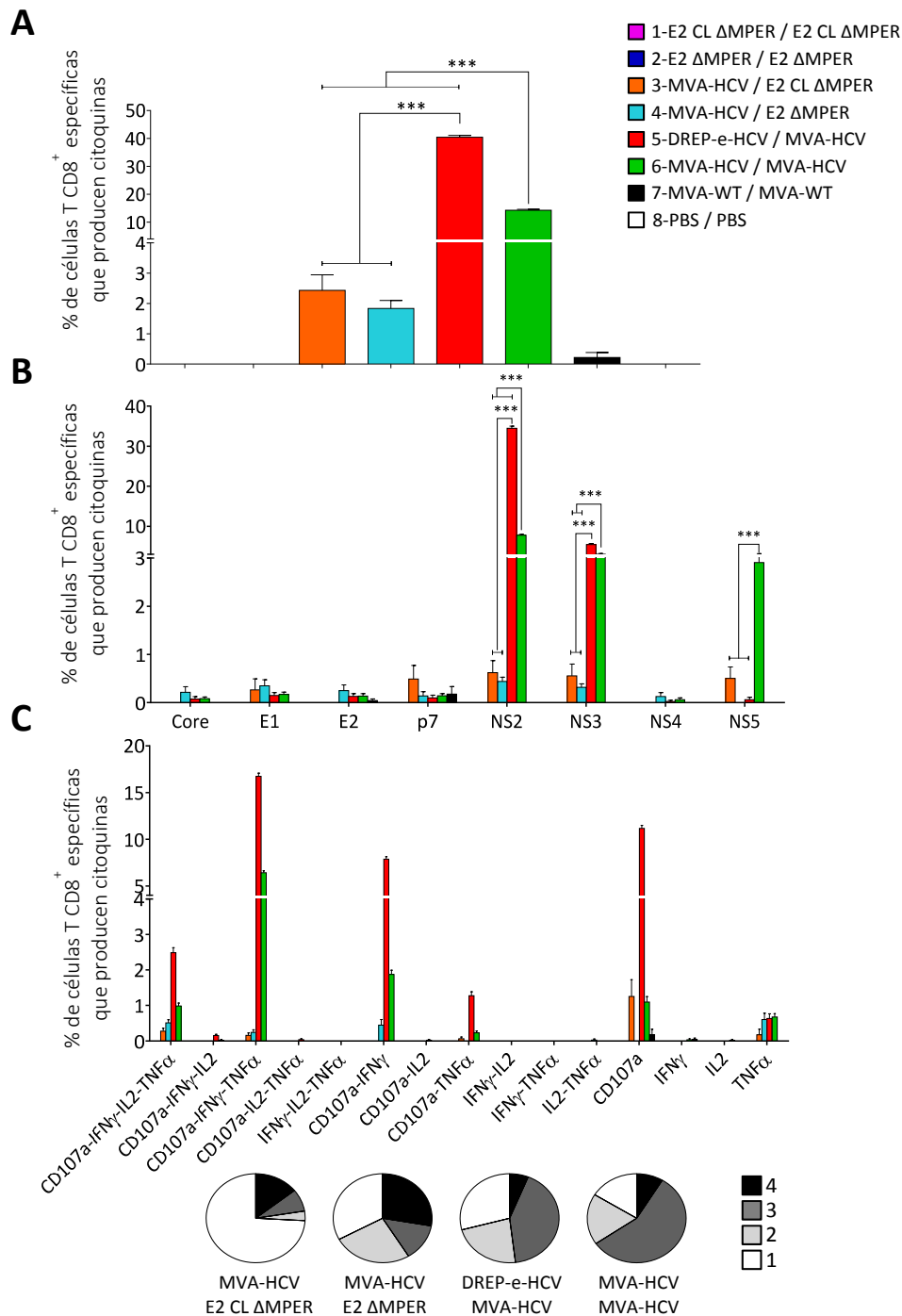
En cuanto a la respuesta inmune celular adaptativa mediada por células T CD8<sup>+</sup> (**Figura 50**), de nuevo el grupo DREP-e-HCV/MVA-HCV es el que generó una respuesta significativamente mayor que el resto, seguido del grupo MVA-HCV/MVA-HCV (**Figura 50A**), confirmando de nuevo los resultados mostrados en el apartado anterior. Los grupos MVA-HCV/E2 (3 y 4) se comportaron de forma similar e indujeron una menor respuesta de células T CD8<sup>+</sup> que MVA-HCV/MVA-HCV, probablemente debido a que solo recibieron una dosis de MVA-HCV; mientras que los grupos E2/E2 (1 y 2), no indujeron respuesta de células T CD8<sup>+</sup> (**Figura 50A**).

En todos los grupos inmunizados, la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> fue dirigida principalmente frente a las proteínas NS2 y NS3 (**Figura 50B**). Por último, una vez más, la respuesta inmune de células T CD8<sup>+</sup> fue altamente polifuncional, con la mayoría de células produciendo 3 y 4 citoquinas en los grupos de mayor magnitud (**Figura 50C**).





**Figura 49. Respuesta inmune adaptativa de células T CD4<sup>+</sup> específicas frente al HCV en ratones inmunizados.** Obtenida de esplenocitos de ratones inmunizados (n=4) 10 días después del *boost*. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar los diferentes grupos entre sí (\*, p < 0.05; \*\*\*, p < 0.001). **(A)** Magnitud total de la respuesta inmune adaptativa de células T CD4<sup>+</sup> específicas frente al HCV. En el eje Y se muestra el porcentaje medido como la suma de células T específicas frente a todos los antígenos del HCV que expresan CD107a y/o que producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2. La línea discontinua separa los grupos estimulados solo con grupos de péptidos de E2 (izquierda) de los grupos estimulados con grupos de péptidos que cubren todo el genoma del HCV (desde Core a NS5) (derecha). **(B)** Amplitud de la respuesta inmune adaptativa de células T CD4<sup>+</sup> mostrada como el porcentaje de células específicas frente a Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4 o NS5 que expresan CD107a y/o que producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2. **(C)** Polifuncionalidad de la respuesta inmune adaptativa de células T CD4<sup>+</sup> dirigidas contra todos los antígenos del HCV. Las respuestas se dividen en función de la producción combinada de CD107a, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2 por los distintos grupos de inmunización, y se agrupan teniendo en cuenta el número de funciones (una, dos, tres, o cuatro, diagramas de círculos).

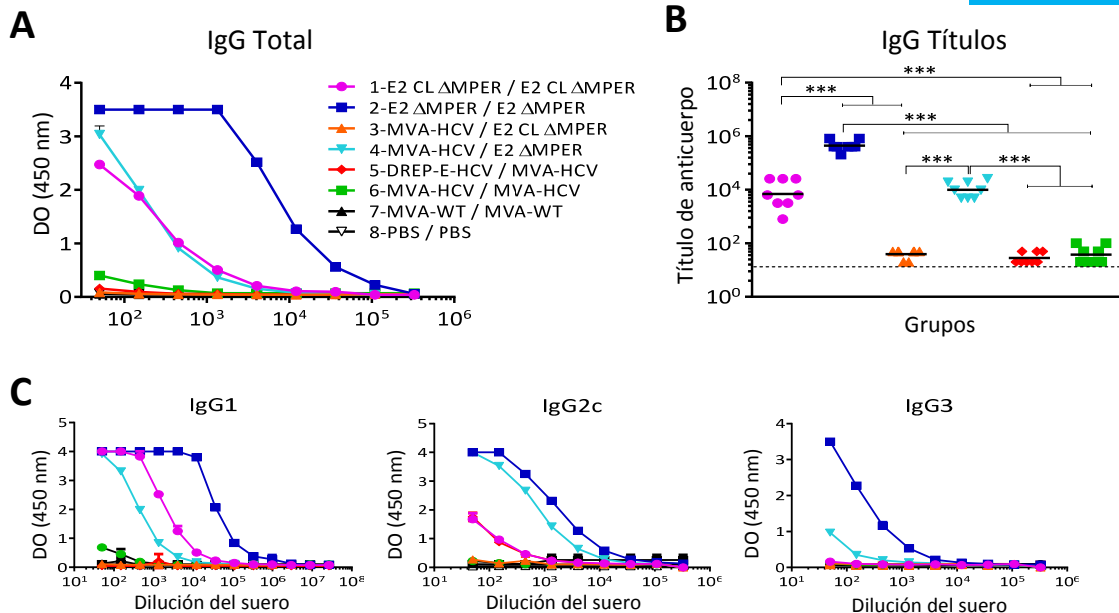


**Figura 50. Respuesta inmune adaptativa de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV en ratones inmunizados.** Obtenida de esplenocitos de ratones inmunizados (n=4) 10 días después del boost. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar los diferentes grupos entre si (\*\*\*, p <0.001). **(A) Magnitud total** de la respuesta inmune adaptativa de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV. En el eje Y se muestra el porcentaje medido como la suma de células T específicas frente a todos los antígenos del HCV que expresan CD107a y/o que producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2. **(B) Amplitud** de la respuesta inmune adaptativa de células T CD8<sup>+</sup> mostrada como el porcentaje de células específicas frente a Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4 o NS5 que expresan CD107a y/o que producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2. **(C) Polifuncionalidad** de la respuesta inmune adaptativa de células T CD8<sup>+</sup> dirigidas contra todos los antígenos del HCV. Las respuestas se dividen en función de la producción combinada de CD107a, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2 por los distintos grupos de inmunización, y se agrupan teniendo en cuenta el número de funciones (una, dos, tres, o cuatro, diagramas de círculos).

#### 4.4.9. E2 $\Delta$ MPER induce niveles superiores de anticuerpos frente a la proteína E2 del HCV que E2 CL $\Delta$ MPER en fase adaptativa

A continuación, se analizó la respuesta inmune humoral inducida por los diferentes grupos de inmunización, cuantificando, mediante ELISA, los niveles totales de anticuerpos IgG frente a la proteína E2 del HCV en sueros obtenidos de ratones individuales 10 días después del *boost* (Figura 48). Los resultados mostraron que, en la fase adaptativa, la proteína E2 en su forma más agregada (E2  $\Delta$ MPER, grupo 2) genera elevados y mayores niveles de anticuerpos IgG totales en comparación con la proteína E2 CL  $\Delta$ MPER, forma monomérica (grupo 1) (Figura 51A y B). Además, estos resultados coinciden cuando ambas proteínas son combinadas con MVA-HCV en protocolos *prime/boost* heterólogos (grupos 3 y 4) (Figura 51A y B). Los protocolos de inmunización E2/E2 o MVA-HCV/E2  $\Delta$ MPER aumentan significativamente los niveles de anticuerpos frente a E2 en comparación con los grupos DREP-e-HCV/MVA-HCV o MVA-HCV/MVA-HCV (Figura 51A y B).

A continuación, se procedió a cuantificar en cada ratón individual el título de anticuerpos obtenido por cada grupo de inmunización y a analizar los diferentes isotipos IgG para evaluar si la respuesta es de tipo Th1 o Th2. Los resultados de cuantificación de título de anticuerpos en ratones individuales mostraron el mismo patrón que anteriormente (niveles de anticuerpos en grupos de sueros), con el grupo E2  $\Delta$ MPER/E2  $\Delta$ MPER siendo el que induce un mayor título de anticuerpos frente a E2, seguido por E2 CL  $\Delta$ MPER/E2 CL  $\Delta$ MPER y MVA-HCV/E2  $\Delta$ MPER que inducen niveles similares de anticuerpos; siendo la media del título de IgG totales de los diferentes grupos la siguiente: 1/500.000 para el grupo 2 (E2  $\Delta$ MPER/E2  $\Delta$ MPER), y 1/12.000 para los grupos 1 (E2 CL  $\Delta$ MPER /E2 CL  $\Delta$ MPER) y 4 (MVA-HCV/E2  $\Delta$ MPER), mientras que en los demás grupos no se pudo obtener título por encontrarse el nivel de anticuerpos por debajo del umbral de detección (Figura 51B). Además, la respuesta de anticuerpos fue mayoritariamente IgG1, seguida de IgG2c y IgG3, mostrando un perfil de respuesta Th2 en todos los grupos (Figura 51C).

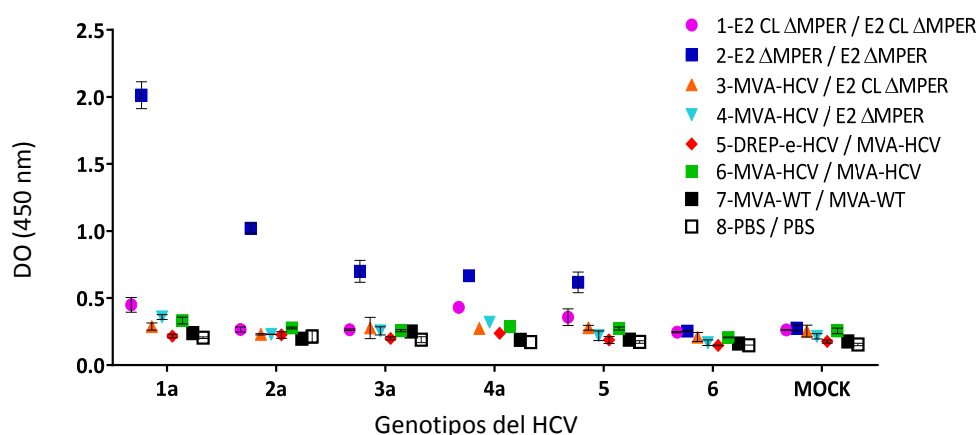


**Figura 51. Respuesta humoral específica frente a la proteína E2 del HCV en fase adaptativa.** ELISAs realizados con los sueros de ratones inmunizados ( $n=8$ ) tras 10 días después del *boost*. DO: densidad óptica. Los valores de  $p$  indican diferencias significativas al comparar los diferentes grupos entre si (\*\*\*,  $p < 0.001$ ) (A) Niveles de IgG totales en grupos de sueros. Los 8 sueros de cada grupo fueron mezclados y diluidos seriadamente 1:3 para medir los niveles totales de anticuerpos IgG anti-E2. (B) Título de anticuerpos anti-E2 de los distintos grupos medidos como la mayor dilución cuya DO es 3 veces mayor que la DO de su correspondiente grupo control (PBS/PBS en el caso de los grupos 1 y 2 y MVA-WT/MVA-WT en el caso de los grupos 3-6). La línea punteada muestra la dilución mínima detectable. (C) Isotipos IgG1, IgG2c y IgG3 en grupos de sueros. Los 8 sueros de cada grupo fueron mezclados y diluidos seriadamente 1:3 para medir los niveles de anticuerpos de los distintos isotipos.

A continuación, se procedió a cuantificar en cada ratón individual el título de anticuerpos obtenido por cada grupo de inmunización y a analizar los diferentes isotipos IgG para evaluar si la respuesta es de tipo Th1 o Th2. Los resultados de cuantificación de título de anticuerpos en ratones individuales mostraron el mismo patrón que anteriormente (niveles de anticuerpos en grupos de sueros), con el grupo E2  $\Delta$ MPER/E2  $\Delta$ MPER siendo el que induce un mayor título de anticuerpos frente a E2, seguido por E2 CL  $\Delta$ MPER/E2 CL  $\Delta$ MPER y MVA-HCV/E2  $\Delta$ MPER que inducen niveles similares de anticuerpos; siendo la media del título de IgG totales de los diferentes grupos la siguiente: 1/500.000 para el grupo 2 (E2  $\Delta$ MPER/E2  $\Delta$ MPER), y 1/12.000 para los grupos 1 (E2 CL  $\Delta$ MPER /E2 CL  $\Delta$ MPER) y 4 (MVA-HCV/E2  $\Delta$ MPER), mientras que en los demás grupos no se pudo obtener título por encontrarse el nivel de anticuerpos por debajo del umbral de detección (Figura 51B). Además, la respuesta de anticuerpos fue mayoritariamente IgG1, seguida de IgG2c y IgG3, mostrando un perfil de respuesta Th2 en todos los grupos (Figura 51C).

#### 4.4.10. E2 $\Delta$ MPER induce anticuerpos con reactividad cruzada frente a otros genotipos del HCV

Para analizar si los anticuerpos generados por los distintos grupos de inmunización a 10 días tras el *boost* también reaccionan frente a proteínas del HCV de diferente genotipo, se cubrieron placas de ELISA con extractos de células HEK-293T sin transfectar (*Mock*) o transfectadas con plásmidos que codifican para las proteínas Core-E1-E2 del genotipo homólogo (1a) o de otros genotipos (2a, 3a, 4a, 5 y 6). Los resultados mostraron que el grupo de inmunización E2  $\Delta$ MPER/E2  $\Delta$ MPER es el que induce unos niveles mayores de anticuerpos frente al genotipo homólogo (1a), seguido por los grupos E2 CL  $\Delta$ MPER/E2 CL  $\Delta$ MPER y MVA-HCV/E2  $\Delta$ MPER (Figura 52), confirmando los datos obtenidos en el apartado anterior. El grupo E2  $\Delta$ MPER/E2  $\Delta$ MPER genera anticuerpos reactivos frente a otros genotipos del HCV, con una mayor reactividad frente al genotipo 2a, seguido de niveles similares de anticuerpos frente a los genotipos 3a, 4a y 5, y sin reactividad frente al genotipo 6 (Figura 52). El resto de grupos no presentan niveles de anticuerpos suficientemente elevados como para concluir si presentan reactividad cruzada (Figura 52).

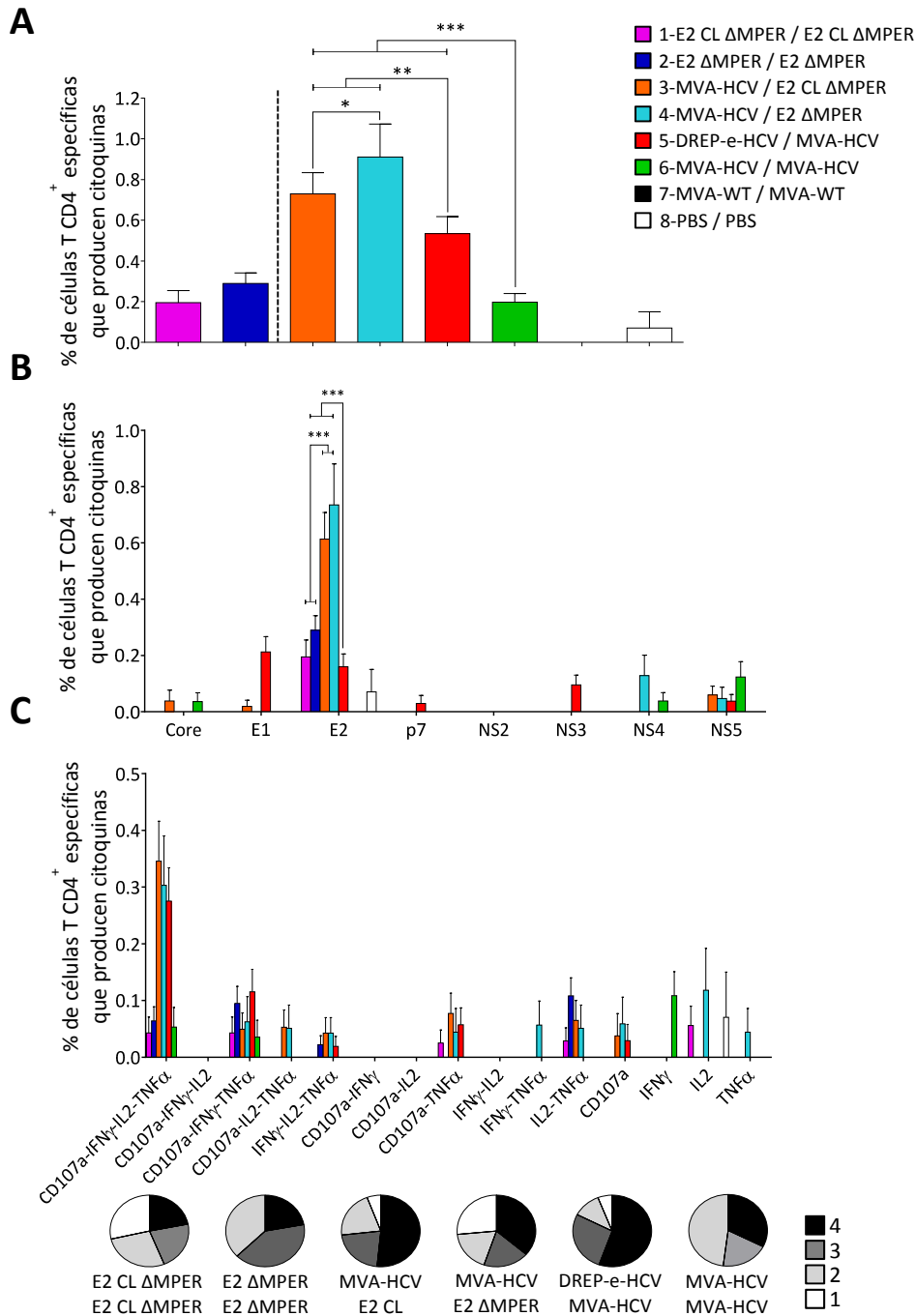


**Figura 52. Reactividad cruzada de la respuesta humoral en fase adaptativa frente a otros genotipos del HCV.** Placas de ELISA fueron cubiertas con extractos de células HEK-293T transfectadas con plásmidos que expresan proteínas estructurales Core-E1-E2 de los diferentes genotipos del HCV y fueron reaccionadas con sueros de ratones inmunizados (n=8) tras 10 días después del *boost* a una dilución 1/50. DO: densidad óptica. Se muestran las medias y desviaciones estándar de las muestras analizadas por duplicado.

#### 4.4.11. La inmunización con las diferentes proteínas E2 recombinantes induce una respuesta inmune celular de memoria específica frente al HCV

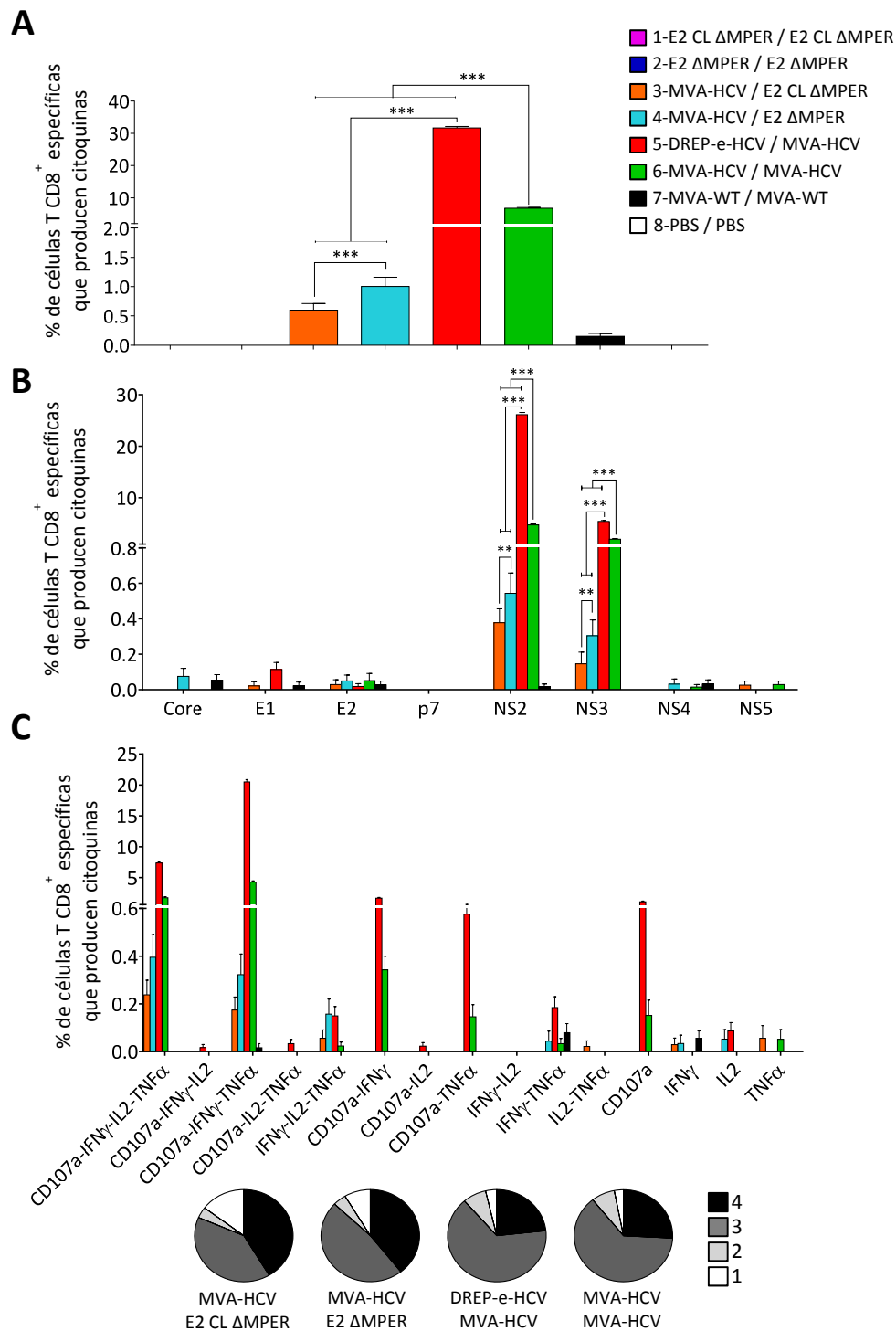
La magnitud de la respuesta inmune de células T CD4<sup>+</sup> de memoria presenta un patrón distinto del descrito en la adaptativa, ya los grupos que presentan mayor magnitud son aquellos en los que se combinó MVA-HCV/E2 (3 y 4), superando incluso al grupo DREP-e-HCV/MVA-HCV, y los grupos E2/E2 (1 y 2) induciendo respuestas similares a MVA-HCV/MVA-HCV (Figura 53A). La respuesta sigue siendo mayoritariamente dirigida frente a E2 en los grupos E2/E2 (1 y 2) y MVA-HCV/E2 (3 y 4), mientras que el grupo DREP-e-HCV/MVA-HCV, mantiene una respuesta distribuida principalmente entre E1 y E2, seguido de NS3, y MVA-HCV/MVA-HCV genera una respuesta mínima frente a NS5, de forma similar a los resultados de la fase adaptativa (Figura 53B). En cuanto a la polifuncionalidad, ésta es similar en los distintos grupos, con una mayoría de células cuádruple productoras de citoquinas (Figura 53C).

Respecto a la respuesta inmune de memoria mediada por células T CD8<sup>+</sup>, al igual que en fase adaptativa, el grupo que indujo mayor magnitud fue DREP-e-HCV/MVA-HCV, seguido de MVA-HCV/MVA-HCV. Los grupos donde se inmunizó con MVA-HCV/E2 (3 y 4) presentan una menor respuesta T CD8<sup>+</sup> que los grupos anteriores, mientras que los grupos inmunizados con E2/E2 (1 y 2), al igual que en la fase adaptativa, no generaron respuesta T CD8<sup>+</sup> (Figura 54A). La amplitud de esta respuesta es principalmente frente a las proteínas NS2 y NS3 del HCV (Figura 54B), siendo estas células altamente polifuncionales, con una mayoría de células triple y cuádruples productoras de citoquinas (Figura 54C).



**Figura 53. Respuesta inmune de memoria de células T CD4<sup>+</sup> específicas frente al HCV en ratones inmunizados.** Obtenida de esplenocitos de ratones inmunizados (n=4) 53 días después del *boost*. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar los diferentes grupos entre si (\*, p <0.05; \*\*, p <0.005, \*\*\*, p <0.001). **(A)** Magnitud total de la respuesta inmune de memoria de células T CD4<sup>+</sup> específicas frente al HCV. En el eje Y se muestra el porcentaje medido como la suma de células T específicas frente a todos los antígenos del HCV que expresan CD107a y/o que producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2. La línea discontinua separa los grupos estimulados solo con grupos de péptidos de E2 (izquierda) de los grupos estimulados con grupos de péptidos que cubren todo el genoma del HCV (desde Core a NS5) (derecha). **(B)** Amplitud de la respuesta inmune de memoria de células T CD4<sup>+</sup> mostrada como el porcentaje de células específicas frente a Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4 o NS5 que expresan CD107a y/o que producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2. **(C)** Polifuncionalidad de la respuesta inmune de memoria de células T CD4<sup>+</sup> dirigidas contra todos los antígenos del HCV. Las respuestas se dividen en función de la producción combinada de CD107a, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2 por los distintos grupos de inmunización, y se

agrupan teniendo en cuenta el número de funciones (una, dos, tres, o cuatro, diagramas de círculos).



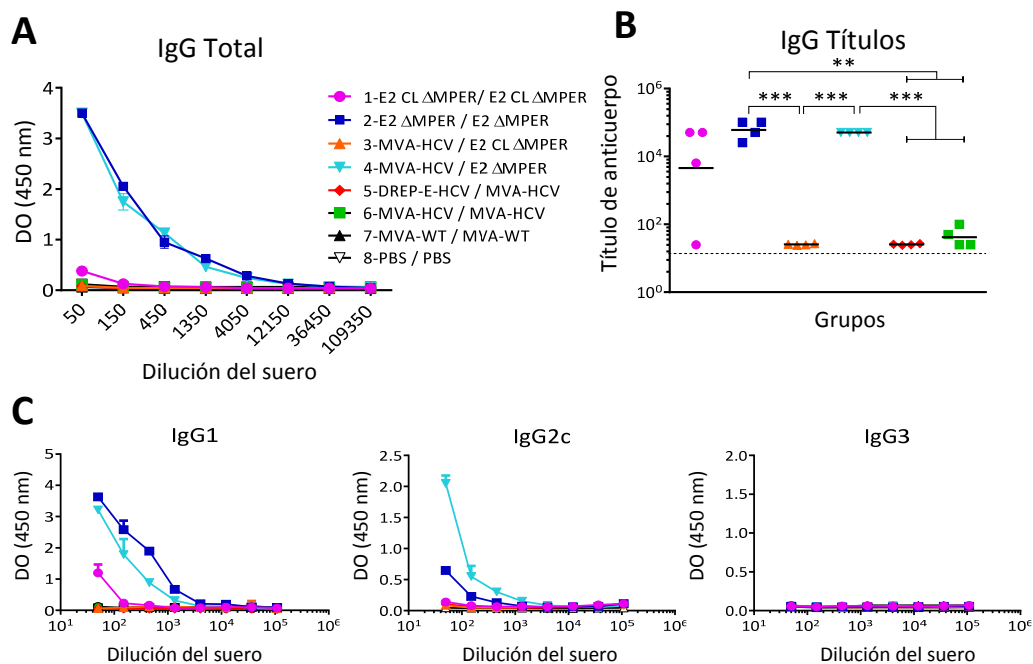
**Figura 54. Respuesta inmune de memoria de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV en ratones inmunizados.** Obtenida de esplenocitos de ratones inmunizados (n=4) 53 días después del boost. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar los diferentes grupos entre si (\*\*, p <0.005, \*\*\*, p <0.001). **(A) Magnitud** total de la respuesta inmune de memoria de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV. En el eje Y se muestra el porcentaje medido como la suma de células T específicas frente a todos los antígenos del HCV que expresan CD107a y/o que producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2. **(B) Amplitud** de la respuesta inmune de memoria de células T CD8<sup>+</sup> mostrada como el porcentaje de células específicas frente a Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4 o NS5 que



expresan CD107a y/o que producen IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2. **(C) Polifuncionalidad** de la respuesta inmune de memoria de células T CD8<sup>+</sup> dirigidas contra todos los antígenos del HCV. Las respuestas se dividen en función de la producción combinada de CD107a, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2 por los distintos grupos de inmunización, y se agrupan teniendo en cuenta el número de funciones (una, dos, tres, o cuatro, diagramas de círculos).

#### 4.4.12. E2 $\Delta$ MPER induce niveles superiores de anticuerpos frente a la proteína E2 del HCV que E2 CL $\Delta$ MPER en fase de memoria

Respecto a la respuesta inmune humoral inducida por los diferentes grupos de inmunización en fase de memoria (53 días después del *boost*) (**Figura 48**), los resultados mostraron que, aunque la proteína E2 en su forma más agregada (E2  $\Delta$ MPER, grupo 2) sigue induciendo un elevado número de anticuerpos frente a la proteína E2 del HCV, con niveles mayores que E2 CL  $\Delta$ MPER, éstos son muy similares a los inducidos por el grupo MVA-HCV/E2  $\Delta$ MPER (**Figura 55A y B**). Los resultados de los títulos de anticuerpos confirman estos resultados, mostrando que el grupo E2  $\Delta$ MPER/E2  $\Delta$ MPER es el que induce mayor título (1/70.000), seguido de MVA-HCV/E2  $\Delta$ MPER (1/50.000) y E2 CL  $\Delta$ MPER/E2 CL  $\Delta$ MPER (1/27.000) (**Figura 55B**). Al igual que en la fase adaptativa, los protocolos de inmunización E2/E2 o MVA-HCV/E2  $\Delta$ MPER aumentan significativamente los niveles de anticuerpos frente a E2 en comparación con los grupos DREP-e-HCV/MVA-HCV o MVA-HCV-MVA-HCV (**Figura 55A y B**).



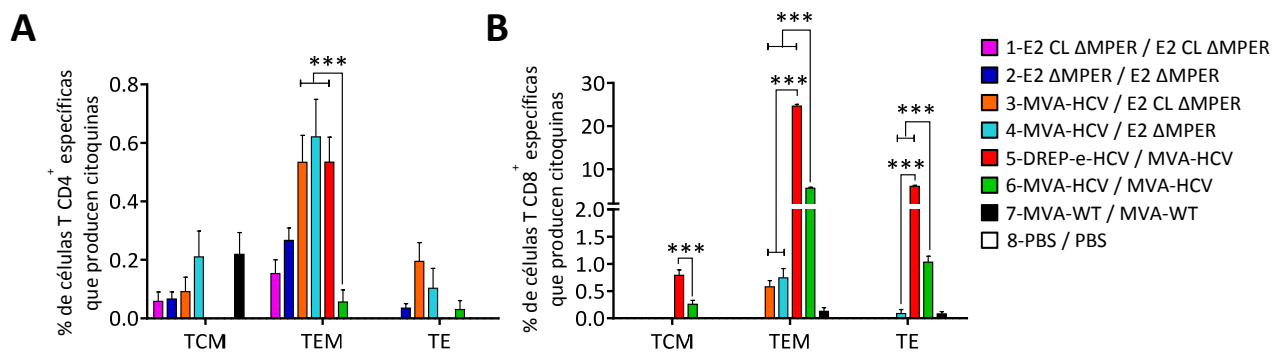
**Figura 55. Respuesta humoral específica frente a la proteína E2 del HCV en fase de memoria.** ELISAs realizados con los sueros de ratones inmunizados (n=4) tras 53 días después del *boost*. DO: densidad óptica. Los valores de p indican diferencias significativas al comparar los diferentes grupos entre si (\*\*, p < 0.005, \*\*\*, p < 0.001). **(A) Niveles de IgG totales** en grupos de sueros. Los 4 sueros de cada grupo fueron mezclados y diluidos seriadamente 1:3 para medir los niveles totales de anticuerpos IgG anti-E2. **(B) Título de anticuerpos** de los distintos grupos medidos como la

mayor dilución cuya DO es 3 veces mayor que la DO de su correspondiente grupo control (PBS/PBS en el caso de grupos 1 y 2 y MVA-WT/MVA-WT en el caso de grupos 3-6). La línea punteada muestra la dilución mínima detectable. **(C)** Isotipos IgG1, IgG2c y IgG3 en grupos de sueros. Los 4 sueros de cada grupo fueron mezclados y diluidos seriadamente 1:3 para medir los niveles de anticuerpos de los distintos isotipos.

Por último, el análisis de los isotipos de anticuerpos IgG frente a E2 muestra que, al igual que en la fase adaptativa, la respuesta humoral es Th2, con mayor número de anticuerpos IgG1, seguido de IgG2c y por último IgG3, donde no se detectaron anticuerpos (**Figura 55C**).

#### 4.4.13. La inmunización con las diferentes proteínas E2 recombinantes induce células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con fenotipo efector de memoria específicas frente al HCV

A continuación, se analizó el fenotipo de memoria de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV inducidas por los diferentes regímenes de vacunación tras 53 días después del *boost* (**Figura 48**). Los resultados mostraron que, en todos los grupos de inmunización, la mayor parte de la respuesta en la fase memoria está formada por células T CD4<sup>+</sup> (**Figura 56A**) y CD8<sup>+</sup> (**Figura 56B**) efectoras de memoria (TEM) (CD127<sup>+</sup>, CD62L<sup>-</sup>). Los grupos de inmunización MVA-HCV/E2 (3 y 4) y DREP-e-HCV/MVA-HCV indujeron las mayores respuestas de células T CD4<sup>+</sup> mientras que el grupo de inmunización DREP-e-HCV/MVA-HCV indujo las mayores respuestas de células T CD8<sup>+</sup>.



**Figura 56. Perfil fenotípico de la respuesta inmune de células T CD4<sup>+</sup> (A) y T CD8<sup>+</sup> (B) de memoria específica frente al HCV en ratones inmunizados.** Esplenocitos de ratones inmunizados (n=4) se obtuvieron 53 días después del *boost* y las respuestas inmunes de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente a grupos de péptidos del HCV se analizaron por ICS, tal y como se describe en Materiales y Métodos. El eje Y indica el porcentaje de células T de memoria central (TCM; CD127<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>), células T de memoria efectora (TEM; CD127<sup>+</sup>, CD62L<sup>-</sup>) y células T efectoras (TE; CD127<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>) específicas frente a todos los grupos de péptidos del HCV y que expresan CD107a y/o IFN- $\gamma$  y/o TNF- $\alpha$  y/o IL-2 (respuesta total). Los valores de p indican diferencias significativas al comparar los diferentes grupos entre sí (\*\*\*, p < 0.001).

# 5. DISCUSIÓN

## 5. DISCUSIÓN

A pesar de los recientes avances en el desarrollo de medicamentos antivirales efectivos contra el HCV y debido al gran número de personas infectadas de forma crónica a nivel mundial (unos 71 millones), sin duda existe la necesidad de desarrollar una vacuna contra el HCV. Los nuevos antivirales siguen siendo muy costosos y no permiten campañas rápidas de tratamiento global, especialmente necesarias en países subdesarrollados, donde la prevalencia del HCV es mayor. Actualmente algunos países desarrollados han anunciado su decisión de proporcionar tratamiento para la hepatitis C a todas las personas infectadas con el virus, como es el caso de España a un coste no oficial de unos 24.000 euros/tratamiento, pero estimaciones realizadas con precios genéricos de Sofosbuvir y Daclatasvir (dos de los medicamentos con mayor efectividad) calculan que el tratamiento todavía costará al menos 200 dólares por paciente [250], por lo que no es una solución viable para erradicar el virus o para tratar a personas infectadas en países en vías de desarrollo.

La OMS ha establecido el 2030 como el año límite para reducir las tasas de nuevas infecciones por el HCV en un 90% [71]. Sin embargo, todos los esfuerzos para erradicar el virus deben contemplar mejores programas de detección para reducir el diagnóstico insuficiente en grupos de alto riesgo, y una prevención mejorada que solo podría lograrse mediante la vacunación [15,251]. Además, la importancia de las vacunas se ha demostrado históricamente, pues la única enfermedad infecciosa humana que ha sido erradicada hasta el momento, la viruela, lo ha sido gracias al desarrollo de una vacuna eficaz y un exhaustivo programa de vacunación mundial [15].

El hecho de que alrededor del 30% de las personas infectadas por el HCV puedan eliminar el virus de manera natural y espontánea tras la infección demuestra que nuestro sistema inmune es capaz de combatir el virus bajo determinadas circunstancias, por lo que una vacuna preventiva capaz de producir estos parámetros inmunes es un objetivo realista y factible [53,251,252].

Actualmente se piensa que una vacuna profiláctica o preventiva es la más plausible para así tratar de prevenir la infección crónica, donde ocurren la mayoría de las secuelas de la infección por el HCV, y generar potentes respuestas inmunes celulares y humorales frente a los distintos genotipos del HCV [53,253]. Por otro lado, una vacuna terapéutica deberá restaurar el fenotipo exhausto característico de la etapa crónica, eliminar el virus de las células infectadas y conseguir una respuesta virológica sostenida (ausencia completa del virus 24 semanas después del tratamiento) [254–257]. Una aproximación que está ganando fuerza es la combinación de los nuevos antivirales con una vacuna terapéutica.

En los últimos años se han desarrollado varios candidatos vacunales contra el HCV. Se han realizado numerosos estudios preclínicos en modelos animales con el fin de inducir fuertes respuestas inmunes humorales y/o celulares, pero solo algunos candidatos vacunales han llegado a fase clínica I y II [18,251,252], sin haber pasado ninguno a fase III.

Previo al presente trabajo, se describió en el laboratorio la generación y caracterización del MVA-HCV, un candidato vacunal contra el HCV basado en un vector MVA que expresa todos los antígenos del HCV (Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-región terminal de NS5b; genotipo 1a, cepa H77), siendo el primer candidato vacunal que codifica todas las proteínas del HCV (estructurales y no estructurales) y, por lo tanto, que cubre la mayoría de los antígenos de células T y B descritos para el HCV. El vector MVA-HCV fue ensayado en ratones de tipo salvaje y humanizados, tanto mediante un protocolo de inmunización *prime/boost* homólogo (MVA-HCV/MVA-HCV) como heterólogo en combinación con vectores de ADN que codifican las proteínas Core, E1, E2 y NS3 del HCV (DNA-HCV). El protocolo de inmunización heterólogo DNA-HCV/MVA-HCV indujo mejores respuestas de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que MVA-HCV/MVA-HCV. Sin embargo, la respuesta de las células T CD4<sup>+</sup> fue baja, y no se evaluó la presencia de anticuerpos [183].

Por lo tanto, aunque MVA-HCV es inmunogénico, es susceptible de ser mejorado y se necesitan nuevas vacunas candidatas y/o nuevos enfoques de inmunización que podrían mejorar la magnitud, amplitud, polifuncionalidad y durabilidad de las respuestas inmunes celulares T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y humorales específicas frente al HCV, convirtiéndose esto en el objetivo de la presente tesis.

La respuesta antiviral dirigida por IFN es especialmente importante tras la infección por el HCV [258–260], debido a su papel esencial en generar una defensa potente y efectiva frente a patógenos intracelulares, creando un estado antiviral en las células que evita el paso al estado crónico de la infección [259,261]. De hecho, a pesar de sus efectos secundarios, la terapia basada en la combinación de IFN con ribavirina ha sido el primer tratamiento de elección durante muchos años, ya que altos niveles de IFN aumentan la respuesta virológica sostenida en los genotipos 1 [262,263], 2 y 3 [264,265].

En esta dirección, una de las estrategias para aumentar la inmunogenicidad de los vectores basados en el MVA es la delección de genes inmunosupresores que aún están presentes en el vector el cual, a pesar de su fenotipo atenuado, todavía codifica proteínas que pueden interferir con las respuestas inmunes del hospedador [266–268]. Uno de los genes candidatos a deleccionar en el MVA es el gen *C6L*, que codifica una proteína que se dirige al complejo TBK1-IRK3 para inhibir la activación de IRF3 y la respuesta de IFN tipo I [225,269,270]. Por tanto, en el

presente trabajo se decidió delecionar el gen *C6L* en el candidato vacunal frente a hepatitis C MVA-HCV (generando el nuevo candidato vacunal MVA-HCV  $\Delta C6L$ ), con la hipótesis de poder aumentar la respuesta de IFN y así obtener respuestas inmunes más potentes frente al HCV, tal y como se había demostrado previamente en nuestro laboratorio para el caso de HIV-1 [193,194].

Por otro lado, además de los genes inmunosupresores aún presentes en el MVA, como el gen *C6L*, el genoma del HCV expresado por partir de MVA-HCV también tiene funciones inmunomoduladoras. El HCV ha evolucionado junto con su hospedador adquiriendo la capacidad de contrarrestar efectivamente la respuesta inmune a varios niveles, y así establecer viremia persistente o crónica. Algunas proteínas como Core, NS3 y NS5 tienen importantes funciones inmunosupresoras [226,227,259,271,272]. En particular, NS3 es un potente inhibidor de la respuesta innata mediada por IFN al proteolizar MAVS y TRIF, que son proteínas celulares implicadas en la respuesta antiviral celular mediada por IFN- $\beta$  y NF- $\kappa$ B [195,196,273]. De esta manera, en el presente trabajo se procedió a generar un nuevo virus recombinante, MVA-HCVmut, que contuviera una mutación puntual en el sitio catalítico de la proteína NS3, que se ha descrito que elimina su actividad catalítica y por tanto inmunosupresora [195,197], de nuevo con la hipótesis de aumentar la respuesta de IFN y así obtener mejores respuestas inmunes frente a los antígenos del HCV.

Los candidatos vacunales MVA-HCV  $\Delta C6L$  y MVA-HCVmut producen eficientemente todos los antígenos del HCV (Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a y una parte de NS5b) al mismo nivel que MVA-HCV. Sin embargo, en MVA-HCVmut, debido a la ausencia de la actividad proteasa de la proteína NS3, y a pesar de la presencia de péptidos autocatalíticos 2A optimizados, la poliproteína del HCV se procesa parcialmente entre las proteínas NS3 y NS5, pues el análisis por WB mostró la presencia de bandas de mayor tamaño molecular al esperado cuando se reveló con el anticuerpo anti-NS5a, bandas compatibles con las proteínas NS3-NS5 sin procesar.

La primera aproximación realizada para estudiar el efecto de la delección del gen *C6L* o de la mutación en NS3 sobre la expresión de genes de IFN tipo I o genes relacionados con la respuesta inmune innata de ambos vectores, fue realizar experimentos en macrófagos o moDCs humanas infectadas y analizar mediante RT-PCR los niveles de dichos genes. Los resultados permitieron una amplia caracterización *in vitro* de ambos vectores, concluyendo que la delección del gen *C6L* en MVA-HCV  $\Delta C6L$  no tuvo un efecto en la inducción de IFN- $\beta$  en comparación con MVA-HCV, mientras que el vector MVA-HCVmut si aumentó significativamente la expresión de IFN- $\beta$ , aunque no la de genes inducidos por IFN, como IFIT1 o IFIT2.

Adicionalmente, en el caso de MVA-HCV  $\Delta C6L$  y con el objetivo de completar en detalle el estudio del efecto de la delección del gen *C6L*, se llevaron a cabo *microarrays* en moDCs humanas infectadas, proporcionando una visión general de los genes diferencialmente expresados en los 3 vectores (MVA-HCV, MVA-HCV  $\Delta C6L$  y MVA-WT) y la influencia de las proteínas del HCV en los mismos. Los resultados mostraron que MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta C6L$  regulan diferencialmente los genes relacionados con IFN (OASL, ZC3HAV1, IFN- $\beta$ 1, IFIT1, IFIT2 e IFIT3), genes involucrados en la apoptosis (PMAIP1) e histonas (HIST1H4D, HIST1H4F, HIST1H4H, HIST1H4J, HIST1H4K, y HIST2H4B) en comparación con MVA-WT. La disminución de la expresión IFN- $\beta$  y genes relacionados con IFN tipo I confirmó los resultados anteriores de las RT-PCRs en moDCs y macrófagos humanos infectados, y está de acuerdo con el papel ejercido por las proteínas del HCV, especialmente NS3, inhibiendo la señalización del IFN tipo I. Cuando los mismos genes del HCV presentes en MVA-HCV se expresaron de forma inducible por parte de un vector basado en una cepa del VACV diferente al MVA (VT7-HCV7.9), se observó apoptosis celular mediada por las proteínas del HCV y las enzimas PKR y RNasa-L [274], las cuales están inducidas por IFN, y la modulación de la transcripción de genes asociados con el metabolismo de los lípidos, el estrés oxidativo, la apoptosis y la proliferación celular [275]. La disminución de la expresión de genes de histonas, que están estrechamente regulados durante la replicación del ADN, indica que la proliferación celular y la progresión del ciclo celular probablemente se vean afectadas en las células infectadas con MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta C6L$ . En este sentido, se ha descrito que la infección de las células Huh7.5 con el HCV produjo una inhibición de la metilación/acetilación de la histona H4 y la fosforilación de la histona H2AX, con un cambio significativo en la expresión de genes importantes para la hepatocarcinogénesis, inhibiendo la reparación del daño al ADN [276].

Cuando MVA-HCV  $\Delta C6L$  y MVA-HCV se inocularon en la cavidad peritoneal de ratones, se produjo un menor reclutamiento de determinados tipos específicos de células inmunes, como las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, NK, NKT, a las 24 horas después de la inoculación en comparación con MVA-WT, pero sin diferencias significativas entre ambos vectores. Este menor reclutamiento de células inmunes innatas puede estar relacionado con los resultados obtenidos *in vitro* donde se observa una disminución de la expresión de genes implicados en la respuesta inmune innata.

A continuación, se realizaron experimentos para estudiar y comparar la respuesta inmune celular adaptativa y de memoria y la respuesta inmune humoral de los nuevos candidatos vacunales MVA-HCV  $\Delta C6L$  y MVA-HCVmut respecto a su parental MVA-HCV. Los resultados mostraron que, a pesar de la inhibición *in vitro* del IFN tipo I producida tras la infección de células humanas con MVA-HCV y MVA-HCV  $\Delta C6L$ , estos vectores aún inducen respuestas de células T específicas frente al HCV en ratones inmunizados, aunque, al igual que en el

experimento *in vitro*, sin diferencias significativas entre ambos. Asimismo, a pesar de que MVA-HCVmut si aumentaba la expresión de IFN- $\beta$  en comparación con MVA-HCV en experimentos *in vitro* (RT-PCR), no se observó ningún efecto de la mutación en los ensayos de inmunogenicidad *in vivo*. Cabe destacar que todas las respuestas inmunes generadas por MVA-HCV  $\Delta$ C6L y MVA-HCVmut fueron altamente funcionales y similares en magnitud a MVA-HCV, aunque la especificidad de la misma contra los antígenos del HCV varía ligeramente entre los vectores: aunque los 3 vectores indujeron respuestas de células T CD8<sup>+</sup> dirigidas principalmente frente a NS2, seguido de NS3, se observó que mientras que MVA-HCV  $\Delta$ C6L indujo una mayor respuesta específica frente a NS3 que MVA-HCV, esta respuesta frente a NS3 fue menor en el caso de MVA-HCVmut en comparación con MVA-HCV. El impacto de estas diferencias debe estudiarse más a fondo, pero se ha propuesto que una respuesta celular frente a la proteína NS3 podría ser importante en el resultado de la infección por el HCV debido al papel de esta proteína en la infección por el virus, con varios epítomos virales de NS3 que desencadenan las respuestas de las células T CD8<sup>+</sup> [257,277,278]. Por ejemplo, se ha descrito que una respuesta inmune celular T CD8<sup>+</sup> específica frente a NS3 ayudó a eliminar la infección en chimpancés infectados [279]. Además, NS3 es uno de los principales antígenos utilizados en el desarrollo de vacunas [280] que han sido probados en ensayos clínicos de fase I y II y frente al cual se han intentado generar respuestas celulares [142,280–282].

Aunque la delección del gen *C6L* produjo un aumento en las respuesta inmunes celulares y humorales frente al HIV-1 en un candidato vacunal basado en el MVA, llamado MVA-B, en comparación con el virus sin la delección [193,194], es posible que en el caso de MVA-HCV no actúe de la misma forma porque los vectores están expresando antígenos heterólogos muy distintos: mientras que MVA-B expresa principalmente proteínas estructurales del HIV-1, MVA-HCV está codificando proteínas estructurales y no estructurales del HCV, las cuales son metabólicamente activas y pueden estar ejerciendo una inhibición más potente y dominante que la ejercida por la proteína C6 del MVA. Respecto a MVA-HCVmut, en este caso NS3 ya no presenta actividad proteasa, pero aún hay otras proteínas del HCV presentes en MVA-HCVmut que también tienen un papel inmunomodulador, como E2 o NS5a, que interactúan con el mecanismo de inducción del IFN mediado por las proteínas Janus-quinasas-transductores de la señal y activadores de la transcripción (Jak-STAT) [283–285]; Core, que interfiere con la translocación nuclear de STAT [286,287] y regula a la baja la transcripción de genes inducidos por IFN [288]; NS2 que inhibe IFN- $\beta$  [289] o NS4b que inhibe la interacción de la proteína estimuladora de genes de interferón (STING) con la proteína quinasa serina/treonina 1 (TBK1) [290]. Todos estos mecanismos demuestran que el HCV ha desarrollado maneras redundantes de inhibir o evadir fuertemente la respuesta inmune del hospedador, por lo que, aunque MVA-



HCVmut aborda uno de los más importantes (la actividad inmunosupresora de NS3), puede que no sea suficiente para obtener un aumento de la inmunogenicidad del vector MVA-HCV.

Tras observar estos resultados, se decidió estudiar otra de las estrategias para generar potentes respuestas inmunes, que es la generación de nuevas vacunas frente al HCV y la combinación de dichas vacunas en protocolos de inmunización *prime/boost* en ratones.

Como se ha descrito en numerosos estudios, el protocolo de inmunización *prime/boost* heterólogo es más inmunogénico que una vacunación homóloga *prime/boost*, al estimular el sistema inmune con inmunógenos de distinta naturaleza y generar respuestas inmunes más potentes y protectoras [187]. Además, especialmente con el uso de vectores virales, es conveniente utilizar diferentes inmunógenos como *prime* o *boost* para evitar que la generación de inmunogenicidad frente al vector merme la eficacia de sucesivas dosis con el mismo [22]. Muchos estudios han combinado vectores basados en MVA con otros vectores vacunales en ensayos preclínicos y clínicos [291–293] obteniendo datos consistentes en: 1) el uso de un poxvirus como *boost* tras una primera dosis de otro inmunógeno mejora la magnitud de las respuestas de las células T específicas de antígeno y 2) el uso de un poxvirus como *prime* en combinación con una proteína y un adyuvante mejora significativamente las respuestas de las células B y desencadena respuestas con elevados niveles de anticuerpos [184]. En el presente trabajo, se exploran ambas alternativas mediante la generación de nuevas vacunas frente al HCV basadas en replicones de ADN denominados DREP y en proteínas E2 recombinantes del HCV, que se han combinado con el candidato vacunal MVA-HCV.

Por un lado, las vacunas basadas en ADN confieren una serie de ventajas tales como la simplicidad de la manipulación, generación, transporte y almacenamiento, el bajo coste de producción, la alta estabilidad y un buen perfil de seguridad. Sin embargo, un inconveniente importante de las mismas es su baja inmunogenicidad cuando se administran solas, requiriendo múltiples dosis de refuerzo u otros agentes para aumentar la duración de su efecto inmunológico [294–297]. Dentro de las vacunas de ADN, aquellas basadas en replicones DREP se consideran un enfoque interesante y prometedor para generar respuestas inmunes específicas debido a su alto nivel de expresión de la proteína heteróloga y a su capacidad para inducir apoptosis, que ejerce un efecto adyuvante [298].

Además, ha sido descrito que los vectores DREP se pueden optimizar con la adición de un potenciador de la traducción o *enhancer* aguas arriba y en la misma pauta de lectura del antígeno heterólogo, que proporciona una expresión incrementada del antígeno y una mejora de las respuestas inmunes humorales específicas frente al mismo [202,203]. Estas características intrínsecas a los vectores DREP hacen que su inmunogenicidad sea superior en comparación con

las vacunas de ADN convencionales [198,205,207,299]. Varios estudios preclínicos han demostrado que la inmunogenicidad de las vacunas DREP puede ser mejorada si se combinan con un vector MVA como *boost*, obteniendo respuestas inmunes elevadas frente a virus como el Chikungunya [230–232], el Ébola [233] y el HIV-1 [205,206]. Sin embargo, no se han desarrollado candidatos vacunales DREP frente al HCV y debido a la falta de una vacuna eficaz contra el mismo, el estudio de la combinación DREP/MVA puede suponer un paso adelante en el desarrollo de una vacuna efectiva contra el HCV.

Por tanto, en el presente trabajo se generaron y caracterizaron 2 nuevos candidatos vacunales basados en los vectores DREP, que expresan la mayoría de los genes del HCV y que difieren en la presencia/ausencia de un *enhancer*. A continuación, se estudió y comparó su inmunogenicidad en combinación con MVA-HCV en ratones inmunizados.

Por otro lado, y en relación al desarrollo de vacunas frente al HCV basadas en proteínas recombinantes, las glicoproteínas E1 y E2 del HCV forman un complejo en la envoltura del virus que es la diana principal de los anticuerpos de amplio espectro. De éstos, la mayoría se dirigen frente a la E2 y, por tanto, una proteína E2 bien plegada y con una conformación lo más nativa posible constituye un candidato vacunal atractivo [102]. Sin embargo, históricamente las glicoproteínas E1 y E2 del HCV han sido difíciles de producir en cantidades suficientemente altas o con la calidad necesaria para que un estudio bioquímico y biofísico completo facilite el diseño de vacunas basadas en las mismas. Por ejemplo, tanto E1 como E2 están altamente glicosiladas, lo cual hace disminuir su inmunogenicidad, y dificulta su desarrollo y estudio como candidatos vacunales. La producción tradicional de proteínas recombinantes se basa en gran medida en sistemas de expresión desarrollados en bacterias o eucariotas inferiores (levaduras o baculovirus, entre otros). Sin embargo, las proteínas complejas (como las del HCV, que presentan glicosilaciones, enlaces disulfuros, dimerizaciones, etc.) a menudo están mal plegadas o no se encuentran en conformación fisiológica cuando se producen de esta manera, ya que estos sistemas no logran generar estas modificaciones con precisión. La expresión de estas glicoproteínas en células humanas, tal y como se hizo en el presente trabajo, supone claras ventajas ya que la maquinaria celular es la adecuada para una traducción, plegamiento y orientación subcelular adecuadas [300]. Además, en el caso de la proteína E2 del HCV, ésta contiene 18 residuos de cisteína altamente conservados que forman una red heterogénea y poco definida de puentes disulfuro [241]. Esta heterogeneidad puede ser la responsable de la agregación de proteínas cuando se producen en cultivo celular y ha dificultado la resolución de una estructura completa de la proteína E2.

En el presente trabajo hemos analizado las discrepancias de los puentes disulfuro entre las 2 estructuras de la proteína E2 publicadas y hemos sustituido estratégicamente 8 cisteínas por alaninas, basándonos también en estudios previos [241,301,302], generando así 2 proteínas E2 que difieren en el número de cisteínas que contienen (E2  $\Delta$ MPER y E2 CL  $\Delta$ MPER). Ambas proteínas también carecen de la región MPER, que es una zona rica en aminoácidos hidrofóbicos y que es común encontrarla en proteínas ancladas a la membrana. La presencia de esta región, estudiada en otras proteínas como las glicoproteínas del HIV-1, contribuye a la formación de agregados, pero su delección no afecta a la antigenicidad de la misma ni altera la estructura tridimensional de la proteína. Por tanto, proteínas con esta región delecionada son una herramienta útil para estudios estructurales e inmunogénicos [242] y presentan potencial para su uso como vacuna. Por último, se ha descrito que los aminoácidos Leu675, Ser678, Leu689 y Leu692, localizados en la región del tallo o *stem* y presentes tanto en E2  $\Delta$ MPER como en E2 CL  $\Delta$ MPER son esenciales para la dimerización con E1 [244], por lo que ambas proteínas potencialmente podrían formar complejos con E1.

Por tanto, en el presente trabajo se generaron y caracterizaron 2 nuevos candidatos vacunales que consisten en 2 proteínas E2 recombinantes sin la región MPER que difieren en el número de cisteínas que contienen. Su inmunogenicidad se estudió y comparó en combinación con la vacuna previamente descrita MVA-HCV en ratones inmunizados.

Una vacuna ideal frente al HCV debe ser capaz de generar potentes respuestas inmunes celulares específicas frente al virus [53]. Una respuesta de elevada magnitud, definida como el número de células que presentan una función efectora tras el contacto con el antígeno (generalmente liberación de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2), y mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> es un factor clave en una vacuna exitosa contra el virus [303]. Sin embargo, la inducción y el mantenimiento de respuestas citotóxicas adecuadas dependen de la presencia de células T CD4<sup>+</sup> funcionales y eficientes, por lo que la respuesta de las células T CD4<sup>+</sup> es un factor clave que también contribuye a controlar la infección del HCV [92,304]. Además, las células T CD4<sup>+</sup> son las reguladoras centrales de la respuesta inmune y si son correctamente estimuladas facilitarán respuestas de alta calidad mediadas por células T CD8<sup>+</sup> y células B. Por tanto, respuestas potentes de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV se asocian con el aclaramiento viral espontáneo y desempeñan un papel importante durante la infección [47,305].

La vacunación de DREP-e-HCV/MVA-HCV presenta el mejor perfil y balance de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> específicas en comparación con las demás vacunas, ya que MVA/MVA (MVA-HCV/MVA-HCV, MVA-HCV  $\Delta$ C6L/MVA-HCV  $\Delta$ C6L y MVA-HCVmut/MVA-HCVmut) sólo generó respuesta T CD8<sup>+</sup>, que fue además de mucha menor magnitud. En cuanto a la inmunización

MVA-HCV/E2, también obtenemos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas, pero también de menor magnitud que con DREP/MVA-HCV; mientras que la inmunización E2/E2 solo indujo células T CD4<sup>+</sup>. Cabe destacar que en el presente trabajo no se llevaron a cabo inmunizaciones DREP/DREP porque ha sido ampliamente descrito que la combinación DREP/MVA es superior a DREP/DREP [205,206,230–233]. Por tanto, el protocolo de inmunización DREP/MVA-HCV es el que genera mayor magnitud de respuesta celular T CD4<sup>+</sup> y potentes respuestas T CD8<sup>+</sup> y, dentro de los vectores DREP desarrollados, la presencia del *enhancer* en DREP-e-HCV supone una mejora de la inmunogenicidad celular significativa en comparación con el DREP sin *enhancer*, siendo la primera demostración de que el *enhancer* mejora las respuestas inmunes celulares específicas frente a un antígeno heterólogo.

Además de la magnitud, una respuesta temprana, amplia y vigorosa frente al HCV evita la aparición de mutaciones de escape viral [251,306–308]. La amplitud viene definida como la variabilidad de epítomos diana de las células T específicas, de manera que cuantas más regiones antigénicas se cubran, menos probabilidad hay de producirse mutaciones de escape. Varios estudios han demostrado que la amplitud de la respuesta se asocia con resolución espontánea de la infección [309,310]. La vacunación DREP/MVA-HCV generó una respuesta no sólo de elevada magnitud, sino también amplia ya que fue dirigida frente a diferentes proteínas del HCV, tanto estructurales como no estructurales (E1 y E2 en el caso de células T CD4<sup>+</sup> y NS2 y NS3 en el caso de células T CD8<sup>+</sup>), lo cual supone una gran mejora respecto a los protocolos de inmunización MVA-HCV/MVA-HCV, MVA-HCV  $\Delta$ C6L/MVA-HCV  $\Delta$ C6L y MVA-HCVmut/MVA-HCVmut, donde la respuesta obtenida sólo incluía células T CD8<sup>+</sup> específicas frente a NS2 y NS3 y donde la magnitud no era tan elevada. Por otro lado, las inmunizaciones E2/E2 sólo produjeron respuesta de células T CD4<sup>+</sup> frente a E2 y las inmunizaciones MVA-HCV/E2 frente a E2 (células T CD4<sup>+</sup>), NS2 y NS3 (células T CD8<sup>+</sup>). Por tanto, el protocolo DREP/MVA-HCV es el que generó una mayor amplitud de respuesta celular.

En muchos microorganismos patógenos de humanos, pero especialmente en aquellos que causan cronicidad, la polifuncional de las células T se correlaciona con protección [258,311]. La polifuncionalidad celular, definida como la capacidad de las células para producir más de una citoquina junto con potencial citotóxico y capacidad proliferativa, es importante en la efectividad de una vacuna y es una medida de la calidad de la respuesta inmune. Una respuesta de células T disfuncional ha sido identificada en aquellos pacientes que no controlan la infección por el HCV a diferencia de los que resuelven espontáneamente [62,93]. Dentro de las citoquinas liberadas, destacan IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  debido a su potente acción antiviral y papel en la infección por el HCV [312], e IL-2 que promueve la expansión clonal de las poblaciones de células T y su diferenciación en subtipos [53,93,313]. La función citotóxica de las células T CD8<sup>+</sup> es esencial

para combatir infecciones virales ya que conlleva la liberación de lisosomas que contienen proteínas formadoras de poros, como las perforinas y las granzimas, que desencadenarán apoptosis en la célula diana [314,315]. Un marcador indirecto para medir la capacidad citotóxica de las células tras una inmunización es la detección del marcador CD107a en la superficie celular [316]. El perfil de polifuncionalidad de los distintos regímenes de inmunización descritos en el presente trabajo es bastante similar, detectándose de forma mayoritaria células específicas T CD4<sup>+</sup> que secretan simultáneamente 4 citoquinas y 3 citoquinas en el caso de las células T CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, la ventaja que posee el protocolo de inmunización DREP-e-HCV/MVA-HCV frente a los demás es que la magnitud de las células polifuncionales es mayor.

Con el descubrimiento y la caracterización de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro aislados de pacientes infectados, y la demostración de que juegan un papel importante a la hora de controlar la infección por el HCV [102,317], cada vez está más aceptado que una vacuna eficiente debe estimular también la respuesta humoral [318]. Sin embargo, el virus también puede transmitirse de célula a célula infectada sin pasar por el medio extracelular [319], por lo que las respuestas inmunes mediadas por células T y B deben combinarse en un efecto sinérgico [21,252]. Actualmente, se han descrito pocos anticuerpos neutralizantes frente a E1, y un estudio demuestra que los pacientes generan 7 veces más anticuerpos frente a E2 que a E1 [320,321], sugiriendo que E2 es inmunodominante.

En el presente trabajo se muestra por primera vez que el candidato vacunal MVA-HCV es capaz de generar anticuerpos frente la proteína E2 en ratones inmunizados, así como los nuevos candidatos vacunales MVA-HCV  $\Delta$ C6L y MVA-HCVmut. Sin embargo, los niveles de estos anticuerpos inducidos tras una inmunización homóloga MVA/MVA no son elevados, por lo que se requiere utilizar una estrategia distinta para potenciar la respuesta humoral frente al HCV.

En el caso de la combinación DREP/MVA, se obtuvieron mayores niveles de anticuerpos que con MVA/MVA, pero éstos aún no fueron suficientemente elevados para evaluar su capacidad de neutralización o su reacción cruzada frente a otros genotipos del HCV. Además, sorprendentemente, la presencia del *enhancer* en DREP-e-HCV no supuso una mejora significativa de los niveles anticuerpos respecto a DREP-HCV, al contrario de lo descrito previamente [202,203].

La presentación de epítomos repetitivos en forma de agregados es un potente inductor de la respuesta inmune humoral que estimula a las células B independientemente de células T [322,323]. En la última parte de este trabajo, se generaron 2 nuevos candidatos vacunales de naturaleza proteica (E2  $\Delta$ MPER, proteína agregada y E2 CL  $\Delta$ MPER, proteína monomérica) con el objetivo de potenciar la respuesta inmune humoral al administrarlas como *boost* tras un *prime*

de MVA-HCV y de dilucidar si es más conveniente utilizar proteína en forma de agregados de elevado peso molecular o en forma de monómeros para estimular una respuesta inmune humoral de calidad frente al HCV.

Los resultados mostraron que en experimentos *in vitro* la proteína monomérica E2 CL  $\Delta$ MPER muestra mejores características inmunogénicas al presentar mayor afinidad por anticuerpos neutralizantes y por el receptor CD81 del HCV, en comparación con la proteína agregada E2  $\Delta$ MPER. En experimentos *in vivo*, sin embargo, aunque ambas proteínas generaron elevados títulos de anticuerpos cuando se inmunizaron en *prime* y *boost*, éstos fueron mayores en el caso de la proteína agregada. El estudio de los isotipos de anticuerpos demuestra que la respuesta es Th2, habiendo mayores niveles de anticuerpos IgG1 que IgG2c o IgG3. Un estudio realizado por Patricia T. Vietheer y colaboradores demuestra que, a pesar de que utilizan proteínas E2 recombinantes truncadas que carecen de la región más inmunogénica de la misma, existen diferencias importantes en la antigenicidad de las proteínas según si se encuentran en forma de monómeros, dímeros o agregados. En concreto, describen que mientras que los monómeros de E2 unen mejor *in vitro* a CD81 y a un panel de diferentes anticuerpos monoclonales (entre ellos, el HC84.26), los agregados de E2 presentan mayores títulos de anticuerpos neutralizantes y mejor reactividad cruzada frente a otros genotipos del HCV en cobayas inmunizadas [324]. Estos investigadores concluyen que este efecto podría deberse a que las formas agregadas ocultan la cara no neutralizante de la proteína E2, mientras que en su forma monomérica queda más expuesta, efecto que también se ha observado en estudios con el HIV-1 [219]. Por otro lado, otro estudio afirma que la elevada inmunogenicidad de los agregados proteicos, en este caso proteína E2 del HCV presente en la superficie de partículas virales del virus del mosaico de la papaya, es debida a que se rompe con la tolerancia basal de las células B al presentar epítomos de manera repetitiva [325]. Por tanto, el presente trabajo confirma estos estudios previos sobre la elevada inmunogenicidad de las formas agregadas de proteínas, siendo la primera vez que se compara la inmunogenicidad en ratones inmunizados de dos proteínas solubles E2 del HCV que difieren en su organización molecular (agregados o monómeros) y producidas en su forma más nativa posible.

La respuesta celular obtenida con las inmunizaciones E2/E2 queda limitada a sólo células T CD4<sup>+</sup> específicas frente a la proteína E2. Sin embargo, la combinación MVA-HCV/E2 potencia respuestas inmunes tanto de células T CD4<sup>+</sup> como de células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV. Además, mientras que la combinación de MVA-HCV/E2  $\Delta$ MPER genera una respuesta humoral bastante elevada, MVA-HCV/E2 CL  $\Delta$ MPER produce muy bajos niveles de anticuerpos. Estos resultados muestran que la proteína en forma de agregados es más adecuada para estimular el

sistema inmune humoral que su forma monomérica, y que su combinación con MVA-HCV supone una ventaja frente a la inmunización homóloga de ambos inmunógenos por separado.

Cabe destacar que, aunque la proteína E2 monomérica (E2 CL  $\Delta$ MPER) no tenga una inmunogenicidad superior a la proteína E2 agregada (E2  $\Delta$ MPER) en los experimentos *in vivo*, supone un interesante avance en la investigación de la estructura nativa de E2, teniendo gran potencial para futuros estudios biofísicos y bioquímicos que puedan eventualmente conllevar a la cristalización de la proteína y la final dilucidación de su estructura nativa. Los anticuerpos monoclonales y el escaneo de mutaciones por alanina proporcionan información útil y fiable para estudios de epítomos conformacionales y validación de estructuras. Estos estudios se están llevando a cabo en el laboratorio del grupo colaborador del Dr. Rogier Sanders en el Centro Médico Académico de Ámsterdam, donde intentarán cristalizar la proteína y purificarla junto a E1 con la conformación más nativa posible, ya que ha sido descrito que un correcto plegamiento de ambas necesita la expresión simultánea de las mismas en *cis*, tal y como se encuentran de manera natural en el virus [126].

Una característica necesaria que debe estar presente en una vacuna efectiva frente al HCV es la reactividad cruzada con otros genotipos, haciendo que la vacuna sea pangentópica o universal [326]. En el presente trabajo se han generado vacunas basadas en el genotipo 1a del HCV, el más prevalente (49.1%) y de distribución mundial [327]. Previamente se ha demostrado que MVA-HCV genera respuestas celulares específicas frente a proteínas del HCV de genotipo 1b [183], al igual que MVA-HCV  $\Delta$ C6L (datos no mostrados), por lo que probablemente MVA-HCVmut y los plásmidos DREP-HCV y DREP-e-HCV también las produzcan. En cuanto a respuestas humorales con reactividad cruzada, en el presente trabajo se realizó una primera aproximación para evaluar la reactividad cruzada de los anticuerpos generados con los distintos protocolos de inmunización frente a los genotipos 2a, 3a, 4a, 5 y 6, aunque solo se obtuvieron respuestas elevadas en el grupo inmunizado con E2  $\Delta$ MPER/E2  $\Delta$ MPER (proteína agregada de genotipo 1a), probablemente debido al elevado número de anticuerpos presentes en el suero de estos ratones, lo que permite analizar en más detalle la respuesta de reactividad cruzada. Esta reactividad cruzada mostró mayores niveles de anticuerpos IgG frente al genotipo 2a, seguido de niveles similares de anticuerpos frente a los genotipos 3a, 4 y 5, y no se detectaron anticuerpos frente al genotipo 6. Futuros estudios serán llevados a cabo para caracterizar en detalle los epítomos frente a los cuales estos anticuerpos van dirigidos. La capacidad neutralizante de estos anticuerpos está siendo actualmente estudiada por nuestro grupo colaborador, liderado por el Dr. Rogier Sanders en Ámsterdam.

Tras un primer contacto con el antígeno, ocurre una expansión robusta de células T específicas de antígeno que se diferencian en poblaciones efectoras y contribuyen a la eliminación del patógeno mediante citotoxicidad y liberación de citoquinas [328–330]. A continuación, hay una segunda fase de rápida contracción de las células T efectoras debido a procesos de apoptosis, y la tercera fase involucra la generación y el mantenimiento de una población de células de memoria estable que mediará la protección frente a posibles reinfecciones [331].

Por tanto, quizás la característica más importante de una vacuna profiláctica frente al HCV es la capacidad de generar células de memoria de larga duración, que puedan desarrollar una respuesta más rápida y efectiva en caso de contacto con el virus. Estas células de memoria se caracterizan por la presencia del marcador CD127, que es el receptor de IL-7, necesario para el establecimiento y mantenimiento de los linfocitos de memoria [94]. Dos estudios en chimpancés han demostrado que los animales que fueron re infectados con el HCV no pudieron eliminar el virus si se les deplecionaba por separado las células T CD4<sup>+</sup> o las T CD8<sup>+</sup> de memoria, sino que solo lo eliminaban cuando ambos tipos de linfocitos estaban presentes, lo que demuestra el papel esencial de las células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> de memoria en la protección a largo plazo [87,88].

Una clasificación general de los subconjuntos de células de memoria es la basada en la expresión de CD127 junto a la expresión de L-selectina (CD62L) [332,333], denominándose células T de memoria central (TCM) a aquellas que expresan ambos receptores y son capaces de transitar a los ganglios linfáticos directamente desde la sangre, mientras que las células T de memoria efectora (TEM), positivas solo para CD127, se excluyen de los ganglios linfáticos y se localizan en los tejidos periféricos, formando la primera línea de defensa contra patógenos invasores [334]. Además de su localización, estas subpoblaciones se diferencian también en que las células TCM muestran una respuesta proliferativa al antígeno más robusta que las TEM [333], mientras que las TEM son efectoras frente al antígeno y han sido asociadas con protección frente a reinfecciones con malaria [335] y el virus de la inmunodeficiencia simia [336].

La infección crónica por el HCV presenta una clara disfunción de células T, las cuales presentan un característico fenotipo exhausto, muy probablemente debido al contacto constante con antígenos del HCV frente a los cuales son reactivos, que acaban aminorando la polifuncionalidad de estas células [337]. Los pacientes crónicos presentan células T con un deterioro funcional y un fenotipo inmaduro, caracterizado por una regulación a la baja del marcador CD127, siendo éste un marcador útil para pronosticar el resultado virológico de la infección por el HCV. Por tanto, la expresión de CD127 debe considerarse en cualquier enfoque terapéutico frente a esta enfermedad [94].



En el presente trabajo se han estudiado las células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV que expresan marcadores de memoria (CD127 y CD62L) 53 días tras la última inmunización con los diferentes candidatos vacunales y se han analizado los distintos fenotipos de las mismas. Todos los grupos de inmunización mostraron una mayoría de células con fenotipo TEM. El número de células con fenotipo TEM obtenido dependió de la magnitud de la respuesta, siendo el grupo DREP-e-HCV/MVA-HCV el que más células T CD8<sup>+</sup> generó y los grupos DREP-e-HCV/MVA-HCV y MVA-HCV/E2 los que más células T CD4<sup>+</sup> generaron. Actualmente no se sabe cuál de estas poblaciones (TEM o TCM) juega un papel más importante en la resolución de la infección por el HCV ni la que debería de estimular una vacuna, aunque es probable que se necesiten ambas para combinar una respuesta proliferativa y efectora [53].

A continuación, se presentan resumidas en la **Tabla 8** las características más destacables de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, con los diferentes protocolos de inmunización llevados a cabo utilizando varios candidatos vacunales frente a hepatitis C:

Inmunización	Respuesta inmune celular					Respuesta inmune humoral		
	T CD4 <sup>+</sup>	T CD8 <sup>+</sup>	Amp.	Poli.	Fen. de memo.	Ab.	React. Cruz.	Isot.
MVA-HCV MVA-HCV	-	++	++	++	TEM	+	-	-
MVA-HCV ΔC6L MVA-HCV ΔC6L	-	++	++	++	TEM	+	ne	ne
MVA-HCVmut MVA-HCVmut	-	++	++	++	TEM	+	ne	ne
DREP-HCV MVA-HCV	++	+++	+++	++	TEM	++	ne	ne
DREP-e-HCV MVA-HCV	+++	++++	+++	++	TEM	++	-	-
E2 ΔMPER E2 ΔMPER	+	-	-	++	TEM	++++	++	Th2
E2 CL ΔMPER E2 CL ΔMPER	+	-	-	++	TEM	+++	+	Th2
MVA-HCV E2 CL ΔMPER	+	+	+	++	TEM	+	-	-
MVA-HCV E2 ΔMPER	+	+	++	++	TEM	+++	+	Th2

**Tabla 8: Resumen de las respuestas inmunes celulares y humorales frente al HCV obtenidas en el presente trabajo con los diferentes candidatos vacunales generados.** Amp: amplitud de la respuesta inmune, Poli: polifuncionalidad de la respuesta inmune, Fen. de memo.: fenotipo de memoria, Ab: anticuerpos, React. Cruz.: Reactividad cruzada de los anticuerpos frente a otros genotipos del HCV, Isot.: Isotipos de anticuerpos que determinan la respuesta Th1 o Th2. Th2: respuesta humoral cuando se generan más anticuerpos de isotipo IgG1 que IgG2c. TEM: células T de memoria efectora. Ne: no estudiado, -: no presenta.

Al contrario de lo que ocurre con otras enfermedades, aún no se sabe si el sistema inmune es capaz de generar una respuesta inmune esterilizante frente al HCV, definida como aquella que es capaz de eliminar el virus completamente tras subsecuentes reinfecciones, ya que incluso aquellos que han sido infectados con el virus y resuelven la infección, o aquellos que han sido curados mediante la terapia antiviral, pueden volver a infectarse [20,22,84]. Por tanto, mientras no sepamos si una vacuna terapéutica puede ofrecer este tipo de inmunidad, probablemente sea más práctico desarrollar una vacuna profiláctica que aumente la probabilidad de aclaramiento espontáneo del HCV. Lecciones aprendidas de otras vacunas (por ejemplo, contra la hepatitis B [338] o la gripe [339,340]) que, en lugar de proporcionar inmunidad esterilizante, protegen contra infecciones persistentes y produce un debilitamiento del curso de las infecciones, pueden ser relevantes para el HCV.

Actualmente, sólo dos candidatos vacunales frente al HCV están mostrando resultados esperanzadores. Uno de ellos está dirigido a generar respuestas celulares, y consiste en el vector adenoviral ChAd3 que codifica las proteínas no estructurales del genotipo 1b del HCV, y que se ha probado en ensayos clínicos de fase I y II administrado junto a una vacuna basada en el MVA codificando los mismos antígenos, generando células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> funcionales y proliferativas frente a varios antígenos del HCV [141,281,341]. El otro candidato vacunal está diseñado para estimular la respuesta inmune humoral, y consiste en las proteínas recombinantes estructurales E1 y E2 (genotipo 1a) junto al adyuvante MF59C, que generó potentes niveles de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro y de reactividad cruzada frente a varios epítomos de E1 y E2 en humanos [144,145]. Notablemente, los candidatos vacunales generados y estudiados en el presente trabajo combinan tanto respuesta celular como humoral, y generan respuestas específicas frente a tanto las proteínas estructurales como las no estructurales, haciendo que sean candidatos prometedores que se podrían considerar en futuros ensayos clínicos. Además, un estudio de meta-análisis demostró que las vacunas que incluyen las proteínas estructurales son más efectivas [80].

Aunque las nuevas infecciones del HCV están siendo cada vez más controladas, y los antivirales suponen un gran triunfo en la medicina moderna, el acceso insuficiente a la terapia antiviral, la necesidad urgente de detectar los portadores del virus, la falta de inmunidad contra

la reinfección, el riesgo de cáncer de hígado incluso tras haber sido tratado con antivirales y la incertidumbre sobre la emergencia de cepas virales resistentes, suponen importantes desafíos que aún se deben superar. Por tanto, actualmente estamos lejos de considerar al HCV erradicado o controlado, y la financiación básica y aplicada del mismo aún debe estar contemplada por los gobiernos y las agencias financiadoras.

Un aspecto importante que cabe destacar es el hecho de que el HIV comparte importantes características con el HCV: ambos producen enfermedades crónicas frente a las cuales no hay vacuna, en ambos se desconocen los parámetros inmunes que confieren protección o control de la infección y presentan un alto escape mutacional. Además, comparten grupos de riesgo y prevalencia [342]. Como resultado, 2.6 millones de personas viven coinfectadas por ambos virus, teniendo que ser tratadas con antivirales para ambos, suponiendo un importante esfuerzo económico para agencias tanto públicas como privadas. De hecho, sólo el 13% de los pacientes coinfectados reciben tratamiento completo para ambas enfermedades y cada virus produce un fuerte impacto en el desarrollo de la enfermedad causada por el otro, ya que pacientes infectados con el HIV tienen más probabilidad de infección crónica por el HCV y desarrollan más rápidamente hepatocarcinoma, y la infección por el HCV es la primera causa de muerte no relacionada con la inmunodeficiencia causada por el HIV [343]. Por tanto, el desarrollo de vacunas combinadas frente a ambos virus y la inclusión de cohortes de pacientes coinfectados en los ensayos clínicos de los diferentes candidatos vacunales deben ser contemplados como estrategias para poder frenar la pandemia que suponen ambas enfermedades [344].

Dado que la inmunización DREP-e-HCV/MVA-HCV consigue potenciar respuestas celulares CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de mayor magnitud y de larga duración, y la inmunización con proteína E2 ΔMPER genera elevados anticuerpos, futuros estudios del presente trabajo incluirán inmunizaciones *prime/boost* en ratones con la combinación DREP-e-HCV/MVA-HCV/E2 ΔMPER, ya sea en forma de 3 inmunizaciones o uniendo MVA-HCV + E2 ΔMPER en una sola inmunización como *boost*, con el objetivo de mantener las altas y potentes respuestas de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> inducidas por DREP-e-HCV/MVA-HCV, pero estimular también la respuesta de anticuerpos al introducir E2 ΔMPER como componente proteico.

Finalmente, el detallado análisis inmunológico que hemos llevado a cabo en la presente tesis doctoral nos ha permitido demostrar las diferencias entre poblaciones de células T y B que se producen entre protocolos de inmunización *prime/boost* con vectores homólogos y heterólogos, estableciendo parámetros inmunológicos que consideramos mas óptimos y novedosos para conseguir una vacunación eficaz frente al HCV.

# 6. CONCLUSIONES

## 6. CONCLUSIONES

- 1) La delección del gen *C6L* del MVA en el candidato vacunal MVA-HCV  $\Delta C6L$  no supuso un aumento de la inmunogenicidad en ensayos *in vitro* e *in vivo* en comparación con MVA-HCV. Por tanto, **MVA-HCV  $\Delta C6L$  genera respuestas inmunes similares a MVA-HCV** en ratones inmunizados, mediadas principalmente por células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV.
- 2) La mutación S139A en la proteína NS3 del HCV, presente en el candidato vacunal MVA-HCVmut, indujo un aumento de IFN- $\beta$  *in vitro*. Sin embargo, no se observó aumento de la inmunogenicidad *in vivo* en comparación con MVA-HCV. Por tanto, **MVA-HCVmut genera respuestas inmunes similares a MVA-HCV** en ratones inmunizados, mediadas principalmente por células T CD8<sup>+</sup> específicas frente al HCV.
- 3) Se han generado nuevos candidatos vacunales frente al HCV, basados en replicones DREP y llamados DREP-HCV y DREP-e-HCV, que al combinarse con MVA-HCV mediante protocolos de inmunización **DREP/MVA-HCV** generan respuestas **inmunes celulares** específicas frente al HCV en ratones inmunizados. Estas respuestas son muy **potentes, amplias y polifuncionales**, y están mediadas principalmente por células T CD8<sup>+</sup>, aunque también se detectan células T CD4<sup>+</sup>. Las inmunizaciones DREP/MVA-HCV también generan mayores niveles de anticuerpos que MVA-HCV/MVA-HCV.
- 4) La presencia del potenciador de la traducción o *enhancer* en **DREP-e-HCV** supone un **aumento de la inmunogenicidad celular** pero no humoral en comparación con el constructo sin *enhancer* DREP-HCV, cuando se combinan con MVA-HCV en ratones inmunizados.
- 5) Se han generado nuevos candidatos vacunales frente al HCV, basados en proteínas recombinantes E2. Una de ellas, **E2  $\Delta$ MPER**, se presenta en forma de **agregados** de elevado peso molecular mientras que la otra, **E2 CL  $\Delta$ MPER**, forma **monómeros** de bajo peso molecular.
- 6) **Ambas proteínas E2** son reconocidas *in vitro* por **anticuerpos neutralizantes** de amplio espectro y por el receptor del **HCV CD81**. Sin embargo, **E2 CL  $\Delta$ MPER (monómeros) presenta mayor afinidad** por ambos que E2  $\Delta$ MPER (agregados).

- 7) Ambas proteínas E2 generan respuestas inmunes de células T CD4<sup>+</sup> específicas frente al HCV y elevados niveles de anticuerpos tras inmunizaciones E2/E2. Estos anticuerpos generados presentan una respuesta de tipo Th2, al haber más IgG1 que IgG2c o IgG3. **E2 ΔMPER (agregados) genera más anticuerpos que E2 CL ΔMPER (monómeros), teniendo además reactividad cruzada frente a otros genotipos del HCV.**
- 8) Los protocolos de inmunización **MVA-HCV/E2** generan respuestas inmunes de células **T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>** específicas frente a varias proteínas del HCV y, en el caso de **MVA-HCV/E2 ΔMPER**, altos niveles de **anticuerpos**.
- 9) Por tanto, la combinación **DREP-e-HCV/MVA-HCV** es la que genera **respuestas inmunes celulares de mayor magnitud y amplitud** específicas frente al HCV, y **MVA-HCV/E2 ΔMPER** presenta la **combinación más balanceada en respuesta celular/humoral de todos los protocolos y candidatos vacunales probados en el presente trabajo.**

# 7. BIBLIOGRAFÍA

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. HCV History & Facts [Internet]. [cited 2018 Oct 21]. Available from: <http://www.hepatitis-c-initiative.eu/index.php/resource-centre/2-uncategorised/35-hcv-history-facts>
2. Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW, et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet Lond Engl*. 1974;2:241–6.
3. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med*. 1975;292:767–70.
4. Lohmann V. Hepatitis C virus cell culture models: an encomium on basic research paving the road to therapy development. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2018;
5. Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis*. 2004;24 Suppl 2:3–8.
6. Bukh J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *J Hepatol*. 2016;65:S2–21.
7. Maugh TH. Where is the hepatitis C virus? *Science*. 1980;210:999–1000.
8. Cuthbert JA. Hepatitis C. *Am J Med Sci*. 1990;299:346–55.
9. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244:359–62.
10. Organizacion Mundial de la Salud, Programa Global de Hepatitis. Global hepatitis report, 2017 [Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 27]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>
11. Koutsoudakis G, Fornis X, Pérez-del-Pulgar S. Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol*. 2013;36:280–93.
12. Elberry MH, Darwish NHE, Mousa SA. Hepatitis C virus management: potential impact of nanotechnology. *Viol J*. 2017;14:88.
13. Jin F, Matthews GV, Grulich AE. Sexual transmission of hepatitis C virus among gay and bisexual men: a systematic review. *Sex Health*. 2017;14:28–41.
14. Rossi RM, Warshak CR. Prevalence of Maternal Hepatitis C Virus Infection in Ohio. *Obstet Gynecol*. 2018;132:708–16.
15. Bartenschlager R, Baumert TF, Bukh J, Houghton M, Lemon SM, Lindenbach BD, et al. Critical challenges and emerging opportunities in hepatitis C virus research in an era of potent antiviral therapy: Considerations for scientists and funding agencies. *Virus Res*. 2018;248:53–62.
16. Cashman SB, Marsden BD, Dustin LB. The Humoral Immune Response to HCV: Understanding is Key to Vaccine Development. *Front Immunol*. 2014;5:550.



17. Kamal SM. Acute hepatitis C: a systematic review. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:1283–97; quiz 1298.
18. Janiak M, Caraballo Cortes K, Demkow U, Radkowski M. Spontaneous Elimination of Hepatitis C Virus Infection. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1039:45–54.
19. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36:S35–46.
20. Torres-Cornejo A, Lauer GM. Hurdles to the Development of Effective HBV Immunotherapies and HCV Vaccines. *Pathog Immun*. 2017;2:102–25.
21. Guo X, Zhong J-Y, Li J-W. Hepatitis C Virus Infection and Vaccine Development. *J Clin Exp Hepatol*. 2018;8:195–204.
22. Abdel-Hakeem MS, Shoukry NH. Protective immunity against hepatitis C: many shades of gray. *Front Immunol*. 2014;5:274.
23. Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, et al. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA*. 2000;284:450–6.
24. Seaberg EC, Witt MD, Jacobson LP, Detels R, Rinaldo CR, Margolick JB, et al. Spontaneous Clearance of the Hepatitis C Virus Among Men Who Have Sex With Men. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2015;61:1381–8.
25. Kong F, Pan Y, Chi X, Wang X, Chen L, Lv J, et al. Factors associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus in Chinese population. *BioMed Res Int*. 2014;2014:527030.
26. Grebely J, Page K, Sacks-Davis R, van der Loeff MS, Rice TM, Bruneau J, 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.
27. Mao X-R, Zhang L-T, Chen H, Xiao P, Zhang Y-C. Correlation between the genetic variations in interleukin 28B and chronic hepatitis C virus genotypes in the Chinese population. *Mol Med Rep*. 2014;10:1037–45.
28. Rao H-Y, Sun D-G, Jiang D, Yang R-F, Guo F, Wang J-H, et al. IL28B genetic variants and gender are associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat*. 2012;19:173–81.
29. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O’Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009;461:798–801.
30. Hegazy D, Thurairajah P, Metzner M, Houldsworth A, Shaw S, Kaminski E, et al. Interleukin 12B gene polymorphism and apparent resistance to hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol*. 2008;152:538–41.
31. Youssef SS, Abd El Aal AM, Nasr AS, el Zanaty T, Seif SM. Interleukin-12B gene polymorphism frequencies in Egyptians and sex-related susceptibility to hepatitis C infection. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res*. 2013;33:415–9.

32. Ocal S, Selcuk H, Korkmaz M, Altun R, Yildirim AE, Akbas E. Effect of HLA on hepatitis C virus clearance and persistence in anti-HCV-positive end-stage renal disease patients. *Saudi J Gastroenterol Off J Saudi Gastroenterol Assoc.* 2014;20:175–81.
33. Tamori A, Kawada N. HLA class II associated with outcomes of hepatitis B and C infections. *World J Gastroenterol.* 2013;19:5395–401.
34. Chevaliez S, Pawlotsky J-M. HCV Genome and Life Cycle. In: Tan S-L, editor. *Hepat C Viruses Genomes Mol Biol.* Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006.
35. Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110:9505–10.
36. Guyader D. Hepatitis crónica viral C. *EMC - Tratado Med.* 2015;19:1–10.
37. Scheel TKH, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med.* 2013;19:837–49.
38. Moriishi K, Matsuura Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front Microbiol.* 2012;3:54.
39. Forton DM, Karayiannis P, Mahmud N, Taylor-Robinson SD, Thomas HC. Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol.* 2004;78:5170–83.
40. Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Inchauspé G, et al. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2003;187:1951–8.
41. Ramirez S, Perez-Del-Pulgar S, Carrion JA, Costa J, Gonzalez P, Massaguer A, et al. Hepatitis C virus compartmentalization and infection recurrence after liver transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2009;9:1591–601.
42. Dahari H, Feliu A, Garcia-Retortillo M, Fornis X, Neumann AU. Second hepatitis C replication compartment indicated by viral dynamics during liver transplantation. *J Hepatol.* 2005;42:491–8.
43. Fan H, Qiao L, Kang K-D, Fan J, Wei W, Luo G. Attachment and Postattachment Receptors Important for Hepatitis C Virus Infection and Cell-to-Cell Transmission. *J Virol.* 2017;91.
44. Douam F, Lavillette D, Cosset F-L. The mechanism of HCV entry into host cells. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;129:63–107.
45. Ujino S, Nishitsuji H, Hishiki T, Sugiyama K, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes VLDLR as a novel entry pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:188–93.
46. Schaefer EAK, Chung RT. HCV and host lipids: an intimate connection. *Semin Liver Dis.* 2013;33:358–68.
47. Holz L, Reherrmann B. T cell responses in hepatitis C virus infection: Historical overview and goals for future research. *Antiviral Res.* 2015;114:96–105.

48. Park S-H, Rehermann B. Immune Responses to HCV and Other Hepatitis Viruses. *Immunity*. 2014;40:13–24.
49. Li K, Lemon SM. Innate immune responses in hepatitis C virus infection. *Semin Immunopathol*. 2013;35:53–72.
50. Klenerman P, Fleming V, Barnes E. What Are the Prospects for Controlling Hepatitis C? *PLoS Med*. 2009;6.
51. Kong L, Jackson KN, Wilson IA, Law M. Capitalizing on knowledge of hepatitis C virus neutralizing epitopes for rational vaccine design. *Curr Opin Virol*. 2015;11:148–57.
52. Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet*. 2008;9:267–76.
53. Swadling L, Klenerman P, Barnes E. Ever closer to a prophylactic vaccine for HCV. *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13:1109–24.
54. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*. 1998;282:103–7.
55. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis*. 1995;15:41–63.
56. Bowen DG, Walker CM. The origin of quasispecies: cause or consequence of chronic hepatitis C viral infection? *J Hepatol*. 2005;42:408–17.
57. Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes. *Int J Mol Sci*. 2017;19.
58. Caraballo Cortés K, Zagordi O, Laskus T, Płoski R, Bukowska-Ośko I, Pawełczyk A, et al. Ultradeep pyrosequencing of hepatitis C virus hypervariable region 1 in quasispecies analysis. *BioMed Res Int*. 2013;2013:626083.
59. Sullivan DG, Bruden D, Deubner H, McArdle S, Chung M, Christensen C, et al. Hepatitis C virus dynamics during natural infection are associated with long-term histological outcome of chronic hepatitis C disease. *J Infect Dis*. 2007;196:239–48.
60. Allain JP, Dong Y, Vandamme AM, Moulton V, Salemi M. Evolutionary rate and genetic drift of hepatitis C virus are not correlated with the host immune response: studies of infected donor-recipient clusters. *J Virol*. 2000;74:2541–9.
61. Kaźmierczak J, Caraballo Cortes K, Bukowska-Ośko I, Radkowski M. Virus-Specific Cellular Response in Hepatitis C Virus Infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64:101–10.
62. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*. 1999;117:933–41.
63. Higashi Y, Kamikawaji N, Suko H, Ando M. Analysis of HLA alleles in Japanese patients with cirrhosis due to chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol*. 1996;11:241–6.

64. Daw MA, El-Bouzedi AA, Ahmed MO, Dau AA, Agnan MM, Drah AM. Geographic integration of hepatitis C virus: A global threat. *World J Virol.* 2016;5:170–82.
65. Fried MW. Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology.* 2002;36:s237–44.
66. Vermehren J, Park JS, Jacobson IM, Zeuzem S. Challenges and perspectives of direct antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2018;69:1178–87.
67. Pradat P, Virlogeux V, Trépo E, Pradat P, Virlogeux V, Trépo E. Epidemiology and Elimination of HCV-Related Liver Disease. *Viruses.* 2018;10:545.
68. Kozbial K, Moser S, Al-Zoairy R, Schwarzer R, Datz C, Stauber R, et al. Follow-up of sustained virological responders with hepatitis C and advanced liver disease after interferon/ribavirin-free treatment. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* 2018;38:1028–35.
69. Cheung MCM, Walker AJ, Hudson BE, Verma S, McLauchlan J, Mutimer DJ, et al. Outcomes after successful direct-acting antiviral therapy for patients with chronic hepatitis C and decompensated cirrhosis. *J Hepatol.* 2016;65:741–7.
70. Pascasio JM, Vinaixa C, Ferrer MT, Colmenero J, Rubin A, Castells L, et al. Clinical outcomes of patients undergoing antiviral therapy while awaiting liver transplantation. *J Hepatol.* 2017;67:1168–76.
71. WHO | Combating hepatitis B and C to reach elimination by 2030 [Internet]. [cited 2018 Sep 16]. Available from: <http://www.who.int/hepatitis/publications/hep-elimination-by-2030-brief/en/>
72. Buti M, Esteban R. Management of direct antiviral agent failures. *Clin Mol Hepatol.* 2016;22:432–8.
73. Aloia AL, Locarnini S, Beard MR. Antiviral resistance and direct-acting antiviral agents for HCV. *Antivir Ther.* 2012;17:1147–62.
74. Freeman ZT, Cox AL. Lessons from Nature: Understanding Immunity to HCV to Guide Vaccine Design. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005632.
75. Iyengar S, Tay-Teo K, Vogler S, Beyer P, Wiktor S, Joncheere K de, et al. Prices, Costs, and Affordability of New Medicines for Hepatitis C in 30 Countries: An Economic Analysis. *PLOS Med.* 2016;13:e1002032.
76. Midgard H, Weir A, Palmateer N, Lo Re V, Pineda JA, Macías J, et al. HCV epidemiology in high-risk groups and the risk of reinfection. *J Hepatol.* 2016;65:S33–45.
77. Dultz G, Graubard BI, Martin P, Welker M-W, Vermehren J, Zeuzem S, et al. Liver transplantation for chronic hepatitis C virus infection in the United States 2002–2014: An analysis of the UNOS/OPTN registry. *PLOS ONE.* 2017;12:e0186898.
78. Pawlowska M, Sobolewska-Pilarczyk M, Domagalski K. Hepatitis C virus infection in children in the era of direct-acting antiviral. *World J Gastroenterol.* 2018;24:2555–66.

79. Mehta SH, Cox A, Hoover DR, Wang X-H, Mao Q, Ray S, et al. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet Lond Engl.* 2002;359:1478–83.
80. Dahari H, Feinstone SM, Major ME. Meta-analysis of hepatitis C virus vaccine efficacy in chimpanzees indicates an importance for structural proteins. *Gastroenterology.* 2010;139:965–74.
81. Osburn WO, Fisher BE, Dowd KA, Urban G, Liu L, Ray SC, et al. Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology.* 2010;138:315–24.
82. Major ME, Mihalik K, Puig M, Rehmann B, Nascimbeni M, Rice CM, et al. Previously infected and recovered chimpanzees exhibit rapid responses that control hepatitis C virus replication upon rechallenge. *J Virol.* 2002;76:6586–95.
83. Bassett SE, Guerra B, Brasky K, Miskovsky E, Houghton M, Klimpel GR, et al. Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection. *Hepatology Baltim Md.* 2001;33:1479–87.
84. Grebely J, Prins M, Hellard M, Cox AL, Osburn WO, Lauer G, et al. Hepatitis C virus clearance, reinfection, and persistence, with insights from studies of injecting drug users: towards a vaccine. *Lancet Infect Dis.* 2012;12:408–14.
85. Abdel-Hakeem MS, Bédard N, Murphy D, Bruneau J, Shoukry NH. Signatures of protective memory immune responses during hepatitis C virus reinfection. *Gastroenterology.* 2014;147:870-881.e8.
86. Sacks-Davis R, Grebely J, Dore GJ, Osburn W, Cox AL, Rice TM, et al. Hepatitis C Virus Reinfection and Spontaneous Clearance of Reinfection-the InC3 Study. *J Infect Dis.* 2015;212:1407–19.
87. Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghayeb J, Reimann KA, et al. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 2003;197:1645–55.
88. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han J-H, Hanson HL, Ghayeb J, et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science.* 2003;302:659–62.
89. Day CL, Lauer GM, Robbins GK, McGovern B, Wurcel AG, Gandhi RT, et al. Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2002;76:12584–95.
90. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity.* 1999;10:439–49.
91. Zhang X, Dou J, Germann MW. Characterization of the cellular immune response in hepatitis C virus infection. *Med Res Rev.* 2009;29:843–66.
92. Urbani S, Amadei B, Fiscaro P, Tola D, Orlandini A, Sacchelli L, et al. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology Baltim Md.* 2006;44:126–39.

93. Wedemeyer H, He X-S, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, et al. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002;169:3447–58.
94. Golden-Mason L, Burton JR, Castelblanco N, Klarquist J, Benlloch S, Wang C, et al. Loss of IL-7 receptor alpha-chain (CD127) expression in acute HCV infection associated with viral persistence. *Hepatology Baltim Md*. 2006;44:1098–109.
95. Shin E-C, Park S-H, Nascimbeni M, Major M, Caggiari L, de Re V, et al. The Frequency of CD127+ Hepatitis C Virus (HCV)-Specific T Cells but Not the Expression of Exhaustion Markers Predicts the Outcome of Acute HCV Infection. *J Virol*. 2013;87:4772–7.
96. Post JJ, Pan Y, Freeman AJ, Harvey CE, White PA, Palladinetti P, et al. Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort. *J Infect Dis*. 2004;189:1846–55.
97. Abdelwahab SF, Zakaria Z, Sobhy M, Rewisha E, Mahmoud MA, Amer MA, et al. Hepatitis C virus-multispecific T-cell responses without viremia or seroconversion among Egyptian health care workers at high risk of infection. *Clin Vaccine Immunol CVI*. 2012;19:780–6.
98. Semmo N, Lucas M, Krashias G, Lauer G, Chapel H, Klenerman P. Maintenance of HCV-specific T-cell responses in antibody-deficient patients a decade after early therapy. *Blood*. 2006;107:4570–1.
99. Dowd KA, Netski DM, Wang X, Cox AL, Ray SC. Selection Pressure From Neutralizing Antibodies Drives Sequence Evolution During Acute Infection With Hepatitis C Virus. *Gastroenterology*. 2009;136:2377–86.
100. Pestka JM, Zeisel MB, Bläser E, Schürmann P, Bartosch B, Cosset F-L, 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.
101. Osburn WO, Snider AE, Wells BL, Latanich R, Bailey JR, Thomas DL, et al. Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses. *Hepatology*. 2014;59:2140–51.
102. Ball JK, Tarr AW, McKeating JA. The past, present and future of neutralizing antibodies for hepatitis C virus. *Antiviral Res*. 2014;105:100–11.
103. Gale M, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature*. 2005;436:939–45.
104. Cheent K, Khakoo SI. Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut*. 2011;60:268–78.
105. Golden-Mason L, Cox AL, Randall JA, Cheng L, Rosen HR. Increased natural killer cell cytotoxicity and NKp30 expression protects against hepatitis C virus infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. *Hepatology Baltim Md*. 2010;52:1581–9.
106. Stoll-Keller F, Barth H, Fafi-Kremer S, Zeisel MB, Baumert TF. Development of hepatitis C virus vaccines: challenges and progress. *Expert Rev Vaccines*. 2009;8:333–45.

107. Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) Committee on the Use of Chimpanzees in Biomedical and Behavioral Research. Chimpanzees in Biomedical and Behavioral Research: Assessing the Necessity. Altevogt BM, Pankevich DE, Shelton-Davenport MK, Kahn JP, editors. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
108. Vriend HJ, Van Veen MG, Prins M, Urbanus AT, Boot HJ, Op De Coul ELM. Hepatitis C virus prevalence in The Netherlands: migrants account for most infections. *Epidemiol Infect.* 2013;141:1310–7.
109. Zuure FR, Urbanus AT, Langendam MW, Helsper CW, van den Berg CH, Davidovich U, et al. Outcomes of hepatitis C screening programs targeted at risk groups hidden in the general population: a systematic review. *BMC Public Health.* 2014;14:66.
110. Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection [Internet]. *Nature.* 2005 [cited 2018 Oct 4]. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature04079>
111. Keck Z, Girard-Blanc C, Wang W, Lau P, Zuiani A, Rey FA, et al. Antibody Response to Hypervariable Region 1 Interferes with Broadly Neutralizing Antibodies to Hepatitis C Virus. *J Virol.* 2016;90:3112–22.
112. Keck Z-Y, Op De Beeck A, Hadlock KG, Xia J, Li T-K, Dubuisson J, et al. Hepatitis C virus E2 has three immunogenic domains containing conformational epitopes with distinct properties and biological functions. *J Virol.* 2004;78:9224–32.
113. Keck Z-Y, Li T-K, Xia J, Gal-Tanamy M, Olson O, Li SH, et al. Definition of a Conserved Immunodominant Domain on Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein by Neutralizing Human Monoclonal Antibodies. *J Virol.* 2008;82:6061–6.
114. Keck Z-Y, Li T-K, Xia J, Bartosch B, Cosset F-L, Dubuisson J, et al. Analysis of a highly flexible conformational immunogenic domain a in hepatitis C virus E2. *J Virol.* 2005;79:13199–208.
115. Keck Z, Angus AGN, Wang W, Lau P, Wang Y, Gatherer D, et al. Non-random escape pathways from a broadly neutralizing human monoclonal antibody map to a highly conserved region on the hepatitis C virus E2 glycoprotein encompassing amino acids 412-423. *PLoS Pathog.* 2014;10:e1004297.
116. Keck Z, Wang W, Wang Y, Lau P, Carlsen THR, Prentoe J, 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.
117. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G, et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89:3468–72.
118. von Hahn T, Yoon JC, Alter H, Rice CM, Rehermann B, Balfe P, et al. Hepatitis C Virus Continuously Escapes From Neutralizing Antibody and T-Cell Responses During Chronic Infection In Vivo. *Gastroenterology.* 2007;132:667–78.
119. Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, De Gioannis D, Strazzer A, et al. 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.* 1996;93:15394–9.

120. Kong L, Lee DE, Kadam RU, Liu T, Giang E, Nieuwsma T, et al. Structural flexibility at a major conserved antibody target on hepatitis C virus E2 antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:12768–73.
121. Khan AG, Whidby J, Miller MT, Scarborough H, Zatorski AV, Cygan A, et al. Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature*. 2014;509:381–4.
122. Kong L, Giang E, Nieuwsma T, Kadam RU, Cogburn KE, Hua Y, et al. Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein Core Structure. *Science*. 2013;342:1090–4.
123. McCaffrey K, Gouklani H, Boo I, Pountourios P, Drummer HE. The variable regions of hepatitis C virus glycoprotein E2 have an essential structural role in glycoprotein assembly and virion infectivity. *J Gen Virol*. 2011;92:112–21.
124. Wrensch F, Crouchet E, Ligat G, Zeisel MB, Keck Z-Y, Fong SKH, et al. Hepatitis C Virus (HCV)-Apolipoprotein Interactions and Immune Evasion and Their Impact on HCV Vaccine Design. *Front Immunol*. 2018;9:1436.
125. Whidby J, Mateu G, Scarborough H, Demeler B, Grakoui A, Marcotrigiano J. Blocking hepatitis C virus infection with recombinant form of envelope protein 2 ectodomain. *J Virol*. 2009;83:11078–89.
126. Brazzoli M, Helenius A, Fong SKH, Houghton M, Abrignani S, Merola M. Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells. *Virology*. 2005;332:438–53.
127. Cocquerel L, Kuo C-C, Dubuisson J, Levy S. CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers. *J Virol*. 2003;77:10677–83.
128. Michalak JP, Wychowski C, Choukhi A, Meunier JC, Ung S, Rice CM, et al. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol*. 1997;78 ( Pt 9):2299–306.
129. Patel J, Patel AH, McLauchlan J. The transmembrane domain of the hepatitis C virus E2 glycoprotein is required for correct folding of the E1 glycoprotein and native complex formation. *Virology*. 2001;279:58–68.
130. El Omari K, Iourin O, Kadlec J, Sutton G, Harlos K, Grimes JM, et al. Unexpected structure for the N-terminal domain of hepatitis C virus envelope glycoprotein E1. *Nat Commun*. 2014;5:4874.
131. Drummer HE, Boo I, Pountourios P. Mutagenesis of a conserved fusion peptide-like motif and membrane-proximal heptad-repeat region of hepatitis C virus glycoprotein E1. *J Gen Virol*. 2007;88:1144–8.
132. Lavillette D, Pécheur E-I, Donot P, Fresquet J, Molle J, Corbau R, et al. Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J Virol*. 2007;81:8752–65.



133. Li H-F, Huang C-H, Ai L-S, Chuang C-K, Chen SSL. Mutagenesis of the fusion peptide-like domain of hepatitis C virus E1 glycoprotein: involvement in cell fusion and virus entry. *J Biomed Sci.* 2009;16:89.
134. Keck Z-Y, Sung VMH, Perkins S, Rowe J, Paul S, Liang TJ, et al. Human Monoclonal Antibody to Hepatitis C Virus E1 Glycoprotein That Blocks Virus Attachment and Viral Infectivity. *J Virol.* 2004;78:7257–63.
135. Meunier J-C, Russell RS, Goossens V, Priem S, Walter H, Depla E, et al. Isolation and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the e1 glycoprotein of hepatitis C virus. *J Virol.* 2008;82:966–73.
136. Wahid A, Helle F, Descamps V, Duverlie G, Penin F, Dubuisson J. Disulfide Bonds in Hepatitis C Virus Glycoprotein E1 Control the Assembly and Entry Functions of E2 Glycoprotein. *J Virol.* 2013;87:1605–17.
137. Lavie M, Goffard A, Dubuisson J. HCV Glycoproteins: Assembly of a Functional E1–E2 Heterodimer. In: Tan S-L, editor. *Hepat C Viruses Genomes Mol Biol.* Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006.
138. Falson P, Bartosch B, Alsaleh K, Tews BA, Loquet A, Ciczora Y, et al. Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1 Forms Trimers at the Surface of the Virion. *J Virol.* 2015;89:10333–46.
139. Gastaminza P, Dryden KA, Boyd B, Wood MR, Law M, Yeager M, et al. Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J Virol.* 2010;84:10999–1009.
140. Merz A, Long G, Hiet M-S, Brügger B, Chlanda P, Andre P, et al. Biochemical and Morphological Properties of Hepatitis C Virus Particles and Determination of Their Lipidome. *J Biol Chem.* 2011;286:3018–32.
141. Swadling L, Capone S, Antrobus RD, Brown A, Richardson R, Newell EW, et al. A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory. *Sci Transl Med.* 2014;6:261ra153.
142. Swadling L, Halliday J, Kelly C, Brown A, Capone S, Ansari MA, et al. Highly-Immunogenic Virally-Vectored T-cell Vaccines Cannot Overcome Subversion of the T-cell Response by HCV during Chronic Infection. *Vaccines.* 2016;4.
143. Di Bisceglie AM, Janczweska-Kazek E, Habersetzer F, Mazur W, Stanciu C, Carreno V, et al. Efficacy of Immunotherapy with TG4040, Peg-interferon, and Ribavirin in A Phase 2 Study of Patients with Chronic HCV Infection. *Gastroenterology.* 2014;
144. Ray R, Meyer K, Banerjee A, Basu A, Coates S, Abrignani S, et al. Characterization of antibodies induced by vaccination with hepatitis c virus envelope glycoproteins. *J Infect Dis.* 2010;202:862–6.
145. Wong JAJ-X, Bhat R, Hockman D, Logan M, Chen C, Levin A, et al. Recombinant hepatitis C virus envelope glycoprotein vaccine elicits antibodies targeting multiple epitopes on the envelope glycoproteins associated with broad cross-neutralization. *J Virol.* 2014;88:14278–88.

146. Frey SE, Houghton M, Coates S, Abrignani S, Chien D, Rosa D, et al. Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine*. 2010;28:6367–73.
147. Colombatto P, Brunetto MR, Maina AM, Romagnoli V, Almasio P, Rumi MG, et al. HCV E1E2-MF59 vaccine in chronic hepatitis C patients treated with PEG-IFN $\alpha$ 2a and Ribavirin: a randomized controlled trial. *J Viral Hepat*. 2014;21:458–65.
148. Law JLM, Chen C, Wong J, Hockman D, Santer DM, Frey SE, et al. A hepatitis C virus (HCV) vaccine comprising envelope glycoproteins gpE1/gpE2 derived from a single isolate elicits broad cross-genotype neutralizing antibodies in humans. *PLoS One*. 2013;8:e59776.
149. Klade CS, Wedemeyer H, Berg T, Hinrichsen H, Cholewinska G, Zeuzem S, et al. Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with the peptide vaccine IC41. *Gastroenterology*. 2008;134:1385–95.
150. GlobeImmune Hepatitis C Therapeutic Vaccine, GI-5005, Doubles Viral Clearance and Increases RVR Rates in Phase 2 Clinical Trial | GlobeImmune [Internet]. [cited 2018 Dec 8]. Available from: <https://globeimmune.com/archived-news/globeimmune-hepatitis-c-therapeutic-vaccine-gi-5005-doubles-viral-clearance-and-increases-rvr-rates-in-phase-2-clinical-trial/>
151. Hughes AL, Irausquin S, Friedman R. The Evolutionary Biology of Poxviruses. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 2010;10:50.
152. McFadden G. Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3:201–13.
153. Mercer A, Schmidt A, Weber O, editors. *Poxviruses*. Birkhäuser Basel; 2007.
154. Esteban M, Flores L, Holowczak JA. Model for vaccinia virus DNA replication. *Virology*. 1977;83:467–73.
155. Goebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, Davis SW, Winslow JP, Paoletti E. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology*. 1990;179:247–66, 517–63.
156. Soloski MJ, Holowczak JA. Characterization of supercoiled nucleoprotein complexes released from detergent-treated vaccinia virions. *J Virol*. 1981;37:770–83.
157. Gubser C, Hué S, Kellam P, Smith GL. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol*. 2004;85:105–17.
158. Upton C, Slack S, Hunter AL, Ehlers A, Roper RL. Poxvirus Orthologous Clusters: toward Defining the Minimum Essential Poxvirus Genome. *J Virol*. 2003;77:7590–600.
159. Moss B. *Poxviridae: The Viruses and Their Replication*. Lippincott-Raven. 2007;
160. Cyrklaff M, Risco C, Fernández JJ, Jiménez MV, Estéban M, Baumeister W, et al. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:2772–7.
161. Smith GL, Vanderplasschen A, Law M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol*. 2002;83:2915–31.

162. Hollinshead M, Vanderplasschen A, Smith GL, Vaux DJ. Vaccinia virus intracellular mature virions contain only one lipid membrane. *J Virol.* 1999;73:1503–17.
163. Munyon W, Paoletti E, Grace JT. RNA polymerase activity in purified infectious vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1967;58:2280–7.
164. Moss B. Poxvirus cell entry: how many proteins does it take? *Viruses.* 2012;4:688–707.
165. Carter GC, Rodger G, Murphy BJ, Law M, Krauss O, Hollinshead M, et al. Vaccinia virus cores are transported on microtubules. *J Gen Virol.* 2003;84:2443–58.
166. Dales S. Replication of animal viruses as studied by electron microscopy. *Am J Med.* 1965;38:699–715.
167. Esteban M, Metz DH. Early virus protein synthesis in vaccinia virus-infected cells. *J Gen Virol.* 1973;19:201–6.
168. Assarsson E, Greenbaum JA, Sundström M, Schaffer L, Hammond JA, Pasquetto V, et al. Kinetic analysis of a complete poxvirus transcriptome reveals an immediate-early class of genes. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105:2140–5.
169. Yang Z, Bruno DP, Martens CA, Porcella SF, Moss B. Simultaneous high-resolution analysis of vaccinia virus and host cell transcriptomes by deep RNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:11513–8.
170. Keck JG, Baldick CJ, Moss B. Role of DNA replication in vaccinia virus gene expression: a naked template is required for transcription of three late trans-activator genes. *Cell.* 1990;61:801–9.
171. Vos JC, Stunnenberg HG. Derepression of a novel class of vaccinia virus genes upon DNA replication. *EMBO J.* 1988;7:3487–92.
172. Blasco R, Moss B. Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *J Virol.* 1991;65:5910–20.
173. Liu L, Cooper T, Howley PM, Hayball JD. From crescent to mature virion: vaccinia virus assembly and maturation. *Viruses.* 2014;6:3787–808.
174. Sánchez-Sampedro L, Perdiguero B, Mejías-Pérez E, García-Arriaza J, Di Pilato M, Esteban M. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses.* 2015;7:1726–803.
175. Volz A, Sutter G. Modified Vaccinia Virus Ankara: History, Value in Basic Research, and Current Perspectives for Vaccine Development. *Adv Virus Res.* 2017;97:187–243.
176. Mayr A, Stickl H, Müller HK, Danner K, Singer H. [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralblatt Für Bakteriol Parasitenkd Infekt Hyg Erste Abt Orig Reihe B Hyg Betriebshygiene Präy Med.* 1978;167:375–90.

177. Wyatt LS, Carroll MW, Czerny CP, Merchlinsky M, Sisler JR, Moss B. Marker rescue of the host range restriction defects of modified vaccinia virus Ankara. *Virology*. 1998;251:334–42.
178. Gómez C, Nájera JL, Krupa M, Perdiguero B, Esteban M. MVA and NYVAC as vaccines against emergent infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther*. 2011;11:189–217.
179. Antoine G, Scheiflinger F, Dorner F, Falkner FG. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*. 1998;244:365–96.
180. Gómez C, Perdiguero B, García-Arriaza J, Esteban M. Clinical applications of attenuated MVA poxvirus strain. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12:1395–416.
181. Hochstein-Mintzel V. [Oral and nasal immunization with Poxvirus vaccinia. I. Criteria for smallpox immunity and immunology of the conventional cutaneous reaction to vaccination]. *Zentralblatt Bakteriologie Parasitenkunde Infektionshygiene Erste Abteilung Originale Reihe B Hygiene Präventive Medizin*. 1972;156:1–14.
182. Smith, Moss. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene*. 1983;25:21–8.
183. Gómez C, Perdiguero B, Cepeda MV, Mingorance L, García-Arriaza J, Vandermeeren A, et al. High, broad, polyfunctional, and durable T cell immune responses induced in mice by a novel hepatitis C virus (HCV) vaccine candidate (MVA-HCV) based on modified vaccinia virus Ankara expressing the nearly full-length HCV genome. *J Virol*. 2013;87:7282–300.
184. García-Arriaza J, Esteban M. Enhancing poxvirus vectors vaccine immunogenicity. *Hum Vaccines Immunother*. 2014;10.
185. Diphtheria, Tetanus, and Pertussis Vaccine Recommendations | CDC [Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 29]. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/vpd/dtap-tdap-td/hcp/recommendations.html>
186. Woodland DL. Jump-starting the immune system: prime–boosting comes of age. *Trends Immunol*. 2004;25:98–104.
187. Lu S. Heterologous Prime-Boost Vaccination. *Curr Opin Immunol*. 2009;21:346–51.
188. Abaitua F, Rodríguez JR, Garzón A, Rodríguez D, Esteban M. Improving recombinant MVA immune responses: potentiation of the immune responses to HIV-1 with MVA and DNA vectors expressing Env and the cytokines IL-12 and IFN-gamma. *Virus Res*. 2006;116:11–20.
189. Chea LS, Amara RR. Immunogenicity and efficacy of DNA/MVA HIV vaccines in rhesus macaque models. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16:973–85.
190. Fournillier A, Frelin L, Jacquier E, Ahlén G, Brass A, Gerossier E, et al. A heterologous prime/boost vaccination strategy enhances the immunogenicity of therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *J Infect Dis*. 2013;208:1008–19.
191. Gómez CE, Nájera JL, Sánchez R, Jiménez V, Esteban M. Multimeric soluble CD40 ligand (sCD40L) efficiently enhances HIV specific cellular immune responses during DNA prime

- and boost with attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC expressing HIV antigens. *Vaccine*. 2009;27:3165–74.
192. McKay PF, Cope AV, Mann JFS, Joseph S, Esteban M, Tatoud R, et al. Glucopyranosyl lipid A adjuvant significantly enhances HIV specific T and B cell responses elicited by a DNA-MVA-protein vaccine regimen. *PLoS One*. 2014;9:e84707.
  193. García-Arriaza J, Nájera JL, Gómez CE, Tewabe N, Sorzano COS, Calandra T, et al. A candidate HIV/AIDS vaccine (MVA-B) lacking vaccinia virus gene C6L enhances memory HIV-1-specific T-cell responses. *PLoS One*. 2011;6:e24244.
  194. García-Arriaza J, Arnáez P, Gómez CE, Sorzano CÓS, Esteban M. Improving Adaptive and Memory Immune Responses of an HIV/AIDS Vaccine Candidate MVA-B by Deletion of Vaccinia Virus Genes (C6L and K7R) Blocking Interferon Signaling Pathways. *PLoS One*. 2013;8:e66894.
  195. Li X-D, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:17717–22.
  196. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*. 2005;437:1167–72.
  197. Ratnoglik SL, Jiang D-P, Aoki C, Sudarmono P, Shoji I, Deng L, et al. Induction of Cell-Mediated Immune Responses in Mice by DNA Vaccines That Express Hepatitis C Virus NS3 Mutants Lacking Serine Protease and NTPase/RNA Helicase Activities. *PLoS ONE*. 2014;9.
  198. Ljungberg K, Liljeström P. Self-replicating alphavirus RNA vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2015;14:177–94.
  199. Näslund TI, Kostic L, Nordström EK, Chen M, Liljeström P. Role of innate signalling pathways in the immunogenicity of alphaviral replicon-based vaccines. *Virology*. 2011;8:36.
  200. Nikonov A, Mölder T, Sikut R, Kiiver K, Männik A, Toots U, et al. RIG-I and MDA-5 Detection of Viral RNA-dependent RNA Polymerase Activity Restricts Positive-Strand RNA Virus Replication. *PLOS Pathog*. 2013;9:e1003610.
  201. Schulz O, Diebold SS, Chen M, Näslund TI, Nolte MA, Alexopoulou L, et al. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*. 2005;433:887–92.
  202. Forsell MNE, McInerney GM, Dosenovic P, Hidmark AS, Eriksson C, Liljeström P, et al. Increased human immunodeficiency virus type 1 Env expression and antibody induction using an enhanced alphavirus vector. *J Gen Virol*. 2007;88:2774–9.
  203. Sjöberg EM, Suomalainen M, Garoff H. A Significantly Improved Semliki Forest Virus Expression System Based on Translation Enhancer Segments from the Viral Capsid Gene. *Nat Biotechnol*. 1994;12:1127–31.
  204. Berglund P, Smerdou C, Fleeton MN, Tubulekas I, Liljeström P. Enhancing immune responses using suicidal DNA vaccines. *Nat Biotechnol*. 1998;16:562–5.

205. Knudsen ML, Mbewe-Mvula A, Rosario M, Johansson DX, Kakoulidou M, Bridgeman A, et al. Superior induction of T cell responses to conserved HIV-1 regions by electroporated alphavirus replicon DNA compared to that with conventional plasmid DNA vaccine. *J Virol.* 2012;86:4082–90.
206. Knudsen ML, Ljungberg K, Tatoud R, Weber J, Esteban M, Liljeström P. Alphavirus replicon DNA expressing HIV antigens is an excellent prime for boosting with recombinant modified vaccinia Ankara (MVA) or with HIV gp140 protein antigen. *PLoS One.* 2015;10:e0117042.
207. Nordström EKL, Forsell MNE, Barnfield C, Bonin E, Hanke T, Sundström M, et al. Enhanced immunogenicity using an alphavirus replicon DNA vaccine against human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol.* 2005;86:349–54.
208. Lundstrom K. Alphavirus-based vaccines. *Viruses.* 2014;6:2392–415.
209. Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
210. Di Pilato M, Mejías-Pérez E, Gómez CE, Perdiguero B, Sorzano COS, Esteban M. New vaccinia virus promoter as a potential candidate for future vaccines. *J Gen Virol.* 2013;94:2771–6.
211. Marín MQ, Pérez P, Gómez CE, Sorzano COS, Esteban M, García-Arriaza J. Removal of the C6 Vaccinia Virus Interferon- $\beta$  Inhibitor in the Hepatitis C Vaccine Candidate MVA-HCV Elicited in Mice High Immunogenicity in Spite of Reduced Host Gene Expression. *Viruses.* 2018;10.
212. Wang Y, Wang F, Wang R, Zhao P, Xia Q. 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*. *Sci Rep.* 2015;5:16273.
213. Sainsbury F, Benchabane M, Goulet M-C, Michaud D. Multimodal Protein Constructs for Herbivore Insect Control. *Toxins.* 2012;4:455–75.
214. Binley JM, Sanders RW, Clas B, Schuelke N, Master A, Guo Y, et al. A recombinant human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein complex stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits is an antigenic mimic of the trimeric virion-associated structure. *J Virol.* 2000;74:627–43.
215. King P, Goodbourn S. The beta-interferon promoter responds to priming through multiple independent regulatory elements. *J Biol Chem.* 1994;269:30609–15.
216. Merat SJ, Molenkamp R, Wagner K, Koekkoek SM, van de Berg D, Yasuda E, et al. Hepatitis C virus Broadly Neutralizing Monoclonal Antibodies Isolated 25 Years after Spontaneous Clearance. *PLoS ONE.* 2016;11.
217. Smyth GK, Speed T. Normalization of cDNA microarray data. *Methods San Diego Calif.* 2003;31:265–73.
218. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004;3:Article3.

219. de Taeye SW, Ozorowski G, Torrents de la Peña A, Guttman M, Julien J-P, van den Kerkhof TLGM, et al. Immunogenicity of Stabilized HIV-1 Envelope Trimers with Reduced Exposure of Non-neutralizing Epitopes. *Cell*. 2015;163:1702–15.
220. Cotter CA, Earl PL, Wyatt LS, Moss B. Preparation of Cell Cultures and Vaccinia Virus Stocks. *Curr Protoc Protein Sci*. 2017;89:5.12.1-5.12.18.
221. Joklik WK. The purification of four strains of poxvirus. *Virology*. 1962;18:9–18.
222. Esteban M. Defective vaccinia virus particles in interferon-treated infected cells. *Virology*. 1984;133:220–7.
223. Nájera JL, Gómez CE, García-Arriaza J, Sorzano CO, Esteban M. Insertion of vaccinia virus C7L host range gene into NYVAC-B genome potentiates immune responses against HIV-1 antigens. *PLoS One*. 2010;5:e11406.
224. García-Arriaza J, Nájera JL, Gómez CE, Sorzano COS, Esteban M. Immunogenic profiling in mice of a HIV/AIDS vaccine candidate (MVA-B) expressing four HIV-1 antigens and potentiation by specific gene deletions. *PLoS One*. 2010;5:e12395.
225. Unterholzner L, Sumner RP, Baran M, Ren H, Mansur DS, Bourke NM, et al. Vaccinia virus protein C6 is a virulence factor that binds TBK-1 adaptor proteins and inhibits activation of IRF3 and IRF7. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1002247.
226. Chen S, Wu Z, Wang M, Cheng A. Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae Non-Structural Proteins. *Viruses*. 2017;9.
227. Yang D-R, Zhu H-Z. Hepatitis C virus and antiviral innate immunity: Who wins at tug-of-war? *World J Gastroenterol WJG*. 2015;21:3786–800.
228. Morikawa K, Lange CM, Gouttenoire J, Meylan E, Brass V, Penin F, et al. Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J Viral Hepat*. 2011;18:305–15.
229. Kim JH, Lee S-R, Li L-H, Park H-J, Park J-H, Lee KY, et al. High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice. *PLOS ONE*. 2011;6:e18556.
230. Roques P, Ljungberg K, Kümmerer BM, Gosse L, Dereuddre-Bosquet N, Tchitchek N, et al. Attenuated and vectored vaccines protect nonhuman primates against Chikungunya virus. *JCI Insight*. 2017;2:e83527.
231. Hallengård D, Lum F-M, Kümmerer BM, Lulla A, Lulla V, García-Arriaza J, et al. Prime-boost immunization strategies against Chikungunya virus. *J Virol*. 2014;88:13333–43.
232. Knudsen ML, Ljungberg K, Kakoulidou M, Kostic L, Hallengård D, García-Arriaza J, et al. Kinetic and phenotypic analysis of CD8+ T cell responses after priming with alphavirus replicons and homologous or heterologous booster immunizations. *J Virol*. 2014;88:12438–51.
233. Öhlund P, García-Arriaza J, Zusinaite E, Szurgot I, Männik A, Kraus A, et al. DNA-launched RNA replicon vaccines induce potent anti-Ebolavirus immune responses that can be further improved by a recombinant MVA boost. *Sci Rep*. 2018;8:12459.

234. Marín MQ, Pérez P, Ljungberg K, Sorzano CÓS, Gómez CE, Liljeström P, et al. Potent Anti-Hepatitis C (HCV) T Cell Immune Responses Induced in Mice Vaccinated with DNA-launched RNA Replicons and MVA-HCV. *J Virol*. 2019;
235. Barry G, Fragkoudis R, Ferguson MC, Lulla A, Merits A, Kohl A, et al. Semliki forest virus-induced endoplasmic reticulum stress accelerates apoptotic death of mammalian cells. *J Virol*. 2010;84:7369–77.
236. Glasgow GM, McGee MM, Sheahan BJ, Atkins GJ. Death mechanisms in cultured cells infected by Semliki Forest virus. *J Gen Virol*. 1997;78 ( Pt 7):1559–63.
237. Li M-L, Stollar V. Alphaviruses and apoptosis. *Int Rev Immunol*. 2004;23:7–24.
238. Lee SB, Esteban M. The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology*. 1994;199:491–6.
239. Gil J, Alcamí J, Esteban M. Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB. *Mol Cell Biol*. 1999;19:4653–63.
240. Drummer HE. Challenges to the development of vaccines to hepatitis C virus that elicit neutralizing antibodies. *Front Microbiol*. 2014;5.
241. McCaffrey K, Boo I, Tewierek K, Edmunds ML, Pountourios P, Drummer HE. Role of Conserved Cysteine Residues in Hepatitis C Virus Glycoprotein E2 Folding and Function. *J Virol*. 2012;86:3961–74.
242. Klasse PJ, Depetris RS, Pejchal R, Julien J-P, Khayat R, Lee JH, et al. Influences on Trimerization and Aggregation of Soluble, Cleaved HIV-1 SOSIP Envelope Glycoprotein. *J Virol*. 2013;87:9873–85.
243. Albecka A, Montserret R, Krey T, Tarr AW, Diesis E, Ball JK, et al. Identification of New Functional Regions in Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2. *J Virol*. 2011;85:1777–92.
244. Drummer HE, Pountourios P. Hepatitis C virus glycoprotein E2 contains a membrane-proximal heptad repeat sequence that is essential for E1E2 glycoprotein heterodimerization and viral entry. *J Biol Chem*. 2004;279:30066–72.
245. Owsianka A, Tarr AW, Juttla VS, Lavillette D, Bartosch B, Cosset F-L, et al. Monoclonal Antibody AP33 Defines a Broadly Neutralizing Epitope on the Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein. *J Virol*. 2005;79:11095–104.
246. Keck Z-Y, Wang Y, Lau P, Lund G, Rangarajan S, Fauvelle C, et al. Affinity maturation of a broadly neutralizing human monoclonal antibody that prevents acute HCV infection. *Hepatology*. 2016;64:1922–33.
247. Keck Z, Xia J, Wang Y, Wang W, Krey T, Prentoe J, 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.
248. Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:801–11.



249. Kitadokoro K, Bordo D, Galli G, Petracca R, Falugi F, Abrignani S, et al. CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J*. 2001;20:12–8.
250. Hill A, Simmons B, Gotham D, Fortunak J. Rapid reductions in prices for generic sofosbuvir and daclatasvir to treat hepatitis C. 2016;2(1):28–31.
251. Shoukry NH. Hepatitis C Vaccines, Antibodies, and T Cells. *Front Immunol*. 2018;9:1480.
252. Man John Law L, Landi A, Magee WC, Lorne Tyrrell D, Houghton M. Progress towards a hepatitis C virus vaccine. *Emerg Microbes Infect*. 2013;2:e79.
253. 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.
254. Houghton M. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses. *Immunol Rev*. 2011;239:99–108.
255. Xue J, Zhu H, Chen Z. Therapeutic vaccines against hepatitis C virus. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 2014;22:120–9.
256. Pearlman BL, Traub N. Sustained Virologic Response to Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C Virus Infection: A Cure and So Much More. *Clin Infect Dis*. 2011;52:889–900.
257. Ip PP, Nijman HW, Wilschut J, Daemen T. Therapeutic vaccination against chronic hepatitis C virus infection. *Antiviral Res*. 2012;96:36–50.
258. Badr G, Bédard N, Abdel-Hakeem MS, Trautmann L, Willems B, Villeneuve J-P, et al. Early Interferon Therapy for Hepatitis C Virus Infection Rescues Polyfunctional, Long-Lived CD8+ Memory T Cells. *J Virol*. 2008;82:10017–31.
259. Huang M, Jiang J-D, Peng Z. Recent advances in the anti-HCV mechanisms of interferon. *Acta Pharm Sin B*. 2014;4:241–7.
260. Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol*. 2014;61:S14-25.
261. Heim MH. Interferons and hepatitis C virus. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13586.
262. Rodriguez-Torres M, Lawitz E, Kowdley KV, Nelson DR, Dejesus E, McHutchison JG, et al. Sofosbuvir (GS-7977) plus peginterferon/ribavirin in treatment-naïve patients with HCV genotype 1: a randomized, 28-day, dose-ranging trial. *J Hepatol*. 2013;58:663–8.
263. Dolatimehr F, Karimi-Sari H, Rezaee-Zavareh MS, Alavian SM, Behnava B, Gholami-Fesharaki M, et al. Combination of sofosbuvir, pegylated-interferon and ribavirin for treatment of hepatitis C virus genotype 1 infection: a systematic review and meta-analysis. *Daru J Fac Pharm Tehran Univ Med Sci*. 2017;25:11.
264. Foster GR, Pianko S, Brown A, Forton D, Nahass RG, George J, et al. Efficacy of sofosbuvir plus ribavirin with or without peginterferon-alfa in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection and treatment-experienced patients with cirrhosis and hepatitis C virus genotype 2 infection. *Gastroenterology*. 2015;149:1462–70.

265. Lawitz E, Poordad F, Brainard DM, Hyland RH, An D, Dvory-Sobol H, et al. Sofosbuvir with peginterferon-ribavirin for 12 weeks in previously treated patients with hepatitis C genotype 2 or 3 and cirrhosis. *Hepatology* Baltim Md. 2015;61:769–75.
266. Perdiguero B, Esteban M. The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res.* 2009;29:581–98.
267. Smith GL, Benfield CTO, Maluquer de Motes C, Mazzon M, Ember SWJ, Ferguson BJ, et al. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J Gen Virol.* 2013;94:2367–92.
268. Albarnaz JD, Torres AA, Smith GL. Modulating Vaccinia Virus Immunomodulators to Improve Immunological Memory. *Viruses.* 2018;10.
269. Stuart JH, Sumner RP, Lu Y, Snowden JS, Smith GL. Vaccinia Virus Protein C6 Inhibits Type I IFN Signalling in the Nucleus and Binds to the Transactivation Domain of STAT2. *PLoS Pathog.* 2016;12:e1005955.
270. Smith GL. Vaccinia Virus Protein C6: A Multifunctional Interferon Antagonist. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1052:1–7.
271. Sharma G, Raheja H, Das S. Hepatitis C virus: Enslavement of host factors. *IUBMB Life.* 2018;70:41–9.
272. Burke KP, Cox AL. Hepatitis C Virus Evasion of Adaptive Immune Responses- A Model for Viral Persistence. *Immunol Res.* 2010;47:216–27.
273. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Ikeda M, Lemon SM, et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science.* 2003;300:1145–8.
274. Gómez CE, Vandermeeren AM, García MA, Domingo-Gil E, Esteban M. Involvement of PKR and RNase L in translational control and induction of apoptosis after Hepatitis C polyprotein expression from a vaccinia virus recombinant. *Virology.* 2005;2:81.
275. Vandermeeren AM, Gómez CE, Patiño C, Domingo-Gil E, Guerra S, González JM, et al. Subcellular forms and biochemical events triggered in human cells by HCV polyprotein expression from a viral vector. *Virology.* 2008;5:102.
276. Duong FHT, Christen V, Lin S, Heim MH. Hepatitis C virus-induced up-regulation of protein phosphatase 2A inhibits histone modification and DNA damage repair. *Hepatology* Baltim Md. 2010;51:741–51.
277. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 2001;194:1395–406.
278. Ward S, Lauer G, Isba R, Walker B, Klenerman P. Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clin Exp Immunol.* 2002;128:195–203.
279. Verstrepen BE, Verschoor EJ, Fagrouch ZC, Mooij P, de Groot NG, Bontrop RE, et al. Strong vaccine-induced CD8 T-cell responses have cytolytic function in a chimpanzee clearing HCV infection. *PLoS One.* 2014;9:e95103.

280. Javadi F, Rahimi P, Modarressi MH, Bolhassani A, Ardestani MS, Sadat SM, et al. Evaluation of Truncated HCV-NS3 Protein for Potential Applications in Immunization and Diagnosis. *Clin Lab*. 2016;62:1271–8.
281. Barnes E, Folgori A, Capone S, Swadling L, Aston S, Kurioka A, et al. Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Sci Transl Med*. 2012;4:115ra1.
282. Kelly C, Swadling L, Capone S, Brown A, Richardson R, Halliday J, et al. Chronic hepatitis C viral infection subverts vaccine-induced T-cell immunity in humans. *Hepatology*. 2016;63:1455–70.
283. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*. 1999;285:107–10.
284. Kmiecik D. [The mechanisms of hepatitis C virus resistance to interferon]. *Postepy Biochem*. 2005;51:22–7.
285. Taguchi T, Nagano-Fujii M, Akutsu M, Kadoya H, Ohgimoto S, Ishido S, et al. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. *J Gen Virol*. 2004;85:959–69.
286. Bode JG, Ludwig S, Ehrhardt C, Albrecht U, Erhardt A, Schaper F, et al. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2003;17:488–90.
287. Melén K, Fagerlund R, Nyqvist M, Keskinen P, Julkunen I. Expression of hepatitis C virus core protein inhibits interferon-induced nuclear import of STATs. *J Med Virol*. 2004;73:536–47.
288. de Lucas S, Bartolome J, Carreno V. Hepatitis C virus core protein down-regulates transcription of interferon-induced antiviral genes. *J Infect Dis*. 2005;191:93–9.
289. Kaukinen P, Sillanpää M, Kotenko S, Lin R, Hiscott J, Melén K, et al. Hepatitis C virus NS2 and NS3/4A proteins are potent inhibitors of host cell cytokine/chemokine gene expression. *Virology*. 2006;3:66.
290. Ding Q, Cao X, Lu J, Huang B, Liu Y-J, Kato N, et al. Hepatitis C virus NS4B blocks the interaction of STING and TBK1 to evade host innate immunity. *J Hepatology*. 2013;59:52–8.
291. Boukhebbaz H, Bellon N, Limacher JM, Inchauspé G. Therapeutic vaccination to treat chronic infectious diseases: current clinical developments using MVA-based vaccines. *Hum Vaccines Immunother*. 2012;8:1746–57.
292. Draper SJ, Cottingham MG, Gilbert SC. Utilizing poxviral vectored vaccines for antibody induction-progress and prospects. *Vaccine*. 2013;31:4223–30.
293. Gilbert SC. Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines. *Vaccine*. 2013;31:4241–6.

294. Roohvand F, Kossari N. Advances in hepatitis C virus vaccines, part two: advances in hepatitis C virus vaccine formulations and modalities. *Expert Opin Ther Pat.* 2012;22:391–415.
295. Lee J, Arun Kumar S, Jhan YY, Bishop CJ. Engineering DNA vaccines against infectious diseases. *Acta Biomater.* 2018;
296. Smooker PM, Rainczuk A, Kennedy N, Spithill TW. DNA vaccines and their application against parasites--promise, limitations and potential solutions. *Biotechnol Annu Rev.* 2004;10:189–236.
297. Khan KH. DNA vaccines: roles against diseases. *Germs.* 2013;3:26–35.
298. Riezebos-Brilman A, Mare A de, Bungener L, Huckriede A, Wilschut J, Daemen T. Recombinant alphaviruses as vectors for anti-tumour and anti-microbial immunotherapy. *J Clin Virol.* 2006;35:233–43.
299. Berglund P, Tubulekas I, Liljeström P. Alphaviruses as vectors for gene delivery. *Trends Biotechnol.* 1996;14:130–4.
300. Yost SA, Whidby J, Khan AG, Wang Y, Marcotrigiano J. Overcoming Challenges of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein Production in Mammalian Cells. In: Law M, editor. *Hepat C Virus Protoc.* New York, NY: Springer New York; 2019. p. 305–16.
301. Drummer HE, Wilson KA, Pountourios P. Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81. *J Virol.* 2002;76:11143–7.
302. Fraser J, Boo I, Pountourios P, Drummer HE. Hepatitis C virus (HCV) envelope glycoproteins E1 and E2 contain reduced cysteine residues essential for virus entry. *J Biol Chem.* 2011;286:31984–92.
303. Neumann-Haefelin C, Thimme R. Adaptive immune responses in hepatitis C virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;369:243–62.
304. Bourgeois C, Tanchot C. Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. *Eur J Immunol.* 2003;33:3225–31.
305. Klenerman P, Thimme R. T cell responses in hepatitis C: the good, the bad and the unconventional. *Gut.* 2012;61:1226–34.
306. Bowen DG, Walker CM. Mutational escape from CD8+ T cell immunity: HCV evolution, from chimpanzees to man. *J Exp Med.* 2005;201:1709–14.
307. Schulze Zur Wiesch J, Ciuffreda D, Lewis-Ximenez L, Kasprovicz V, Nolan BE, Streeck H, et al. Broadly directed virus-specific CD4+ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *J Exp Med.* 2012;209:61–75.
308. Semmo N, Klenerman P. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007;13:4831–8.

309. Meyer-Olson D, Shoukry NH, Brady KW, Kim H, Olson DP, Hartman K, et al. Limited T cell receptor diversity of HCV-specific T cell responses is associated with CTL escape. *J Exp Med.* 2004;200:307–19.
310. Lauer GM, Barnes E, Lucas M, Timm J, Ouchi K, Kim AY, et al. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 2004;127:924–36.
311. Harari A, Dutoit V, Cellerai C, Bart P-A, Du Pasquier RA, Pantaleo G. Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev.* 2006;211:236–54.
312. Jo J, Aichele U, Kersting N, Klein R, Aichele P, Bisse E, et al. Analysis of CD8+ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. *Gastroenterology.* 2009;136:1391–401.
313. Semmo N, Day CL, Ward SM, Lucas M, Harcourt G, Loughry A, et al. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology Baltim Md.* 2005;41:1019–28.
314. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:15661–8.
315. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med.* 2000;191:1499–512.
316. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods.* 2004;294:15–22.
317. Abdelwahab KS, Ahmed Said ZN. Status of hepatitis C virus vaccination: Recent update. *World J Gastroenterol.* 2016;22:862–73.
318. Drummer HE. Editorial on Broadly neutralizing antibodies abrogate established hepatitis C virus infection published in *Science Translational Medicine* on 17th September 2014. *Ann Transl Med.* 2015;3.
319. Brimacombe CL, Grove J, Meredith LW, Hu K, Syder AJ, Flores MV, et al. Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol.* 2011;85:596–605.
320. Luo K, Li S, Jiang L, Zuo T, Qing J, Shi X, et al. Combinatorial library-based profiling of the antibody response against hepatitis C virus in humans. *J Gen Virol.* 2015;96:52–63.
321. Wahid A, Dubuisson J. Virus-neutralizing antibodies to hepatitis C virus. *J Viral Hepat.* 2013;20:369–76.
322. Bachmann MF, Rohrer UH, Kündig TM, Bürki K, Hengartner H, Zinkernagel RM. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science.* 1993;262:1448–51.
323. Wang W, Singh SK, Li N, Toler MR, King KR, Nema S. Immunogenicity of protein aggregates--concerns and realities. *Int J Pharm.* 2012;431:1–11.

324. Vietheer PT, Boo I, Gu J, McCaffrey K, Edwards S, Owczarek C, et al. The core domain of hepatitis C virus glycoprotein E2 generates potent cross-neutralizing antibodies in guinea pigs. *Hepatology*. 2017;65:1117–31.
325. Denis J, Majeau N, Acosta-Ramirez E, Savard C, Bedard M-C, Simard S, et al. Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: Evidence for the critical function of multimerization. *Virology*. 2007;363:59–68.
326. Wijesundara DK, Gummow J, Li Y, Yu W, Quah BJ, Ranasinghe C, et al. Induction of Genotype Cross-Reactive, Hepatitis C Virus-Specific, Cell-Mediated Immunity in DNA-Vaccinated Mice. *J Virol*. 2018;92:e02133-17.
327. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol*. 2016;22:7824.
328. Harty JT, Badovinac VP. Influence of effector molecules on the CD8+ T cell response to infection. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:360–5.
329. Williams MA, Bevan MJ. Immunology: Exhausted T cells perk up. *Nature*. 2006;439:669–70.
330. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Vaccines: Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:251–62.
331. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol*. 2003;4:1191–8.
332. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401:708–12.
333. Wherry EJ, Teichgräber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol*. 2003;4:225–34.
334. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrançois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*. 2001;291:2413–7.
335. Reyes-Sandoval A, Wyllie DH, Bauza K, Milicic A, Forbes EK, Rollier CS, et al. CD8+ T effector memory cells protect against liver-stage malaria. *J Immunol*. 2011;187:1347–57.
336. Hansen SG, Vieville C, Whizin N, Coyne-Johnson L, Siess DC, Drummond DD, et al. Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat Med*. 2009;15:293–9.
337. Luxenburger H, Neumann-Haefelin C, Thimme R, Boettler T. HCV-Specific T Cell Responses During and After Chronic HCV Infection. *Viruses*. 2018;10:645.

338. Werner JM, Abdalla A, Gara N, Ghany MG, Rehermann B. The hepatitis B vaccine protects re-exposed health care workers, but does not provide sterilizing immunity. *Gastroenterology*. 2013;145:1026–34.
339. Dutta A, Huang C-T, Lin C-Y, Chen T-C, Lin Y-C, Chang C-S, et al. Sterilizing immunity to influenza virus infection requires local antigen-specific T cell response in the lungs. *Sci Rep*. 2016;6:32973.
340. Chiu C. Seasonal influenza vaccines and hurdles to mutual protection. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:S113–9.
341. Kelly C, Swadling L, Brown A, Capone S, Folgori A, Salio M, et al. Cross-reactivity of hepatitis C virus specific vaccine-induced T cells at immunodominant epitopes. *Eur J Immunol*. 2015;45:309–16.
342. Hartnell F, Brown A, Capone S, Kopycinski J, Bliss C, Makvandi-Nejad S, et al. A Novel Vaccine Strategy Employing Serologically Different Chimpanzee Adenoviral Vectors for the Prevention of HIV-1 and HCV Coinfection. *Front Immunol*. 2018;9:3175.
343. Mandorfer M, Schwabl P, Steiner S, Reiberger T, Peck-Radosavljevic M. Advances in the management of HIV/HCV coinfection. *Hepatol Int*. 2016;10:424–35.
344. Lambotin M, Barth H, Moog C, Habersetzer F, Baumert TF, Stoll-Keller F, et al. Challenges for HCV vaccine development in HIV-HCV coinfection. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11:791–804.

# 8. ANEXOS