



**Título: Obtención y evaluación de poxvirus recombinantes para
antígenos estructurales del virus de la hepatitis C (VHC) como
inmunógenos y herramientas analíticas**

Autora: Liz Alvarez-Lajonchere Ponce de León

Tutor: Dr. Santiago Dueñas Carrera

**Trabajo en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias
Biológicas**

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

La Habana

2008

Tabla de contenido

Glosario	ii
1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	6
2.1 El virus de la hepatitis C. Características generales.....	6
2.1.1 Características del virión.....	6
2.1.2 Organización molecular del virus de la hepatitis C y sus proteínas.....	6
2.1.3 Ciclo viral.....	11
2.2 Historia natural de la infección y Patogénesis	12
2.3 Respuesta inmune	15
2.3.1 Respuesta inmune innata.....	15
2.3.2 Respuesta de anticuerpos	16
2.3.3 Respuesta celular.....	17
2.4 Heterogeneidad y estrategias de evasión viral	21
2.5 Terapias.....	22
2.6 Modelos de replicación <i>in vitro</i> del virus de la hepatitis C.....	23
2.7 Modelos animales para el virus de la hepatitis C.....	24
2.8 Uso de virus vaccinia recombinantes en estudios de protección	25
2.9 Estrategias para el desarrollo de vacunas contra el virus de la hepatitis C.....	28
2.9.1 Vacunas de subunidades basadas en proteínas virales, péptidos o partículas similares a virus	28
2.9.2 Uso de vectores virales para la inmunización.....	30
2.10 Poxvirus	32
2.10.1 Morfología general.....	32
2.10.2 Genoma	32
2.10.3 Ciclo de replicación.....	32
2.10.4 Ventajas y desventajas del uso de los poxvirus como vectores vivos.....	33
2.10.5 Avipoxvirus.....	34
3. Materiales y Métodos.....	36
3.1 Enzimas, reactivos y marcadores de peso molecular	36
3.2 Oligonucleótidos	36
3.3 Proteínas recombinantes.....	37
3.4 Plasmidios	37
3.5 Cepas de bacterias y células de organismos superiores empleadas	38
3.6 Obtención de cultivos primarios de fibroblastos de embriones de pollo	38
3.7 Medios de cultivo para células de organismos superiores	39
3.8 Anticuerpo monoclonal y sueros policlonales	39
3.9 Virus.....	39
3.10 Procesamiento de los sueros	40
3.10.1 Adsorción de anticuerpos anti-FP9 de sueros humanos.....	40
3.10.2 Obtención de sueros de ratón y monos	40
3.11 Métodos de Biología Molecular.....	41
3.11.1 Técnicas generales de Biología Molecular	41
3.11.2 Purificación de plasmidio.....	41
3.11.3 Secuenciación de ADN	41

3.12 Obtención de virus de viruela aviar y virus vaccinia recombinantes para antígenos del virus de la hepatitis C.....	41
3.12.1 Transfección usando lipofectamina	41
3.12.2 Pases de selección de los recombinantes	42
3.12.3 Titulación de virus vaccinia y virus de viruela aviar	43
3.13 Obtención de muestras para la reacción en cadena de la polimerasa	43
3.14 Reacción en cadena de la polimerasa.....	44
3.15 Purificación de los virus para su uso en esquemas de inmunización.....	44
3.16 Replicación <i>in vitro</i> de los virus vaccinia recombinantes.....	44
3.17 Modelos Animales	45
3.17.1 Reto con virus vaccinia.....	45
3.17.2 Estudios en ratones	46
3.17.2.1 Replicación <i>in vivo</i> de los virus vaccinia recombinantes para antígenos del virus de la hepatitis C.....	46
3.17.2.2 Uso de los virus vaccinia recombinantes para antígenos del virus de la hepatitis C en modelos de reto en ratones.....	46
3.17.2.3 Inmunogenicidad del virus de viruela aviar recombinante para antígenos de la región estructural del virus de la hepatitis C en ratones	47
3.17.2.4 Estrategias de sensibilización/recuerdo empleando el virus de viruela aviar recombinante para antígenos de la región estructural del virus de la hepatitis C	47
3.17.3 Evaluación de la inmunogenicidad del virus de viruela aviar recombinante para antígenos de la región estructural del virus de la hepatitis C en monos verdes.....	48
3.18 Métodos Analíticos	48
3.18.1 Expresión de proteínas recombinantes en células infectadas con virus vaccinia o virus de viruela aviar.....	48
3.18.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	49
3.18.3 Inmunodetección por <i>Western blotting</i> de proteínas expresadas a partir de virus vaccinia recombinantes.....	49
3.18.4 Inmunodetección por <i>Western blotting</i> de proteínas expresadas a partir del virus de viruela aviar recombinante para antígenos estructurales del virus de la hepatitis C....	50
3.18.5 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida contra las proteínas recombinantes de la región estructural del virus de la hepatitis C.....	50
3.18.6 Obtención de células de bazo de ratones y células mononucleares de sangre periférica de monos.....	51
3.18.7 Ensayo de proliferación linfocitaria.....	51
3.18.8 Ensayo de ELISPOT de IFN- γ	52
3.19 Cuantificación de la replicación <i>in vivo</i> de los virus vaccinia	53
3.19.1 Procesamiento de ovarios de ratones infectados con virus vaccinia.....	53
3.19.2 Titulación de virus vaccinia a partir de sangre periférica de monos verdes	54
3.19.3 Medición de las lesiones en el sitio de inoculación con el virus vaccinia recombinante para la región estructural del virus de la hepatitis C en monos verdes	54
3.20 Consideraciones de Bioseguridad	54
3.21 Métodos estadísticos	54
4. Resultados	55

4.1 Generación y caracterización de virus vaccinia recombinantes para antígenos estructurales del virus de la hepatitis C de genotipo 1b.....	55
4.1.1 Obtención de plasmidios codificantes para antígenos estructurales del virus de la hepatitis C para la inserción en el genoma de virus vaccinia.....	55
4.1.2 Obtención de virus vaccinia recombinantes para las proteínas estructurales del virus de la hepatitis C.....	58
4.1.3 Replicación <i>in vitro</i> de los virus vaccinia recombinantes vvRE y vvCore.....	60
4.1.4 Estudio de la capacidad replicativa de los virus vaccinia recombinantes para los antígenos estructurales del VHC en ratones no inmunizados.....	60
4.1.5 Estudio de la capacidad replicativa de los virus vaccinia recombinantes para los antígenos estructurales del VHC en ratones previamente vacunados con diferentes inmunógenos.....	61
4.2 Generación de un virus de viruela aviar recombinante para una variante de la proteína de la cápsida y la E1 del virus de la hepatitis C y evaluación de su inmunogenicidad en modelos animales.....	65
4.2.1 Obtención del plasmidio codificante para una variante poliproteica cápsida-E1 para la inserción en virus de viruela aviar.....	65
4.2.2 Obtención de virus de viruela aviar recombinante para la proteína de la cápsida y la E1 del virus de la hepatitis C.....	66
4.2.3 Estudios de inmunogenicidad del virus de viruela aviar recombinante para la proteína de la cápsida y la E1 del virus de la hepatitis C en ratones.....	69
4.2.4 Evaluación de la efectividad de diferentes estrategias de sensibilización/recuerdo con el virus de viruela aviar recombinante FPCoE1 y la preparación pIDKE2+Co.120 en ratones BALB/c.....	71
4.2.5 Evaluación de la inmunogenicidad del virus de viruela aviar recombinante FPCoE1 en monos verdes.....	74
5. Discusión.....	77
6. Conclusiones.....	88
7. Recomendaciones.....	89
8. Autbibliografía.....	90
8.1 Relacionada con el documento de tesis.....	90
8.2 No relacionada con el documento de tesis.....	91
9. Referencias.....	93
10. ANEXOS.....	115
Anexo 1.....	115
Anexo 2.....	117
Anexo 3.....	121

Glosario

- aa: Aminoácidos
- Ac: anticuerpo
- AcM: anticuerpo monoclonal
- Acs: anticuerpos
- ADN: Ácido desoxiribonucleico
- ADNc: ADN complementario
- AEC: Amino Etil Carbazol
- Ag: Antígeno
- Ags: Antígenos
- ANOVA: Método de análisis de varianza de clasificación simple
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- CENPALAB: Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio
- CFP: Células formadoras de puntos
- CIGB: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
- cpm: conteos por minuto
- DC: del inglés, “Dendritic cell”, célula dendrítica
- DMEM: del inglés, “Dulbecco’s Modified Eagle Médium”, Medio Eagle modificado por Dulbecco
- dNTPs: Mezcla que contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- EDTA: Etilen glicol bis aminoetil eter N, N, N, N ácido tetra acético
- ELISPOT: del inglés “enzyme-linked-immunospots”, ensayo inmunoenzimático de detección de puntos
- FEP: Fibroblastos de embriones de pollo
- HLA: del inglés, “histocompatibility leukocyte antigens”, antígenos leucocitarios de histocompatibilidad
- i.m: Intramuscular
- i.p: Intraperitoneal

- IE: Índice de Estimulación
- IFN: Interferón
- Ig: Inmunoglobulina
- IL: Interleucina
- IRES: del inglés, “Internal ribosome entry site”, sitio interno de entrada al ribosoma
- kb: kilobase
- kDa: Kilodaltons
- LTC: Linfocitos T citotóxicos
- MHC: del inglés, “Major Histocompatibility Complex”, Complejo Principal de Histocompatibilidad
- MOI: del inglés, “multiplicity of infection”, multiplicidad de infección
- MVA: del inglés, “Modified virus Ankara”, virus Ankara modificado
- MXH: selección empleando ácido micofenólico, Xantina e Hipoxantina
- NK: del inglés, “Natural Killer”, asesinas naturales
- nt: nucleótidos
- ORF: del inglés, “Open reading frame”, marco abierto de lectura
- pb: Pares de bases nitrogenadas
- RCP: Reacción en cadena de la polimerasa
- RE: Retículo endoplasmático
- RHV-I: Región Hipervariable I
- RHV-II: Región Hipervariable II
- RPMI 1640: del inglés “Roswell Park Memorial Institute medium 1640”
- SDS: del inglés, “Sodium Duodecil sulphate”, duodecil sulfato de sodio
- SFB: Suero fetal bovino
- SSTF: Solución salina tamponada con fosfato
- SSTFT: SSTF con Tween 0,05% (v/v)
- Th: del inglés, “T helper”, T auxiliaadoras
- TK: del inglés, “Thymidine Kinase”, Timidina Quinasa
- TNF: del inglés, “Tumor Necrosis Factor”, Factor de Necrosis Tumoral
- ufp: unidades formadoras de placas
- VHB: Virus de la Hepatitis B

Poxvirus recombinantes para antígenos del VHC

- VHC: Virus de la hepatitis C
- VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana
- VLP: del inglés, “virus like particles”, partículas semejantes a virus
- VPH: Virus de Papiloma Humano
- VV: virus vaccinia
- VVA: virus de viruela aviar
- WR: Western Reserve, cepa salvaje de virus vaccinia.

1. Introducción

De acuerdo a estimados recientes, en el ámbito mundial existen más de 170 millones de personas infectadas de forma crónica por el virus de la hepatitis C (VHC). En los individuos crónicamente infectados es frecuente la aparición de formas severas de la enfermedad hepática como la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (Prince *y cols.* 2001). En Cuba, se ha informado que al menos el 0,8% de la población tiene anticuerpos contra el VHC (Arus *y cols.* 1998). Hasta el momento no existe una vacuna contra el VHC disponible en el mercado y la terapia es efectiva en menos del 50% de los pacientes tratados, para las mejores alternativas de tratamiento con interferón α combinado con otros antivirales (Chevaliez *y cols.* 2006). La vía principal de transmisión del VHC es la parenteral (Alter, 2007). Las fuentes de contagio fundamentales son la reutilización de jeringuillas y agujas sin una adecuada esterilización, así como el contacto con sangre contaminada y sus derivados (Prince *y cols.* 2001).

Las dificultades para replicar el VHC *in vitro* y la carencia de un modelo animal adecuado, a excepción del chimpancé, han limitado las investigaciones sobre los antígenos virales y la respuesta inmune dirigida contra ellos. Por tanto, reviste vital importancia la implementación de sistemas alternativos en modelos animales más asequibles. De hecho, no se han establecido completamente los parámetros inmunológicos que correlacionan con la protección frente a la infección por el VHC. Los estudios en individuos que resuelven de forma espontánea la infección por el VHC sugieren que el desarrollo temprano de una respuesta inmune potente, sobre todo de naturaleza celular, de larga duración, y dirigida contra varios de los antígenos virales, brinda un pronóstico favorable para eliminar la infección (Pape *y cols.* 1999; Takaki *y cols.* 2000).

La búsqueda de una vacuna eficaz contra la infección por el VHC ha constituido una de las mayores aspiraciones desde que se identificó su agente etiológico en 1989 hasta la actualidad (Choo *y cols.* 1989), pero ha resultado una tarea compleja. El VHC es altamente heterogéneo y parece desarrollar una complicada interacción con el hospedero y en particular con el sistema inmune, que le permite persistir en el organismo infectado. Todas las estrategias de inmunización han sido abordadas para el desarrollo de candidatos vacunales efectivos contra este patógeno, incluyendo las combinaciones basadas en esquemas de sensibilización-recuerdo (Inchauspe *y cols.* 2003; Duenas-Carrera, 2004). Los estudios se han concentrado fundamentalmente en la fase pre-clínica, aunque se han desarrollado también algunos ensayos

clínicos Fase I-II (Nevens *y cols.* 2003; Firbas *y cols.* 2006). Los resultados preliminares evidencian la capacidad de los candidatos vacunales para inducir una respuesta inmune específica contra los antígenos del VHC, tanto en individuos sanos como en infectados por este patógeno (Nevens *y cols.* 2003; Firbas *y cols.* 2006). Particularmente, un candidato vacunal basado en la proteína de la envoltura E1, no produjo reducción significativa de la carga viral aunque logró mejoría histológica en parte de los pacientes (Leroux-Roels *y cols.* 2005). Sin embargo, a pesar de estos resultados preliminares de interés, no está clara la capacidad de los candidatos vacunales evaluados hasta ahora para proteger de la infección o permitir la clarificación viral, una vez establecida, con la consiguiente prevención o mejoría del daño hepático.

La utilización de vectores virales, y entre ellos los poxvirus recombinantes, es una de las estrategias en estudio para la obtención de candidatos vacunales frente a infecciones persistentes como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de papiloma humano (VPH) (Dale *y cols.* 2004; Fiander *y cols.* 2006). El virus vaccinia es el prototipo de poxvirus empleado con éxito en la vacunación, aunque durante las campañas masivas se detectaron algunos efectos adversos (Lane *y cols.* 2003). Por tal motivo, en las estrategias actuales se han desarrollado cepas atenuadas de virus vaccinia o se emplean avipoxvirus que no se replican en células de mamíferos. Entre los avipoxvirus frecuentemente empleados para estos fines se encuentra el virus de viruela aviar (Coupar *y cols.* 2006), aunque este no se ha utilizado hasta el momento como vector viral para el desarrollo de candidatos vacunales contra el VHC. Particularmente, para la generación de candidatos vacunales frente al VHC se han obtenido y evaluado variantes recombinantes de virus Ankara modificado (MVA, del inglés Modified virus Ankara) (Abraham *y cols.* 2004) y virus de viruela de canarios (Pancholi *y cols.* 2003). La replicación citoplasmática de los poxvirus y la codificación en su genoma de gran parte de las enzimas y factores requeridos para la replicación, la transcripción, y la traducción, son las mayores ventajas para su uso como vectores (Tartaglia *y cols.* 1990). Además, con este sistema se puede lograr una buena respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD8⁺, ya que el antígeno es procesado en el interior de la célula infectada y los epitopos se presentan en el contexto del sistema principal de histocompatibilidad tipo I (Roitt *y cols.* 1988).

Se ha descrito previamente la generación de virus vaccinia recombinantes para antígenos del VHC (Baumert *y cols.* 1998; Dubuisson *y cols.* 1994). Estos virus han resultado útiles como herramientas para la evaluación de candidatos vacunales de diferente naturaleza (Arribillaga *y cols.* 2002; Pancholi *y cols.* 2003), particularmente en sistemas de reto con virus sustituto.

La elevada heterogeneidad del VHC (Simmonds, 2004), caracterizada por la existencia de 6 genotipos principales y al menos 50 subtipos virales, e incluso de “cuasiespecies” en un mismo individuo, impone dificultades adicionales a la generación de vacunas efectivas e incluso a su evaluación, debido a la importancia de los cambios en la secuencia de ácidos nucleicos y de proteínas desde el punto de vista funcional y analítico. Particularmente, los aislamientos de genotipo 1b, predominantes desde el punto de vista epidemiológico, se distinguen por su resistencia a las terapias antivirales, elevada carga viral y heterogeneidad de secuencia (Hadziyannis *y cols.* 2004; Wohnsland *y cols.* 2007), por lo que contar con candidatos vacunales y herramientas para su estudio, dirigidas contra aislamientos de este genotipo, constituye una prioridad.

El presente trabajo se incluye en el campo de las investigaciones dirigidas al estudio de los antígenos del VHC, la respuesta inmune inducida contra ellos, y al desarrollo de candidatos vacunales para el uso profiláctico y/o terapéutico contra la infección por este patógeno. Teniendo en cuenta los aspectos generales y específicos expuestos anteriormente, se formuló la siguiente **Hipótesis: Es posible generar un virus de viruela aviar recombinante para antígenos estructurales del virus de la hepatitis C, capaz de inducir una respuesta inmune específica y control de la carga viral en un modelo de reto con virus vaccinia que exprese proteínas del virus de la hepatitis C de genotipo 1b.**

Para aceptar o refutar esta hipótesis, nos propusimos los siguientes objetivos y tareas:

Objetivo 1: Obtener virus vaccinia recombinantes para antígenos estructurales del VHC de un aislamiento de genotipo 1b y estudiar su capacidad replicativa *in vitro* e *in vivo*.

Tarea 1- Obtención de un plasmidio que contenga la región codificante para la proteína de la cápsida del VHC para su inserción en el genoma de virus vaccinia.

Tarea 2- Generación de un virus vaccinia recombinante para la proteína de la cápsida del VHC.

Tarea 3- Obtención de un plasmidio que contenga la región codificante para la proteína de la cápsida y las proteínas de la envoltura del VHC para la inserción en genoma de virus vaccinia.

Poxvirus recombinantes para antígenos del VHC

Tarea 4- Generación de un virus vaccinia recombinante para las proteínas de de la cápsida y de la envoltura del VHC.

Tarea 5- Evaluación de la capacidad replicativa *in vitro* de los virus vaccinia recombinantes para los antígenos estructurales del VHC.

Tarea 6- Estudio de la capacidad replicativa de los virus vaccinia recombinantes para los antígenos estructurales del VHC en ratones no inmunizados y en ratones previamente vacunados con diferentes inmunógenos.

Objetivo 2: Obtener un virus de viruela aviar recombinante para una variante de la proteína de la cápsida y la E1 del VHC de un aislamiento de genotipo 1b, evaluar su inmunogenicidad y su capacidad de inducir protección frente al reto con virus sustituto en modelos animales.

Tarea 1- Obtención de un plasmidio que contenga la región codificante para una variante de la proteína de la cápsida y la proteína E1 del VHC para la inserción en genoma de virus de viruela aviar.

Tarea 2- Obtención de un virus de viruela aviar recombinante para la proteína de la cápsida y la E1 del VHC.

Tarea 3- Evaluación de la respuesta inmune y la capacidad protectora frente al reto con virus sustituto, inducida en ratones por un virus de viruela aviar recombinante para las proteínas de la cápsida y la E1 del VHC, administrado de forma individual o en esquemas de sensibilización/recuerdo.

Tarea 4- Evaluación de la respuesta inmune y la capacidad protectora frente al reto con virus sustituto, inducida en monos verdes por un virus de viruela aviar recombinante para las proteínas de la cápsida y la E1 del VHC.

Este trabajo contiene varios **elementos novedosos**. Se genera por primera vez un virus de viruela aviar recombinante para más de un antígeno del VHC. Además, se obtienen y caracterizan por primera vez poxvirus recombinantes para antígenos del VHC basados en la secuencia de un aislamiento cubano de genotipo 1b de este patógeno. Constituye también el primer estudio donde se describe que los virus vaccinia recombinantes que expresan la proteína de la cápsida del VHC de genotipo 1b no presentan una capacidad infectiva letal incrementada. Además, gracias a la disponibilidad de los virus vaccinia recombinantes obtenidos en este trabajo, se demuestra por primera vez la capacidad de una preparación novedosa basada en la mezcla de un plasmidio para la inmunización con ADN y una proteína

recombinante de controlar la infección *in vivo* en un modelo de reto con virus sustituto. Igualmente, se demuestra por primera vez la inducción de respuesta inmune específica y el control de viremia en este modelo de reto después de la inmunización con un virus de viruela aviar recombinante para una proteína de fusión cápsida-E1.

Los resultados descritos en esta tesis tienen **importancia teórica** pues brindan nuevos elementos acerca de la caracterización de la respuesta inmune inducida contra los antígenos del VHC. Adicionalmente, se demuestra el comportamiento similar en cuanto a capacidad replicativa de los virus vaccinia recombinantes para antígenos estructurales del VHC de genotipo 1b con relación al virus parental, lo cual difiere del comportamiento descrito previamente para virus vaccinia recombinantes basados en la proteína de la cápsida del VHC de genotipo 1a y confirma la necesidad de profundizar en la caracterización diferencial de antígenos de distinto subtipo del VHC. Además, los resultados evidencian que la investigación en el campo de la inmunización con virus de viruela aviar recombinantes para antígenos del VHC es un modelo útil para estudiar las posibilidades de candidatos vacunales contra el VHC basados en vectores vivos recombinantes.

La **importancia práctica** consiste en que los poxvirus recombinantes desarrollados en este trabajo constituyen una herramienta disponible para el estudio de la respuesta inmune contra el VHC. En particular, el virus de viruela aviar recombinante para los antígenos del VHC generado en el presente trabajo puede ser un componente de un futuro tratamiento preventivo o terapéutico efectivo contra la infección por el VHC. Adicionalmente, los virus vaccinia recombinantes pueden ser usados en la realización de ensayos *in vitro* donde se requiera la generación de células presentadoras de epitopos de los antígenos de la región estructural del VHC. Además, el sistema de reto *in vivo* con los virus vaccinia recombinantes constituye una poderosa herramienta para la evaluación y optimización de candidatos vacunales contra el VHC, particularmente para aislamientos de genotipo 1b.

Los resultados contenidos en este trabajo se encuentran incluidos en 4 publicaciones científicas en revistas internacionales y una solicitud internacional de patente. Además, han sido presentados en 5 eventos científicos.

2. Revisión bibliográfica

2.1 El virus de la hepatitis C. Características generales

2.1.1 Características del virión

El VHC es un virus de ARN de simple cadena de polaridad positiva que se clasifica dentro del género Hepacivirus de la familia *Flaviviridae* (Robertson *y cols.* 1998). El ARN del VHC está protegido por una cápsida proteica icosaédrica envuelta en una bicapa lipídica con dos glicoproteínas virales ancladas (Penin *y cols.* 2004b). Se ha demostrado la presencia de partículas de 20-100 nm en estudios de microscopía electrónica de partículas de VHC en suero (Petit *y cols.* 2005), (Roingard *y cols.* 2004; Andre *y cols.* 2005). Esta variación puede estar dada por la presencia de viriones envueltos y desnudos en el suero de los pacientes (Diedrich, 2006). Además, se ha demostrado que la mayor parte de los viriones se encuentran unidos a lipoproteínas (Schettler *y cols.* 2001). La densidad de los viriones del VHC puede variar considerablemente, desde 1,03 a 1,20 g/mL (Kanto *y cols.* 1994; Prince *y cols.* 1996).

2.1.2 Organización molecular del virus de la hepatitis C y sus proteínas

El genoma del VHC está constituido por una molécula de ARN de polaridad positiva, de 9,6 kilobases (kb) aproximadamente. Los primeros 341 nucleótidos (nt) constituyen la región 5' no traducida que forma estructuras secundarias y terciarias estables. Este fragmento es muy conservado, mostrando más de un 90% de identidad de secuencia nucleotídica entre 81 aislamientos diferentes (Bukh *y cols.* 1992). Esta región contiene múltiples codones AUG antes del sitio de inicio de la traducción, así como regiones que intervienen en la replicación y en la traducción. Tal es el caso del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, del inglés, "internal ribosome entry site") que diferencia la traducción del genoma viral de la que tiene lugar para los ARNm celulares (Honda *y cols.* 1996). El elemento IRES elimina la necesidad de una estructura 5'cap o de un extremo 5' libre en el ARN mensajero. El IRES comprende los nt del 44 al 354 del genoma viral, solapándose con los primeros 13 nt de la región codificante.

A continuación de la región 5' no traducida, el genoma del VHC contiene un marco abierto de lectura que codifica una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos (aa). Este precursor proteico es procesado co-traduccionalmente y post-traduccionalmente por una combinación de proteasas virales y del hospedero (Manabe *y cols.* 1994), rindiendo al menos 10 proteínas individuales (Takamizawa *y cols.* 1991) (**Figura 1**). Las proteínas no

estructurales: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B son escindidas del precursor poliproteico por la acción de las proteasas virales, NS2-3 y NS3-4A. Por otro lado, las proteínas estructurales cápsida, E1, E2 y p7 se separan por una peptidasa señal del Retículo Endoplasmático (RE) (Reed *y cols.* 2000). El genoma del VHC contiene adicionalmente, un marco abierto de lectura sobrelapado en +1, que puede conducir a la síntesis de una proteína alternativa a partir de la región codificante para la proteína de la cápsida (Branch *y cols.* 2005).

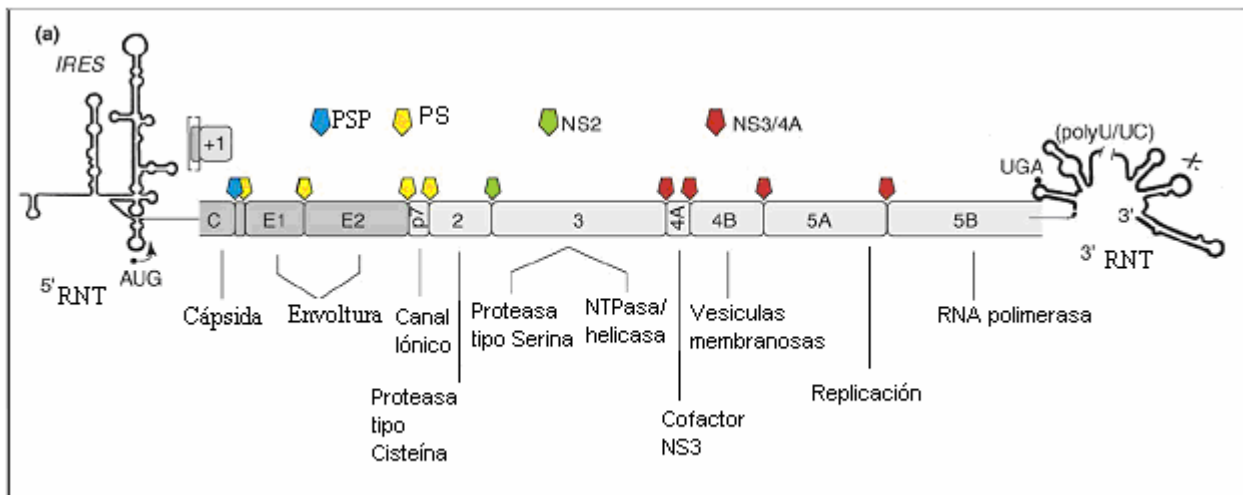


Figura 1. Representación esquemática del genoma del VHC.

La región que codifica para la proteína de la cápsida está conservada entre los diferentes aislamientos correspondientes a diferentes genotipos, mostrando una identidad a nivel nucleotídico de más del 90% (Bukh *y cols.* 1995). La proteína de la cápsida tiene capacidad de unión a ARN y forma la nucleocápsida viral (Takahashi *y cols.* 1992). Esta proteína es separada de la poliproteína viral por una peptidasa señal del hospedero rindiendo la forma inmadura de la proteína de 21 kDa (Santolini *y cols.* 1994). Con posterioridad, el péptido señal del extremo C-terminal es procesado, obteniéndose la forma madura de la proteína (McLauchlan *y cols.* 2002). El dominio N-terminal de esta proteína viral contiene numerosos aa cargados positivamente, mostrando características hidrofílicas y similitudes con las proteínas de la cápsida de pestivirus y flavivirus (Boulant *y cols.* 2005). En algunas condiciones la proteína de la cápsida se ha detectado en núcleo (Yasui *y cols.* 1998) debido a la presencia de señales de localización nuclear como las ubicadas de los aa 5-13, 38-43, y 58-71 (Chang *y cols.* 1994). Se plantea que el tráfico de esta proteína entre las membranas del RE

y las gotas de lípidos está regulado por la acción de la peptidasa señal, al escindir el extremo C-terminal de la proteína (McLauchlan, 2000). Ha sido descrito por varios grupos que la proteína de la cápsida se une a la región 5' no traducida del genoma del VHC (Hwang *y cols.* 1995), (Reed *y cols.* 1998b), lo que puede ser importante para la encapsidación y el ensamblaje de la partícula. Otro paso del ensamblaje del virión que se ha podido establecer es la multimerización de la proteína de la cápsida (Matsumoto *y cols.* 1996).

Por otra parte, ha sido descrito que la proteína de la cápsida interactúa con varias proteínas celulares, interviniendo en diferentes funciones de la célula. Se ha propuesto que la proteína de la cápsida del VHC está involucrada en vías de señalización, la apoptosis, la carcinogenesis y el metabolismo lipídico (Ray *y cols.* 2001; Tellinghuisen *y cols.* 2002). Sin embargo, en la mayoría de los casos no queda claro si estas interacciones ocurren en el curso normal de la infección o son artefactos de la expresión ectópica o de la sobre-expresión de la proteína. Serán necesarios estudios adicionales para dilucidar el papel real de la proteína de la cápsida durante la infección por el VHC.

La glicoproteína E1 consta de 192 aa (del aa 192 al 383) con un peso molecular de 32- 35 kDa. La E1 posee un péptido señal seguido de una secuencia de corte en su extremo amino terminal. Su extremo carboxílico es hidrofóbico, dentro del cual están incluidos cinco motivos de glicosilación, de los cuales sólo cuatro son utilizados (Fournillier *y cols.* 1996).

La segunda glicoproteína, E2, abarca del aa 384 al 746 de la poliproteína viral y posee 11 sitios potenciales de glicosilación (Goffard *y cols.* 2005). Las dos glicoproteínas tienen un ectodominio N-terminal y un dominio transmembrana C-terminal. Adicionalmente, la proteína E2 también ha evidenciado su capacidad para interactuar con la proteína quinasa dependiente de ARN de doble cadena, por lo cual ha sido asociada con los mecanismos de resistencia al interferón (IFN) (Taylor *y cols.* 1999).

Las proteínas de la envoltura E1 y E2 interactúan de manera no covalente entre ellas para formar heterodímeros (Deleersnyder *y cols.* 1997) que se localizan en el RE de la célula infectada debido a la presencia de señales de retención en los dominios transmembrana de ambos antígenos (Ags) (Cocquerel *y cols.* 1998). El heterodímero E1E2 es el componente viral presente en la superficie de las partículas del VHC y es el candidato obvio como ligando de los posibles receptores celulares. Las dos proteínas de la envoltura están altamente modificadas por N glicanos. Se debe destacar que se ha encontrado que algunos glicanos

participan en el plegamiento de las glicoproteínas virales y en la entrada del VHC a la célula (Helle *y cols.* 2006).

Ambas proteínas de la envoltura se caracterizan por una marcada variabilidad, incluso dentro de un mismo individuo. La variabilidad es particularmente alta en las 2 regiones hipervariables (RHV-I y RHV-II), localizadas en la proteína E2. La presencia de la RHV-I, de 30 aa, ha sido comprobada en la mayoría de los aislamientos virales y comienza justo con el inicio de la proteína E2 (aa 384). La disminución de la infectividad de las ppl que carecían de esta región, indica que este dominio debe participar en la entrada del virus a la célula (Callens *y cols.* 2005). La segunda RHV ha sido descrita sólo en los aislamientos de genotipo 1b y abarca 7 aa (aa 454-460) (Rosa *y cols.* 1996). Hasta el momento la función propuesta para la RHV-II es la modulación de la unión de la E2 al receptor (Roccasecca *y cols.* 2003).

El polipéptido P7 se localiza en la unión entre las proteínas estructurales y no estructurales (Carrere-Kremer *y cols.* 2002). Este polipéptido es una pequeña proteína de membrana politópica, que en membranas lipídicas artificiales ha mostrado actividad de canal iónico (Premkumar *y cols.* 2004). Además, en estudios en chimpancés se ha encontrado que es esencial para la infectividad del VHC (Sakai *y cols.* 2003).

La NS2 es una proteína integral de membrana de 23 kDa, de carácter hidrofóbico (Santolini *y cols.* 1995), que no es esencial para la formación del complejo de replicación (Blight *y cols.* 2000). La función de esta proteína en su forma madura no se conoce, sin embargo, antes de ser separada de la poliproteína participa en el procesamiento NS2/NS3 (Lindenbach *y cols.* 2001). Para este procesamiento se requiere también de los primeros 180 aa de la proteína NS3. Esta enzima NS2-3 se ha descrito como una proteasa tipo cisteína (Pallaoro *y cols.* 2001).

La NS3, por su parte, es una proteína de 70 kDa y codifica tres actividades enzimáticas, una proteasa del tipo serina (Steinkuhler *y cols.* 1996) y una combinación NTPasa/helicasa. La actividad proteasa de la NS3 se incrementa con la unión del polipéptido hidrofóbico NS4A, de 8 kDa aproximadamente (Kim *y cols.* 1996). La NS4A media la asociación de NS3 con la membrana del RE, lo que puede ser importante para la función de la proteasa (Wolk *y cols.* 2000). Además de sus funciones en el procesamiento de la poliproteína, la NS3-4 escinde proteínas adaptadoras en la vía clásica de inducción de IFN (Meylan *y cols.* 2005). El extremo C-terminal de la NS3 codifica una ARN helicasa (Tai *y cols.* 1996). La NS3 es una de las

proteínas virales que se propone interviene en los procesos de carcinogénesis relacionados con el VHC (Deng *y cols.* 2006).

La NS4B es una proteína de 27 kDa, altamente hidrofóbica que contiene cuatro dominios transmembrana (Lundin *y cols.* 2003), por lo que se detecta en asociación a las membranas del RE (Lundin *y cols.* 2003) y se ha observado que induce alteración de membranas intracelulares (Egger *y cols.* 2002). Estos elementos sugieren que una de sus funciones es inducir la formación de estructuras membranosas que soporten la replicación del ARN viral (Egger *y cols.* 2002).

La proteína NS5A es una proteína asociada a membranas que contiene un único dominio anfipático en su extremo N-terminal, que le sirve de anclaje a membrana (Penin *y cols.* 2004a). Además de la secuencia de anclaje, la NS5A tiene tres dominios, que están separados por dos secuencias de baja complejidad (Tellinghuisen *y cols.* 2004). El dominio II de esta proteína es capaz de reprimir a la proteína quinasa inducida por IFN activada por ARN de doble cadena, por interacción directa con el dominio catalítico (Gale *y cols.* 1998). Otra acción de la proteína NS5A es la inducción de interleucina (IL)-8, una citocina que inhibe la acción antiviral del IFN (Polyak *y cols.* 2001). Por estos datos, la proteína NS5A parece intervenir en el mecanismo que confiere resistencia al efecto antiviral del IFN en las células infectadas. Ha sido descrito que cuando se eliminan secuencias de la región N-terminal de la NS5A, dicha proteína funciona como un activador transcripcional potente, siendo esta una actividad potencial de la proteína NS5A (Kato, 2001).

Por su parte, la NS5B contiene un motivo característico de las polimerasas que usan moldes de ARN. Está demostrado que esta proteína tiene una localización perinuclear (Hwang *y cols.* 1997). Su interacción con membranas sugiere que la replicación debe ocurrir asociada a las membranas del RE alrededor del núcleo. Esta proteína puede iniciar la síntesis de ARN *de novo*, al menos *in vitro*, y se asume que esto debe ocurrir también *in vivo* (Bartenschlager *y cols.* 2004).

Al final de la molécula de ARN del VHC se localiza la región 3' no codificante que incluye una porción de 40 nt poco conservada, una cola de poli U de longitud heterogénea, y una secuencia altamente conservada de 98 nt que forma estructuras secundarias y terciarias estables y parece jugar un papel importante en la replicación viral (Kolykhalov *y cols.* 1996), (Bartenschlager *y cols.* 2000).

2.1.3 Ciclo viral

Los hepatocitos son el blanco principal de la infección y la replicación del VHC, aunque este virus puede infectar otros tipos celulares (Laporte *y cols.* 2003). La carencia de sistemas de replicación *in vitro* robustos para la propagación del VHC es una limitación importante para el estudio de este patógeno y una de las causas por las cuales el receptor celular del VHC no ha sido identificado. La proteína E2, o el complejo E1/E2, son los componentes del virión que están propuestos como ligandos del receptor en la superficie de la célula. La unión del virus a la célula hospedera debe requerir la interacción de la proteína E2 con un receptor que este presente en la superficie celular. Parece ser que la molécula CD81 participa en esa interacción como lo indica su unión a partículas virales (Pileri *y cols.* 1998) y su participación en la entrada de pseudos partículas del VHC (ppVHC) a la célula (Zhang *y cols.* 2004). El sitio de la E2 que interactúa con CD81 es conformacional e involucra las regiones comprendidas entre los aa 480-493 y 554-569 de la poliproteína viral.

Alternativamente, la asociación de partículas del VHC con β -lipoproteínas pudiera indicar que la entrada del VHC a la célula podría estar mediada por los receptores de estas moléculas (Thomssen *y cols.* 1992). Adicionalmente, se ha sugerido que el receptor BI de macrófagos (Scarselli *y cols.* 2002), el heparan sulfato (Barth *y cols.* 2003), la proteína claudina I (Evans *y cols.* 2007) y las moléculas DC-SIGN y L-SIGN (Gardner *y cols.* 2003; Pohlmann *y cols.* 2003) pueden estar mediando la entrada del VHC a la célula. Debido a la co-existencia en el suero de viriones con diferentes características es posible que la entrada a la célula pueda producirse por más de una vía y pudiera involucrar a varias moléculas simultáneamente.

Después de la entrada a la célula, probablemente a través de la endocitosis mediada por el receptor, el ARN viral es liberado de la nucleocápsida en el citoplasma. Posteriormente, el genoma viral es traducido a partir del IRES y la poliproteína viral es procesada proteolíticamente en las proteínas virales individuales. La mayoría de estas proteínas, sino todas, forman un complejo multiproteico altamente ordenado fuertemente asociado con membranas intracelulares alteradas (Gosert *y cols.* 2003). Dentro de este complejo, la cadena positiva de ARN es copiada a un intermediario de cadena negativa, que a su vez sirve de molde para la síntesis de un exceso de la progenie de cadena positiva. La NS5B, la ARN polimerasa ARN dependiente, produce las nuevas cadenas de ARN, mediante el mecanismo de síntesis *de novo*, o sea, sin necesidad de un cebador inicial. La cadena positiva, sintetizada

por esta vía, puede ser usada tanto para la síntesis de nuevas cadenas negativas, para la traducción o para la encapsidación en partículas virales (Bartenschlager *y cols.* 2000).

El autoensamblaje de las proteínas estructurales ocurre en el lumen del RE, del cual se adquieren algunos de los componentes de la envoltura del virión. Durante este proceso ocurre la formación de multímeros intermediarios de la cápsida y de heterodímeros de la E1 y la E2 (Blanchard *y cols.* 2002). Finalmente, el virus parece ser exportado de la célula por la vía secretora constitutiva a través del complejo de Golgi (Bartenschlager *y cols.* 2000).

El nivel de viremia promedio en los pacientes infectados crónicamente es aproximadamente 3,5 millones de copias/mL (McHutchison *y cols.* 1998), independientemente del genotipo viral (Zeuzem, 2001). Los niveles de ARN viral tienen poca fluctuación y su cinética ha sido relacionada con la cinética de la proteína de la cápsida en el suero de los individuos crónicos no tratados con antivirales. Los cálculos muestran un mínimo de producción viral y clarificación diaria de aproximadamente 10^{11} a 10^{13} viriones, en individuos crónicos no tratados. El virus libre tiene un tiempo de vida medio de 1,5 a 4,6 h, mostrando un recambio del 97 al 99%/día. En cambio, el virus dentro de la célula tiene un tiempo de vida media que oscila entre 1,7 y más de 70 días, mostrando un recambio diario del 1 al 33% (Zeuzem, 2001). La existencia de células infectadas en estado de latencia, en las cuales el período no productivo es considerablemente más largo que el ciclo productivo de la infección es un factor importante en la infección por el VHC (Zeuzem, 2001).

2.2 Historia natural de la infección y Patogénesis

La historia precisa de la infección con el VHC no se ha establecido debido a la ausencia de datos prospectivos, la frecuente dificultad para determinar el inicio de la enfermedad y la influencia variable de múltiples cofactores que dirigen la progresión de la enfermedad (Poynard *y cols.* 1997). La cronicidad es el destino predominante de la infección por el VHC. Aproximadamente, entre 15 y 30% de los pacientes infectados por el VHC se recuperan espontáneamente y el resto desarrolla infección crónica (Hoofnagle, 1997). La infección por el VHC permanece asintomática en la mayoría de los casos y la enfermedad crónica ocasiona frecuentemente afectaciones histológicas leves o moderadas (Yano *y cols.* 1996; Kage *y cols.* 1997). Para la aparición de cirrosis y carcinoma hepatocelular deben transcurrir varios años, incluso décadas (Alter, 2007).

Los hepatocitos constituyen las principales células dianas, aunque se ha podido comprobar que las células mononucleadas de sangre periférica, los leucocitos polimorfonucleados y las células B son también blancos naturales de la infección y replicación del VHC, encontrándose en ellas cadenas de ARN de polaridad negativa e intermediarios de la replicación (Laskus y cols. 1998; Crovatto y cols. 2000). Por otra parte, se ha descrito infección extrahepática del VHC en ovarios, útero y corazón (Sugiyama y cols. 1997).

La infección por el VHC en estos grupos de células puede ser la causa de las manifestaciones extrahepáticas que incluyen, desórdenes hematológicos, renales, dermatológicos, endocrinos y autoinmunes (Gumber y cols. 1995). Existen evidencias que indican que la infección por el VHC tiene efectos citopáticos relacionados con la replicación del virus, contribuyendo directamente a la progresión de la enfermedad. *In vivo*, el VHC se asocia generalmente a diferentes daños morfológicos en las células hepáticas (Scheuer y cols. 1992). Además, Steffan y cols han demostrado la ocurrencia de fenómenos de agrandamiento celular, vacuolización, marginación de la cromatina, proliferación de membranas y ruptura de organelos citoplasmáticos, así como la inducción de apoptosis en células Daudi y HepG2 infectadas por el VHC *in vitro* (Kalkeri y cols. 2001); (Steffan y cols. 2001). El fenómeno apoptótico ha sido observado también durante el curso de la infección natural por el VHC (Fischer y cols. 1996). Resta por establecer si la apoptosis observada en humanos se debe a la acción directa del virus o a la infiltración de linfocitos T citotóxicos (LTC), a ambos, o a otros factores (Steffan y cols. 2001).

Algunos estudios indican que el daño asociado a la infección con el VHC puede estar mediado, al menos en parte, por la respuesta inmune del huésped (Poccia y cols. 2003). La infección con el VHC ha sido asociada con el carcinoma hepatocelular (Koike, 2007). Sin embargo, el virus no parece ser directamente oncogénico debido a que el tiempo que media entre la infección y la aparición de carcinoma hepatocelular es prolongado. Además, durante la replicación viral no se produce intermediario de ADN que pudiera integrarse al genoma del hospedero y provocar mutagénesis insercional (Choo y cols. 1989). No obstante, se ha especulado que la repetida regeneración de los hepatocitos que tiene lugar en los individuos infectados por el VHC, para mantener la función hepática, pudiera incrementar la posibilidad de alteración genética. Además, algunas proteínas virales han sido involucradas con el control de la proliferación y carcinogénesis de los hepatocitos (Kato, 2001).

La IL-8 inducida por la proteína NS5A, actúa como citocina pro-inflamatoria y atrayendo células inflamatorias independientemente de su especificidad. Esta citocina además, activa la producción de matriz extracelular, paso importante en los procesos de fibrosis.

Las proteínas de la cápsida y la NS3 activan al receptor tipo *Toll-2* en monocitos y macrófagos induciendo la secreción de citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6, IL-8 y TNF (del inglés, “Tumor necrosis Factor”). Aunque las vías dependientes de Patrones moleculares asociados a patógenos son parte de la respuesta inmune innata frente al VHC, la estimulación de citocinas pro-inflamatorias, puede contribuir al daño de los hepatocitos, la fibrogénesis y la transformación maligna. En este sentido, se ha descrito una considerable infiltración de LTC mayoritariamente no específicos en pacientes con hepatitis C crónica (Cecere y cols. 2004).

La fibrosis en la hepatitis C crónica ocurre como resultado de la activación de células estrelladas hepáticas por citocinas y otras señales moleculares inducidas por procesos inflamatorios.

Otro rasgo histológico común en la hepatitis C crónica es la esteatosis, que está dada por la acumulación de gotas de lípidos en el citoplasma y acelera el desarrollo de la fibrosis (Ramalho, 2003). Se ha encontrado que la proteína de la cápsida modifica el ensamblaje y secreción de lipoproteínas de muy baja densidad en el hígado e incrementa la concentración de ácidos grasos mono-insaturados (Perlemuter y cols. 2002), por lo que pudiera involucrarse en la esteatosis.

Se ha podido asociar determinados haplotipos de Ags leucocitarios de histocompatibilidad (del inglés, “histocompatibility leukocyte antigen”, HLA), sobre todo de clase II, con un curso favorable de la infección por el VHC (Thio y cols. 2001). Los alelos DQB1*0301 y DRB1*1101 son los más comúnmente asociados con el aclaramiento viral (Yee, 2004). En contraste, solo se ha podido relacionar un alelo: HLA Cw*04 con la persistencia viral (Thio y cols. 2002).

Debido a la larga evolución de la infección por el VHC, son muy frecuentes las coinfecciones con otros virus. En particular, se encuentra hasta un 92% de pacientes infectados con el VHC en pacientes VIH positivos. Otras coinfecciones frecuentes son con el virus de la hepatitis B (VHB) y con *Schistosoma mansoni*, virus de la hepatitis A y especies de *Helicobacter* (Sagnelli y cols. 2000; Farid y cols. 2005; Spada y cols. 2005; Rocha y cols. 2005). La presencia de dos o más entidades virales debe modificar la historia natural de la infección.

2.3 Respuesta inmune

La inmunidad inducida por la infección natural con el VHC es generalmente débil e inefectiva para proteger contra la infección viral (Prince *y cols.* 1992; Wyatt *y cols.* 1998). Sin embargo, la aparición frecuente de formas leves o autoresueltas de la enfermedad producida por segundas infecciones con el VHC indican que existe un grado importante de inmunidad (Prince *y cols.* 2001).

La respuesta del sistema inmune frente al VHC incluye generalmente tanto la respuesta humoral como celular, abarcando la totalidad de las proteínas virales (Jackson *y cols.* 1997), aunque una buena parte de los pacientes con hepatitis C crónica no desarrollan una respuesta inmune celular detectable contra los Ags del VHC (Botarelli *y cols.* 1993; Lechmann *y cols.* 1996).

2.3.1 Respuesta inmune innata

Una evidencia del papel de la inmunidad innata en el control del VHC es el aclaramiento viral encontrado en chimpancés sin la presencia demostrada de linfocitos T (Thomson *y cols.* 2003).

Estudios en chimpancés infectados en su fase aguda, mediante técnicas de genómica han revelado que el aclaramiento transiente o sostenido del virus está asociado con el incremento de la transcripción de genes inducidos por IFN- γ en el hígado (Bigger *y cols.* 2001; Su *y cols.* 2002).

El VHC induce una serie de cambios tempranos en la expresión de algunos genes intrahepáticos, incluyendo aquellos involucrados con la respuesta a IFNs tipo I (Su *y cols.* 2002), lo que parece presentarse como un mecanismo de resistencia que frecuente en el establecimiento de una hepatitis crónica.

Las proteínas del VHC interfieren en la función de las células efectoras de la inmunidad innata, tales como las células NK (del inglés, “natural killer”). El papel de las NK en la infección temprana por el VHC ha sido recientemente indicado por estudios inmunogenéticos en los cuales la presencia de los genes codificantes para el receptor de células NK, KIR2DL3 y su ligando, el Ag leucocitario humano C 1 correlacionan con el aclaramiento viral y la recuperación de los síntomas clínicos (Khakoo *y cols.* 2004). Recientes estudios *in vitro* han mostrado que, en altas concentraciones, la proteína E2 recombinante se une al CD81 en la superficie de las células NK e inhibe la citotoxicidad de las mismas, así como la producción

de citocinas (Crotta *y cols.* 2002; Tseng *y cols.* 2002). Otros estudios *in vitro*, muestran una diferencia en la capacidad de activación de las células dendríticas por las células NK de pacientes infectados con respecto a individuos controles sanos, así como en la producción de TGF- β (del inglés, “transforming growth factor”) e IL-10 (Crotta *y cols.* 2002). No obstante, aún permanece por determinarse si las concentraciones *in vivo* de la proteína E2 y su estructura nativa son compatibles con la inhibición de la respuesta de células NK en los pacientes infectados (Rehermann *y cols.* 2005).

Las células dendríticas, importantes para desarrollar una respuesta inmune efectiva frente al VHC, se ven afectadas durante la infección crónica, posiblemente por servir de reservorios de virus, lo cuál parece ser un mecanismo que contribuye a la persistencia viral (Bain *y cols.* 2001).

2.3.2 Respuesta de anticuerpos

Los anticuerpos (Acs) anti-VHC se pueden detectar como promedio 23 días (7-72) después de haber aparecido la viremia en plasma (Peterson *y cols.* 2000). Estos Acs son detectables durante décadas de infección crónica y están dirigidos principalmente contra la región N-terminal de la proteína de la cápsida (Jackson *y cols.* 1997). En los individuos que clarifican la infección, los títulos de Acs disminuyen gradualmente (Rodger *y cols.* 2000). Otra característica de la respuesta humoral frente al VHC es la presencia predominante de la subclase IgG1 (Chen *y cols.* 1999).

Se ha podido identificar un grupo de Acs, fundamentalmente anti-E2, que parecen ser de naturaleza protectora. Específicamente, se ha logrado correlacionar la generación de respuesta temprana de Acs anti-RHV-I con formas de infección aguda autoresueltas. En pacientes que desarrollan infección crónica estos Acs son generados tardíamente, manteniéndose incluso después de 17 años (Zibert *y cols.* 1997). Estos Acs son usualmente específicos para el suero de donde se derivó la secuencia de la RHV-I. Sin embargo, con frecuencia son incapaces de reconocer secuencias de RHV-I obtenidas del mismo individuo en un estado posterior de la infección (Kato *y cols.* 1993). Estas observaciones indican que la proteína E2 puede inducir una respuesta de Acs neutralizantes que resulta en la selección por el sistema inmune de genomas del VHC con mutaciones de la RHV-I. Otra evidencia que apunta a la presencia de epitopos neutralizantes en la proteína E2, es la aparición y persistencia de altos títulos de Acs que inhiben la unión de esta proteína a células humanas en individuos que resuelven

naturalmente la infección (Ishii *y cols.* 1998). Estudios previos sugieren que aunque existen unos pocos epitopos de células B fuera de la RHV-I, capaces incluso de inducir Acs neutralizantes, estos Acs no están probablemente asociados a la resolución de la infección (Lechner *y cols.* 1998). La excepción parece radicar en los Acs dirigidos contra la región de unión al CD81 (Yi *y cols.* 2006).

El papel de los Acs en la protección frente al VHC ha sido cuestionado debido a que su presencia no evita la re-infección de humanos o chimpancés (Farci *y cols.* 1992; Lai *y cols.* 1994). Además, su presencia no correlaciona con un resultado favorable de la enfermedad (Chen *y cols.* 1999). Por otra parte, en individuos con hipogammaglobulinemia la clarificación de la infección ocurre en una proporción similar a la población general (Bjoro *y cols.* 1994).

Han aparecido nuevas evidencias del papel de los Acs a partir de la utilización de pseudo-partículas lentivirales (ppl) que exponen las glicoproteínas estructurales del VHC (Meunier *y cols.* 2005). De hecho, se ha demostrado la neutralización cruzada de ppl por Acs de personas con infección crónica, mientras que este tipo de respuesta no se encuentra utilizando Ac de personas que autoresuelven la infección (Bartosch *y cols.* 2003; Meunier *y cols.* 2005). En un sistema de cultivo *in vitro*, se evidenció que Acs neutralizantes impedían la replicación del VHC (Yi *y cols.* 2006) y podían también modular la infección por el VHC *in vivo* (Eren *y cols.* 2006). Estas evidencias no brindan aún claridad acerca del papel real de los Acs en el resultado final de la infección por el VHC.

2.3.3 Respuesta celular

Los linfocitos T CD4⁺ se consideran críticos para generar una respuesta inmune humoral y celular efectiva frente al VHC (Elliot *y cols.* 2006). El papel crucial de los linfocitos T CD4⁺ se evidencia en estudios de eliminación selectiva de esta población en chimpancés donde la pérdida de linfocitos T CD4⁺ conduce a la persistencia viral (Grakoui *y cols.* 2003). Existe el consenso de que una respuesta temprana, vigorosa y multiespecífica de células T auxiliaadoras (Th, del inglés, “T helper”) favorece la resolución de la enfermedad y la inmunidad contra el virus (Diepolder *y cols.* 1995; Gerlach *y cols.* 1999). Por el contrario, una respuesta de células T débil y tardía se relaciona con el establecimiento de la inmunopatología crónica del hígado (Cerny *y cols.* 1999; Cooper *y cols.* 1999; Lechner *y cols.* 2000a; Takaki *y cols.* 2000).

En aquellos individuos que resuelven la infección por el VHC la respuesta de linfocitos T CD4⁺ se llega a mantener por 20 años después de la recuperación (Takaki *y cols.* 2000). Sin embargo, en algunos pacientes a pesar de desarrollarse una respuesta de linfocitos T CD4⁺ vigorosa tempranamente en la infección, se produce un re-incremento en la viremia y llegan a una infección persistente (Thimme *y cols.* 2002; Gerlach *y cols.* 1999). Thimme *y cols.* mostraron que en pacientes que desarrollan una infección crónica, se detecta respuesta CD4⁺ y que puede ser vigorosa esporádicamente, indicando que esta respuesta debe ser sostenida en el tiempo para facilitar el aclaramiento viral (Thimme *y cols.* 2002).

Adicionalmente, en individuos que clarifican la infección se ha encontrado mayor diversificación de la respuesta T CD4⁺, con un reconocimiento de entre 10 y 37 epitopos ubicados en las proteínas de la cápsida, NS3, NS4 y NS5, en contraste con los individuos con infección crónica que reconocen uno o menos (Day *y cols.* 2002).

En relación con el patrón de secreción de citocinas por parte de los linfocitos T CD4⁺ de acuerdo al paradigma Th1/Th2, las células de pacientes crónicos o con resolución de la infección han mostrado resultados variables aunque con un predominio del patrón Th1 (Gramenzi *y cols.* 2005). Sin embargo, los patrones de tipo Th1 son más frecuentes en los pacientes que han aclarado la infección, lo que sugiere una asociación entre la secreción de citocinas antivirales como el IFN- γ y un curso clínico favorable (Gramenzi *y cols.* 2005).

La escasa respuesta de linfocitos CD4⁺ en los individuos con infección crónica por el VHC no está completamente explicada, aunque puede estar dada por una afectación funcional, más que por la eliminación o ausencia de estas células. Semmo *y cols.* demostraron una pérdida de la secreción de IL-2 en individuos con infección crónica, mientras que aquellos con infección resuelta mantienen fuertes respuestas de secreción de IL-2 (Semmo *y cols.* 2005).

Las teorías que se manejan para explicar la inadecuada respuesta de los linfocitos T CD4⁺, incluyen la anergia o el agotamiento, o posiblemente ambas. Evidencias recientes implican células T regulatorias en la supresión funcional de las respuestas CD4⁺ durante la infección por el VHC (Sugimoto *y cols.* 2003). Un estudio en chimpancés con infección aguda por el VHC, demostró que la frecuencia y la actividad supresora de las células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ predice el establecimiento de infecciones crónicas (Manigold *y cols.* 2006)

Existen claras evidencias de que tanto la respuesta de células T CD8⁺ como las citocinas secretadas por estas células juegan un importante papel tanto en la inhibición viral como en la

inmunopatogénesis y particularmente en el daño hepático (Koziel, 1997). En las infecciones auto-resueltas la respuesta de células T CD8⁺ es también vigorosa y multiespecífica, teniendo como blanco entre 8 y 12 epitopos virales (Gruner *y cols.* 2000; Lechner *y cols.* 2000c). Se destaca un estudio por Cox *y cols.* (Cox *y cols.* 2005a), donde los linfocitos T CD8⁺ de pacientes que progresaron a la cronicidad perdieron el reconocimiento por uno o más epitopos, lo que sugiere la aparición de mutantes de escape. Además, en los pacientes con infección crónica no se generaron nuevas especificidades.

Algunos estudios demuestran que en individuos con infección auto-resuelta, se presenta una mayor prevalencia de linfocitos T CD8⁺ específicos para proteínas no estructurales y estructurales en comparación con individuos con infección crónica (Cucchiaroni *y cols.* 2000). Otros estudios en chimpancés encuentran que estas diferencias se presentan específicamente para los linfocitos T CD8⁺ que reconocen epitopos en las proteínas de la cápsida y la NS3 (Shata *y cols.* 2002).

La mayor parte de los estudios en que se examina la respuesta de células T CD8⁺ se han realizado utilizando epitopos que fueron definidos empíricamente, o predichos a partir de la secuencia de la proteína. Otra deficiencia es que se han realizado con células mononucleadas de sangre periférica en lugar de estudiar las poblaciones presentes en hígado, en pacientes con infección crónica. En un estudio donde se utilizaron péptidos sobrelapados cubriendo la totalidad de la proteína se encontró que el 65% de los individuos crónicos tenían respuestas anti-VHC específicas en sangre periférica (Lauer *y cols.* 2002). Además, los epitopos reconocidos se encontraron a lo largo de toda la secuencia. Este resultado ilustra la necesidad de utilizar este tipo de enfoque, en lugar de utilizar un grupo reducido de péptidos que cubren solo una parte de los epitopos potenciales.

Hay datos contradictorios sobre el mantenimiento de la respuesta T CD8⁺, después del aclaramiento de la infección. Algunos estudios muestran que dicha respuesta se mantiene décadas después de la resolución (Takaki *y cols.* 2000). Por otra parte, Chang *y cols.*, encontraron que la respuesta T CD8⁺ específica para el VHC persiste en los pacientes crónicos, pero no en los que resuelven la infección (Chang *y cols.* 2001).

Varios estudios utilizando la tinción con tetrámeros han mostrado que tanto en la infección aguda como en la crónica ocurre disfunción de linfocitos T CD8⁺ (Gruener *y cols.* 2001; Thimme *y cols.* 2001; Wedemeyer *y cols.* 2002). Varias de las funciones de las células T

pueden verse afectadas: la proliferación, la citotoxicidad, la secreción de IFN- γ , y TNF- α durante la activación; este último fenómeno conocido como “fenotipo aturcido”. Particularmente, se ha encontrado que las funciones antivirales de los linfocitos T CD8⁺ en el hígado están afectadas. Un estudio reciente muestra que los linfocitos T CD8⁺ intrahepáticos anti-VHC específicos tenían disminuida la secreción de IFN γ a pesar de su acumulación en este órgano, fenómeno que no se detectaba para los linfocitos T CD8⁺ específicos para influenza (Spangenberg *y cols.* 2005). Es de destacar que se ha encontrado disfunción de las células T CD8⁺ en la fase aguda de la infección, independientemente del curso ulterior de la infección; sin embargo, en aquellos pacientes que resuelven la infección, la recuperación de la función de los linfocitos T CD8⁺ se asoció en tiempo con una disminución rápida de la carga viral y la resolución de la infección (Thimme *y cols.* 2001; Lechner *y cols.* 2000a).

El mecanismo responsable del fallo primario de las células T o de su agotamiento no está esclarecido hasta el momento. Se ha sugerido que la presentación de Ags por parte de las células dendríticas (DC, del inglés, “Dendritic cells”) y macrófagos está afectado en la infección por el VHC (Bain *y cols.* 2001; Sarobe *y cols.* 2002), resultando en una activación inefectiva de las células T o en la afectación del mantenimiento de las células de memoria. Se conoce que la respuesta primaria y de memoria de las células T a otros virus no está afectada (Boni *y cols.* 2004) indicando esto que la naturaleza específica del VHC constituye la base de estas diferencias (Rehermann *y cols.* 2005). No sólo la cantidad de las células del sistema inmune está afectada, sino también la capacidad de proliferar frente a activadores policlonales en comparación con individuos sanos (Fan *y cols.* 2000).

Datos recientes indican que la vía PD-1/PD-1 ligando tiene un papel clave en el agotamiento de los linfocitos T (Barber *y cols.* 2006), siendo los niveles altos de expresión de PD-1 un marcador de células T CD8⁺ funcionalmente agotadas.

Otra de las hipótesis para explicar estas alteraciones en los linfocitos T CD8⁺ es que sean resultado de una respuesta auxiliadora débil o disfuncional por parte de los linfocitos T CD4⁺ específicos, lo que es común en la infección por el VHC (Semmo *y cols.* 2005; Ulsenheimer *y cols.* 2003).

Hay evidencia creciente del papel de los linfocitos T CD4⁺CD5⁺ reguladores en la supresión de los linfocitos T CD8⁺. Efectivamente, estas células se encuentran en mayor cantidad en individuos crónicos que en individuos que auto-resuelven o en individuos sanos,

demostrándose en experimentos de eliminación selectiva *in vitro* y co-cultivo que la producción específica de IFN- γ y la proliferación de linfocitos T CD8⁺ anti-VHC específicos fueron inhibidas por linfocitos T CD4⁺CD5⁺ de manera dosis dependiente y por contacto directo célula-célula (Rushbrook *y cols.* 2005; Sugimoto *y cols.* 2003).

Recientes análisis *ex vivo* de la respuesta inmune de pacientes infectados con VHC muestran una correlación entre una producción subóptima de IL-2 y una incompleta maduración y diferenciación de las células T específicas al VHC (Kittlesen *y cols.* 2000). Verdaderamente, las células T específicas al VHC están menos diferenciadas que las células T específicas que se generan contra otros patógenos (Rollier *y cols.* 2003).

Se ha encontrado una secuencia específica de la proteína de la cápsida que es capaz de unirse a un dominio globular del receptor del componente del complemento C1q; el cual se expresa en la superficie de los macrófagos y las células T relacionándose con la regulación negativa de la producción de IL-12 por los macrófagos (Eisen-Vandervelde *y cols.* 2004), la regulación negativa de la proliferación de células T y macrófagos, así como en la producción de IL-2 e IFN- γ por las células T (Kittlesen *y cols.* 2000).

2.4 Heterogeneidad y estrategias de evasión viral

Siendo un virus de infección persistente, el VHC ha desarrollado sofisticadas estrategias de escape para enfrentarse al sistema inmune innato y adaptativo. La alta tasa de error de la ARN polimerasa dependiente de ARN y a la carencia aparente de mecanismos de corrección durante la síntesis del ARN viral permite la aparición de 10^{-3} y 10^{-4} sustituciones por sitio de genoma por año (Abe *y cols.* 1992). Este valor es suficientemente alto como para que coexista en un individuo infectado una población relacionada de diferentes genomas del virus, de los cuales uno se hace dominante bajo la presión del sistema inmune. Este fenómeno es conocido como dinámica de "cuasiespecies" y constituye un mecanismo rápido y eficiente para el escape del virus a la respuesta inmune (Bukh *y cols.* 1995). Los aislamientos del VHC pueden separarse en, al menos, 6 tipos principales, subdivididos en más de 50 subtipos (Simmonds *y cols.* 2005). Los subtipos se designan por un número arábigo que corresponde al del tipo principal dentro del cual se clasifica, seguido por una letra minúscula en orden según el descubrimiento (Ejemplos 1a, 1b, 2a, 2b...).

Adicionalmente el VHC tiene una serie de mecanismos de escape encaminados a interferir en la respuesta anti-viral del hospedero. El VHC es muy eficiente ocasionando alteraciones a la respuesta a IFN en diferentes niveles (Gale, Jr. y cols. 2005).

Otros estudios no han confirmado la afectación en la función de las DC (Longman y cols. 2004). En otros estudios se ha comprobado la afectación de las capacidades de migración de las DC, más que sus funciones estimuladoras (Nattermann y cols. 2006).

En estos momentos no se conoce porque la infección por el VHC tiene un curso persistente a pesar de existir fuertes respuestas de células T CD8+. Sin embargo, la aparición de mutantes de escape puede ser una de las causas principales (Chang y cols. 2001). Se han encontrado evidencias de mutaciones en múltiples epitopos restringidos a HLA de clase I, pero no en epitopos no restringidos o en las regiones flanqueantes, durante los primeros meses de la infección crónica en chimpancés. En el caso de los mutantes para células T no se ha encontrado diversificación después de varios años de seguimiento en pacientes infectados, por lo que se sugiere que este proceso ocurre tempranamente durante la infección (Bowen y cols. 2005; Cox y cols. 2005b).

2.5 Terapias

En este momento los tratamientos más efectivos frente al VHC incluyen IFN- α combinado con el análogo de nucleósido, ribavirina; con un 40% de respuesta sostenida, que se define por la no detección de ARN viral por más de seis meses después de terminada la terapia. Además, a consecuencia del IFN y la ribavirina, comúnmente se desarrollan efectos secundarios adversos que claramente apuntan hacia la necesidad de terapias más efectivas (Bartenschlager y cols. 2001).

Como otra versión del IFN, se obtuvo una formulación subcutánea, el peginterferón α -2a (PEG-IFN- α -2a) (Hadziyannis y cols. 2003). Esta nueva forma ha sido utilizada para mejorar la farmacodinámica y por lo tanto, la eficacia del IFN, pues provee niveles terapéuticos sostenidos en plasma y puede ser administrado una vez por semana (Ferenci, 2003). El PEG-IFN- α -2a es bien tolerado cuando se administra tanto solo, como combinado con ribavirina, aunque la terapia combinada es significativamente más efectiva que la monoterapia (Craxi y cols. 2003). Tanto para el IFN-PEG como para el IFN no modificado se obtienen diferentes niveles de respuesta virológica sostenida dependiendo del genotipo viral, siendo el genotipo 1 con el que se obtienen los menores porcentos de respuesta (Hadziyannis y cols. 2004).

Otros tratamientos alternativos basados en terapia con vitaminas, acupuntura, terapias con hierbas y técnicas de modificación del estilo de vida han sido ampliamente empleados, aunque los escasos ensayos controlados publicados no avalan su eficacia (Liu *y cols.* 2003).

La identificación de varios blancos atractivos para compuestos antivirales, como son el sitio interno de entrada al ribosoma, la proteasa NS2-3, la proteasa de tipo serina NS3, la NTPasa/helicasa NS3 y la polimerasa NS5B (Reed *y cols.* 1998a), abre nuevas perspectivas en este campo. Particularmente, las estrategias moleculares entre las que se destacan el desarrollo de ribozimas, oligonucleótidos antisentido y la inmunización con ADN aparecen como variantes futuras atractivas.

2.6 Modelos de replicación *in vitro* del virus de la hepatitis C

Una de las mayores limitaciones en el estudio del VHC es la carencia de un sistema de cultivo celular que permita una propagación confiable y eficiente de este virus.

Se ha probado la susceptibilidad de varias líneas celulares humanas y de chimpancé (*Pan troglodytes*); sin embargo, el nivel de replicación en estos sistemas no es satisfactorio, ya que se requiere realizar una reacción en cadena de la polimerasa (RCP) con retrotranscripción para la detección del ARN.

Por otra parte, se han obtenido clones infecciosos de ADN complementario (ADNc); comprobándose que el RNA transcrito es infeccioso en chimpancés inoculados intra-hepáticamente (Yanagi *y cols.* 1997). Sin embargo, estos ADNc no se han adaptado a condiciones de cultivo, lográndose niveles reducidos de replicación (Yanagi *y cols.* 1997; Lanford *y cols.* 2001).

La obtención de replicones subgenómicos para el VHC resultó un enfoque novedoso para lograr un modelo *in vitro* para el estudio del VHC. Estas moléculas se derivan de una secuencia consenso obtenida de un genoma de VHC que fue clonado a partir de un paciente infectado crónicamente con genotipo 1b (Koch *y cols.* 1999). A esta secuencia se le eliminó la región estructural y se le insertó en ese sitio el marcador de selección neomicina fosfotransferasa y el IRES del virus de la encefalomiocarditis. La transfección de la línea Huh-7 con este replicón y la posterior selección, reveló el crecimiento de un número bajo de células. El análisis de estas células arrojó que contenían ARN viral auto-replicante. La cantidad de ARN producido pudo ser detectada por *Northern blot* y se logró propagarlos durante 2 años. Las proteínas virales no estructurales se detectaron en el citoplasma, en

estrecha asociación con las membranas del RE, sugiriendo que este es el sitio de replicación viral (Lohmann *y cols.* 1999). Con posterioridad, utilizando clones permisivos de células Huh 7 se lograron replicones del genoma integro del VHC, aunque sin la obtención de partículas virales (Pietschmann *y cols.* 2002; Ikeda *y cols.* 2002). Este sistema ha sido muy útil para la evaluación de antivirales y en estudios sobre la replicación del VHC.

Al menos uno de estos sistemas de replicones genómicos ha producido partículas virales infecciosas para chimpancés (Wakita *y cols.* 2005). Haqshenas, G *y cols.* demostraron que el genoma de genotipo 2a quimérico para el gen P7 de genotipo 1b produce partículas virales *in vitro* (Haqshenas *y cols.* 2007).

Por otra parte, como parte de los esfuerzos para desarrollar modelos experimentales murinos para el VHC, se emplearon replicones derivados de la cepa JFH-1 de genotipo 2a y se logró establecer la replicación estable del VHC en células de hepatocitos y fibroblastos murinos. La replicación viral en las células murinas fue similar a la encontrada para las células Huh-7, aunque no fue posible detectar partículas virales infectivas (Uprichard *y cols.* 2006).

2.7 Modelos animales para el virus de la hepatitis C

El único modelo animal satisfactorio hasta el momento para reproducir la infección por el VHC es el chimpancé; el cual puede desarrollar infección aguda o persistente. Este modelo tiene un uso muy limitado por razones éticas y por el alto costo que representa el mantenimiento de estos animales bajo condiciones óptimas. Además, en esta especie la clarificación de la infección ocurre en mayor porcentaje que en humanos. Debido a esto, hay muchos estudios destinados a la búsqueda de un modelo animal más factible. Se plantea que el *Tupaia* (*T. belangeri chinensis*) en ciertas ocasiones se infecta con el VHC, desarrollando viremia, aunque los resultados son poco reproducibles (Xie *y cols.* 1998). Otro enfoque para estudiar la replicación del VHC y drogas anti-virales, ha sido la utilización del virus GB-B (GBV-B), un virus hepatotrópico, miembro de la familia *Flaviviridae*, y que infecta eficientemente a monos tamarinos (Simons *y cols.* 1995) y marmotas (Lanford *y cols.* 2003), como vector para la generación de virus recombinantes para Ags del VHC.

En 1995 un grupo de investigadores logró expresar el genoma completo del VHC en células del hígado de ratas, por medio de transferencia génica *in vivo* de un complejo formado por ADN unido a liposomas, aunque el análisis histológico del hígado no mostró evidencia de hepatitis (Takehara *y cols.* 1995).

Los ratones transgénicos han sido ampliamente usados en el estudio de varias enfermedades y en el caso de la hepatitis C se han obtenido varios resultados. Las proteínas estructurales han sido las más utilizadas en estas estrategias y especialmente la proteína de la cápsida (Kremsdorf *y cols.* 2007). Wakita y colaboradores obtuvieron ratones transgénicos que contenían un ADN correspondiente a los nt 294-3435 del VHC, detectándose las proteínas de la cápsida, la E1 y la E2 en los hepatocitos de los ratones. Con estos modelos se han obtenido evidencias del papel de estas proteínas en la patogénesis viral (Honda *y cols.* 1999; Naas *y cols.* 2005; Sarcar *y cols.* 2004).

Otra estrategia que se ha seguido es el uso de los llamados sistemas trómeros en los que se utilizan ratones inmunocomprometidos a los cuales se les implanta en el hígado hepatocitos humanos y luego se infectan con un agente determinado; esto se hizo para el VHB y se logró el desarrollo de viremia (Kato, 2001). Recientemente, un grupo de investigadores utilizó ratones SCID (del inglés, “Severe combined immunodeficiency”) a los que se les implantó hepatocitos humanos normales, generando hígados humanos quiméricos. Estos ratones se inocularon con suero humano infectado con el VHC y se demostró el desarrollo de la infección con altos títulos virales. La replicación viral fue confirmada por la detección de la cadena de ARN negativa. Las proteínas virales se localizaron en los nódulos de los hepatocitos y la infección logró propagarse durante tres generaciones de ratones (Mercer *y cols.* 2001).

Otro sistema novedoso utiliza ratas que son tolerizadas en su etapa embrionaria, a las que se les transplantan células Huh 7 después del nacimiento, lográndose que un 6 por ciento de los hepatocitos correspondan a la línea celular. Después de inocular los animales con un suero humano VHC positivo, un 30% de los hepatocitos humanos es positivo para la proteína de la cápsida (Wu *y cols.* 2005). Las características de estos modelos implican que si bien resultan útiles para determinados estudios, generalmente no son efectivos para la evaluación de la respuesta inmune de candidatos vacunales.

2.8 Uso de virus vaccinia recombinantes en estudios de protección

El conocimiento de los eventos inmunológicos que ocurren en el organismo, en presencia de patógenos intracelulares como el VHC, es muy limitado. Por esto se hace necesario desarrollar sistemas que permitan conocer qué tipo de respuesta es importante para la

eliminación del virus, y qué candidato vacunal pudiera conferir protección frente a una infección por el VHC.

Se han tratado de esclarecer los mecanismos de defensa que se desencadenan en la respuesta inmune cuando se realizan estudios de protección, prestando principal atención al papel de la respuesta celular. Se han hecho varios estudios utilizando distintos inmunógenos y varios modelos de reto, alguno de los cuales usan virus vaccinia (VV) recombinante.

La protección mediada por células frente a una infección por un VV recombinante ha sido evaluada en ratones, para analizar la contribución de los LTC respecto a las células T CD4⁺ y a la producción de ILs. En un estudio se utilizó la cepa de ratón C57BL/6 de haplotipo H-2^b que es capaz de generar respuesta de LTC frente a infecciones virales y la cepa B10.BR de haplotipo H-2^k, la cual no desarrolla respuesta de LTC ante una infección viral. Ambas cepas de ratones mostraron un nivel similar de protección frente al reto con bajas dosis de VV recombinante. Cuando se realizó la eliminación de células CD8⁺, la cepa C57BL/6 mostró una disminución del nivel de protección; sin embargo fue altamente resistente a la eliminación de las células T CD4⁺ y al tratamiento con Acs anti- IFN- γ y anti- TNF- α . En estos ensayos de eliminación de células CD8⁺, CD4⁺ y tratamientos con Acs anti- IFN- γ y anti- TNF- α , en animales B10.BR se obtuvieron resultados totalmente opuestos. Por otra parte, al aumentar la dosis del VV recombinante en el reto, los animales H-2^b fueron capaces de eliminar el virus, sin embargo los H-2^k no pudieron controlar la infección y murieron (Binder *y cols.* 1991). Estos resultados sugieren que las células T CD4⁺ pueden mediar la protección antiviral, pero su eficiencia es menor comparada con la protección mediada por LTC.

El uso de un VV recombinante expresando la nucleoproteína del virus de la estomatitis vesicular, como sistema de reto fue descrito en 1994 por Bachman y colaboradores (Bachmann *y cols.* 1994). A partir de aquí se han obtenido VV recombinantes para diferentes Ags de varios patógenos y estos han demostrado ser un buen sistema para estudiar la respuesta inmune celular frente a diferentes Ags. Un VV recombinante para el gen I1 del VPH fue exitosamente usado para comprobar la protección conferida por partículas similares a este virus (Marais *y cols.* 1999). Para el VIH hay varios trabajos donde estudian la protección conferida por diferentes candidatos vacunales diseñados a partir de ADN (Kent *y cols.* 1998), o vacunas peptídicas (Kiszka *y cols.* 2002). También se han hecho estudios para ver qué vía de inoculación es la más adecuada, analizando cuál confiere mayor protección frente a un reto

con VV recombinante (Belyakov *y cols.* 1998). Además, para VIH se ha obtenido protección ante una infección con VV recombinante en el modelo murino, lo cual coincide con estudios hechos en macacos retados con la cepa del VIH-1 (Kent *y cols.* 1998). Esto demuestra la efectividad del modelo del VV recombinante para su uso en estudios de protección, ya que los resultados obtenidos previamente en ratones, pueden ser extrapolados a otros modelos animales. Esto tiene grandes ventajas para el estudio de enfermedades como la hepatitis C, y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, cuyos agentes causales no se replican en los modelos animales de laboratorio usados tradicionalmente.

Para el caso del VHC hay pocos trabajos en los cuales se establezca un estudio de protección con VV recombinante para cualquiera de las proteínas virales. En uno de los trabajos sobre el tema, se diseñó una estrategia de inmunización que consistió en inocular por vía oral una cepa de *Salmonella typhimurium*, codificante para la proteína NS3 del VHC, en ratones transgénicos. El posterior reto con VV recombinante para NS3 demostró que el inmunógeno confería protección ya que el título viral se redujo significativamente en los animales inmunizados (Wedemeyer *y cols.* 2001).

Además, se ha demostrado que las células efectoras de animales sensibilizados con Ags del VHC son capaces de reconocer y destruir células blanco infectadas por VV recombinante para la proteína de la cápsida del VHC (Hiranuma *y cols.* 1999). Esto indica que los Ags del VHC expresados de forma heteróloga por el VV, son procesados y presentados correctamente, induciendo una respuesta celular. Esto demuestra que el VV recombinante puede resultar un buen sistema para los estudios de protección anti-VHC por lo que este tipo de ensayo amerita ser estudiado.

Particularmente, se han empleado VV recombinantes para los Ags estructurales del VHC como poliproteína en estudios de protección (Majid *y cols.* 2006). También se han empleado VV recombinantes para Ags individuales de la región estructural, como la proteína F de genotipo 1a (Troesch *y cols.* 2005). Sin embargo la mayoría de estos virus recombinantes contienen secuencias de genotipo 1a, debido a la mayor facilidad para contar con aislamientos de este genotipo en los laboratorios (Troesch *y cols.* 2005; Engler *y cols.* 2004; Large *y cols.* 1999). Se cuenta con el precedente del empleo de un VV recombinante para la región estructural de genotipo 1b cepa J, en estudios de protección por parte de Murata *y cols.* 2003, este mismo virus recombinante fue empleado por Majid *y cols.* para evaluar las

potencialidades del virus de la estomatitis vesicular como vehículo para vacunas frente al VHC. Otro VV recombinante para Ags de la región estructural del VHC de genotipo 1b cepa BK fue generado por Pancholi *y cols* 2003, aunque este recombinante también contenía las proteínas no estructurales NS2 y NS3 (Pancholi *y cols*. 2003).

2.9 Estrategias para el desarrollo de vacunas contra el virus de la hepatitis C

Varios enfoques han sido empleados para desarrollar una vacuna contra el VHC; entre estos se destacan el empleo de proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, VLP (del inglés, “virus like particles”), virus recombinantes y ADN desnudo.

2.9.1 Vacunas de subunidades basadas en proteínas virales, péptidos o partículas similares a virus

En 1994, en un estudio pionero, Choo *y cols* describieron el primer intento de inmunizar chimpancés contra el VHC utilizando heterodímeros de E1/E2 obtenidos a partir de células de mamíferos, formulados con MF-59 y muramil dipéptido (Choo *y cols*. 1994). Se observó una respuesta de Acs fuerte, aunque transitoria contra estos Ags. Los animales se retaron en el pico de la respuesta. Cinco de los 7 animales inmunizados resistieron totalmente al reto con el virus homólogo. Dicha protección ha sido correlacionada con la presencia de Acs capaces de inhibir la unión de E2 a células humanas (Rosa *y cols*. 1996). Sin embargo, no se observó protección contra el reto con un aislamiento heterólogo del mismo genotipo. Estos datos sugirieron que la inmunidad inducida fue aislamiento específica. Ninguno de estos animales inmunizados desarrolló la infección crónica (Prince *y cols*. 2001).

En otro estudio, la proteína recombinante E1 proveniente de un aislamiento del genotipo 1b fue purificada como homodímeros que se asociaban en partículas de 9 nm de diámetro aproximadamente (Maertens *y cols*. 2000). Dos chimpancés infectados crónicamente con el VHC recibieron 9 dosis de 50 µg de la proteína E1 recombinante. La inmunización mejoró la histología hepática, determinó la desaparición de los Ags virales del hígado y disminuyó los niveles de alanina amino transferasa. Sin embargo, los niveles de ARN viral en suero no cambiaron durante el tratamiento, así como la inflamación hepática después de concluir el tratamiento. Se observó una asociación entre los altos niveles de Acs contra E1 y el mejoramiento temporal de la enfermedad (Maertens *y cols*. 2000). Teniendo en cuenta estos precedentes este grupo desarrolló un estudio clínico Fase I con individuos sanos, que se inmunizaron con 20 µg de una proteína E1 obtenida en células Vero. Después de tres dosis

por vía intramuscular (i.m) con este candidato vacunal, se obtuvo un 100% de seroconversión y de respuesta linfoproliferativa frente a E1 en los individuos en estudio (Leroux-Roels *y cols.* 2004). Posteriormente se desarrolló otro estudio Fase I con este mismo candidato, pero administrando 4 µg por vía subcutánea y sin adyuvante. En este segundo caso se inmunizaron individuos sanos, individuos con infección autoresuelta e individuos con infección crónica por el VHC. La reducción en la dosis y el cambio en la formulación provocaron que se obtuviera una respuesta humoral débil en solo el 30% y respuesta proliferativa en solo el 10% (Leroux-Roels *y cols.* 2005).

Otras formulaciones basadas en proteínas virales han sido estudiadas fundamentalmente en ratones (Harase *y cols.* 1995; Alvarez-Obregon *y cols.* 2001). Particularmente, la formación de VLP a partir de proteínas recombinantes y su empleo como vacunas resulta muy atractiva porque estas formaciones simulan con frecuencia las propiedades morfológicas, biofísicas y antigénicas de los virus. Partículas de esta naturaleza, obtenidas a partir de células de insecto infectadas con un baculovirus recombinante conteniendo la secuencia de los Ags de la región estructural del VHC, han sido capaces de generar una respuesta inmune tanto humoral como celular fuerte contra estos Ags (Baumert *y cols.* 1999; Lechmann *y cols.* 2001). La inmunogenicidad es altamente dependiente de la formación de la partícula. En otra variante, partículas compuestas por la proteína de la cápsida formulada con complejos inmunoestimuladores indujeron también una respuesta inmune proliferativa y citotóxica específica fuerte en *macacos rhesus* (Polakos *y cols.* 2001). Aunque los resultados obtenidos con los candidatos vacunales basados en subunidades proteicas recombinantes son alentadores, la respuesta inmune inducida por estas variantes se dirige fundamentalmente hacia la rama humoral, siendo frecuentemente de corta o mediana duración y específica para el aislamiento en que se basa.

El uso de péptidos conteniendo epitopos para linfocitos CD4+ y CD8+ representa un enfoque alternativo de inmunización. La identificación de varios epitopos para células T CD4+ y CD8+ en la poliproteína viral del VHC que pudieran ser importantes en la clarificación viral, apoyan la estrategia de usar péptidos sintéticos como candidatos vacunales contra este patógeno. Diferentes péptidos solos o lipidados, conteniendo epitopos de C, NS4 y NS5, han inducido una fuerte respuesta de tipo T citotóxica en ratones (Shirai *y cols.* 1996; Oseroff *y cols.* 1998; Hiranuma *y cols.* 1999). También ha sido evaluado este enfoque de inmunización

para inducir Acs contra la RHV-I del VHC, con algunos resultados alentadores en conejos y chimpancés (Esumi *y cols.* 1999), (Shang *y cols.* 1999). El principal obstáculo para el enfoque de vacunas peptídicas radica en el limitado espectro epitópico que pueden abarcar y en que aquellos péptidos sin función auxiliadora son pobres inmunógenos.

Recientemente se desarrolló un estudio Fase I con un candidato vacunal basado en péptidos sintéticos del VHC y poli-Arginina. La mezcla de péptidos consiste en 5 péptidos altamente conservados, lo que debe minimizar el escape viral. Sin embargo la respuesta de linfocitos T CD8+ se dirigió principalmente al péptido de la NS3 (1073-1081 aa), por lo que este objetivo no se cumplió. En el estudio se inmunizaron individuos sanos positivos para HLA A2, por vía subcutánea 1 vez al mes, durante 4 meses. Las dosis de la mezcla de péptidos variaron desde 0,5 hasta 5 mg. En todos los grupos del estudio el inmunógeno, IC41, fue bien tolerado y el evento adverso más frecuente fue dolor de cabeza. IC41 indujo respuesta inmune en todos los grupos. Los mayores porcentos de respuesta se encontraron en los grupos con dosis altas (2,5-5 mg) y el incremento del número de dosis se asoció a un mayor porcentaje de respuesta y respuestas más robustas. La poli-Arginina fue necesaria para la inducción de respuesta de secreción de IFN- γ (Firbas *y cols.* 2006).

Otro candidato peptídico que llegó a Fase I, es la inmunización personalizada con péptidos derivados de secuencias de genotipo 1b. El estudio se desarrolló en pacientes no respondedores a tratamiento con IFN y positivos a HLA-A24. Se examinó la respuesta de células mononucleares de sangre periférica e IgG pre-vacunación frente a los 4 péptidos propuestos y solo los péptidos reactivos se administraron cada dos semanas en dos ciclos de inmunizaciones, donde todos los pacientes recibieron al menos 14 inmunizaciones. Las dosis fueron de 0,3 1 y 3 mg administradas en adyuvante incompleto de Freund, por vía subcutánea en el abdomen. Este inmunógeno fue bien tolerado sin toxicidad severa. Después de la séptima inmunización se produjo incremento de la respuesta LTC e IgG frente a al menos 1 de los péptidos inoculados. Sin embargo, no se logró la reducción en más de 1 log en ninguno de los pacientes (Yutani *y cols.* 2007).

2.9.2 Uso de vectores virales para la inmunización

Al igual que para otras infecciones persistentes, para la obtención de candidatos vacunales contra al VHC, se han utilizado vectores virales recombinantes. Los adenovirus recombinantes se han empleado como vehículos de regiones del VHC debido a su

hepatotropismo, su potencia para inducir inmunidad tanto humoral como celular y la posibilidad de ser administrados tanto parenteral como oralmente. Adenovirus recombinantes conteniendo los genes codificantes para las proteínas estructurales del VHC inducen una respuesta de Acs contra cada una de estas proteínas (Makimura *y cols.* 1996). Además, después de inmunizar ratones con adenovirus recombinantes para C y E1, se detecta una respuesta de tipo T citotóxica específica contra estos Ags (Bruna-Romero *y cols.* 1997).

El empleo de otros virus recombinantes, como virus de viruela de canarios, conteniendo diferentes genes del VHC ha inducido fuertes respuestas de tipo T citotóxicas y auxiliaadoras en ratones (Pancholi *y cols.* 2003). Ninguno de estos virus se replica en células de mamíferos, pero pueden infectar y expresar eficientemente las proteínas codificadas por su genoma en el citoplasma.

Con este sistema de inmunización basado en virus recombinantes, se puede lograr una buena respuesta citotóxica celular mediada por linfocitos CD8⁺, ya que se asegura que el Ag sea procesado en el interior de la célula infectada y los epitopos se presentan en el contexto del sistema principal de histocompatibilidad tipo I (MHC I, del inglés, “Major Histocompatibility Complex Class I”) (Limbach *y cols.* 1996). Igualmente, se conoce que los vectores poxvirales activan la inmunidad humoral durante su replicación (Cox, 1992). Un virus de viruela aviar (VVA) recombinante para Ags del VIH e IFN- γ estimuló la respuesta de células T en macacos (Dale *y cols.* 2000). Los resultados más alentadores se han obtenido en regímenes de sensibilización/recuerdo empleando vacunas de ADN, VLPs y proteínas, entre otras (Pancholi *y cols.* 2003; Zanotto *y cols.* 2003).

Otra estrategia para optimizar la inmunogenicidad de poxvirus recombinantes para Ags del VHC es la manipulación de la localización subcelular de los Ags. Específicamente se han evaluado la respuesta humoral y LTC en ratones inmunizados con virus Ankara modificada (del inglés “modified virus Ankara”, MVA) recombinantes para las proteínas de la envoltura E1 y E2 nativas, truncadas y secretadas y expresándose como un heterodimero quimérico localizadas en membrana plasmática. Se encontró que cuando los Ags son secretados o permanecen unidos a membrana se favorece la respuesta humoral y se produce un ligero incremento en la respuesta celular cuando los Ags se exponen en la superficie de la célula (Abraham *y cols.* 2004). Adicionalmente, se han evaluado esquemas de inmunización

acelerados con vistas a mejorar la respuesta obtenida con MVA recombinantes para proteínas no estructurales del VHC (Fournillier *y cols.* 2007).

2.10 Poxvirus

2.10.1 Morfología general

Los poxvirus son los mayores virus de animales y pueden ser visualizados, aunque solo como partículas sin rasgos detallados, al microscopio de campo claro. La microscopía electrónica ha revelado que los viriones son ovales o esféricos, de 200 a 400 nm de largo. Su superficie externa contiene crestas en filas paralelas o, como en el caso de los parapoxvirus, en una hélice continua. Muestran una bicapa lipoproteica llamada membrana externa, que rodea a la cápsida. En los poxvirus de vertebrados la cápsida es bicóncava. El examen detallado de la sustancia interna de la cápsida revela una nucleoproteína fibrosa, torcida y plegada. Por fijación del material nuclear fue posible observar estructuras globulares, electrodensas, interconectadas por fibras de ADN (Moss, 2001).

2.10.2 Genoma

Los poxvirus contienen un genoma lineal de doble cadena de ADN que varía entre 130 000 pares de bases (pb) en Parapoxvirus y 300 000 pb en Avipoxvirus y difieren ampliamente en su contenido de G+C. Los rasgos estructurales básicos de este genoma son: un lazo terminal cerrado en ambos extremos (Baroudy *y cols.* 1982), repeticiones en tandem, repetición terminal invertida y una región central altamente conservada (Moss, 2001).

Entre las características más relevantes del genoma viral se encuentran la ausencia de intrones y el aprovechamiento al máximo del genoma, aunque es muy raro el solapamiento de los genes. Se ha podido definir que los genes esenciales para la supervivencia del virus se encuentran ubicados hacia el centro del genoma, mientras que hacia los extremos se ubican la mayoría de los genes no esenciales, como los que definen su rango de hospedero (Goebel *y cols.* 1990).

2.10.3 Ciclo de replicación

Generalmente se describe el ciclo replicativo del VV por ser este el miembro prototipo de la familia y el primero en utilizarse como vector viral (Hruby, 1990). El virus se adsorbe a las células susceptibles y entra, ya sea por penetración directa o por viropexis. Una vez en el citoplasma, la envoltura viral es eliminada por enzimas del hospedero y comienza la expresión de los genes virales tempranos. Esta fase de transcripción se lleva a cabo por enzimas virales que han sido empacadas en el virión (Jones *y cols.* 1987). Estas enzimas

incluyen la ARN polimerasa dependiente de ADN y la poli(A) polimerasa entre otras (Miner *y cols.* 1988).

Entre los productos de los genes tempranos inmediatos se encuentran por ejemplo la ADN polimerasa (Jones *y cols.* 1984), la timidina quinasa (del inglés, “Thymidine Kinase”, TK) (Hruby *y cols.* 1982) y la ribonucleótido reductasa (Tengelsen *y cols.* 1988), así como otras enzimas necesarias para catalizar la ruptura de la cápsida y la liberación del ADN viral.

A pesar de la diferencia en tamaño, la TK de 20 kDa de poxvirus tiene homologías con la TK de 40 kDa de humanos y pollos (Moss, 2001).

Aunque el VV no transforma las células, tampoco es considerado lítico. Es capaz de moverse de una célula infectada a una no infectada, vecina, por fusión celular y formación de sincicios, lo que provoca la formación de placas y por lo tanto, provee de un método conveniente para la purificación parcial del virus (Hruby, 1990).

2.10.4 Ventajas y desventajas del uso de los poxvirus como vectores vivos

La replicación citoplasmática de estos virus y la codificación en su genoma de gran parte de las enzimas y factores requeridos para la transcripción, replicación y traducción, son las mayores ventajas para su uso como vectores. Los poxvirus son capaces de perder gran parte de la información genética sin que se afecte su replicación *in vitro* y de aceptar, igualmente, gran cantidad de información (hasta 25 kilobases) (Limbach *y cols.* 1996). Así, múltiples Acs del mismo o de varios patógenos pueden ser expresados por un único recombinante, lo que hace posible la obtención de candidatos vacunales multivalentes (Pincus *y cols.* 1995).

La expresión a través de los poxvirus recombinantes permite la realización de las modificaciones post-traduccionales y el tráfico intracelular normal de las proteínas, las cuales son presentadas en una conformación similar a la nativa (Dubuisson *y cols.* 1994). Esto es importante debido a que muchos Acs neutralizantes están dirigidos contra epitopos conformacionales que aparecen en la proteína nativa que se necesita existan en las variantes recombinantes.

Con este sistema viral se puede lograr una buena respuesta citotóxica celular mediada por linfocitos T CD8⁺, ya que se asegura que el Ag se procese en el interior de la célula infectada y los epitopos se presenten en el contexto del MHC I (Limbach *y cols.* 1996). Igualmente se conoce que los vectores poxvirales activan la inmunidad humoral durante su replicación (Cox, 1992).

El VV constituyó un agente adecuado para la inmunización, sus preparaciones son estables, el costo de producción es bajo, la administración es fácil y la inducción de la inmunidad es de larga duración (Vazquez-Blomquist, 1998).

A pesar de lo anterior, el amplio uso del VV en la lucha contra la viruela humana demostró la aparición, en algunos casos, de encefalitis con desmielinización, e infección progresiva con el VV, así como *eczema vaccinatum* (Lane y cols. 2003). Las complicaciones estuvieron asociadas a la edad, el estado inmunitario de los vacunados y a las cepas de VV usadas.

Es debido a esto que en la actualidad se explora el uso de otros vectores atenuados derivados del VV y de vectores con rango de hospedero más restringido como los avipoxvirus, que puedan ser usados en vacunas seguras, si se mantienen las propiedades inmunológicas deseadas, a la vez que los genes virulentos son eliminados del genoma viral (Beukema y cols. 2006; Kent y cols. 2007).

2.10.5 Avipoxvirus

El género *Avipoxvirus* agrupa virus que infectan a las aves y cuya replicación en mamíferos es abortiva. Esto último ofrece una barrera de seguridad contra la ocurrencia de complicaciones asociadas con o inducidas por la vacuna (Pincus y cols. 1995). Sin embargo, los avipoxvirus recombinantes no se replican en células de mamíferos, existe una síntesis *de novo* de las proteínas recombinantes, que induce una respuesta inmune contra las mismas (Limbach y cols. 1996).

El VVA es el prototipo de este género. En muchos trabajos se han definido regiones genómicas del VVA con organización semejante al VV (Zantinge y cols. 1996) y en otros se han encontrado segmentos con ciertas diferencias. Tal es el caso del gen de la TK, el cual está translocado a otra posición (Boyle y cols. 1987). Se ha comprobado que es posible la transcripción de genes en el VVA bajo promotores del VV y viceversa, aunque puedan existir diferencias en cuanto a la eficiencia de la transcripción (Kumar y cols. 1990).

Su eficacia como vector para la inmunización fue demostrada en 1988 por Taylor y colaboradores, tanto en especies aviares como no aviares. Específicamente se demostró su utilidad en la inmunización de mamíferos con el uso de un VVA recombinante que expresa la glicoproteína del virus de la rabia. La inoculación con este recombinante protegió a gatos, perros y ratones ante el reto con el virus salvaje (Taylor y cols. 1988).

El VVA también ha mostrado ser eficiente como vector en la generación de respuestas inmunes satisfactorias contra Ags del VIH, fundamentalmente involucrado en regímenes de inmunización basados en dosis de sensibilización y de recuerdo. Cuando se sensibilizaron ratones con un MVA recombinante y luego recibieron una dosis de recuerdo con VVA recombinante, ambos expresaban polipéptidos multiepitópicos de la región V3 del VIH 1, se encontró que se incrementaba el número de células secretoras de IFN- γ específicas. El incremento obtenido con esta combinación fue superior al obtenido al sensibilizar con ADN y dar dosis de recuerdo con MVA o con VVA recombinantes (Vazquez-Blomquist *y cols.* 2004). Por otro lado, un candidato vacunal contra el VIH basado en un VVA recombinante para los Ags Gag y Pol del VIH 1, y que coexpresaba IFN- γ , estimuló las respuestas de células T en macacos (Dale *y cols.* 2000).

Por otra parte, los VVA recombinantes han sido exitosos en ensayos clínicos Fase II en el tratamiento del cáncer de próstata (Arlen *y cols.* 2006) y demostraron ser seguros como vacuna terapéutica contra el VIH en un estudio en macacos (De Rose *y cols.* 2005). Además, el VVA ha sido introducido con éxito en terapias contra tumores intestinales (Kudo-Saito *y cols.* 2004) y ha generado fuertes respuestas de células T contra la malaria (Cottingham *y cols.* 2006).

Hasta el momento no se han empleado VVA recombinantes en estrategias vacunales frente al VHC, aunque se generó un VVA recombinante conteniendo la secuencia de la proteína de la cápsida del VHC para estudios *in vitro* de esta proteína (Yap *y cols.* 1998).

3. Materiales y Métodos

3.1 Enzimas, reactivos y marcadores de peso molecular

Se utilizaron las enzimas de restricción *AccI*, *XbaI*, *EcoRV*, *ClaI*, *BglIII*, *BamHI*, *PstI* y *SmaI* suministradas por la casa comercial Promega (Wisconsin, EE.UU). Las condiciones óptimas se establecieron mediante reacciones analíticas.

Se emplearon además, las enzimas de modificación RNAsa, T4 Ligasa (Pharmacia, Suecia), y Taq polimerasa (Promega, Wisconsin, EE.UU).

Los reactivos químicos empleados fueron suministrados generalmente por la casa comercial Merck (Darmstadt, Alemania). En los procedimientos donde se emplearon reactivos de otras casas comerciales se especifican las fuentes de los mismos.

Lambda *HindIII* (New England Biolabs, MA, EE.UU): Marcador de peso molecular para ADN producto de la digestión del ADN del fago Lambda con *HindIII*. Las bandas que aparecen en un gel de agarosa al 0,8 % son las siguientes (kb): 23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,3; 2,0; 0,56; 0,13.

Marcador de peso molecular de amplio rango para proteínas (BioRad, California, EE.UU) que contiene las siguientes proteínas: Miosina (200 kDa), β -Galactosidasa (116,3 kDa), Fosforilasa b (97,4 kDa), Albumina sérica (66,2 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anhidrasa Carbónica (31 kDa), Inhibidor de Tripsina (21,5 kDa), Lisozima (14,4 kDa), Aprotinina (6,5 kDa).

3.2 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados se sintetizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, La Habana, Cuba) por el método del β -cianoetilfosforamidito (Sinha y cols. 1984). Los oligonucleótidos 6052 y 6053 se diseñaron para obtener un adaptador con extremos compatibles con sitios *XbaI* y *BglIII*.

6052 5'GATCTCAGCCACTAGCGAAT 3'

6053 5'CTAGATTCGCTAGTGGCTGA 3'

Los oligonucleótidos 3333 (cebador 5') y 6418 (cebador 3') se utilizaron en la RCP para comprobar la identidad del VVA recombinante. El oligonucleotido 6418 es complementario a la región 1863-1879 nt del plasmidio pFP67xgpt, que se extiende de la posición +35 a +53 nt con respecto al último sitio de restricción del sitio múltiple de clonaje en dicho plasmidio. El

oligonucleótido 3333 es complementario a la secuencia 353-376 nt de la poliproteína del VHC.

6418: 5' TTTACGAGCTTGTCGAAG 3'

3333: 5' CATGGATTTGGGTAAGGTCAT 3'

Condiciones utilizadas para la obtención del adaptador

Se mezclaron 25 pmol de cada oligonucleótido en una solución de tris-HCl 100 mM y MgCl₂ 10 mM, pH 8. Dicha solución se mantuvo 1 minuto (min) a 95°C y 10 min a 70°C. Se dejó enfriar a 28°C y luego se incubó 1 hora a 40°C. Se conservó a -20°C.

3.3 Proteínas recombinantes

La proteína Co.120 es una proteína recombinante que comprende los primeros 120 aa de la proteína de la cápsida del VHC. Es producida a partir de la cepa BL-21(DE3) de *Escherichia coli*. Se purifica hasta un 90% mediante procedimientos de lavado del precipitado de ruptura y cromatografía de exclusión molecular descritos previamente (Dueñas-Carrera *y cols.* 1999).

Las proteínas E1.340 y E2C se obtienen a partir de la cepa BL-21(DE3) de *E. coli*, con más de 85% de pureza, a través de una combinación de procedimientos de solubilización diferencial y cromatografía de exclusión molecular. La proteína E1.340 abarca la región comprendida entre los aa 192-340 (Lorenzo *y cols.* 2000) y la proteína E2C abarca la región comprendida entre los aa 384-605 (Duenas-Carrera *y cols.* 2001) de la poliproteína viral.

La proteína E2.680 se obtuvo a partir de la levadura *Picchia pastoris* transformada, con más de 90% de pureza. Esta proteína abarca la región comprendida entre los aa 384-680 de la poliproteína viral (Martinez-Donato *y cols.* 2006).

3.4 Plasmidios

El plasmidio pAEC-K6 es un vector para la inmunización con ADN, que posee un sitio múltiple de clonaje para la inserción de genes heterólogos bajo el control de la unidad transcripcional integrada por el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano, y las señales de terminación y procesamiento del ARNm provenientes del virus 40 de Simio (Herrera *y cols.* 2000).

El plasmidio pIDKE2 es un derivado del plasmidio pAEC-K6 que tiene insertado el fragmento codificante para los aa 1-650 (Cápsida-E1-E2) de la poliproteína viral del aislamiento cubano del VHC de genotipo 1b (Morales, 1998), en los sitios compatibles de dicho plasmidio digerido *XbaI/EcoRV* (Duenas-Carrera *y cols.* 2002).

El plasmidio pIDKCo es un derivado del plasmidio pAEC-K6 que tiene insertado el fragmento codificante para los aa 1-176 (Cápsida) de la poliproteína viral del aislamiento cubano del VHC de genotipo 1b (Morales, 1998), en los sitios compatibles de dicho plasmidio digerido *XbaI/EcoRV* (Duenas-Carrera *y cols.* 2002).

El plasmidio pFP67xgpt (Vazquez-Blomquist *y cols.* 2002), contiene la secuencia de los ORF (del inglés, “Open reading frames”) 6 y 7 del fragmento *BamHI* de 11,2 kb del genoma de VVA. Estas secuencias permiten la recombinación homóloga entre el plasmidio pFP67xgpt y el genoma del VVA. En el plasmidio pFP67xgpt, las secuencias correspondientes a los ORF 6 y 7 flanquean el promotor sintético temprano/tardío (pE/L) y el gen codificante para la enzima Xantina guanina fosforribosil transferasa (*Xgpt*) bajo el control del promotor p7.5K del VV. El plasmidio pFP67xgpt posee además un gen que confiere resistencia a ampicilina y un origen de replicación para su amplificación en bacterias.

El plasmidio pHLZ posee regiones del gen de la hemaglutinina del VV, que permiten la recombinación homóloga del plasmidio con el genoma de este virus. El plasmidio pHLZ incluye además el gen codificante para la enzima β -galactosidasa que permite la selección de los virus recombinantes en medio con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-tiogalactopiranosido). El plasmidio pHLZ también posee un gen que confiere resistencia a ampicilina y un origen de replicación para su amplificación en bacterias (Vazquez *y cols.* 1999).

3.5 Cepas de bacterias y células de organismos superiores empleadas

Se utilizó la cepa de *E. coli* DH10B: [*F'*, *mcr A*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80, *lacZ* Δ *M15*, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD39*, Δ (*ara-leu*)7697, *galK*, *galU*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*] (Sheng *y cols.* 1995) para los estudios de clonación en bacterias.

Las células P815 (ECACC/ACC1) son una línea de mastocitoma murino H-2d (Ralph *y cols.* 1974).

Las células BSC40 se derivadas de la línea BSC-1 (ATCC CCL-26). Son obtenidas a partir de células de riñón de mono (Brockman *y cols.* 1974).

3.6 Obtención de cultivos primarios de fibroblastos de embriones de pollo

Se emplearon huevos fértiles con 9-11 días de incubación y se siguió el método de desagregación celular con tripsina (Silim *y cols.* 1981).

3.7 Medios de cultivo para células de organismos superiores

DMEM (del inglés, “Dulbbeco’s Modified Eagle Medium”): de la casa comercial Gibco BRL, NY, EEUU; suplementado con glutamina 2 mM (Gibco BRL, NY, EEUU), piruvato de sodio 1 mM (Gibco BRL, NY, EEUU), estreptomina 100 µg/mL (Sigma, St Louis, EE.UU), penicilina 100 U/mL (Sigma, St Louis, EE.UU).

DMEM 2%: DMEM conteniendo además 2% (v/v) de suero fetal bovino (SFB).

DMEM sólido: Se prepara mezclando iguales cantidades de DMEM doblemente concentrado al 4% (v/v) de SFB y una solución al 2% (p/v) de agarosa de bajo punto de fusión.

DMEM-MXH: DMEM 2% conteniendo además ácido micofenólico 25 µg/mL (Sigma, St Louis, EE.UU), xantina 250 µg/mL (Sigma, St Louis, EE.UU), hipoxantina 15 µg/mL (Sigma, St Louis, EE.UU).

DMEM-MXH sólido: DMEM sólido conteniendo además ácido micofenólico 25 µg/mL, xantina 250 µg/mL, hipoxantina 15 µg/mL.

RPMI (del inglés, “Roswell Park Memorial Institute Medium 1640”): de la casa comercial Boheringer Mannheim, Alemania, suplementado igual que el DMEM.

RPMI 7%: RPMI conteniendo además 7% (v/v) de SFB.

RPMI 10%: RPMI conteniendo además 10% (v/v) de SFB.

3.8 Anticuerpo monoclonal y sueros policlonales

En los ensayos de *Western blotting* se empleó el anticuerpo monoclonal (AcM) HepC-1 (CIGB, Sancti Spiritus) (Falcon *y cols.* 1999) que reconoce la región comprendida entre los aa 5-35 de la proteína de la cápsida del VHC y un suero policlonal contra la proteína E2 del VHC obtenido en conejos (Martinez-Donato *y cols.* 2000). Además, se empleó una mezcla de sueros anti-VHC positivos (UMELISA, Centro de Inmunoensayo) de 10 individuos infectados crónicamente, provenientes de la seroteca del Departamento Hepatitis C del CIGB. También se emplearon sueros humanos anti-VHC negativos de 3 individuos sanos obtenidos de la referida seroteca.

3.9 Virus

Se empleó la cepa salvaje de VV Western Reserve (WR) (Bronson *y cols.* 1941).

Se empleó la cepa FP9 de VVA, que se obtuvo a partir de la cepa HP-438. Brevemente, la cepa HP-438, derivada de la cepa patogénica HP-1, fue atenuada por seis pases en fibroblastos de embriones de pollo (FEP), dos en membrana corioalantoidea y 438 pases en

FEP (Mayr y cols. 1966). Una placa viral derivada de HP-438 y purificada tres veces fue pasada otras seis veces para constituir el stock viral de FP9 (Mockett y cols. 1992).

3.10 Procesamiento de los sueros

3.10.1 Adsorción de anticuerpos anti-FP9 de sueros humanos

Los sueros humanos que fueron empleados en experimentos de *Western blotting*, podían contener anticuerpos que reconocieran epitopos presentes en FEP infectados con FP9. Con el objetivo de eliminar dichos anticuerpos se siguió el procedimiento descrito a continuación. Se tomaron FEP previamente infectados con el virus FP9, los cuales fueron resuspendidos en 1 mL de H₂O. Esta preparación se subdividió en tres partes iguales. La primera de estas fracciones se centrifugó a 1000 xg durante 10 min y luego se desechó el sobrenadante. Al precipitado obtenido se le añadieron 500 µL de solución salina tamponada de fosfato (SSTF) (NaCl 0,1 M, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, pH 7,2)-Tween 20 al 0,05% (v/v) (SSTF-T). La segunda fracción fue tratada bajo las mismas condiciones que la primera fracción hasta la resuspensión del precipitado en 500 µL de SSTF-T. A partir de ese punto, se procedió a sonicar el material cinco veces a 40 amplitudes en un sonicador de copa (Cole Palmer, EE.UU), con 1 min de incubación en hielo entre un ciclo y otro. A la tercera fracción se le añadieron 170 µL de H₂O y se calentó 10 min a 95°C. Posteriormente, se mezclaron 500 µL de cada fracción procesada y se adicionó todo el volumen a 1 mL de la mezcla de sueros humanos anti-VHC positivos o anti-VHC negativos y se completó a 10 mL con leche descremada (Oxoid, Cambridge, Reino Unido) al 2% (p/v) en SSTF. Esta mezcla se incubó 1 h a 37°C, luego 2 h a 25-28 °C, y finalmente 12 h a 4°C. A continuación, se centrifugó a 1000 xg durante 15 min, y se desechó el precipitado formado.

3.10.2 Obtención de sueros de ratón y monos

En las semanas indicadas se extrajeron 200 µL de sangre a cada ratón. Este volumen se incubó 1 hora a 37°C y luego 1 hora a 4°C. A continuación, se centrifugó 15 min a 8600 xg. El suero se colectó y conservó a -20°C hasta su análisis.

En el estudio en monos se extrajo 1 mL de sangre a cada animal y para la obtención del suero se procedió como se describe en el párrafo anterior.

3.11 Métodos de Biología Molecular

3.11.1 Técnicas generales de Biología Molecular

La determinación de concentración de ADN, la digestión de ADN con enzimas de restricción, la electroforesis de ADN en geles de agarosa, la recuperación y purificación de ADN fraccionado de geles de agarosa de bajo punto de fusión, así como el ligamiento de fragmentos de ADN con el uso de la ADN ligasa del bacteriófago T4, la preparación de células competentes y la transformación de bacterias, se realizaron básicamente de acuerdo a los procedimientos descritos por Sambrook *y cols* (Sambrook *y cols*, 1989), y según las recomendaciones de los fabricantes de las diferentes enzimas.

3.11.2 Purificación de plasmidio

La purificación de ADN plasmídico de *E. coli*, a escala masiva fue desarrollada esencialmente según el protocolo descrito por Sambrook *y cols* (Sambrook *y cols.*, 1989). En particular, el ADN plasmídico empleado en la inmunización de los animales se purificó por una modificación del método descrita por Horn *y colaboradores* (Horn *y cols.* 1995). Antes de ser administrados a los animales, los plasmidios se analizaron por digestión enzimática para comprobar su identidad.

3.11.3 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se realizó esencialmente según el método de Sanger (Sanger *y cols.* 1977) en un secuenciador automático ALF express II (Amersham Pharmacia Biotech), mediante el juego de reactivos ThermoSequenaseTM CyTM 5 Dye terminator^{Kit} (Amersham Pharmacia Biotech).

3.12 Obtención de virus de viruela aviar y virus vaccinia recombinantes para antígenos del virus de la hepatitis C

3.12.1 Transfección usando lipofectamina

Se sembraron placas de 60 mm de diámetro (P60) (Costar, NY, EE.UU) con FEP para ser infectados con VVA y con células BSC40 para infectarse con VV. La infección se realizó a 1 y 0,05 unidades formadoras de placas/célula (multiplicidad de infección: MOI), respectivamente, y se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ por 2 h en DMEM suplementado. Se les retiró el medio y se les adicionaron 5 mL de DMEM 2% y se incubaron por otras 2 h. Se diluyeron por separado 10 µg del plasmidio y 20 µL de lipofectamina (Invitrogen, Nueva Zelanda) en 100 µL de medio DMEM suplementado. Estas soluciones se

dejaron en reposo a 28°C por 30 min. Se combinaron las soluciones y se incubaron a 28°C por 10-15 min. Las monocapas infectadas se lavaron dos veces con 3 mL de DMEM suplementado. A los tubos que contenían la mezcla lipofectamina-ADN se le adicionaron 3 mL de DMEM 2% y se aplicó su contenido sobre las células lavadas previamente. Las células se incubaron durante 16 h a 37°C, 5% de CO₂. A los FEP se les retiró el medio y se reemplazó por 5 mL de DMEM-MXH, incubándose por 4 días, mientras que las placas con VV se incubaron 2 días con 5 mL de DMEM 2%. Al término de la incubación, a las placas con VV se les retiró el medio y se guardaron a -70°C, mientras que las placas infectadas con VVA se guardaron directamente a -70°C.

Para ambos virus, las placas infectadas se congelaron y descongelaron tres veces. Luego, las muestras se sonicaron a 40 amplitudes en un sonicador de copa (Cole Palmer, EE.UU), se centrifugaron a 1000 xg y se recuperó el sobrenadante.

3.12.2 Pases de selección de los recombinantes

Para obtener VVA recombinantes, se hicieron diluciones 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ del producto de la transfección en DMEM, y se infectaron FEP crecidas en placas P-60. Estas placas se incubaron durante 2 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Después de este paso, se retiró el inoculo y se añadió DMEM sólido con selección MXH y sin ella. Se escogieron placas virales de la mayor dilución con medio selectivo y se utilizaron para las rondas de selección; de las cuales se realizaron tres, en DMEM-MXH sólido. Con el producto del último pase de selección se infectó un frasco de 25 cm², a 0,01 MOI, en el cual se amplificó el virus para usarlo en los pasos subsiguientes del trabajo.

Para obtener los recombinantes de VV se hicieron diluciones 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ del producto de la transfección, con las que se infectaron monocapas confluentes de BSC40 y se incubaron con DMEM 2% sólido. A los 2 días se añadió DMEM 2% sólido con X-gal 0,33 mg/mL, incubándose por 24 h. Se tomaron placas azules de la mayor dilución donde aparecieron placas de este tipo.

Para los pasos de selección se repitieron estos procedimientos empleando diluciones 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ del producto viral de las placas de infección. Cuando se obtuvo un 100% de placas azules, se amplificó el virus en un frasco de 25 cm², obteniéndose el banco primario.

3.12.3 Titulación de virus vaccinia y virus de viruela aviar

La titulación viral se realizó empleando FEP para los VVA y BSC40 para los VV. Se hicieron diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-9} de las muestras virales en DMEM suplementado y se infectaron FEP o BSC40, crecidos en placas P60 (Costar, NY, EE.UU), con 1 mL de estas diluciones. Se dejó adsorber el medio con virus 1 hora a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%. A continuación se retiró ese medio y se añadió DMEM 2% en el caso de los VV y DMEM sólido en el caso de VVA. Las placas se incubaron 2 días en el caso de los VV y 4 días para los VVA, a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%. Seguidamente se retiró el medio de las placas infectadas con VV, dichas placas se tiñeron con violeta cristal al 1% (p/v) en metanol por 10 min. Luego se lavaron las placas con agua corriente y se dejaron secar. Por último se contaron las placas de infección, el título se expresó como el \log_{10} de las unidades formadoras de placa (ufp)/mL.

Al cuarto día de incubación, a las placas infectadas con VVA se le añadieron 2,5 mL de DMEM sólido conteniendo rojo neutro 0,5 mg/mL (Sigma, St. Louis, EE.UU), se incubaron 24 h y se procedió a contar las placas de infección. El título viral se expresó como el \log_{10} de las ufp/mL.

3.13 Obtención de muestras para la reacción en cadena de la polimerasa

Se inocularon FEP, sembrados en placas P60, con VVA proveniente del banco primario a 0,01 MOI y se incubaron durante 4 días. La monocapa se lavó dos veces con SSTF, se desprendió y se centrifugó a 1000 xg durante 10 min. El precipitado se resuspendió en 200 μ L de tampón de extracción (NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,5% (p/v), β -mercaptoetanol 2% (v/v), Tris HCl 10 mM, pH 8), con proteinasa K 1,25 mg/mL y se incubó 2 h a 55°C. Luego se adicionaron 800 μ L de agua y se tomaron 500 μ L de la mezcla para continuar el procedimiento. Se adicionaron 500 μ L de fenol-cloroformo y se centrifugó a 10000 xg 5 min. Luego se añadieron 500 μ L de éter y se centrifugó a 10000 xg por 5 min. El ADN se precipitó con 1/10 del volumen de NaAc 3M, pH 4,8 y dos volúmenes de etanol absoluto. Esta mezcla se incubó por 16 horas a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 10000 xg por 15min. El precipitado se lavó con 500 μ L de etanol al 70%. Posteriormente, se centrifugó a 10000 xg por 15 min. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 20 μ L de agua estéril.

3.14 Reacción en cadena de la polimerasa

Para comprobar la obtención del VVA recombinante, se realizó una RCP (Saiki y cols. 1988) donde se usaron los oligonucleótidos 3333 y 6418. Para la reacción se utilizaron 25 pmol de cada oligonucleótido, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 250 μM, 5 unidades de Taq polimerasa y 5 μL de ADN muestra, todo en un volumen final de 200 μL de tampón KCl 50 mM, Triton X-100 1% (v/v), TrisHCl 10 mM, pH 9. Como control positivo se usaron 13 ng del plasmidio que se usó en la transfección. La RCP se realizó en un programador automático de temperaturas (MiniCycler, MJ Research Inc, EE.UU), usando el siguiente programa:

- 1- 3 min de desnaturalización a 95°C
- 2- 1 min de desnaturalización a 95°C
- 3- 1 min de hibridación a 56°C
- 4- 1 min de extensión a 72°C
- 5- Ir 25 veces a 2
- 6- 2 min de extensión a 72°C

3.15 Purificación de los virus para su uso en esquemas de inmunización

Para el caso de los VVA se infectaron monocapas confluentes de FEP a 0,01 MOI, sembradas en frascos de cultivo de 162 cm² (Costar, NY, EE.UU) en DMEM 2% y se incubaron durante 4 días. A continuación, el material se centrifugó a 1000 xg, durante 10 min. El precipitado se desechó y el sobrenadante se centrifugó durante 80 min a 35900 xg a 4°C. El precipitado se resuspendió en SSTF y se conservó a -70°C hasta su empleo.

Para purificar VV se procedió de manera similar con los cambios que se describen a continuación. Se infectaron células BSC40 durante 2 días, luego se les retiró el medio dejando 0,04 mL de medio/cm² y se aplicaron 3 pases de congelación/descongelación. Posteriormente, el material obtenido fue sonificado en dos ocasiones, a 40 amplitudes en un sonicador de copa (Cole Palmer, EE.UU). La segunda centrifugación se realizó durante 1 h a 19700 xg. El precipitado fue resuspendido en Na₂HPO₄ 1 mM, y conservado a -70°C hasta su empleo.

3.16 Replicación *in vitro* de los virus vaccinia recombinantes

Para analizar la replicación de los VV recombinantes se infectaron monocapas confluentes de BSC40 con 0,01 MOI de cada uno de los recombinantes y del virus parental WR. Las muestras de células y del sobrenadante se tomaron por separado, en diferentes intervalos de tiempo. Las muestras de células se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación.

Todas las muestras se sonicaron en dos ocasiones, a 40 amplitudes en un sonicador de copa (Cole Palmer, EE.UU) y el título viral se determinó por infección sobre monocapas de BSC40 como se explica en el acápite 3. 12. 3.

3.17 Modelos Animales

Se adquirieron embriones de pollo de 9 a 11 días de incubación y libres de patógenos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba, o de Lohmann Tierzucht GMBH, Alemania.

Para los experimentos con ratones se emplearon animales BALB/c hembras, de 6 a 8 semanas, suministrados por el CENPALAB (La Habana, Cuba). Los estudios con ratones se llevaron a cabo en el Bioterio del CIGB, manteniendo 5 animales por caja con alimentación y agua *ad libitum*, siguiendo las Buenas Prácticas Pre-Clínicas.

Para el experimento en monos se emplearon un total de seis animales de la especie *Cercopithecus aethiops sabaesus*, machos, con peso corporal entre 3 y 7 Kg, y entre 4 y 7 años de edad.

El estudio de inmunogenicidad en monos se realizó en el local de experimentación del área convencional de primates no humanos del Bioterio del CIGB. Previo al inicio del experimento, los monos se adaptaron por un mes a las condiciones del área. Posteriormente, los animales se trasladaron al Laboratorio BL-2 destinado a los ensayos con microorganismos de riesgo tipo 2 del propio Bioterio, donde tuvo lugar el reto viral.

En ambas instalaciones los primates se mantuvieron en módulos individuales. Se les suministró alimento concentrado fórmula EMO 1600, a razón de 300 g por animal, procedente del CENPALAB, frutas frescas y agua a libre demanda. Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales controladas (temperatura y humedad relativa), siempre bajo el cumplimiento de las Buenas Prácticas Preclínicas.

Los esquemas en ratones se realizaron por duplicado y el estudio en monos se realizó una vez.

3.17.1 Reto con virus vaccinia

Para los estudios de reto en ratones se inocularon cinco animales de cada grupo con 10^6 ufp por ratón de los VV recombinantes o WR, por inyección intraperitoneal (i.p). El reto se aplicó en un volumen final de 200 μ L en SSTF. Los animales se sacrificaron 5 días después del reto, y se les extrajeron los ovarios.

En el estudio en monos verdes africanos se empleó el VV recombinante para la región estructural del VHC y la dosis fue 10^7 ufp/mono. El virus se diluyó en 1 mL de SSTF y la inoculación viral se realizó por inyección subcutánea en la región de la espalda. Se realizaron extracciones de 1 mL de sangre por animal 2, 5, 7 y 14 días después de la aplicación del reto. Se empleó EDTA 1 mg/mL como anti-coagulante.

3.17.2 Estudios en ratones

3.17.2.1 Replicación *in vivo* de los virus vaccinia recombinantes para antígenos del virus de la hepatitis C

La replicación *in vivo* de los VV recombinantes obtenidos se evaluó mediante la inyección i.p de una dosis de 10^6 ufp del virus correspondiente en 200 μ L de SSTF. Se inocularon grupos de 5 ratones con cada uno de los VV recombinantes o con el VV parental, WR. Cinco días después de la inoculación, los animales se sacrificaron para determinar el título viral en ovarios. El efecto de altas dosis virales se evaluó en otro esquema mediante la administración i.p de 5×10^7 , 8×10^7 o 1×10^8 ufp (200 μ L) del VV recombinante para la proteína de la cápsida del VHC, en SSTF. Además un cuarto grupo recibió 1×10^8 ufp del VV parental, WR. Los grupos estuvieron conformados por 12 animales. El seguimiento de los animales se extendió por 15 días y al finalizar los animales fueron sacrificados.

3.17.2.2 Uso de los virus vaccinia recombinantes para antígenos del virus de la hepatitis C en modelos de reto en ratones

El primer esquema incluyó 4 grupos, con 25 animales por grupo. A los ratones de los grupos 1 y 2 se les administró 50 μ g de los plasmidios pAEC-K6 y pIDKE2, respectivamente. Los animales del grupo 3 se inmunizaron con 5 μ g de la proteína Co.120. El grupo 4 se inmunizó con 50 μ g del plasmidio pIDKE2 mezclado con 5 μ g de la proteína Co.120. Se administraron 5 dosis del inmunógeno en las semanas 0, 3, 7, 12 y 16. Se realizaron extracciones de sangre en las semanas 0, 5, 8 y 14 del esquema. El inmunógeno fue administrado en un volumen final de 100 μ L en SSTF. La mezcla del plasmidio y la proteína se realizó inmediatamente antes de la inmunización. Todos los animales se inmunizaron por inyección i.m en el cuádriceps. Se retaron 5 animales por grupo, 1 y 3 semanas después de la tercera y quinta inmunizaciones, con el VV recombinante para la proteína de la cápsida del VHC. El reto se realizó de acuerdo a lo descrito en el acápite 3.17.1.

En el segundo esquema de inmunización se utilizaron 2 grupos de 5 ratones cada uno. El grupo 1 fue inmunizado con la mezcla pIDKE2+Co.120 (50 μ g de pIDKE2+5 μ g de Co.120)

en SSTF, y el grupo 2 fue inmunizado con 50 µg del plasmidio control negativo pAEC-K6. Los animales recibieron inmunizaciones en las semanas 0, 2, 4, 6 y 12. Las inmunizaciones se realizaron por inyección i.m. Dos semanas después de la última inmunización 5 animales de cada grupo se retaron con el VV recombinante para la región estructural del VHC, según lo descrito en el acápite 3.17.1.

3.17.2.3 Inmunogenicidad del virus de viruela aviar recombinante para antígenos de la región estructural del virus de la hepatitis C en ratones

El esquema contó con dos grupos de 15 animales cada uno, que se inmunizaron con $2,5 \times 10^7$ ufp/ratón del VVA parental FP9 o del VVA recombinante para Ags estructurales del VHC, respectivamente, en 200 µL de SSTF. Los ratones recibieron las dosis en las semanas 0 y 3 siempre por inyección i.p. En la semana 5 se retaron cinco ratones de cada grupo con el VV recombinante para Ags de la región estructural del VHC y cinco con el VV parental, WR. En esta misma semana, 5 ratones de cada grupo, que no fueron retados, fueron sacrificados y se extrajeron los bazo para realizar ensayos de ELISPOT (del inglés, “Enzyme-linked-immunospots”) como se describirá posteriormente.

3.17.2.4 Estrategias de sensibilización/recuerdo empleando el virus de viruela aviar recombinante para antígenos de la región estructural del virus de la hepatitis C

El estudio contó con 6 grupos de 12 ratones cada uno. Los grupos 1 y 2 se inmunizaron con los VVA parental y recombinante, respectivamente, en las semanas 0 y 3. El grupo 3 recibió el VVA recombinante en las semanas 0 y 3, y una mezcla de pIDKE2+Co.120 en las semanas 6 y 9. El grupo 4 fue inmunizado con la mezcla anterior en las semanas 0 y 3 y con el VVA recombinante en las semanas 9 y 12. Los grupos 5 y 6 recibieron la mezcla pIDKE2+Co.120 y el plasmidio pAEC-K6, respectivamente, en las semanas 0, 3, 7 y 12 del esquema. Los poxvirus se inocularon por inyección i.p, en un volumen de 200 µL con una dosis de $2,5 \times 10^7$ ufp/ratón. Los plasmidios y la proteína se inocularon por inyección i.m en 100 µL, a concentraciones de 0,5 µg/µL y 0,05 µg/µL, respectivamente. Todos los inmunógenos se prepararon en SSTF.

Las extracciones de sangre se realizaron en las semanas 5 y 14 para evaluar los títulos de Acs específicos. En la semana 14 se efectuó el reto con el VV recombinante para la región estructural del VHC a cinco animales de cada grupo.

3.17.3 Evaluación de la inmunogenicidad del virus de viruela aviar recombinante para antígenos de la región estructural del virus de la hepatitis C en monos verdes

El esquema contó con seis animales distribuidos en dos grupos. Los primates incluidos en estos grupos recibieron 3 inmunizaciones con el VVA recombinante (n=4) y el virus parental FP9 (n=2), respectivamente, las cuales se realizaron en los meses 0, 3 y 4. Se realizó el pesaje de los animales los días correspondientes a las extracciones de sangre e inoculaciones, así como inspección clínica diaria dos veces al día, incluidos los días en que se realizaba extracción de sangre e inoculación. Para realizar la extracción de sangre e inoculación se sedaron los animales con clorhidrato de ketamina (Laboratorios LIORAD, La Habana, Cuba), 10 mg/Kg de peso corporal por inyección i.m. Los VVA se diluyeron en SSTF, en todos los casos el volumen de inóculo fue de 1 mL y las dosis fueron de 10^8 ufp/mono. Los monos recibieron las dosis siempre por la inyección i.m. Las extracciones de sangre se realizaron en las semanas: 0, 12, 16 y 18 del esquema de inmunización, para evaluar los títulos de Acs específicos. En la última extracción de sangre se aislaron linfocitos de sangre periférica como se describe en el acápite 3.18.6 para evaluar la respuesta linfoproliferativa.

El día 14 posterior a la última inmunización se procedió al reto de los animales con el VV recombinante para Ags de la región estructural del VHC, como se describió en el acápite 3.17.1.

3.18 Métodos Analíticos

3.18.1 Expresión de proteínas recombinantes en células infectadas con virus vaccinia o virus de viruela aviar

Para analizar la expresión de proteínas en células infectadas con VV se utilizaron monocapas confluentes de BSC40, cultivadas en placas P60, que se infectaron a MOI=1. Como control negativo se utilizaron células infectadas con la cepa parental WR. Se detuvo el proceso retirando la monocapa y resuspendiéndola en tampón desnaturizante (EDTA 1 mM, SDS 1% (p/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v), glicerol 20% (v/v), Tris-HCl 10 mM, pH 8,0) a diferentes horas: 21, 24, 45 y 48, para el VV recombinante para la región estructural del VHC; 24 y 48 h para el VV recombinante para la proteína de la cápsida del VHC, y a las 48 horas para el VV parental, WR. Para el caso del VV recombinante para la proteína de la cápsida del VHC, algunas muestras se trataron, previo a la resuspensión en tampón desnaturizante, con un tampón de lisis (Tritón X-100 0,5%, NaCl 100 mM, Fenilmetil-sulfonil fluoruro 0,2 mM,

Tris-HCl 20 mM, pH 8,0), se incubaron en hielo por 10 min y luego se centrifugaron a 1000 xg durante 10 min. El sobrenadante y el precipitado resultantes se resuspendieron de forma independiente en tampón desnaturalizante. Las muestras se usaron en los experimentos de electroforesis de proteínas y *Western blotting*.

Para analizar la expresión de proteínas en células infectadas con VVA se infectaron monocapas de FEP con el virus parental FP9 o el virus recombinante para Ags de la región estructural del VHC. Se procedió como explica el párrafo anterior, pero las muestras se tomaron a las 24, 48, 72 y 96 h posteriores a la infección.

3.18.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Se desarrolló esencialmente según lo descrito previamente por Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras se prepararon en condiciones de reducción y desnaturalización, mediante calentamiento a 100°C durante 10 min en el tampón desnaturalizante (EDTA 1 mM, SDS 1% (p/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v), glicerol 20% (v/v), Tris-HCl 10 mM, pH 8,0). El gel de poliacrilamida se preparó al 12,5 % o al 15%.

3.18.3 Inmunodetección por *Western blotting* de proteínas expresadas a partir de virus vaccinia recombinantes

Después de la electroforesis de proteínas, éstas se transfirieron del gel de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido), según lo descrito por Towbin y Gordon (Towbin, 1981), en una solución tampón (glicina 150 mM, metanol 20% (v/v), Tris-HCl 20 mM, pH 8,3). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% (p/v) en SSTF (NaCl 0,1 M, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, pH 7,2) con Tween 0,05% (p/v) (SSTFT), durante 1 hora a 37°C. Después de tres lavados con SSTF, las membranas se incubaron durante 1 h a 37°C con el AcM HepC-1 o un suero policlonal contra la proteína E2.680, ambos referidos en el acápite 3.8, diluidos 1:1000 en leche descremada 5% (p/v) en SSTF-T. Posteriormente, se incubaron con Acs policlonales anti-IgG de ratón, o anti-Igs de conejo, obtenidos en carnero, conjugados a peroxidasa, diluidos 1:3000 (Sigma, St.Louis, EE.UU) durante 1 h a 37°C. La reacción inmunológica se reveló utilizando Amino Etil Carbazol (AEC) (Sigma, St Louis, EE.UU) en NaAc 3 M, pH 5,2 como cromógeno, o por el método ECLTM (Amersham Pharmacia, Reino Unido). La reacción se detuvo lavando las membranas con agua destilada. Como controles positivos de

inmunodetección se emplearon las proteínas Co.120 y E2.680, reconocidas por el AcM HepC-1 y el suero policlonal de conejo anti-E2.680, respectivamente.

3.18.4 Inmunodetección por *Western blotting* de proteínas expresadas a partir del virus de viruela aviar recombinante para antígenos estructurales del virus de la hepatitis C

Se realizó siguiendo los pasos descritos en el acápite 3.18.3 con las modificaciones siguientes. Los lavados se realizaron con SSTF más Tween 20 al 0,1% (p/v). Para la inmunodetección las membranas se incubaron con las mezclas de los sueros humanos anti-VHC positivos o anti-VHC negativos, descritas en el acápite 3.10.1, durante 12 h a 4°C. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-IgG humano obtenido en carnero conjugado a peroxidasa, diluido 1:3000 (Sigma, St.Louis, EE.UU), durante 2 h a 28°C.

3.18.5 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida contra las proteínas recombinantes de la región estructural del virus de la hepatitis C

Se recubrieron placas de 96 pocillos (Costar, NY, EE.UU) con 100 µL de las proteínas Co.120, E1.340 y E2C, todas a 5 µg/mL, diluidas en tampón de recubrimiento (tampón carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9,6) incubándose 16 h a 4°C. Entre pasos se lavó tres veces con 200 µL por pocillo de SSTF-T. Los pocillos se incubaron siempre con 100 µL de las soluciones que se describen. La placa se bloqueó con leche al 2% (p/v) en SSTF-T durante 30 min a 37°C. El paso siguiente fue la incubación con los sueros de ratón diluidos en leche descremada al 2% (p/v) en SSTF-T durante 1 hora a 37°C. Después se incubó por 1 hora a 37°C con un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón obtenido en carnero, conjugado a peroxidasa (Sigma, St Louis, EEUU), diluido 1: 20000 en SSTF-T. Para revelar la reacción, se incubó por 5 min con o-fenilendiamina (Sigma, St Louis, EE.UU) al 0,05% (p/v) en tampón citrato de sodio 0,1 M, pH 5,2, con 0,05% (v/v) de peróxido de hidrógeno. Se detuvo la reacción con 50 µL de H₂SO₄ 3 M. La absorbancia a 492 nm (A_{492nm}) se midió en un lector de placas (SensIdent Scan, Merck, Darmstadt, Alemania). Para analizar la seroconversión, la dilución de suero empleada fue de 1:50. Los ratones que seroconvirtieron frente a un Ag dado fueron aquellos cuyo suero diluido 1:50 rindió una reactividad, determinada como la A_{492nm} , contra la proteína recombinante que superó dos veces el valor promedio de la A_{492nm} del

grupo control negativo en iguales condiciones. Para titular se hicieron diluciones 1: 2 sucesivas del suero a partir de 1:50.

Para la determinación de anticuerpos generados en monos frente a las proteínas de la región estructural del VHC se siguieron los pasos descritos anteriormente, con las modificaciones que se señalan a continuación. Las proteínas Co.120 y E1.340 se utilizaron a 10 µg/mL. La solución de lavado fue SSTF con Tween 20 al 0,1% (v/v) (SSTF-T 0,1%). El bloqueo de la placa se realizó durante 2 h y la incubación con los sueros de monos se realizó durante 12 h a 4°C. Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-IgG humana, obtenido en carnero, conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma, St Louis, EE.UU), diluido 1:20000. Para revelar la reacción, se incubaron los pozos durante 5 min con 100 µL de una solución de p-nitrofenil fosfato 1 mg/mL, MgCl₂ 0,2 mg/mL, dietanolamina 9,7% (v/v), pH 9,8. Se midió la Absorbancia a 405 nm en un lector de placas (SensIdent Scan, Merck, Darmstadt, Alemania).

3.18.6 Obtención de células de bazo de ratones y células mononucleares de sangre periférica de monos

Para la preparación de suspensiones de células mononucleares de sangre periférica de los monos verdes se extrajeron 15 mL de sangre a los monos incluidos en el ensayo. La sangre se diluyó con un volumen de SSTF y se procedió a depositarla lentamente sobre Ficoll (Sigma, St. Louis, EE.UU), a una proporción sangre diluida/Ficoll de 5/3 (v/v). A continuación se centrifugó a 860 xg durante 45 min a temperatura ambiente. Seguidamente se extrajo el anillo de células blancas y se depositó en tubos de centrifuga. Posteriormente, las células se resuspendieron con 10 mL de RPMI 10%, se centrifugó la suspensión celular a 370 xg durante 10 min, a temperatura ambiente, y se decantó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió otras dos veces. Finalmente se resuspendieron las células con 10 mL de RPMI 10% para su posterior uso.

Para obtener células de bazo de ratones, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical. Las células de bazo se lavaron una vez con RPMI 10%, y posteriormente se procedió a la ruptura de los eritrocitos con NH₄Cl 0,83% (p/v). A continuación se lavaron tres veces y se suspendieron en RPMI 10%.

3.18.7 Ensayo de proliferación linfocitaria

La respuesta linfoproliferativa se determinó según lo descrito por de Felice y colaboradores (De Felice y cols. 1987). El ensayo de proliferación fue desarrollado en triplicado, partiendo

de células mononucleares de sangre periférica de monos verdes o células de bazo de ratones obtenidas como se describe en el acápite 3.18.6. Un total de 2×10^5 células/pocillo se cultivaron en 200 μL de RPMI 10%, en placas de fondo en U de 96 pocillos (Costar, NY; EE.UU). Las células se estimularon con las proteínas Co.120, E1.340, E2C y E2.680 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; como control positivo de estimulación celular se empleó una mezcla de Concanavalina A 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y fitohemaglutinina 1% (v/v), mientras que el RPMI 10% fue empleado como control del crecimiento celular basal. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda de 5% de CO_2 por 96 horas. Se aplicó [H^3]-timidina 1 $\mu\text{Ci}/\text{pocillo}$ durante las últimas 16-18 horas de cultivo. Finalmente, se determinó la incorporación de radioactividad utilizando un contador de emisiones Beta (Rack-Beta counter, LKB, Wallac, Suecia). Los datos son expresados como el índice de estimulación (IE), que se define como la relación entre el promedio de los conteos por minuto (cpm) obtenidos con la estimulación y los obtenidos con el medio RPMI 10%. Se consideró una respuesta linfoproliferativa positiva para los valores del IE iguales o superiores a 3.

3.18.8 Ensayo de ELISPOT de IFN- γ

Las células efectoras de bazo de ratón se utilizaron en el ensayo sin re-estimulación, y se hicieron diferentes diluciones en RPMI 10% e IL-2 (10 U/mL) antes de incubarlas con las células presentadoras.

Las células presentadoras P815 se prepararon mediante infección con el VV recombinante para la proteína de la cápsida del VHC, o el VV WR, a 5 ufp por célula. Las células P815 infectadas con el VV WR se emplearon como controles negativos. Las células presentadoras se incubaron 1 h a 37°C, luego se lavaron dos veces con medio RPMI 7% y se les añadió mitomicina C (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente, se incubaron durante 15 min a 37°C y 5% de CO_2 y se adicionó RPMI 7%, y se centrifugó a 370 xg durante 6 min. Se repitió el lavado y las células se resuspendieron a 10^6 células/mL en RPMI 10% con IL-2 (10 U/mL).

Se recubrieron placas MultiScreen-HA de 96 pocillos (Millipore, Molsheim, Francia) con un Ac anti-IFN- γ murino purificado, producido en rata a partir del clon R46A2 (PharMingen, California, EE.UU), a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón carbonato/bicarbonato, pH 9,6 (100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$). Las placas se incubaron 12 h a 4°C, se lavaron tres veces con SSTF y se incubaron con RPMI 10%, a razón de 200 μL por pocillo, para bloquear una hora a 37°C en cámara húmeda. El medio de bloqueo se retiró de las placas y se aplicaron en cada pozo 100 μL de células P815 y

100 μ L de células de bazo de ratón. En el caso particular de la estimulación de las células de bazo de ratón con las proteínas Co.120 y E1.340 a 2 μ g/mL, no se emplearon células P815. En todos los casos, las placas se incubaron 17 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. A continuación, las placas se lavaron tres veces con SSTF y cinco veces con SSTF-T, en ambas caras de la placa. Posteriormente se adicionó un Ac anti-IFN- γ , producido en rata a partir del clón XMG1.2 conjugado con biotina (Pharmingen, California, EE.UU), a 0,5 μ g/mL en SSTF-T (100 μ L/pocillo). Las placas se incubaron 2 h a 28°C. Se repitió el lavado con SSTF-T, para posteriormente adicionar un complejo estreptavidina-peroxidasa (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido), diluido 1:800 en SSTF-T. Las placas se incubaron 1h a 28°C y se lavaron nuevamente con SSTF y SSTF-T. El revelado se llevó a cabo con 3, 3'-diaminobenzidina (Sigma, Saint Louis, EE.UU) a 0,1% (p/v) en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, o con AEC (Sigma, Saint Louis, EEUU) a 0,3 mg/mL en tampón NaAc 0,1 M, pH 5,2. En ambos casos, se adicionó H₂O₂ al 0,1% (v/v). Seguidamente, se añadió la solución de revelado seleccionada, a razón de 100 μ L/pocillo, hasta que aparecieron los puntos. La reacción se detuvo con agua corriente y las placas se dejaron secar a 28°C. Por último, se contaron los puntos en un microscopio estereoscopio (Leica Microscopy System, Heerbrugg, Suiza). Cada condición se evaluó por duplicado. Los resultados se expresaron como el número de células formadoras de puntos (CFP) por 10⁶ células de bazo. Se consideró como resultado positivo el valor en el número promedio de CFP/pozo superior a 10, y que excediera en dos veces el número de CFP por 10⁶ células de bazo detectados en el control negativo para cada muestra.

3.19 Cuantificación de la replicación *in vivo* de los virus vaccinia

3.19.1 Procesamiento de ovarios de ratones infectados con virus vaccinia

Ambos ovarios se maceraron vigorosamente en DMEM, quedando en un volumen final de 2 mL. Después se procedió a dar tres pases sucesivos de congelación-descongelación a la mezcla. Posteriormente, se sonicó a 40 Amplitudes durante 30 segundos, utilizando un sonicador de copa (Cole Palmer, EE.UU), y se centrifugó a 1000 xg durante 10 min. A partir de este momento se utilizó el sobrenadante. Estas muestras se titularon según se describe en el acápite 3.12.3.

3.19.2 Titulación de virus vaccinia a partir de sangre periférica de monos verdes

Se hicieron diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} de las muestras de sangre en DMEM y se determinó su título según se describe en el acápite 3. 12. 3.

3.19.3 Medición de las lesiones en el sitio de inoculación con el virus vaccinia recombinante para la región estructural del virus de la hepatitis C en monos verdes

Se midieron las lesiones por la administración de VV recombinante para la región estructural del VHC 2, 5, 7 y 14 días después de la inoculación. Se empleó una regla graduada y la medición se realizó de manera independiente por dos investigadores. El valor que se muestra es el resultado del promedio de las dos mediciones en cada momento.

3.20 Consideraciones de Bioseguridad

El VV y el VVA se clasifican dentro del grupo de riesgo de bioseguridad nivel II por el Centro Nacional de Seguridad Biológica. Por este motivo, todos los procedimientos donde se utilizaron estos virus o sus derivados se efectuaron en laboratorios de nivel II de Bioseguridad del CIGB, que cuenta con licencias otorgadas por el Centro Nacional de Seguridad Biológica para estos propósitos.

3.21 Métodos estadísticos

El procesamiento estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 2.01, 1995 (StatMate, incluido), y fundamentalmente: el método de Kolmogorov-Smirnov para el análisis de la normalidad de los valores, la prueba de Bartlett para el análisis de la homogeneidad de varianza. Para la comparación entre dos grupos se empleó como prueba no paramétrica la prueba de Mann-Whitney y como paramétrica la prueba T de Student. El método de Análisis de Varianza de clasificación Simple (ANOVA), combinado con el método de Newman-Keuls se empleó para la comparación entre más de dos grupos, para valores que mostraban una distribución Gaussiana. La prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn se emplearon para la comparación entre más de dos grupos, cuando los valores no cumplían con una distribución Gausiana o no existía homogeneidad de varianza. Se utilizó la Prueba exacta de Fisher para la comparación entre dos grupos en cuanto a la frecuencia de aparición de una respuesta determinada. Se consideraron diferencias significativas para $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Generación y caracterización de virus vaccinia recombinantes para antígenos estructurales del virus de la hepatitis C de genotipo 1b

4.1.1 Obtención de plasmidios codificantes para antígenos estructurales del virus de la hepatitis C para la inserción en el genoma de virus vaccinia

El plasmidio pVACore se obtuvo a partir de la digestión del plasmidio pIDKCo con las enzimas de restricción *XbaI* y *EcoRV*. El fragmento obtenido, que corresponde a la secuencia de ADN que codifica para la proteína de la cápsida del VHC (aa 1-176), se insertó en el plasmidio pHLZ, previamente digerido con las enzimas *SmaI* y *BglIII*. El acople de los extremos se logró por la inclusión de un adaptador con extremos *XbaI* y *BglIII* (**Figura 2A**).

Para comprobar el carácter recombinante del plasmidio pVACore se realizó una digestión con las enzimas *PstI* y *BglIII*. Como se muestra en la **Figura 2B**, se obtuvo una banda de 564 pb que no aparece en el plasmidio parental. Además, la identidad del plasmidio pVACore se verificó por secuenciación de ADN. La secuencia de ADN del plasmidio pVACore se muestra en el **Anexo 1**.

Para obtener el plasmidio pVACRE se procedió de manera similar, pero partiendo del plasmidio pIDKE2 que contiene la secuencia codificante para los Ags de la región estructural del VHC, aa 1-650 (**Figura 3A**). Para comprobar la identidad del plasmidio pVACRE se efectuó un análisis de restricción con la enzima *EcoRV*. Con la digestión del plasmidio recombinante se debía obtener un fragmento de 3320 pb, debido a la inclusión de la secuencia del VHC; mientras que del plasmidio parental pHLZ, se debía obtener un fragmento de 1347 pb. En la **Figura 3B** se muestran los resultados del análisis de restricción, que están en concordancia con lo previsto. Además, la identidad del plasmidio pVACRE se verificó por secuenciación de ADN. La secuencia de ADN del plasmidio pVACRE se muestra en el **Anexo 2**.

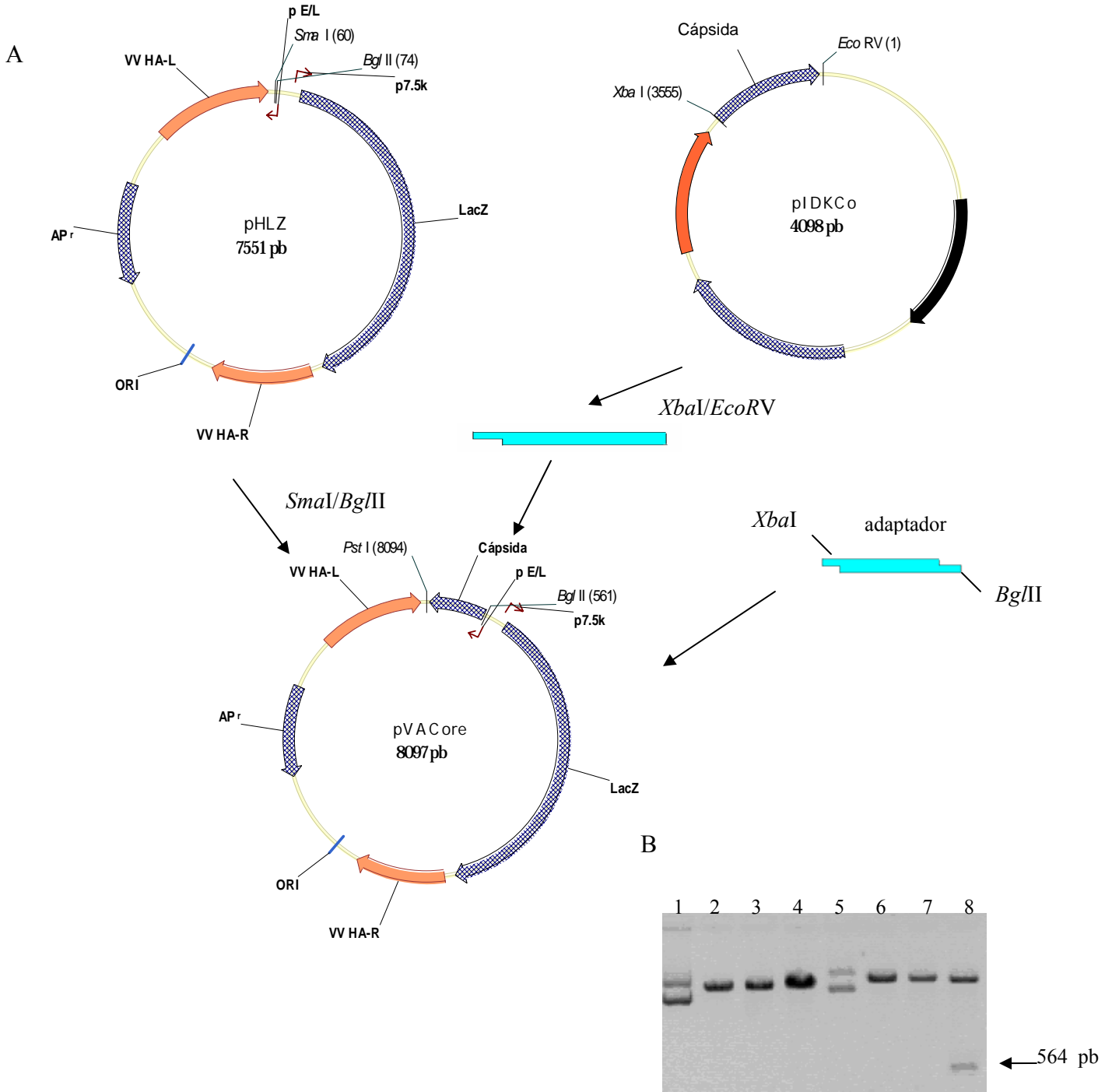


Figura 2. Esquema de obtención del plasmidio pVACore (A). El plasmidio pVACore incluye secuencias homólogas al gen de la hemaglutinina del virus vaccinia (VV HA), un promotor sintético para vaccinia (P E/L), el promotor 7,5 K de vaccinia (P 7,5) y el gen de la β -galactosidasa (Lac Z), el gen que confiere resistencia a la ampicilina (AP^r), la secuencia codificante para los aa 1-176 de la poliproteína del VHC (Cápsida) y el análisis de restricción correspondiente (B). Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0,8% (p/v), los carriles corresponden a 1: pHLZ nativo, 2: pHLZ digerido *Pst*I, 3: pHLZ digerido *Bgl*III 4: pHLZ digerido *Pst*I y *Bgl*III 5: pVACore nativo, 6: pVACore digerido *Pst*I, 7: pVACore digerido *Bgl*III, 8: pVACore digerido *Pst*I y *Bgl*III. La flecha indica el fragmento de interés y se muestra el número de pb del mismo.

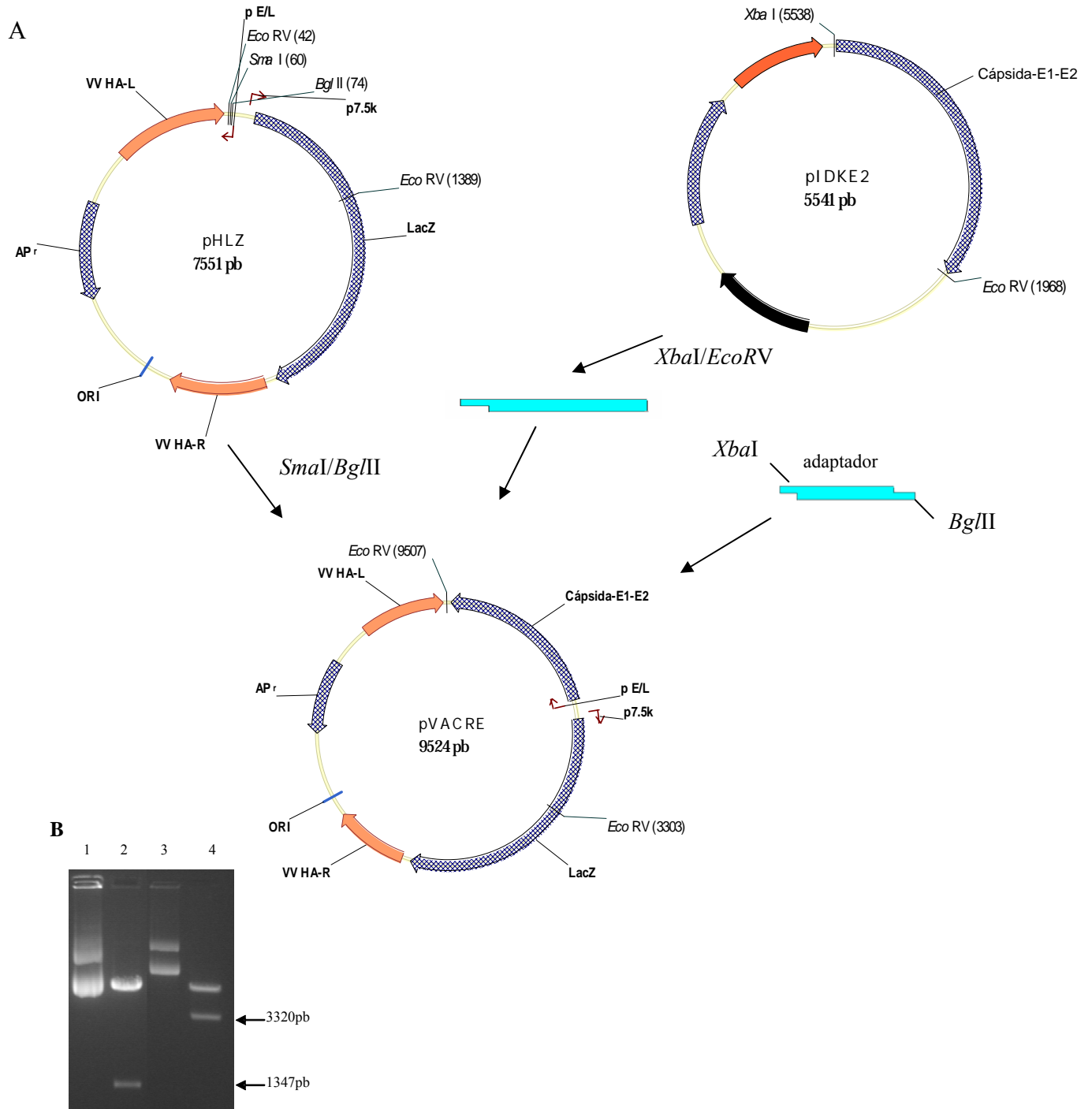


Figura 3. Esquema de la obtención del plasmidio pVACRE (A). El plasmidio incluye secuencias homólogas al gen de la hemaglutinina del virus vaccinia (VV HA), un promotor sintético para virus vaccinia (P E/L), el promotor 7,5 K de virus vaccinia (P 7,5) y el gen de la β-galactosidasa (Lac Z), el gen que confiere resistencia a la ampicilina (AP^r), la secuencia codificante para los aa 1-650 de la poliproteína del VHC (Cápsida-E1-E2) y el análisis de restricción correspondiente (B). Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0,8% (p/v), los carriles corresponden a 1: pHLZ nativo, 2: pHLZ digerido *Eco*RV, 3: pVACRE nativo, 4: pVACRE digerido *Eco*RV. Las flechas indican los fragmentos de interés y se muestra el número de pb de cada uno.

4.1.2 Obtención de virus vaccinia recombinantes para las proteínas estructurales del virus de la hepatitis C

Con el objetivo de obtener VV recombinantes para Ags del VHC se contaba con la cepa salvaje del VV WR y los plasmidios pVACore y pVACRE, con secuencias del gen de la hemaglutinina de VV flanqueando la región codificante para las proteínas del VHC. Se infectaron células BSC40 con el VV WR y se transfectaron con los plasmidios antes mencionados, tal como se describió previamente en la sección de Materiales y Métodos. Posteriormente, se procedió a la selección, amplificación y verificación de los posibles recombinantes, que se denotaron vvCore y vvRE, dependiendo del plasmidio de partida pVACore o pVACRE, respectivamente.

Se verificó el carácter recombinante de los VV generados mediante la detección de la expresión de proteínas en células BSC40 infectadas con los posibles recombinantes y con la cepa parental como control negativo. Los resultados obtenidos con muestras provenientes de células BSC40 transfectadas inicialmente con pVACore se muestran en la **Figura 4**, como control positivo se utilizó la proteína de la cápsida Co.120, obtenida por vía recombinante. Se aprecia la detección de la proteína de la cápsida en los carriles correspondientes a células totales y precipitado de lisis de células BSC40 después de 24 y 48 h de infectadas con vvCore, con una migración electroforética similar al control positivo, la proteína Co.120. Dichos resultados indican el carácter recombinante del virus vvCore.

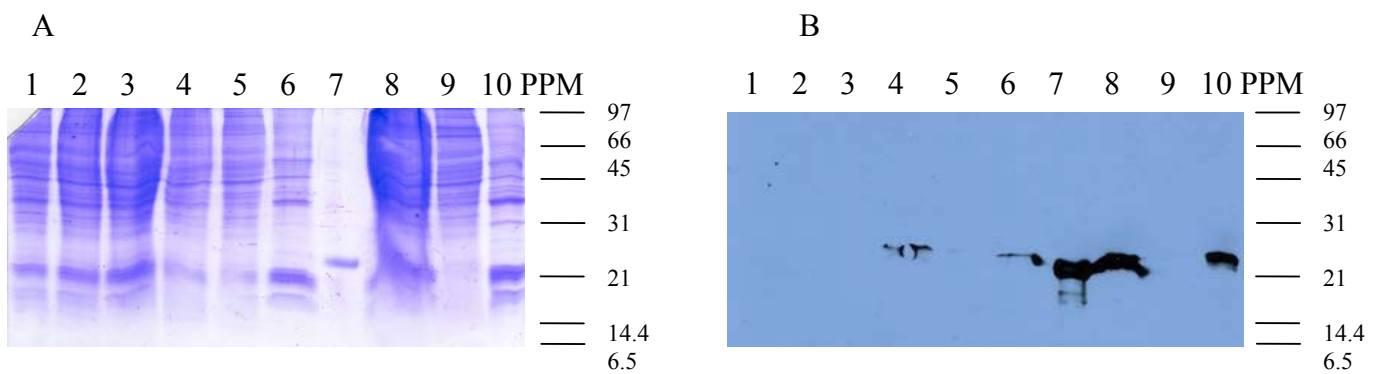


Figura 4. Análisis de expresión de proteínas en células BSC40 infectadas con vvCore. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes (A) y *Western blotting* (B) empleando el Ac monoclonal HepC-1 y el sistema ECL™ para el revelado. Los carriles corresponden a: 1 WR células totales 48 h, 2 WR sobrenadante de lisis 48 h, 3 WR precipitado de lisis 48 h, 4 vvCore células totales 24 h, 5 vvCore sobrenadante de lisis 24 h, 6 vvCore precipitado de lisis 24 h, 7 Co.120 (control positivo), 8 vvCore células totales 48 h, 9 vvCore sobrenadante de lisis 48 h, 10 vvCore precipitado de lisis 48 h. PPM: patrón de peso molecular, los números a la derecha del panel son los pesos moleculares expresados en kDa.

En la **Figura 5** se muestran los resultados obtenidos en la electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (**Figura 5A**) y *Western blotting* (**Figura 5B y C**) con muestras provenientes de células infectadas con el posible recombinante vvRE. En los ensayos de *Western blotting* se empleó un AcM que reconoce la proteína de la cápsida (**Figura 5B**) o un suero policlonal de conejo contra la proteína E2 (**Figura 5C**). En la **Figura 5B** se aprecia el reconocimiento de una proteína con migración electroforética similar a la proteína Co.120, que se utilizó como control positivo. En la **Figura 5C** se aprecia el reconocimiento de bandas de aproximadamente 35 kDa y 60 kDa en las muestras infectadas con vvRE, correspondientes con el patrón descrito para variantes no glicosiladas o glicosiladas, respectivamente, de la proteína E2. Estos resultados indican el carácter recombinante del VV vvRE.

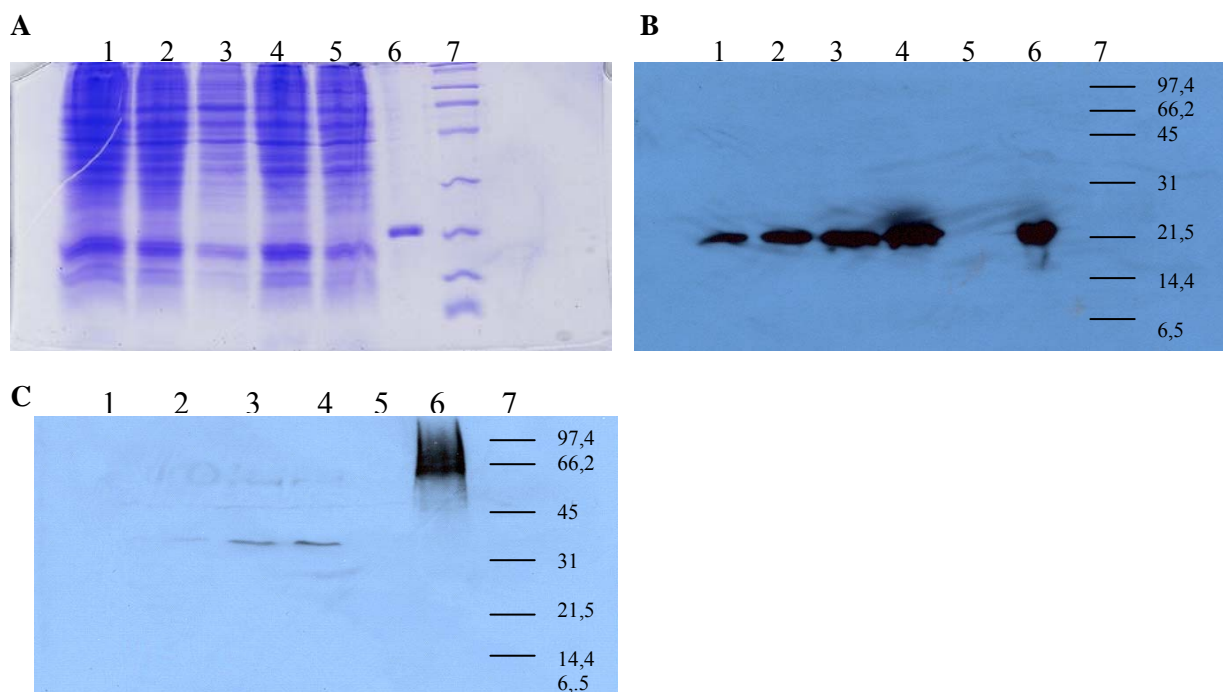


Figura 5. Análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (**A**) y *Western blotting* (**B y C**) de la expresión de proteínas en células infectadas con vvRE. Se utilizó un gel de poliacrilamida al 15%, para la inmunodetección se empleó el AcM HepC-1 (**B**) o un suero policlonal anti-E2 (**C**), y el sistema ECLTM para el revelado en ambos casos. Las muestras de los carriles 1-5 corresponden a células BSC40 infectadas con los virus que se indican y colectadas en diferentes momentos; 1 vvRE 21 h, 2 vvRE 24 h, 3 vvRE 45 h, 4 vvRE 48 h, 5 WR 48 h, 6 Co.120 (**A** y **B**) o E2.680 (**C**) como control positivo, 7 Patrón de Peso Molecular, los números a la derecha del panel son los pesos moleculares expresados en kDa.

4.1.3 Replicación *in vitro* de los virus vaccinia recombinantes vvRE y vvCore

Se comparó la replicación *in vitro* de los VV recombinantes vvCore y vvRE con respecto al virus parental WR, para evaluar efectos potenciales relacionados con la introducción en el genoma de VV de secuencias del VHC. Con este objetivo se infectaron células BSC40 con los diferentes VV y se tomaron muestras 18, 24, 42 y 48 h después de la infección, para determinar el título viral. En general, no se observaron diferencias significativas en el título viral entre los VV recombinantes y el virus parental (**Figura 6**). Solo a las 18 y 24 h el título viral en la fracción intracelular de las muestras infectadas con vvRE fue inferior al detectado para las muestras equivalentes infectadas con WR (Prueba de Kruskal Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

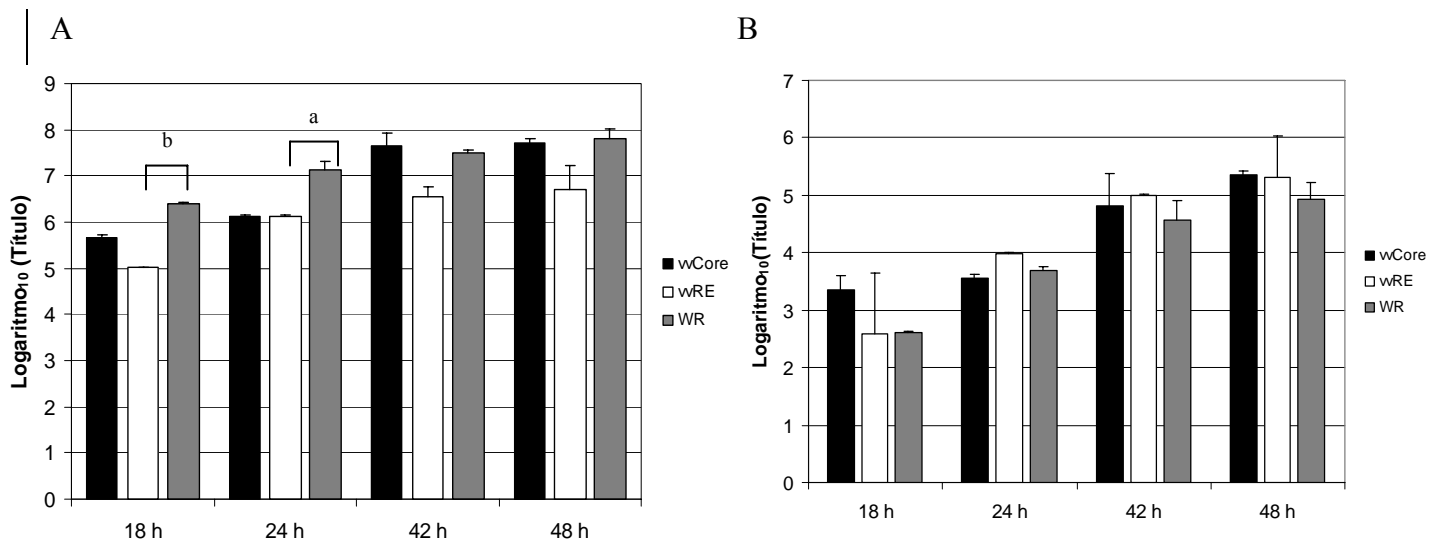


Figura 6. Replicación *in vitro* de los virus vaccinia vvRE, vvCore y WR. Se infectaron células BSC40 con MOI 0,01 de cada VV, se determinaron los títulos virales en la fracción intracelular (A) y extracelular (B). En los tiempos indicados después de la infección, se colectó el sobrenadante de cultivo y las células, estas últimas se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación. Los títulos virales se determinaron por ensayo de placas virales sobre monocapas de células BSC40. Los datos representan la media de 4 réplicas experimentales. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. “a” denota $p < 0,05$ y “b” denota $p < 0,01$, de acuerdo a una prueba de Kruskal-Wallis y una prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

4.1.4 Estudio de la capacidad replicativa de los virus vaccinia recombinantes para los antígenos estructurales del VHC en ratones no inmunizados

En aras de evaluar comparativamente la capacidad replicativa *in vivo* de los VV recombinantes con respecto al virus parental, se inocularon ratones BALB/c con 10^6 ufp de

cada virus. La **Figura 7** muestra que 5 días después de la inoculación, los niveles de los tres virus detectados en los ovarios eran similares ($p > 0,05$, ANOVA).

Con la finalidad de evaluar si la administración de dosis virales superiores de VV recombinante para la proteína de la cápsida del VHC resultaba letal para los ratones BALB/c, los animales se inocularon con 5×10^7 , 8×10^7 y 1×10^8 ufp de vvCore y con 1×10^8 ufp del VV parental, WR, como control. Los animales se observaron por 15 días y no ocurrieron muertes en ese período.

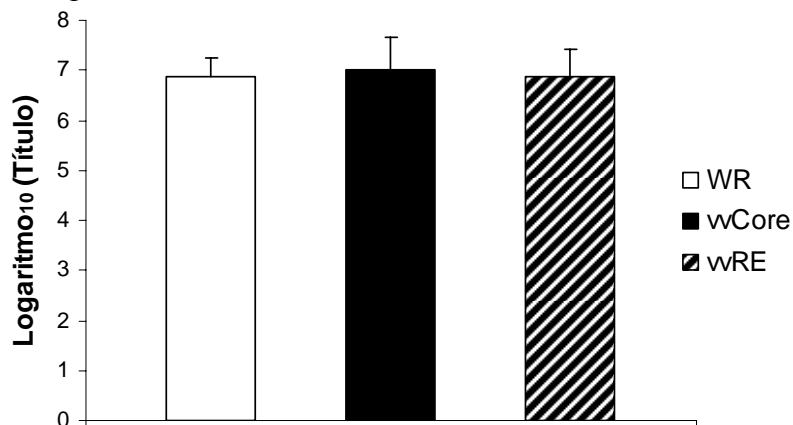


Figura 7: Títulos de virus vaccinia en los ovarios de los animales inoculados. Cinco días después de la inoculación de 10^6 ufp de los virus recombinantes y del parental, se extrajeron los ovarios, se homogeneizaron y se determinó el título viral en células BSC40. Las barras indican la media del \log_{10} de los títulos de 5 animales por grupo. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0,05$, ANOVA).

4.1.5 Estudio de la capacidad replicativa de los virus vaccinia recombinantes para los antígenos estructurales del VHC en ratones previamente vacunados con diferentes inmunógenos

Una vez disponibles los VV recombinantes para los Ags estructurales del VHC, y demostrada su capacidad replicativa *in vitro* e *in vivo*, evaluamos su empleo para el análisis de la funcionalidad de la respuesta inducida por diferentes inmunógenos basados en Ags del VHC de genotipo 1b. En el estudio se utilizó un plasmidio para la inmunización con ADN, pIDKE2, y la variante truncada de la proteína de la cápsida del VHC, Co.120. Se decidió evaluar cada uno de estos componentes de forma individual, así como su combinación, empleando además del análisis de la respuesta inmune humoral y la linfoproliferativa, la capacidad de controlar la infección con el virus vaccinia recombinante vvCore.

Cinco semanas después de la primera inmunización, todos los animales inmunizados, excepto los inoculados con pAEC-K6 (control negativo), tenían Acs anti-VHC (datos no mostrados). La **Figura 8** muestra la respuesta de Acs frente a los Ags de la región estructural 14 semanas después de la primera inmunización, luego de haber recibido las dosis en las semanas 0, 3, 7 y 12. Se alcanzaron títulos medios de Acs de al menos 1: 2000, frente a las proteínas de la región estructural del VHC, en los animales inmunizados con la mezcla de pIDKE2 y Co.120.

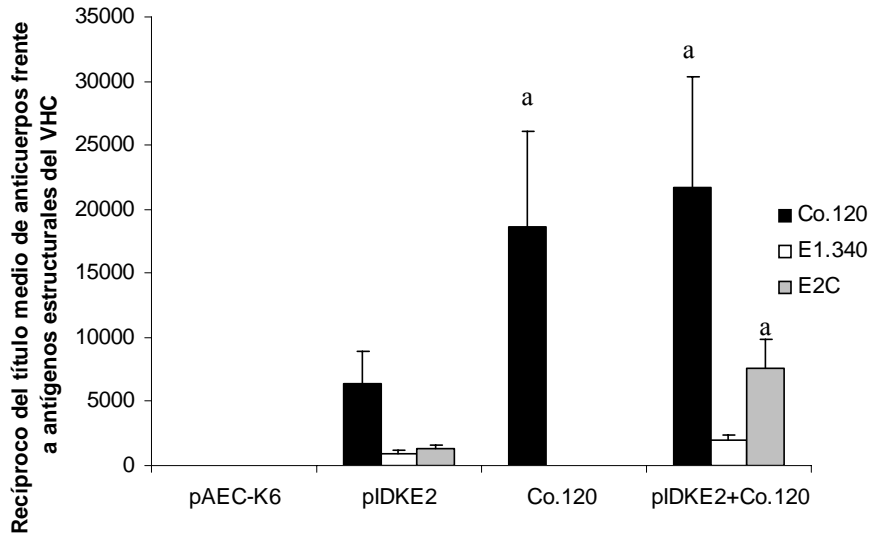


Figura 8. Respuesta de Acs frente a las proteínas Co.120, E1.340 y E2C. Los ratones se inmunizaron con el plasmidio control pAEC-K6, pIDKE2, Co.120 o pIDKE2+Co.120. Las barras indican la media de los títulos de Acs de los animales individuales en la semana 14 del esquema de inmunización. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. “a”: denota diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo inmunizado con pIDKE2 ($p < 0,05$ analizado por Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

Específicamente, los títulos de Acs frente a las proteínas Co.120 y E2C en este grupo fueron significativamente superiores a los obtenidos en los animales inoculados solo con el plasmidio pIDKE2 ($p < 0,05$, analizado por Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn). De hecho, los títulos de Acs inducidos contra la proteína Co.120 por el plasmidio pIDKE2 fueron también significativamente inferiores a los inducidos por la inmunización con la proteína Co.120 ($p < 0,05$, analizado por Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn). Por otra parte, los títulos de Acs frente a la proteína de la cápsida fueron similares en los grupos inmunizados con la proteína Co.120 sola o mezclada con el plasmidio pIDKE2. Los animales inmunizados con pAEC-K6 no indujeron una respuesta de Acs detectable.

Para estudiar la respuesta inmune celular, se analizó la proliferación *in vitro* de células de bazo de ratón, estimuladas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las proteínas Co.120, E1.340 y E2C, por ensayo de incorporación de $[\text{H}^3]$ -timidina, en la semana 14 del esquema. La **Figura 9** muestra que los animales inoculados con el plasmidio pAEC-K6 no desarrollaron respuesta proliferativa frente a los Ags evaluados, mientras que los animales inmunizados con Co.120 generaron respuesta proliferativa frente a este Ag, pero no frente a las proteínas de la envoltura. Todos los animales inmunizados con pIDKE2 solo o combinado con Co.120 mostraron respuesta proliferativa frente a los tres Ag empleados. Se detectó una respuesta proliferativa similar frente a Co.120 en los animales inmunizados con Co.120 solo o combinado con pIDKE2.

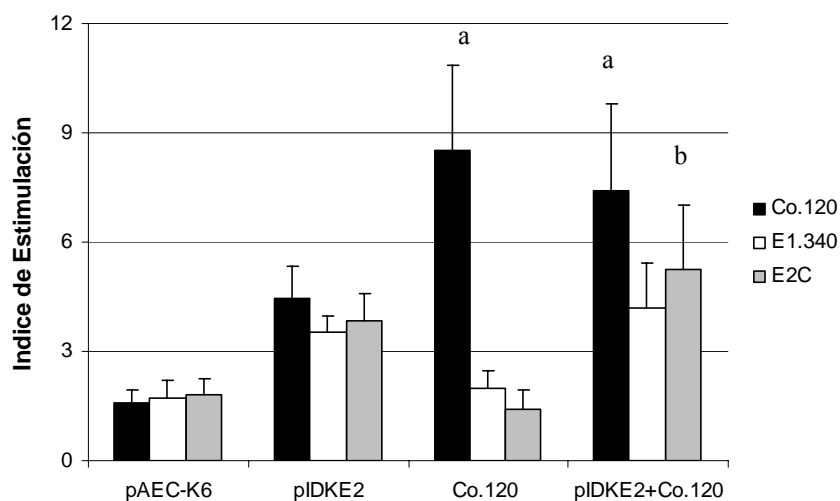


Figura 9. Respuesta linfoproliferativa frente a las proteínas Co.120, E1.340 y E2C. Los ratones se inmunizaron con el plasmidio control negativo pAEC-K6, el plasmidio pIDKE2, la proteína Co.120, o la mezcla pIDKE2+Co.120. El ensayo se realizó en la semana 14 del esquema de inmunización. Las barras representan la media de los Índices de Estimulación (IE) individuales de 5 animales por grupo. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las células de bazo de los animales individuales (5 por grupo) se estimularon con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las diferentes proteínas recombinantes. Se consideraron positivos los IE iguales o superiores a 3. “a”: denota diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo inmunizado con el plasmidio pIDKE2 ($p < 0,001$, ANOVA y Newman Keuls). “b”: denota diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo inmunizado con el plasmidio pIDKE2 ($p < 0,05$, ANOVA y Newman Keuls).

Los valores de IE detectados contra Co.120 en el grupo inmunizado solo con el plasmidio pIDKE2 fueron significativamente inferiores a los detectados en los animales inmunizados con la proteína Co.120 administrada de forma individual o mezclada con el plasmidio pIDKE2 ($p < 0.001$, analizado por ANOVA y Newman-Keuls). Además, el grupo inmunizado con la mezcla mostró IE significativamente superiores contra la proteína E2C con respecto al

grupo inmunizado solo con el plasmidio pIDKE2 ($p < 0.05$, analizado por ANOVA y Newman-Keuls).

Para evaluar la respuesta *in vivo* de los animales inmunizados, se retaron 5 animales de cada grupo con el VV recombinante vvCore. Cuando el reto se efectuó 1 o 3 semanas después de la tercera inmunización, no se encontraron diferencias en los títulos de vvCore entre los grupos inmunizados con relación a los grupos controles. En ese momento, los títulos virales promedios detectados oscilaron entre $1,3 \times 10^6$ y 5×10^6 ufp/mL. En contraste, cuando el reto se efectuó después de las otras dos inmunizaciones en las semanas 12 y 16, los animales que recibieron pIDKE2+Co.120 mostraron un título de vvCore después del reto (**Figura 10**) significativamente inferior al detectado en el resto de los grupos ($p < 0.05$, prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn). De hecho, estas diferencias alcanzan 2 logs, 7 días después de la última inmunización.

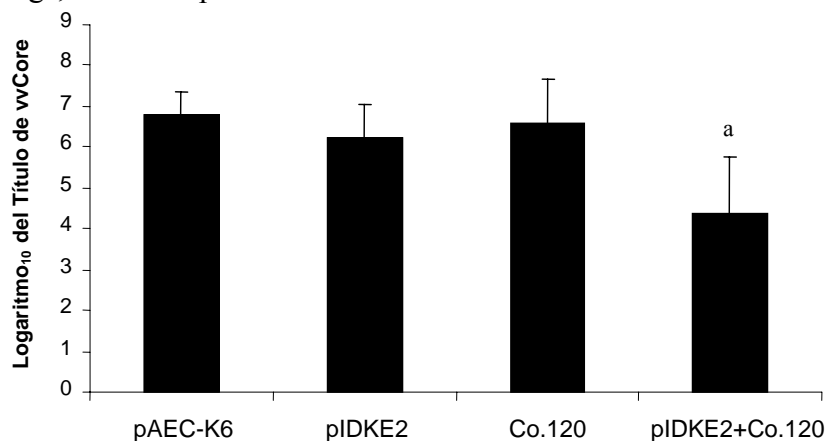


Figura 10. Título de vvCore en los ovarios de los ratones retados. En la semana 17 se retaron cinco animales por grupo (inmunizados con pAEC-K6, pIDKE2, Co.120 o pIDKE2+Co.120 en las semanas 0, 3, 7, 12 y 16), con 10^6 ufp por vía i.p. Los ovarios se extrajeron 5 días después del reto. Las barras indican la media del \log_{10} de los títulos individuales de vvCore de 5 animales por grupo. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. “a”: denota diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de los grupos ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

En ese momento, todos los animales del grupo inmunizado con pIDKE2+Co.120 redujeron en al menos 1 log el título de vvCore con respecto a la media de los títulos virales en el grupo control (pAEC-K6). Cuando el reto se efectúa 21 días después de la última inmunización, los títulos virales medios en el grupo inmunizado con pIDKE2+Co.120 eran todavía dos logs inferiores a los encontrados en el grupo control (datos no mostrados).

Se desarrolló un estudio similar en ratones para evaluar el comportamiento de la preparación pIDKE2+Co.120 frente al reto con el VV recombinante vvRE, que expresa las proteínas de la región estructural del VHC. En este caso se administraron también 5 dosis, pero en las semanas 0, 2, 4, 6 y 12. Dos semanas después de la última inmunización, se retaron los animales con 10^6 ufp de vvRE y 5 días después se evaluaron los títulos de virus en ovarios.

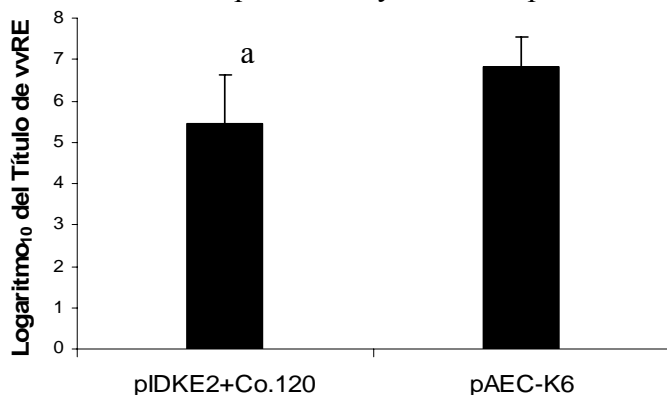


Figura 11. Control de la viremia en un modelo de reto con virus vaccinia. Los resultados se muestran como la media del logaritmo del título de vvRE, en los ovarios de los animales inmunizados. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de 5 animales individuales. “a”: denota diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$, Prueba T de Student).

Como muestra la **Figura 11**, se encontró más de 1 log de diferencia en el título de vvRE detectado en ovarios entre los grupos inmunizados con la mezcla pIDKE2+Co.120 y el control negativo, inmunizado con el plasmidio pAEC-K6. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$, Prueba T de Student).

4.2 Generación de un virus de viruela aviar recombinante para una variante de la proteína de la cápsida y la E1 del virus de la hepatitis C y evaluación de su inmunogenicidad en modelos animales

4.2.1 Obtención del plasmidio codificante para una variante poliproteica cápsida-E1 para la inserción en virus de viruela aviar

Con el objetivo de obtener el plasmidio pFPCoE1 se digirió el plasmidio pIDKE2 con las enzimas de restricción *SmaI* y *BamHI* que tienen sitios de corte en los nt 237 y 1016 de la secuencia que codifica para la poliproteína del VHC, respectivamente. El fragmento obtenido se insertó en los sitios compatibles del plasmidio pFP67xgpt. El fragmento a insertar incluye la secuencia codificante para la proteína de la cápsida desde el aa 79 hasta el 191 y para la proteína E1 desde el aa 192 hasta el aa 338 (**Figura 12A**).

Poxvirus recombinantes para antígenos del VHC

Para comprobar la identidad de la construcción obtenida se digirieron tanto el plasmidio parental como el posible recombinante con las enzimas *ClaI* y *AccI*. El plasmidio parental no posee sitio *ClaI* y tiene un sitio *AccI* en el sitio múltiple de clonaje. La secuencia del fragmento insertado tiene un sitio *ClaI* correspondiente al nt 369 en la secuencia de ADN que codifica para la poliproteína del VHC, por lo que la digestión *ClaI* y *AccI* rinde un fragmento de 655 pb en el recombinante; pero no en el plasmidio parental. En la **Figura 12 B** se observa que el patrón de bandas obtenido de la digestión se corresponde con lo esperado.

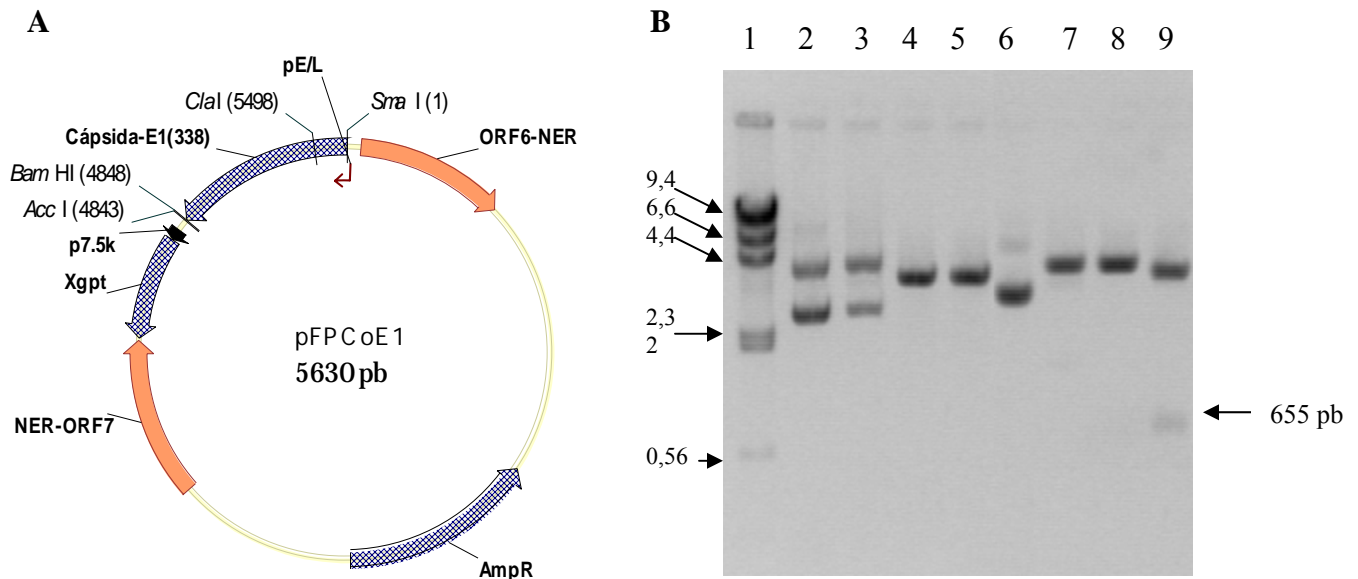


Figura 12. Esquema del plasmidio pFPCoE1 (A) y análisis de restricción (B). El plasmidio incluye secuencias homólogas al genoma de VVA (NER-ORF7, ORF6-NER), un promotor sintético para VVA (P E/L), el promotor 7,5 K de virus vaccinia (P 7,5) y el gen de la xantina guanina fosforribosil transferasa (Xgpt), el gen que confiere resistencia a la ampicilina (AmpR), la secuencia codificante para los aa 79-338 de la poliproteína del VHC (Cápsida-E1) y el análisis de restricción correspondiente (B). Los carriles corresponden a 1: λ *HindIII*, 2: pFP67xgpt nativo, 3: pFP67xgpt digerido *ClaI*, 4: pFP67xgpt digerido *AccI*, 5: pFP67xgpt digerido *ClaI/AccI*, 6: pFPCoE1 nativo, 7: pFPCoE1 digerido *ClaI*, 8: pFPCoE1 digerido *AccI*, 9: pFPCoE1 digerido *ClaI/AccI*. La flecha de la derecha indica el fragmento obtenido. A la izquierda del panel aparece el número de kpb de los fragmentos del patrón λ *HindIII*

4.2.2 Obtención de virus de viruela aviar recombinante para la proteína de la cápsida y la E1 del virus de la hepatitis C

Con vistas a obtener este recombinante se infectaron FEP con la cepa FP9 de VVA y luego fueron transfectados con el plasmidio pFPCoE1. Después de tres pases de selección en FEP con medio selectivo DMEM-MXH, se amplificó el producto viral de una placa de infección. Con este banco primario del virus se infectaron FEP, después de 4 días se extrajo el ADN viral que sirvió de molde para un RCP usando los oligonucleótidos 3333 y 6418. El

oligonucleótido 6418 es complementario a la secuencia +35 con respecto al promotor E/L, el 3333 es complementario a 353-376 nt de la la secuencia que codifica para la poliproteína del VHC, por lo que el fragmento que se debe amplificar en caso de que el virus sea recombinante es de 800 pb. La **Figura 13** muestra que cuando se utiliza el ADN de células infectadas con el virus FPCoE1 se obtiene dicho fragmento, pero cuando el ADN molde procede de células infectadas con el virus parental no se obtiene el fragmento amplificado. Esto revela el carácter recombinante del virus FPCoE1.

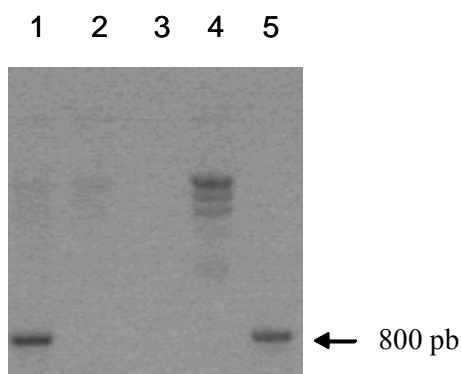


Figura 13. Análisis en gel de agarosa al 0,8% de la RCP a partir de ADN de FEP infectados con VVA. Se emplearon los oligonucleótidos 6418 y 3333 de DNA extraído de FEP infectados con FPCoE1 o FP9. La flecha señala el fragmento amplificado. Los carriles corresponden a: 1: FPCoE1, 2: FP9, 3: Control negativo, 4: λ Hind III, 5: plasmidio pFPCoE1 como control positivo.

Para corroborar el carácter recombinante del VVA FPCoE1, se estudió la expresión de los productos proteicos en FEP infectados con los virus FPCoE1 y FP9, según se refiere en Materiales y Métodos. Se tomaron muestras de las monocapas de las células infectadas de ambos virus a las 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la infección, las cuales se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y a través de *Western blotting*.

En la **Figura 14A** se observa en la electroforesis de proteínas la presencia de bandas en los carriles correspondientes a las muestras infectadas con FPCoE1, que no se detectan en la corrida de las muestras infectadas con FP9. En el *Western blotting* (**Figura 14B**) se pudo verificar la expresión de una proteína diferencial, con una talla entre los 31 a 45 kDa que se corresponde con la poliproteína CoE1, la cual es a su vez reconocida por una mezcla de sueros humanos provenientes de pacientes infectados con VHC, reactivos a la proteína de la cápsida. La mezcla de sueros provenientes de pacientes VHC positivos que se utilizó en el *Western blotting* se adsorbió frente a FEP infectados con el VVA parental, FP9.

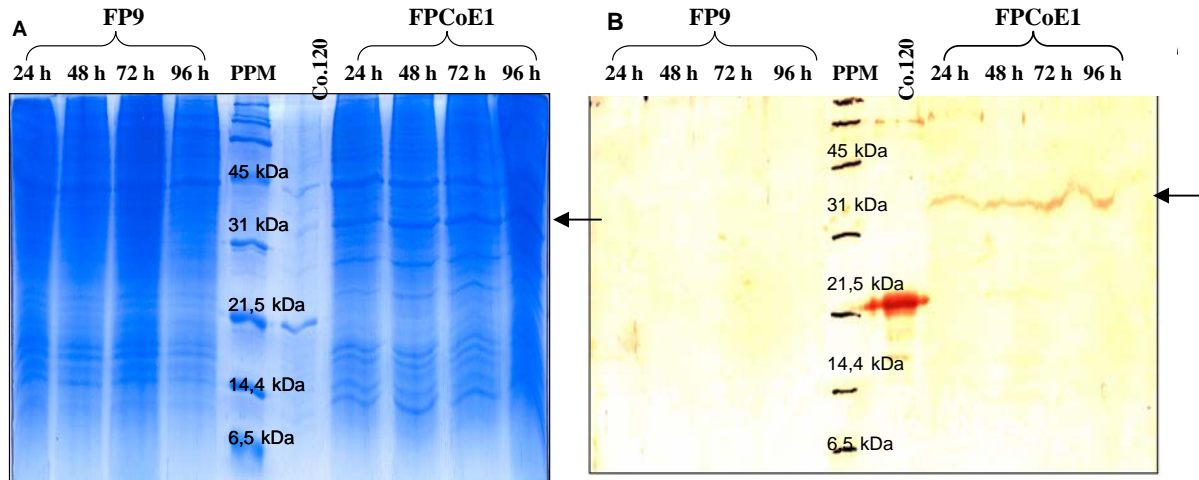


Figura 14. Análisis mediante electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalizantes (A) y *Western blotting* (B) de la expresión de proteínas en FEP infectados con los VVA FP9 y FPCoE1. Como control positivo para la inmunodetección se utilizó la proteína recombinante de la cápsida, Co.120. PPM, patrón de peso molecular. En el *Western blotting* se empleó una mezcla de sueros humanos que reconocen la proteína de la cápsida del VHC, previamente adsorbida frente a FEP infectados con FP9 y un anticuerpo policlonal anti-IgG humano obtenido en carnero conjugado a peroxidasa. La membrana se reveló empleando AEC. La cabeza de flecha indica la posición aproximada de la poliproteína CoE1.

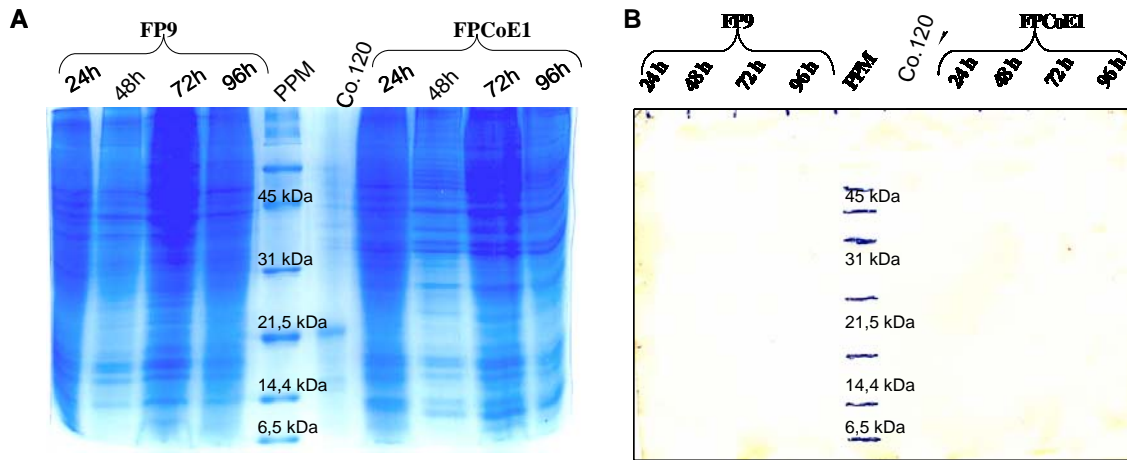


Figura 15. Análisis mediante electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalizantes (A) y *Western blotting* (B) de la expresión de proteínas en FEP infectados con los VVA FP9 y FPCoE1. Como control positivo para la inmunodetección se utilizó la proteína recombinante de la cápsida, Co.120. PPM: patrón de peso molecular. En el *Western blotting* se empleó una mezcla de sueros humanos provenientes de individuos anti-VHC negativos, previamente adsorbida frente a FEP infectados con FP9 y un anticuerpo policlonal anti-IgG humano obtenido en carnero conjugado a peroxidasa. La membrana se reveló empleando AEC.

Como control negativo adicional se evaluó el reconocimiento de las muestras por una mezcla de sueros humanos VHC negativos provenientes de individuos sanos (**Figura 15**), bajo las mismas

condiciones. Como se puede apreciar en la **Figura 15B** no se observa reconocimiento de los productos de expresión del VVA recombinante FPCoE1 por dicha mezcla.

Estos resultados muestran la expresión de la poliproteína expresada por el VVA recombinante, FPCoE1 de forma no procesada desde las 24 h.

4.2.3 Estudios de inmunogenicidad del virus de viruela aviar recombinante para la proteína de la cápsida y la E1 del virus de la hepatitis C en ratones

Una vez demostrado el carácter recombinante del VVA recombinante FPCoE1, se procedió a realizar un esquema de inmunización en ratones, tal como se describe en Materiales y Métodos. Los animales se inmunizaron con FPCoE1 o FP9 en las semanas 0 y 3. La presencia de Acs anti-cápsida y E1 en las semanas 0 y 4 del esquema de inmunización se determinó mediante un ensayo inmunoenzimático en fase sólida. En el grupo inmunizado con FPCoE1 sólo un ratón presentó respuesta de Acs contra Acs del VHC (positiva contra Co.120 y E1.340), para un 10% de seroconversión. En el grupo inmunizado con FP9 ningún ratón mostró respuesta contra ninguna de las dos proteínas (datos no mostrados).

Se evaluó la respuesta de linfocitos secretores de IFN- γ frente a Acs del VHC mediante un ELISPOT, en la semana 5. Las células de bazo se estimularon con las proteínas Co.120 o E1.340, o se enfrentaron a P815 infectadas previamente con vvCore. No se detectó respuesta frente a la proteína E1 en este ensayo. En contraste, el 60% de los animales inoculados con FPCoE1 desarrollaron una respuesta de secreción de IFN- γ frente a la proteína Co.120. (**Figura 16A**). También se observó respuesta frente a la proteína de la cápsida en el 80% de los animales inmunizados con FPCoE1 cuando se utilizaron células P815 infectadas con VV recombinante vvCore como células presentadoras en el ensayo (**Figura 16B**). En este caso, la media del número de puntos/millón de células de bazo en los animales inmunizados con FPCoE1 fue significativamente superior al valor obtenido en los animales inmunizados con FP9 ($p=0,0079$ Prueba Mann-Whitney), lo cual no se aprecia para la respuesta de secreción de IFN- γ frente a la proteína Co.120 ($p=0,22$ Prueba de Mann-Whitney). En el grupo inmunizado con FP9 no se detectó respuesta específica de secreción de IFN- γ .

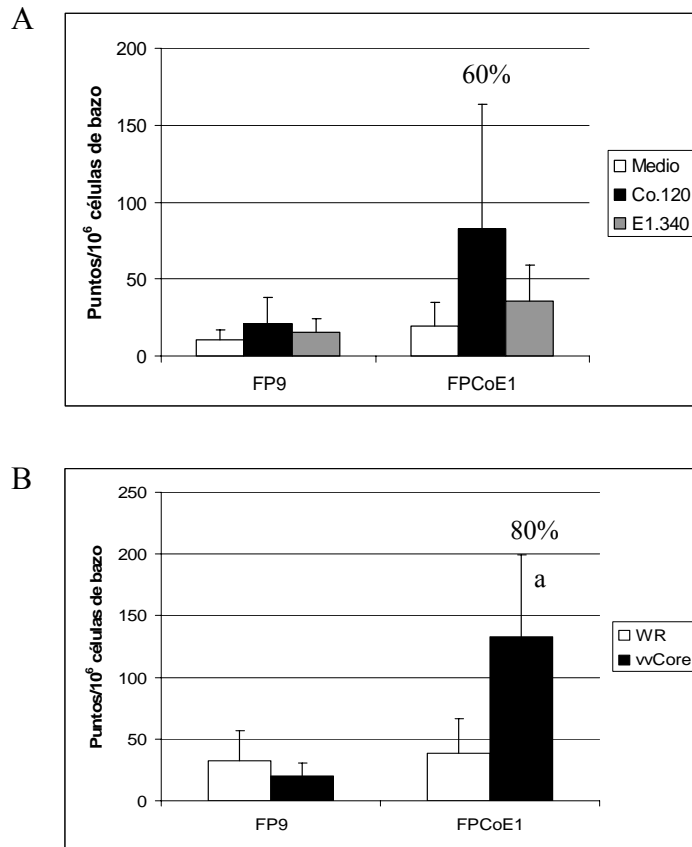


Figura 16. Respuesta de secreción de IFN- γ determinada por ELISPOT en ratones inmunizados. Las células de bazo se estimularon con **(A)** las proteínas Co.120 y E1.340 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y RPMI 1640 o **(B)** P815 infectadas con WR o vvCore. Los resultados se presentan como la media de CFP/ 10^6 células de bazo de cinco animales por grupo. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Los valores sobre las columnas indican el porcentaje de animales positivos en esa condición. “a” indica diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0079$) entre el grupo inmunizado con FPCoE1 y el grupo inmunizado con FP9 usando la prueba de Mann-Whitney. Se consideró como resultado positivo el valor en el número de CFP por 10^6 células de bazo que excediera en dos veces el número de CFP por 10^6 células de bazo detectados en el control negativo para cada grupo (medio o WR). Además, el número de puntos en los pozos estimulados debe ser superior a 10.

En aras de evaluar la funcionalidad de la respuesta inmune inducida por la administración del FPCoE1 en ratones, dos semanas después de la última inmunización, cinco animales por grupo se retaron con WR o vvRE. Los títulos virales se determinaron en ovarios y los datos se muestran en la **Figura 17**. Se observaron diferencias estadísticamente significativas, en cuanto al título de VV vvRE, entre los animales inmunizados con FPCoE1 y FP9 ($p=0,0001$, según Prueba T de Student). Es de destacar que no se detectó presencia de vvRE en los ovarios del 40% de los animales inmunizados con FPCoE1. En contraste, no se encontraron diferencias en los títulos de VV WR en los ovarios de los animales inmunizados con FPCoE1 y FP9. Estos elementos indican que el virus recombinante FPCoE1 es capaz de inducir una

respuesta inmune específica en ratones capaz de controlar la viremia después del reto con vvRE.

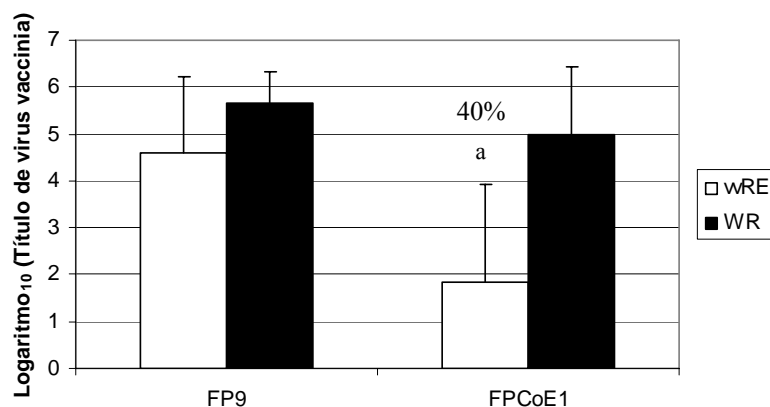


Figura 17: Títulos de virus vaccinia en los ovarios de los ratones retados. Los ratones inmunizados con virus FP9 o virus FPCoE1 se retaron en la semana 5 con 10^6 pfu de vvRE o WR, por inoculación i.p. Los ovarios se extrajeron 5 días después de la inoculación. Las barras indican la media del \log_{10} de los títulos de virus vaccinia en los animals individuales. Estos resultados comprenden datos de 3 experimentos individuales, con 5 animales individuales en cada caso. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Los valores de porcentaje se refieren a los animales que se protegieron totalmente frente al reto con vvRE. “a” indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) con respecto a los títulos de vvRE, entre los animales inmunizados con FP9 y FPCoE1, según la prueba T de Student.

4.2.4 Evaluación de la efectividad de diferentes estrategias de sensibilización/recuerdo con el virus de viruela aviar recombinante FPCoE1 y la preparación pIDKE2+Co.120 en ratones BALB/c

Con vistas a estudiar el comportamiento de la respuesta inducida por el FPCoE1 a más largo plazo después de la última inoculación, así como la capacidad potencial de la mezcla pIDKE2+Co.120 de incrementar la respuesta de Ac y mantener o mejorar el control de la viremia en el modelo de reto con VV, inducido por el VVA recombinante FPCoE1, se inmunizaron ratones BALB/c en diferentes estrategias de sensibilización/recuerdo. Los dos primeros grupos recibieron dos inoculaciones de FP9 y FPCoE1, respectivamente, en las semanas 0 y 3. Otro grupo recibió dos inoculaciones con FPCoE1 en las semanas 0 y 3, y luego dos inoculaciones de la mezcla pIDKE2+Co.120 en las semanas 6 y 9; un cuarto grupo recibió primero la mezcla pIDKE2+Co.120 en las semanas 0 y 3, y luego la administración del FPCoE1 en las semanas 9 y 12. Los grupos 5 y 6 recibieron cuatro inoculaciones en las

semanas 0, 3, 7 y 12 con la mezcla pIDKE2+Co.120 o el plasmidio control negativo pAEC-K6, respectivamente.

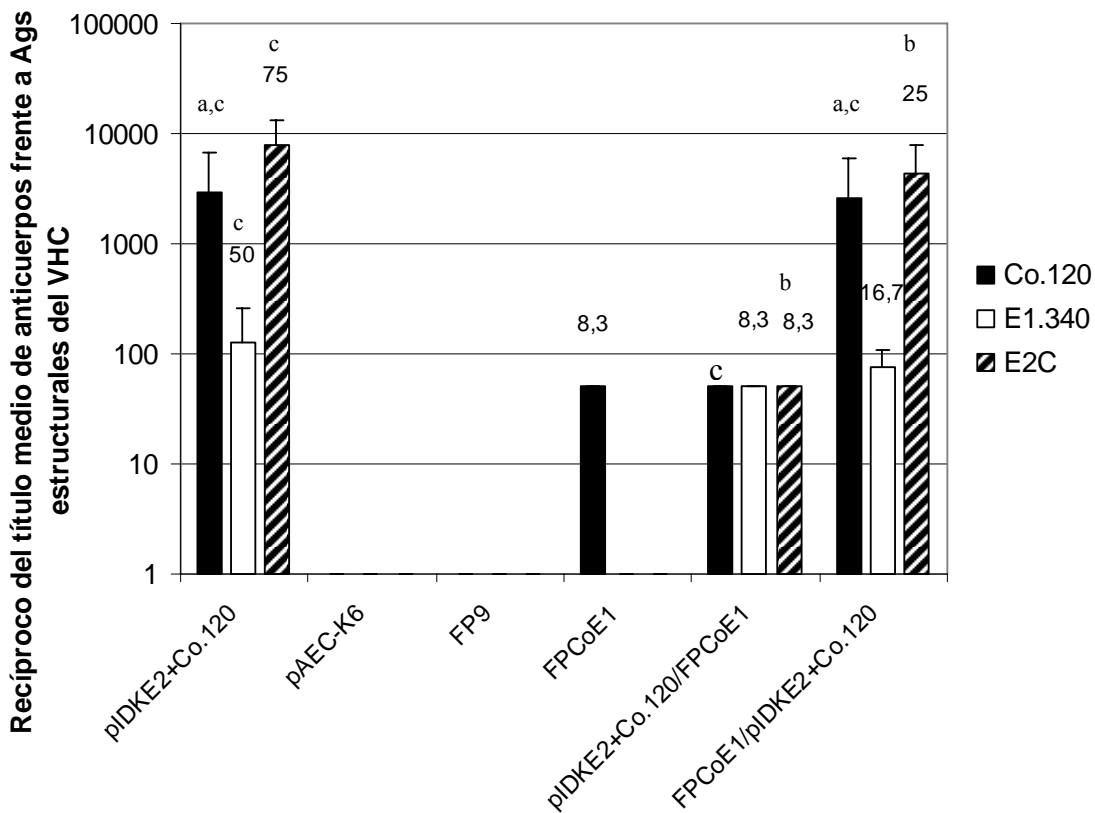


Figura 18. Respuesta humoral contra las proteínas estructurales del VHC en la semana 14 del esquema de inmunización. Las barras representan las medias de los títulos de Acs de los animales que seroconvirtieron en cada grupo frente a cada proteína. Las barras de error indican la desviación estándar de la media en cada caso. En el eje x se indican los inmunógenos recibidos por cada grupo. Sobre cada barra se indica el porcentaje de seroconversión de cada grupo, cuando el porcentaje fue menor de un 100%. La “a” denota diferencias estadísticamente significativas en el recíproco del título de Acs con respecto al grupo pIDKE2+Co.120/FPCoE1 ($p < 0,01$, prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn). La “b” denota diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de serconversión con respecto al grupo pIDKE2+Co.120 ($p < 0,05$, Prueba exacta de Fisher). “c” denota diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de serconversión con respecto a los grupos pAEC-K6, FP9 y FPCoE1 ($p < 0,005$, Prueba exacta de Fisher)

Como muestra la **Figura 18**, en la semana 14, el grupo inmunizado con la mezcla de ADN+proteína mostró una respuesta de Acs positiva contra todos los Ags estructurales, con títulos de Acs contra las proteínas de la cápsida y la E2, superiores a 1:2000. Los grupos inmunizados con regímenes de sensibilización/recuerdo tuvieron respuesta detectable de Acs contra todos los Ags estructurales del VHC, mostrando porcentos de seroconversión contra la proteína de la cápsida superiores a los del grupo inmunizado con el VVAr FPCoE1 solo

($p < 0,001$, Prueba Exacta de Fisher). Sin embargo, el porcentaje de seroconversión contra E2 en los grupos inmunizados con regímenes de sensibilización/recuerdo fue significativamente inferior al observado en el grupo inmunizado con pIDKE2+Co.120 ($p < 0,05$, Prueba exacta de Fisher). En cuanto a la magnitud de la respuesta contra la proteína de la cápsida, existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos inmunizados con pIDKE2+Co.120 y FPCoE1/pIDKE2+Co.120, con respecto al grupo inmunizado con pIDKE2+Co.120/FPCoE1 ($p < 0,01$, prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Dunn). Solo un ratón mostró respuesta de Acs contra la proteína de la cápsida (título 1:50) en el grupo inmunizado únicamente con el virus FPCoE1. No se detectó respuesta de Acs contra los Ags estructurales del VHC en los ratones inmunizados con los controles negativos (FP9 y pAEC-K6).

Adicionalmente, en la semana 14 se retaron cinco animales de todos los grupos con vvRE. En los dos grupos que habían sido inmunizados bajo los regímenes de sensibilización/recuerdo uno de los cinco animales retados resultó totalmente protegido. Entre esos dos grupos no se encontraron diferencias significativas con relación al título viral; sin embargo, sí tienen diferencias significativas con el resto de los grupos ($p < 0,01$, prueba de ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls). En los animales inmunizados con el virus FPCoE1 o pIDKE2+Co.120 no se alcanzó protección ni hubo reducción significativa del título viral en la semana 14, en comparación con los controles correspondientes (**Figura 19**).

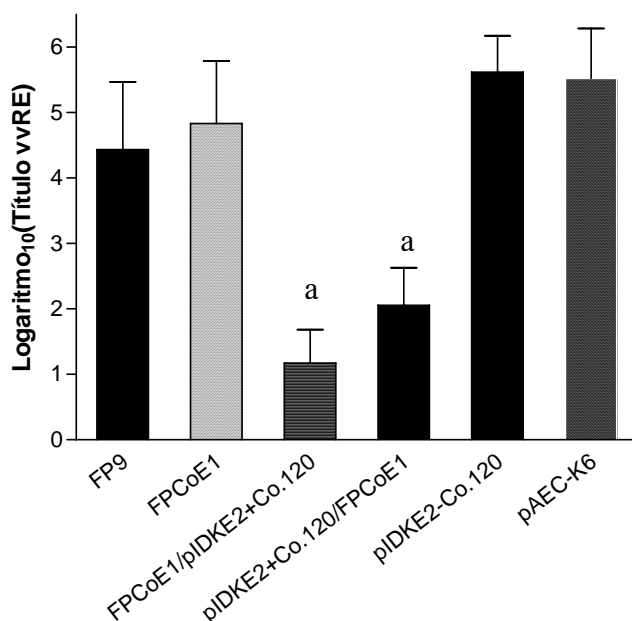


Figura 19. Títulos de vvRE en macerados de ovarios de ratones retados en la semana 14 del esquema de inmunización. En el eje x se indican los inmunógenos recibidos por cada grupo. Las barras representan la media del título viral expresado como logaritmo₁₀ de 5 animales individuales por grupo. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media. La “a” denota diferencias estadísticamente significativas $p < 0,01$ (prueba de ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls) con respecto a los grupos FP9, FPCoE1, pIDKE2-Co.120 y pAEC-K6.

4.2.5 Evaluación de la inmunogenicidad del virus de viruela aviar recombinante FPCoE1 en monos verdes

Se inmunizaron monos verdes *Cercopithecus aethiops sabaesus* para profundizar en la evaluación de la inmunogenicidad del VVA FPCoE1, recombinante para los Ags de la cápsida y la E1 del VHC, en otro modelo animal más cercano a humanos. Cuatro animales se inmunizaron con el virus FPCoE1 y 2 animales con el virus control negativo FP9, según se describió en Materiales y Métodos. Teniendo en cuenta los resultados del esquema de sensibilización/recuerdo, se incluyó una dosis adicional con FPCoE1 con respecto al esquema en ratones.

En correspondencia con los resultados en ratones, la respuesta inmune humoral en los monos fue débil, detectándose un 25% de seroconversión contra E1 y no se detectó respuesta de Acs contra la proteína de la cápsida en los animales inmunizados con FPCoE1, dos semanas después de la última inmunización. No se detectó respuesta específica de Acs en los animales inmunizados con FP9 (datos no mostrados).

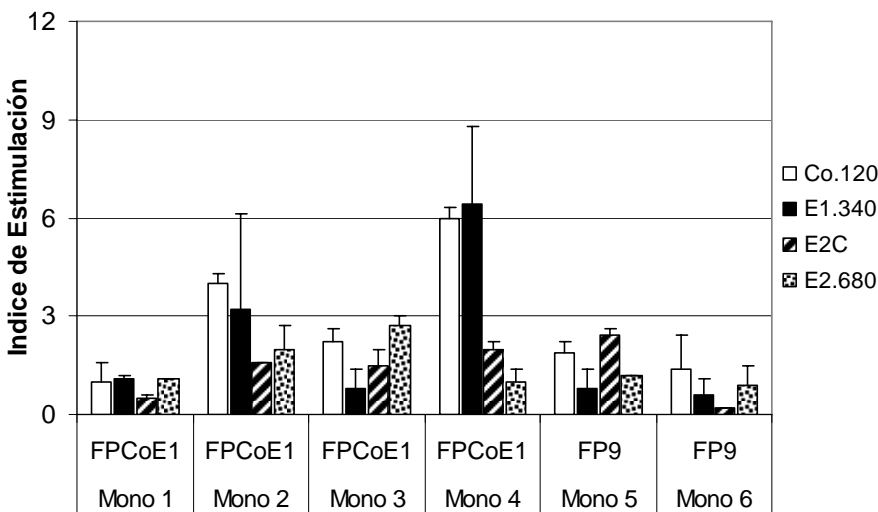


Figura 20. Respuesta proliferativa de los linfocitos de sangre periférica de monos verdes ante la estimulación con las proteínas recombinantes Co.120, E1.340, E2C y E2.680. Los resultados se muestran como índice de estimulación (IE) determinado como la relación entre el promedio de los conteos por minuto (cpm) obtenidos con la estimulación y los obtenidos con el RPMI 10%. Las barras de error indican la desviación estándar de la media de 3 réplicas.

El análisis de la respuesta celular se efectuó a través de un ensayo de proliferación a partir de linfocitos de sangre periférica de cada uno de los animales (**Figura 20**). Los resultados muestran un 50% de respuesta linfoproliferativa positiva contra la proteína de la cápsida y la proteína E1 en el grupo inmunizado con FPCoE1. En cambio, en el grupo inmunizado con

FP9 no se observa respuesta linfoproliferativa positiva ante la estimulación con los Ags utilizados (**Figura 20**). De la misma manera, el 100% de los animales muestra una respuesta proliferativa negativa ante las dos variantes recombinantes de la proteína de la envoltura E2, lo cual demuestra la especificidad del ensayo.

Para evaluar la respuesta *in vivo* del VVA recombinante FPCoE1 en monos, se llevó a cabo el reto de los animales con el VV recombinante vvRE. El VV recombinante se administró por vía subcutánea, 14 días después de la tercera inoculación, y se determinó el título viral en la sangre de los animales de cada grupo. Las determinaciones de viremia en sangre se realizaron los días 2, 5, 7 y 14, posteriores al reto.

En la **Figura 21** se puede observar que no se detectó carga viral de vvRE en ninguna de las determinaciones realizadas en la sangre de los animales del grupo inmunizado con el virus FPCoE1. En cambio, en el grupo control negativo, inmunizado con el virus FP9, se detecta título de vvRE en los días 5 y 7 posteriores al reto. En los animales inmunizados con el virus FP9 no se detectó virus vvRE en sangre a partir del día 14 posterior al reto (**Figura 21**).

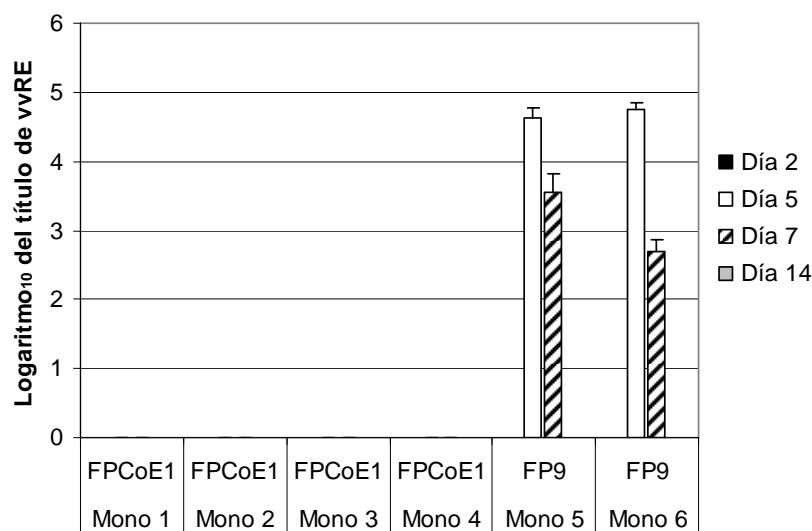


Figura 21. Titulación de vvRE en la sangre de los monos inmunizados con los virus FPCoE1 y FP9. Los animales se retaron el día 14 posterior a la última inoculación con 10^7 ufp de vvRE. Las barras representan la media de 2 réplicas experimentales. Las barras de error indican la desviación estándar entre réplicas experimentales.

Como otro punto de análisis, se estudió la aparición de lesiones, en el sitio de inoculación, posterior al reto con VV recombinante (**Figura 22**). Las lesiones detectadas en el sitio de administración iniciaron con la aparición de un ligero hematoma con engrosamiento de la piel

que posteriormente evolucionó hacia la necrosis de la zona circundante al sitio de inoculación, con posterior formación de lesiones ulcerosas.



Figura 22. Visualización del sitio de inoculación del reto con virus vaccinia recombinante en monos inmunizados con FPCoE1 (A) y con FP9 (B).

Tal y como se muestra en la **Figura 23**, solo uno de los animales inmunizados con el virus FPCoE1 manifestó una pequeña lesión al segundo día posterior al reto, la cual había desaparecido en la determinación realizada al quinto día después del reto (**Figura 23**). En cambio, el 100% de los animales inmunizados con FP9 manifestaron lesiones que se mantuvieron al menos hasta el séptimo día posterior al reto, con diferencias en el momento de aparición (día 2, animal 5 y día 5, animal 6). No obstante, es válido destacar que el día 14 posterior al reto ya las lesiones habían desaparecido totalmente en el 100% de los animales que las padecieron (**Figura 23**).

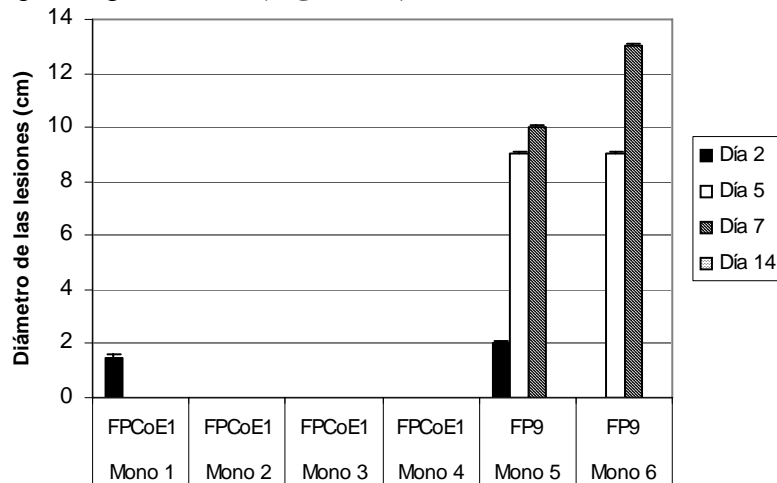


Figura 23. Diámetro de las lesiones observadas posteriores al reto con el vvRE en el sitio de inoculación, para cada uno de los animales. Las barras de error indican la desviación estándar entre dos mediciones independientes.

De acuerdo a los resultados presentados, el VVA recombinante FPCoE1 es capaz de inducir una respuesta inmune específica y control de la infección en un modelo de reto con virus sustituto en monos verdes.

5. Discusión

Actualmente siguen siendo limitados los sistemas *in vitro* o *in vivo* que permitan la replicación adecuada del VHC. Esta situación ha retardado el desarrollo de vacunas y tratamientos efectivos frente a este patógeno. Debido a esto, la búsqueda de modelos alternativos que permitan estudiar los Ags del VHC, sus roles en la infección, y la respuesta inmune inducida contra ellos, sigue revistiendo suma importancia. La alternativa de generar virus sustitutos recombinantes para Ags del VHC, como herramientas en este sentido, es una de las más exploradas (Pancholi *y cols.* 2003; Murata *y cols.* 2003).

En el presente trabajo se generaron VV recombinantes para Ags estructurales de un aislamiento cubano del VHC de genotipo 1b. Particularmente, los aislamientos de genotipo 1b son de los más representados epidemiológicamente y se distinguen por su resistencia a los tratamientos antivirales en uso, entre otras características (Hadziyannis *y cols.* 2004), por lo que el conocimiento detallado de los mismos tiene un significado particular. De acuerdo a los resultados presentados, la capacidad replicativa de los VV que expresan la proteína de la cápsida del VHC de genotipo 1b, de forma individual o como poliproteína, fue similar entre sí y con relación al VV parental.

Por otra parte, el comportamiento electroforético de la proteína de la cápsida del VHC, en muestras de células infectadas por los VV recombinantes, sugiere que este Ag viral es procesado de forma similar a lo descrito para la poliproteína viral. Este hecho se confirma por el reconocimiento diferencial de la proteína E2 del VHC, observado en las muestras de células infectadas por el vvRE. Es conocido que los Ags estructurales del VHC se procesan por acción de proteasas presentes en células de mamíferos sobre la poliproteína viral (Penin *y cols.* 2004b). De hecho, tanto el procesamiento de los Ags estructurales, como la asociación de la proteína de la cápsida al precipitado celular, están en concordancia con otros estudios *in vitro* realizados previamente (Boulant *y cols.* 2005; McLauchlan, 2000).

Los VV recombinantes para Ags del VHC generados en este trabajo mostraron capacidad replicativa tanto *in vitro* como *in vivo*. En trabajos previos, se han descrito cambios en los niveles de replicación de algunos VV recombinantes, incluyendo diferencias en los tamaños de placas y morfología, con relación al virus parental, producto de la manipulación genética (Chan *y cols.* 2005). En sentido general, en el presente trabajo no se detectaron diferencias de esa naturaleza. Solo se observaron diferencias en los títulos virales detectados en la fracción

intracelular entre vvRE y WR en estadios tempranos de la replicación, fenómeno que pudiera estar asociado a la línea celular empleada para el análisis, pero estas diferencias no se encontraron ya a las 48 h de infección. Debe destacarse que no se apreciaron diferencias en cuanto a la replicación *in vivo* entre los diferentes VV evaluados.

Anteriormente, VV recombinantes para la proteína de la cápsida del VHC han mostrado una virulencia incrementada en ratones. Específicamente, se encontraron mayores títulos virales en el hígado de los animales inoculados con un virus vaccinia recombinante para la proteína de la cápsida, al comparar con el virus parental (Large *y cols.* 1999). En nuestro estudio, el título viral se determinó en ovarios, ya que este es el órgano preferencial de replicación del VV en los ratones (Binder *y cols.* 1991). En este órgano encontramos títulos virales similares al comparar los animales inoculados con los VV recombinantes o el parental.

Por otra parte, Large *y cols.*, también encontraron niveles incrementados de mortalidad en los ratones inoculados con un VV recombinante para la proteína de la cápsida, en comparación con el virus parental y con un VV recombinante para las proteínas no-estructurales del VHC. Los resultados obtenidos previamente por Zhang *y cols.* sugieren que la respuesta inmune del hospedero no contribuye a la mortalidad inducida por la proteína de la cápsida del VHC (Zhang, 2003). Sin embargo, en nuestro estudio no se encontró un efecto letal de los VV recombinantes después de la inoculación con una dosis alta de virus. Una posible explicación para estos resultados contradictorios pudiera ser la diferencia en las secuencias codificantes para la proteína de la cápsida que se usan para la obtención de los recombinantes, ya que en el estudio de Large se emplean secuencias correspondientes a un aislamiento del VHC de genotipo 1a (Shirai *y cols.* 1994), y en el nuestro provienen de uno de genotipo 1b (Morales, 1998). Sin embargo, la identidad de las secuencias codificantes para la proteína de la cápsida del VHC contenidas en ambos virus es elevada (92,6% a nivel nucleotídico y 98, 2% a nivel de aa). Se detectan diferencias en las posiciones 75 (TxS), 91 (CxM) y 176 (IxL) de la proteína de la cápsida expresada. Hasta ahora no se ha establecido claramente la importancia de un genotipo particular o de motivos de secuencia específicos que resulten críticos para la infectividad o la aparición de un efecto letal relacionado con antígenos del VHC.

Los VV recombinantes se han empleado ampliamente como herramientas para la evaluación de la respuesta celular inducida contra Ags virales en modelos animales y en humanos. En particular, se ha empleado el modelo de reto con VV recombinantes para medir la respuesta *in*

vivo frente a Ags provenientes del virus de la estomatitis vesicular, el VIH, el virus del papiloma humano y el VHC, entre otros (Bachmann *y cols.* 1994; Kent *y cols.* 1998; Marais *y cols.* 1999; Wedemeyer *y cols.* 2001). En este mismo sentido se evaluaron en el presente trabajo los VV recombinantes para Ags estructurales del VHC, para estudiar la respuesta inmune inducida por candidatos vacunales basados en los Ags estructurales de un aislamiento cubano de genotipo 1b. Se destaca que la co-administración del plasmidio pIDKE2 y la proteína recombinante Co.120 generó una respuesta inmune capaz de controlar la infección con el VV vvCore y con el VV vvRE. Otros candidatos vacunales basados en adenovirus y virus de viruela de canarios han mostrado diferentes grados de protección específica frente a retos con VV recombinantes (Pancholi *y cols.* 2003; Arribillaga *y cols.* 2002), pero los resultados presentados son la primera demostración de que una mezcla de ADN y proteína logra este tipo de protección. Los resultados del reto con VV recombinantes también permiten evaluar la importancia de factores como el número y frecuencia de las inmunizaciones, así como el tiempo necesario para el desarrollo de una respuesta inmune funcional en este modelo de reto con virus sustituto.

Se ha demostrado que la protección frente a la infección primaria por VV en ratones se logra a través de respuesta de LTC, mientras los Acs cooperan en el aclaramiento y evitan la diseminación (Hirsch *y cols.* 1968). Se han hecho estudios de protección en los cuales a ratones BALB/c se les elimina las células T CD8⁺ y se evidencia la pérdida total de protección frente a un reto con VV recombinante. Sin embargo, el tratamiento con Acs anti-IFN- γ y anti-TNF- α no afectó el nivel de protección (Binder *y cols.* 1991). Particularmente, existen evidencias experimentales bien establecidas que indican que en el modelo de reto con VV recombinantes en ratones, la respuesta protectora está mediada por la respuesta celular frente a los Ags compartidos entre el virus y el inmunógeno usado (Doherty *y cols.* 1989; Arribillaga *y cols.* 2002; Murata *y cols.* 2003). En estudios anteriores se encontró que en ratones esta protección estaba mediada por células T CD8⁺, porque la eliminación *in vivo* de estas células en el momento del reto con un VV recombinante para Ags del VHC, previene la protección inducida por un adenovirus de replicación deficiente, recombinante para la proteína no estructural NS3 del VHC (Arribillaga *y cols.* 2002). Sin embargo, la eliminación de las células T CD4⁺ durante la fase efectora no elimina el efecto protector inducido por la inmunización con el adenovirus, frente al reto con VV. En cambio, la eliminación de estas

células antes de la inmunización con el adenovirus recombinante para la proteína NS3 del VHC, evitó la protección frente al reto; sugiriendo que la inducción de las células T CD4+ específicas, en este caso particular a NS3, es un paso necesario para la manifestación de una inmunidad protectora frente al reto en este modelo animal (Arribillaga *y cols.* 2002).

Por otra parte, usando ratones que carecen del receptor de IFN- γ , se ha podido demostrar que esta citocina es importante para controlar la infección con VV (Huang *y cols.* 1993). Sin embargo, la adición de Acs anti-IFN- γ en la fase efectora (días 1 y 2 después del reto con VV en ratones BALB/c) no elimina la protección frente al reto inducida por la inmunización con adenovirus recombinante a NS3. Estos resultados sugieren que en la infección con VV el IFN- γ juega un rol importante, principalmente durante la fase de inducción de la respuesta inmune (Arribillaga *y cols.* 2002). Por tanto, el sistema de reto con los VV recombinantes para Acs del VHC de un aislamiento de genotipo 1b, desarrollados en este trabajo, es una herramienta poderosa para el estudio de la respuesta celular funcional *in vivo*.

Los poxvirus recombinantes, además de utilizarse en sistemas de reto, o como herramientas para estudios *in vitro*, se emplean como vectores vivos en estrategias vacunales frente a diferentes patógenos. Varios candidatos vacunales basados en poxvirus recombinantes han llegado a estudios clínicos con resultados satisfactorios de seguridad y de generación de respuesta inmune (Cao *y cols.* 2003). Una de las características de la respuesta inmune generada por estos vectores es la generación de respuesta inmune celular frente a los Acs heterólogos, lo que es deseable en un candidato vacunal contra el VHC. Esto se debe a que, aunque no se han establecido completamente los parámetros de la respuesta inmune que correlacionan con la protección frente a la infección por el VHC, existen evidencias de que la respuesta celular tiene un rol protagónico. En estudios realizados en chimpancés (Grakoui *y cols.* 2003) y humanos (Thimme *y cols.* 2001) se ha encontrado que el aclaramiento viral y la recuperación clínica guardan una fuerte correlación con la potencia y la especificidad de las células T. Cuando se induce un agotamiento de los linfocitos T CD4+ o CD8+ se previene el aclaramiento viral en chimpancés (Shoukry *y cols.* 2003; Grakoui *y cols.* 2003), así como la recuperación clínica. Por otra parte, se ha observado en estudios tanto en chimpancés como en humanos que el fallo en la generación de respuestas inmunes celulares multiespecíficas contra el VHC en la fase aguda de la infección está asociado a la cronicidad (Bassett *y cols.* 2001).

Por estos motivos se persigue que los candidatos vacunales generen respuestas de LTC y linfoproliferativas frente a los Ags del VHC.

Los avipoxvirus recombinantes han sido poco evaluados como candidatos vacunales contra el VHC, a pesar de sus ventajas potenciales. Todos los avipoxvirus tienen capacidad inmunomoduladora (Fachinger *y cols.*, 2000) y particularmente el VVA es capaz de infectar células dendríticas y estimular células T Ag específicas *in vitro* (Brown *y cols.* 2000). Se conoce que las infecciones virales pueden ser controladas por LTC en ausencia incluso de respuesta inmune de Acs. Particularmente, la resolución de la infección aguda por el VHC se ha asociado con una respuesta de linfocitos T CD8+ multiespecíficos (Lauer *y cols.* 2004). En el presente trabajo se generó el VVA recombinante FPCoE1, que expresa una variante proteica que comprende los aa 79-338 de la poliproteína viral de un aislamiento del VHC de genotipo 1b.

La proteína de la cápsida y la E1 son blancos relevantes del sistema inmune debido a que forman parte del virión y tienen funciones importantes en el ciclo de replicación viral. Específicamente, la porción C-terminal de la proteína de la cápsida incluye varios epitopos bien conservados y reconocidos por linfocitos T CD8+ y CD4+ (Cerny *y cols.* 1995). Además, la inducción de respuestas fuertes de linfocitos T CD4+ frente a la proteína de la cápsida se ha asociado con infecciones auto-resueltas (Missale *y cols.* 1996). Sin embargo, en la región N-terminal de la proteína de la cápsida se han detectado secuencias inmunomoduladoras negativas (Kittlesen *y cols.* 2000) y epitopos específicos para linfocitos reguladores negativos CD4+CD25+FoxP3+ (Li *y cols.* 2007). Por otra parte, la proteína E1 tiene poca variabilidad entre aislamientos en comparación con la otra proteína de la envoltura del VHC (Weiner *y cols.* 1991). Específicamente, la respuesta anti-E1 muestra diferentes grados de reactividad cruzada dependiendo del tipo y subtipo viral (Maertens *y cols.*, 1993). La mayoría de los pacientes con infección crónica no logran generar una respuesta inmune humoral o celular fuerte frente a E1, a pesar de la existencia de epitopos para células B y T en la proteína (Depraetere S, 1999). Esto puede estar dado por la existencia de una jerarquía de la respuesta inmune E2>cápsida>E1, evidenciada en ratones (Satoi *y cols.* 2001). Sin embargo, un candidato vacunal basado en la proteína E1 ha obtenido recientemente resultados preliminares positivos en cuanto a inmunogenicidad (Leroux-Roels *y cols.* 2005).

La respuesta humoral generada por el VVA recombinante FPCoE1 en ratones fue muy débil. Esto está en concordancia con trabajos previos con poxvirus recombinantes (Robinson *y cols.* 1999; Vazquez-Blomquist *y cols.* 2002) y puede ser probablemente explicado por la inducción preferencial de inmunidad de perfil Th1. De hecho, se generó una respuesta de secreción de IFN- γ en los ratones inmunizados con el VVA recombinante. Las personas infectadas con el VHC que muestran un incremento en la producción de IFN- γ parecen tener más posibilidades de clarificar la infección (Rosen *y cols.* 2002). Además, se ha descrito que la eliminación del virus en la hepatitis C aguda se asocia con la producción de IFN- γ dependiente de células T CD8+ en ausencia de daño hepático (Thimme *y cols.* 2001).

Además, se ha encontrado que una respuesta fuerte de células T con perfil Th1, específicas para la proteína de la cápsida en pacientes VHC positivos, se relaciona con un curso benigno de la infección o con una respuesta inmune exitosa frente al VHC (Missale *y cols.* 1996; Botarelli *y cols.* 1993).

Se destaca que los ratones inmunizados con el VVA recombinante FPCoE1 controlaron de forma específica la viremia en un modelo de reto con virus sustituto basado en VV recombinante, con un 40% de protección total. Dicho resultado no ha sido informado hasta el momento para otros VVA recombinantes, pero sí para un adenovirus recombinante para la proteína NS3 del VHC, con el cual se obtuvo un 66% de protección total frente al reto con VV recombinante en ratones BALB/c (Arribillaga *y cols.* 2002).

Una limitación importante de la respuesta inducida por el VVA recombinante, FPCoE1, administrado de forma individual, es que induce en ratones una protección satisfactoria de corta duración en el modelo de reto con virus sustituto, pues no se mantiene 11 semanas después de la segunda inmunización con el FPCoE1. Las vacunas basadas en poxvirus inducen inmunidad frente al vector, y esto puede potencialmente interferir con la capacidad de inducir o expandir la respuesta de memoria frente al Ag deseado, después de inmunizaciones repetidas (Harrington *y cols.* 2002). Las estrategias de sensibilización/recuerdo son una opción frecuente para subvertir esta dificultad (Webster *y cols.* 2005; Radaelli *y cols.* 2003). Particularmente, los esquemas combinados en los que la dosis de sensibilización es con ADN y la de refuerzo con vectores virales, han generado una fuerte inmunidad celular (Pancholi *y cols.* 2003). Por ejemplo, en un estudio en macacos rhesus, utilizando la estrategia de sensibilización con ADN y dosis de recuerdo con MVA recombinantes para Ags del VIH, se

obtuvieron incrementos en la producción de Acs y en la respuesta de células T, así como en la eficacia protectora (Amara *y cols.* 2001). La lógica de esta estrategia radica en que la sensibilización con ADN genera una inmunidad moderada, pero que persiste cuando es seguida de una fuerte dosis de recuerdo con un virus recombinante para los mismos Ags que codifica el ADN (Duenas-Carrera, 2004).

Se plantea que inclusive siguiendo esta estrategia es posible reducir la dosis de ADN necesaria para la sensibilización de los animales (Sedegah *y cols.* 2000). Este enfoque ha sido empleado también de forma exitosa en animales, administrando dosis de recuerdo con VVA recombinantes para Ags del virus de inmunodeficiencia de simios (Radaelli *y cols.* 2003) y del VIH (Robinson *y cols.* 1999). Específicamente, en el caso del VHC, los resultados de Pancholi *y cols.* (Pancholi *y cols.* 2000) indican que los ratones que recibieron un plasmidio que codificaba para la región estructural, así como para las proteínas NS2 y NS3 del VHC, con una dosis de recuerdo con virus de viruela de canarios, que codificaba para la misma región, tuvieron respuestas humorales y celulares incrementadas contra las proteínas virales, en comparación con los animales que solo recibieron ADN. Un régimen similar indujo respuestas celulares potentes contra las proteínas estructurales y no estructurales del VHC, en ratones transgénicos para HLA2.1. En particular, se observó reactividad de LTC contra la proteína NS3 sintetizada endógenamente en células de bazo, sin previa expansión *in vitro*. Después del reto con un VV recombinante para las proteínas del VHC, los ratones inmunizados bajo dicho régimen mostraron una completa reducción de los títulos del VV, en comparación con los inmunizados solo con ADN (Pancholi *y cols.* 2003).

Anteriormente había sido observado, en conejos y en macacos, que todos los animales inoculados con el plasmidio pIDKE2 para la inmunización con ADN, generaron altos títulos de Acs contra la proteína de la cápsida y las proteínas de la envoltura, aunque en los macacos la respuesta se desarrolló lentamente (Duenas-Carrera *y cols.* 2004). Además, en el presente trabajo se evidenció que la preparación basada en la mezcla del plasmidio pIDKE2 con la proteína recombinante de la cápsida, Co.120, no solo era capaz de generar Acs y respuesta linfoproliferativa contra todos los Ags estructurales del VHC, sino que después de repetidas dosis inducía una respuesta específica que controla la viremia en el modelo de reto con los VV recombinantes. Teniendo estos elementos en consideración, se diseñó un esquema en

ratones para evaluar la factibilidad de una estrategia de sensibilización/recuerdo empleando el VVA recombinante FPCoE1 y la mezcla del plasmidio pIDKE2 con la proteína Co.120.

Se observó que, en el grupo que recibe el virus recombinante primero y después las dosis de recuerdo con la mezcla de ADN+proteína, los niveles de Acs son superiores al final del esquema a los detectados en la variante inversa.

Los esquemas de sensibilización/recuerdo estudiados permitieron inducir una respuesta capaz de controlar la viremia en el modelo de reto con VV recombinante, independientemente de cuál inmunógeno se administró primero. Estos resultados difieren de lo informado previamente empleando un modelo de malaria en ratones, donde se obtuvo una respuesta de protección satisfactoria al sensibilizar con ADN y administrar dosis de recuerdo con un MVA recombinante, mientras que el esquema inverso no ofreció protección (Schneider *y cols.* 1998). De acuerdo a nuestros resultados, la inmunización primero con el virus FPCoE1 permite la inducción de una respuesta específica temprana contra los Acs del VHC, capaz de controlar la viremia en el modelo de reto con virus vaccinia recombinante desde la semana 4. Gracias a la administración posterior de la mezcla de ADN+proteína, la capacidad de controlar la viremia en el modelo de reto se detecta aún varias semanas más tarde. La importancia de generar una respuesta celular temprana ha sido sugerida por varios estudios donde se encuentra que las respuestas multiespecíficas, tempranas y vigorosas, tanto de LTC como de células Th1 específicas para epitopos del VHC, favorecen la resolución de la infección y la inmunidad contra el VHC, mientras que las respuestas tardías o poco intensas se relacionan con el establecimiento de la inmunopatología hepática crónica (Lechner *y cols.* 2000b; Takaki *y cols.* 2000). Por tanto, nuestros resultados confirman la validez del enfoque basado en estrategias de sensibilización/recuerdo como alternativa para el desarrollo de una respuesta inmune más diversa y efectiva.

Con el precedente de las respuestas obtenidas en ratones BALB/c se decidió llevar a cabo un estudio de inmunogenicidad en un modelo animal que simulara con mayor exactitud la posible dinámica de expresión, procesamiento y presentación antigénica del virus FPCoE1 en humanos. De esta manera, se seleccionaron primates no humanos, considerando además su capacidad de infectarse con VV. El diseño del esquema de inmunización se sustenta en estudios precedentes, en los que se obtuvieron resultados positivos utilizando VVA en diferentes regímenes de inmunización. En varios estudios realizados en macacos rhesus

(*Macaca mulatta*), con el objetivo de evaluar la inmunogenicidad generada por varios VVA recombinantes para Acs del VIH-I, se han utilizado dosis de inmunización en el orden de 10^8 ufp/mono, suministradas siempre por vía i.m (Robinson y cols. 1999; Radaelli y cols. 2003). Para ambos casos, se ha informado la inducción de una respuesta positiva de linfocitos T CD8⁺, utilizando estrategias de sensibilización/recuerdo. En un trabajo similar, realizado con otra especie de macacos (*Macaca nemestrina*), con objetivos similares y manteniendo las mismas condiciones en cuanto a dosis y vía de inoculación utilizada, se demostró también la capacidad de inducción de respuesta positiva de LTC que implicó la reducción de la carga viral referida al VIH-I en animales previamente infectados (Kent y cols. 2000). En todos los casos antes mencionados, se realizaron las inmunizaciones con el avipoxvirus recombinante con un intervalo entre dosis que comprende entre 1 y 5 meses. Por todas estas razones, se decidió diseñar un esquema de inmunización en el que se llevaran a cabo tres inmunizaciones a intervalos de 3 meses entre la primera y la segunda, y de 1 mes entre esta última y la tercera, con dosis de 10^8 ufp/mono, siempre suministradas por vía i.m. La utilización de una especie de primate diferente para nuestro estudio (*Cercopithecus aethiops sabaesus*), con respecto a las antes mencionadas, está sustentada en la disponibilidad real del modelo animal.

La débil respuesta de Acs encontrada, 25% de seroconversión contra E1, en los animales inmunizados con FPCoE1 es coherente a la encontrada con otros poxvirus de rango hospedero limitado, en los cuales se producen bajos niveles de Acs virales circulantes (Ramirez y cols. 2000). Además, hay que tener presente que las proteínas de la cápsida y la E1 del VHC se están expresando a partir del virus FPCoE1 al parecer como una poliproteína no procesada, tal como se evidencia en los análisis de electroforesis y *Western blotting* de los experimentos de expresión. Esto pudiera estar determinado por la carencia de los primeros 78 aa de la proteína de la cápsida, potencialmente necesarios para el reconocimiento y final procesamiento llevado a cabo por la peptidasa señal celular (Grakoui y cols. 1993). Por otra parte, de ocurrir también *in vivo* la expresión temprana de la poliproteína CoE1 por el virus FPCoE1, se asegura que el Ag sea procesado en el interior celular y los epitopos sean presentados en el contexto del sistema principal de histocompatibilidad de clase I con mayor rapidez (Limbach y cols. 1996). Este podría ser un factor positivo para lograr la inducción rápida de respuesta inmune, sobre todo celular. De esta manera, se favorece en buena medida la respuesta celular mediada por linfocitos T CD8⁺. Para que se desarrolle una potente y persistente respuesta citotóxica

resulta conveniente la inducción de una respuesta auxiliadora del tipo 1 (Roitt, 1988). En nuestro caso, el 50% de los animales mostraron una respuesta linfoproliferativa positiva contra la proteína de la cápsida y la E1 del VHC. Particularmente, la respuesta de linfocitos Th contra la proteína de la cápsida se ha correlacionado con la clarificación de la infección o el curso benigno de la enfermedad (Lauer *y cols.* 2004).

Debido a la carencia de un sistema de proliferación asequible y de reproducción confiable de la infección por el VHC, se han establecido sistemas alternativos para estudiar la respuesta inmune frente al virus. En nuestro caso, el reto con un VV recombinante para los Ags estructurales del VHC (vvRE), ha sido el modelo alternativo utilizado para el estudio de la inmunidad protectora inducida por el virus FPCoE1. Los resultados muestran que el VVA recombinante FPCoE1, induce una respuesta capaz de controlar la infección a niveles no detectables en todos los monos inmunizados. Estos resultados son superiores a los ya mencionados (Arribillaga *y cols.* 2002) en ratones BALB/c inmunizados con un adenovirus recombinante para la proteína no estructural NS3 del VHC (66%). Siguiendo la misma línea comparativa, estos resultados son también superiores a los obtenidos ante la inmunización VLP de Ags estructurales del VHC en ratones BALB/c. En dichos estudios, la reducción viral resultó de 1-2 órdenes logarítmicos con respecto al título viral medio (Murata *y cols.* 2003).

De manera significativa, en dos de los cuatro monos inmunizados con el VVA FPCoE1, no se puede relacionar una respuesta anti-VHC específica con la protección frente al reto, ya que en estos animales no se detectó respuesta inmune humoral ni respuesta linfoproliferativa en las condiciones ensayadas. Se requieren experimentos adicionales para dilucidar los elementos involucrados directamente en la protección frente al reto con VV recombinante observado en estos dos monos.

El papel de los principales efectores del sistema inmune en la protección frente al reto con VV recombinantes para Ags del VHC ha sido previamente demostrado en ratones BALB/c, pero existe muy poca información acerca de este tema en primates no humanos.

Dentro de la sintomatología típica de la infección con VV se manifiesta la aparición de eritemas que pueden estar acompañados de fiebre y otros síntomas (Vazquez-Blomquist, 1998). A pesar de lo antes mencionado, se observó que en solo uno de los monos del grupo inmunizado con el VVA FPCoE1 hubo aparición de una lesión apreciable al segundo día posterior al reto, que desapareció rápidamente, siendo imperceptible al quinto día posterior al

reto. En cambio, en el grupo inmunizado con el virus FP9 se observaron lesiones en los monos desde el segundo día para uno y desde el quinto día para el otro, que se mantuvieron al menos hasta el séptimo día posterior al reto. Estos resultados pudieran guardar una relación indirecta con la potencia de la respuesta inmune específica generada ante el vvRE, partiendo de la premisa de que a mayor número de efectores previamente generados contra el vvRE más rápida será su clarificación y con ello menos perceptible su manifestación clínica.

Los experimentos de reto con VV recombinantes para Ags del VHC, si bien no reproducen la infección por el VHC en humanos, permiten estudiar la protección antiviral específica contra este patógeno, mediada fundamentalmente por células T (Duenas-Carrera, 2004). Un análisis global de los resultados obtenidos pone de manifiesto la capacidad del VVA recombinante, FPCoE1, para inducir una respuesta inmune específica en ratones y primates no humanos, potencialmente efectiva contra la infección por el VHC. Estos elementos convierten al virus FPCoE1 en un candidato vacunal atractivo para su posterior evaluación en humanos, ya sea de forma individual o en combinación con otros candidatos vacunales.

6. Conclusiones

1- Los virus vaccinia recombinantes obtenidos en este trabajo, que expresan la proteína de la cápsida de un aislamiento del VHC de genotipo 1b de forma individual o como poliproteína, tienen una capacidad replicativa similar al virus vaccinia parental.

2- El reto con los virus vaccinia recombinantes para proteínas estructurales del VHC de genotipo 1b permite evidenciar que una mezcla compuesta por una variante de la proteína de la cápsida del VHC y un plasmidio para la inmunización con ADN, que expresa los antígenos estructurales de este patógeno, induce una respuesta inmune específica capaz de controlar la replicación de un virus sustituto.

3- La inmunización con el virus de viruela aviar FPCoE1, recombinante para una variante de la proteína de la cápsida y la E1 de un aislamiento del VHC de genotipo 1b, induce una respuesta inmune específica en ratones y primates no humanos, capaz de conferir protección en un modelo de reto con virus vaccinia recombinante para los antígenos estructurales del VHC.

4- La combinación del virus de viruela aviar FPCoE1 con una mezcla compuesta por una variante de la proteína de la cápsida del VHC y un plasmidio para la inmunización con ADN que expresa los antígenos estructurales de este patógeno, en esquemas de sensibilización/recuerdo en ratones, permite mejorar la respuesta de anticuerpos contra los antígenos del VHC inducida por el virus FPCoE1, así como prolongar en el tiempo la capacidad para controlar la viremia en el modelo de reto con virus vaccinia recombinante para antígenos estructurales del VHC.

7. Recomendaciones

- 1- Generar, caracterizar, y comparar con los virus vaccinia vvCore y vvRE, virus vaccinia recombinantes que expresen la E1 y la E2 de un aislamiento de genotipo 1b del VHC, de forma individual o como heterodímero.

- 2- Emplear el reto con el virus vaccinia recombinante vvRE como herramienta para la evaluación de otros candidatos vacunales, incluyendo mezclas de proteínas recombinantes, capaces de inducir una respuesta inmune positiva contra los antígenos estructurales del VHC.

- 3- Profundizar en el estudio de la respuesta inmune inducida por el FPCoE1 en modelos animales, incluyendo el conocimiento detallado de los elementos involucrados en la protección frente al reto con virus vaccinia recombinante para los antígenos estructurales del VHC.

- 4- Estudiar la respuesta inmune inducida por esquemas de sensibilización/recuerdo en primates no humanos empleando el virus FPCoE1 en combinación con otros candidatos vacunales basados en preparaciones de ADN o mezclas de proteínas recombinantes.

8. Autobiografía

8.1 Relacionada con el documento de tesis

1. **Liz Alvarez-Lajonchere**, Yalena Amador-Cañizares, Roberto Frías, Yoamel Milian, Alexis Musacchio, Ivis Guerra, Nelson Acosta-Rivero, Gillian Martínez, Jorge Castro, Pedro Puentes, Karelia Cosme, Santiago Dueñas-Carrera. Immunization with a recombinant fowlpox virus expressing a hepatitis C virus Core-E1 polyprotein variant protects mice and monkeys against challenge with a surrogate vaccinia virus. *Biotechnol Appl Biochem* 2008. Publicación electrónica previa a la impresión. doi:10.1042/BA20070182
2. **Alvarez-Lajonchere L**, Gonzalez M, Alvarez-Obregon JC, Guerra I, Viña A, Acosta-Rivero N, Musacchio A, Morales J, Dueñas-Carrera S. Hepatitis C virus (HCV) core protein enhances the immunogenicity of a co-delivered DNA vaccine encoding HCV structural antigens in mice. *Biotechnol Appl Biochem*. 2006;44:9-17.
3. Acosta-Rivero N, Aguilera Y, Falcon V, Poutou J, Musacchio A, **Alvarez-Lajonchere L**, Guerra I, Alvarez-Obregón JC, Amador-Cañizares Y, Martínez-Donato G, Marante J, Aguilar JC, Soria Y, Alvarez F, Perez A, de la Rosa MC, Morales J, Kouri JB and Dueñas-Carrera S. Ultrastructural and Immunological Characterization of Hepatitis C Core Protein-DNA Plasmid Complexes. *Am. J. Immunol* 2006;2(3):67-72.
4. **Alvarez-Lajonchere L**, Guerra I, Amador-Cañizares Y, Frías R, Vazquez-Blomquist D, Morales J, Dueñas-Carrera S. Generation and characterization of recombinant vaccinia viruses expressing a genotype 1b hepatitis C virus Core protein, individually or as a polyprotein. Aceptada en *Biotecnología Aplicada*.
5. **Liz Alvarez-Lajonchere**, Santiago Dueñas-Carrera, Ivis Guerra, Nelson Acosta-Rivero, Alexis Musacchio. Vectores vivos recombinantes y su uso en composiciones farmacéuticas contra el virus de la Hepatitis C. PCT/WO/2006/015557.

8.2 No relacionada con el documento de tesis

1. **Alvarez-Lajonchere L**, Dueñas-Carrera S, Viña A, Ramos T, Pichardo D, Morales J. Additives and Protein-DNA Combinations Modulate the Humoral Immune Response Elicited by a Hepatitis C Virus Core-encoding Plasmid in Mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97(1).
2. Dueñas-Carrera S, **Alvarez-Lajonchere L**, Alvarez-Obregón JC, Herrera A, Lorenzo LJ, Pichardo D, Morales J. A truncated variant of the hepatitis C virus core induces a slow but potent immune response in mice following DNA immunization. *Vaccine* 2000;19(7):992-997.
3. Dueñas-Carrera S, **Alvarez-Lajonchere L**, Alvarez JC, Ramos T, Pichardo D, Morales J. Repeated administration of hepatitis C virus core-encoding plasmid to mice does not necessarily increase the immune response generated against this antigen. *Biotechnol Appl Biochem* 2001;33(1):47-51.
4. Dueñas-Carrera S, Viña A, Garay HE, Reyes O, **Alvarez-Lajonchere L**, Guerra I, González LJ, Morales J. Immunological evaluation of *Escherichia coli*-derived hepatitis C virus second envelope protein (E2) variants. *J Peptide Res* 2001, 58:221-228.
5. Dueñas-Carrera S, Morales J, **Alvarez-Lajonchere L**, Alvarez-Obregón JC, Lorenzo LJ, Acosta-Rivero N, Martínez G, Viña A, Guerra I, Pichardo D, Herrera A, Martínez R, Vazquez DM, Silva R, Cosme K. Definición de un candidato vacunal contra el virus de la Hepatitis C a partir de los resultados de estudios pre-clínicos. *Biología Aplicada* 2001; 8: 99-100.
6. Dueñas-Carrera S, **Alvarez-Lajonchere L**, Alvarez-Obregón JC, Pérez A, Acosta-Rivero N, Vázquez DM, Martínez G, Viña A, Pichardo D, Morales J. Enhancement of the immune response generated against the hepatitis C virus envelope proteins after DNA vaccination with polyprotein-encoding plasmids. *Biotechnol Appl Biochem*. 2002;35:205-212.
7. **Liz Alvarez-Lajonchere**, Gillian Martínez, Juan Morales, Julio C Aguilar and Santiago Dueñas-Carrera. "Immunization with HCV synthetic peptides conjugated to the P64k carrier protein without adjuvant elicited strong antibody response in mice" *Biología Aplicada* 2003; 20: 209-213.
8. Acosta-Rivero N, Dueñas-Carrera S, **Alvarez-Lajonchere L**, Morales-Grillo J. HCV core protein-expressing DNA vaccine induces a strong class I-binding peptide DTH response in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314(3):781-6.
9. Dueñas-Carrera S, Vina A, Martinez R, **Alvarez-Lajonchere L**, Alvarez-Obregon JC, Marante J, Perez A, Mosqueda O, Martinez G, Morales J. Immunization with a DNA vaccine encoding the hepatitis-C-virus structural antigens elicits a specific immune response against the capsid and envelope proteins in rabbits and Macaca irus (crab-eating macaque monkeys). *Biotechnol Appl Biochem*. 2004;39(Pt 2):249-55
10. Gillian Martínez Donato, Santiago Dueñas Carrera, **Liz Alvarez-Lajonchere Ponce de León**, Juan Morales Grillo, Nelson Acosta Rivero, Eduardo Martínez, Ariel Viña Rodríguez, Ivis Guerra Aizpurúa, Angel Pérez Aguiar, Alexis Musacchio Lasa, José García, Osvaldo Reyes, Hilda E Garay, Luis J González, Julio C Alvarez, Yordanka Soria. Antigenicity and immunogenicity of the hepatitis C virus envelope E2 protein. *Biología Aplicada* 2006; 1: 60-63.

11. Musacchio, O. López, S. Dueñas, **L. Alvarez-Lajonchere**, N. Acosta, G. Martínez, M. Guirola, G. Sardiñas. Composición vacunal contra el virus de la hepatitis C. PCT/WO/2006/024240A.

9. Referencias

1. Abe K, Inchauspe G, Fujisawa K (1992) Genomic characterization and mutation rate of hepatitis C virus isolated from a patient who contracted hepatitis during an epidemic of non-A, non-B hepatitis in Japan. *J.Gen.Virol.* **73 (Pt 10)** 2725-2729.
2. Abraham JD, Himoudi N, Kien F, Berland JL, Codran A, Bartosch B, Baumert T, Paranhos-Baccala G, Schuster C, Inchauspe G, Kieny MP (2004) Comparative immunogenicity analysis of modified vaccinia Ankara vectors expressing native or modified forms of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *Vaccine* **22** 3917-3928.
3. Alter MJ (2007) Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J.Gastroenterol.* **13** 2436-2441.
4. Alvarez-Obregon JC, Duenas-Carrera S, Valenzuela C, Grillo JM (2001) A truncated HCV core protein elicits a potent immune response with a strong participation of cellular immunity components in mice. *Vaccine* **19** 3940-3946.
5. Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI, Montefiori DC, Xu Y, Herndon JG, Wyatt LS, Candido MA, Kozyr NL, Earl PL, Smith JM, Ma HL, Grimm BD, Hulsey ML, Miller J, McClure HM, McNicholl JM, Moss B, Robinson HL (2001) Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science.* **292** 69-74.
6. Andre P, Perlemuter G, Budkowska A, Brechot C, Lotteau V (2005) Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin.Liver Dis.* **25** 93-104.
7. Arlen PM, Pazdur M, Skarupa L, Rauckhorst M, Gulley JL (2006) A randomized phase II study of docetaxel alone or in combination with PANVAC-V (vaccinia) and PANVAC-F (fowlpox) in patients with metastatic breast cancer (NCI 05-C-0229). *Clin.Breast Cancer* **7** 176-179.
8. Arribillaga L, de Cerio AL, Sarobe P, Casares N, Gorraiz M, Vales A, Bruna-Romero O, Borrascueta F, Paranhos-Baccala G, Prieto J, Ruiz J, Lasarte JJ (2002) Vaccination with an adenoviral vector encoding hepatitis C virus (HCV) NS3 protein protects against infection with HCV-recombinant vaccinia virus. *Vaccine* **21** 202-210.
9. Arus SE, Guillen G, Jameel S, Kamili S, Marrocco C, Mas P, Morales-Grillo J, Muzio V, Padron G, Penton E, Sagnelli E, Sariol C, Scolastico C, Zafrullah M (1998) Bases moleculares para el estudio de las hepatitis virales. *Elfos Scientiae*, Ciudad de la Habana, Cuba.
10. Bachmann MF, Kundig TM, Freer G, Li Y, Kang CY, Bishop DH, Hengartner H, Zinkernagel RM (1994) Induction of protective cytotoxic T cells with viral proteins. *Eur.J.Immunol.* **24** 2228-2236.
11. Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspe G (2001) Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* **120** 512-524.
12. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R (2006) Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439** 682-687.
13. Baroudy BM, Venkatesan S, Moss B (1982) Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell* **28** 315-324.

14. Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T (2004) Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv.Virus Res.* **63** 71-180.
15. Bartenschlager R, Lohmann V (2000) Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* **14** 241-254.
16. Bartenschlager R, Lohmann V (2001) Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res.* **52** 1-17.
17. Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Toida T, Van Kuppevelt TH, Depla E, von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF (2003) Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J.Biol.Chem.* **278** 41003-41012.
18. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J.Exp.Med.* **197** 633-642.
19. Bassett SE, Guerra B, Brasky K, Miskovsky E, Houghton M, Klimpel GR, Lanford RE (2001) Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection. *Hepatology* **33** 1479-1487.
20. Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ (1998) Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J.Virol.* **72** 3827-3836.
21. Baumert TF, Vergalla J, Satoi J, Thomson M, Lechmann M, Herion D, Greenberg HB, Ito S, Liang TJ (1999) Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology* **117** 1397-1407.
22. Belyakov IM, Derby MA, Ahlers JD, Kelsall BL, Earl P, Moss B, Strober W, Berzofsky JA (1998) Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95** 1709-1714.
23. Beukema EL, Brown MP, Hayball JD (2006) The potential role of fowlpox virus in rational vaccine design. *Expert.Rev.Vaccines.* **5** 565-577.
24. Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE (2001) DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J.Virol.* **75** 7059-7066.
25. Binder D, Kundig TM (1991) Antiviral protection by CD8+ versus CD4+ T cells. CD8+ T cells correlating with cytotoxic activity in vitro are more efficient in antivaccinia virus protection than CD4-dependent IL. *J.Immunol.* **146** 4301-4307.
26. Bjoro K, Froland SS, Yun Z, Samdal HH, Haaland T (1994) Hepatitis C infection in patients with primary hypogammaglobulinemia after treatment with contaminated immune globulin. *N.Engl.J.Med.* **331** 1607-1611.
27. Blanchard E, Brand D, Trassard S, Goudeau A, Roingeard P (2002) Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *J.Virol.* **76** 4073-4079.
28. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM (2000) Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **290** 1972-1974.
29. Boni C, Amadei B, Urbani S, Fiscicaro P, Zerbin A, Mori C, Missale G, Bertoni R, Azzurri A, Del Prete G, Ferrari C (2004) Antiviral CD8-mediated responses in chronic HCV carriers with HBV superinfection. *Hepatology* **40** 289-299.

30. Botarelli P, Brunetto MR, Minutello MA, Calvo P, Unutmaz D, Weiner AJ, Choo QL, Shuster JR, Kuo G, Bonino F (1993) T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* **104** 580-587.
31. Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne JP (2005) Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J.Virol.* **79** 11353-11365.
32. Bowen DG, Walker CM (2005) Mutational escape from CD8+ T cell immunity: HCV evolution, from chimpanzees to man. *J.Exp.Med.* **201** 1709-1714.
33. Boyle DB, Coupar BE, Gibbs AJ, Seigman LJ, Both GW (1987) Fowlpox virus thymidine kinase: nucleotide sequence and relationships to other thymidine kinases. *Virology* **156** 355-365.
34. Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL (2005) The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin.Liver Dis.* **25** 105-117.
35. Brockman WW, Nathans D (1974) The isolation of simian virus 40 variants with specifically altered genomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A* **71** 942-946.
36. Bronson LH, Parker RF (1941) The neutralization of vaccine virus by immune serum: titration by the intracerebral inoculation of mice. *J.Bacterol* **41** 56-57.
37. Brown M, Zhang Y, Dermine S, de Wynter EA, Hart C, Kitchener H, Stern PL, Skinner MA, Stacey SN (2000) Dendritic cells infected with recombinant fowlpox virus vectors are potent and long-acting stimulators of transgene-specific class I restricted T lymphocyte activity. *Gene Ther.* **7** 1680-1689.
38. Bruna-Romero O, Lasarte JJ, Wilkinson G, Grace K, Clarke B, Borrás-Cuesta F, Prieto J (1997) Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus. *Hepatology* **25** 470-477.
39. Bukh J, Miller RH, Purcell RH (1995) Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin.Liver Dis.* **15** 41-63.
40. Bukh J, Purcell RH, Miller RH (1992) Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89** 4942-4946.
41. Callens N, Ciczora Y, Bartosch B, Vu-Dac N, Cosset FL, Pawlotsky JM, Penin F, Dubuisson J (2005) Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J.Virol.* **79** 15331-15341.
42. Cao H, Kaleebu P, Hom D, Flores J, Agrawal D, Jones N, Serwanga J, Okello M, Walker C, Sheppard H, El Habib R, Klein M, Mbidde E, Mugenyi P, Walker B, Ellner J, Mugerwa R (2003) Immunogenicity of a recombinant human immunodeficiency virus (HIV)-canarypox vaccine in HIV-seronegative Ugandan volunteers: results of the HIV Network for Prevention Trials 007 Vaccine Study. *J.Infect.Dis.* **187** 887-895.
43. Carrere-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J (2002) Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J.Virol.* **76** 3720-3730.
44. Cecere A, Marotta F, Vangieri B, Tancredi L, Gattoni A (2004) Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection is related to altered cellular immune response and to different cytokine profile. *Panminerva Med.* **46** 171-187.
45. Cerny A, Chisari FV (1999) Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* **30** 595-601.

46. Cerny A, McHutchison JG, Pasquinelli C, Brown ME, Brothers MA, Grabscheid B, Fowler P, Houghton M, Chisari FV (1995) Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus-derived peptides containing the HLA A2.1 binding motif. *J.Clin.Invest* **95** 521-530.
47. Chan KS, Verardi PH, Legrand FA, Yilma TD (2005) Nef from pathogenic simian immunodeficiency virus is a negative factor for vaccinia virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102** 8734-8739.
48. Chang KM, Thimme R, Melpolder JJ, Oldach D, Pemberton J, Moorhead-Loudis J, McHutchison JG, Alter HJ, Chisari FV (2001) Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology* **33** 267-276.
49. Chang SC, Yen JH, Kang HY, Jang MH, Chang MF (1994) Nuclear localization signals in the core protein of hepatitis C virus. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **205** 1284-1290.
50. Chen M, Sallberg M, Sonnerborg A, Weiland O, Mattsson L, Jin L, Birkett A, Peterson D, Milich DR (1999) Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **116** 135-143.
51. Chevaliez S, Pawlotsky JM (2006) Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int.J.Med.Sci.* **3** 35-40.
52. Choo QL, Kuo G, Ralston R, Weiner A, Chien D, Van Nest G, Han J, Berger K, Thudium K, Kuo C (1994) Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91** 1294-1298.
53. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244** 359-362.
54. Cocquerel L, Meunier JC, Pillez A, Wychowski C, Dubuisson J (1998) A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J.Virol.* **72** 2183-2191.
55. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM (1999) Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity.* **10** 439-449.
56. Cottingham MG, van Maurik A, Zago M, Newton AT, Anderson RJ, Howard MK, Schneider J, Skinner MA (2006) Different levels of immunogenicity of two strains of Fowlpox virus as recombinant vaccine vectors eliciting T-cell responses in heterologous prime-boost vaccination strategies. *Clin.Vaccine Immunol.* **13** 747-757.
57. Coupar BE, Purcell DF, Thomson SA, Ramshaw IA, Kent SJ, Boyle DB (2006) Fowlpox virus vaccines for HIV and SHIV clinical and pre-clinical trials. *Vaccine* **24** 1378-1388.
58. Cox AL, Mosbrugger T, Lauer GM, Pardoll D, Thomas DL, Ray SC (2005a) Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology* **42** 104-112.
59. Cox AL, Mosbrugger T, Mao Q, Liu Z, Wang XH, Yang HC, Sidney J, Sette A, Pardoll D, Thomas DL, Ray SC (2005b) Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J.Exp.Med.* **201** 1741-1752.
60. Cox WI, Tartaglia J, Paoletti E (1992) Poxvirus recombinants as live vaccines. In: Recombinant poxviruses (eds Binns MM, Smith GL), pp. 123-162. CRC Press, Boca Raton, Fla.
61. Craxi A, Licata A (2003) Clinical trial results of peginterferons in combination with ribavirin. *Semin.Liver Dis.* **23 Suppl 1** 35-46.

62. Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, Valiante NM (2002) Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J.Exp.Med.* **195** 35-41.
63. Crovatto M, Pozzato G, Zorat F, Pussini E, Nascimben F, Baracetti S, Grando MG, Mazzaro C, Reitano M, Modolo ML, Martelli P, Spada A, Santini G (2000) Peripheral blood neutrophils from hepatitis C virus-infected patients are replication sites of the virus. *Haematologica* **85** 356-361.
64. Cucchiaroni M, Kammer AR, Grabscheid B, Diepolder HM, Gerlach TJ, Gruner N, Santantonio T, Reichen J, Pape GR, Cerny A (2000) Vigorous peripheral blood cytotoxic T cell response during the acute phase of hepatitis C virus infection. *Cell Immunol.* **203** 111-123.
65. Dale CJ, De Rose R, Wilson KM, Croom HA, Thomson S, Coupar BE, Ramsay A, Purcell DF, Ffrench R, Law M, Emery S, Cooper DA, Ramshaw IA, Boyle DB, Kent SJ (2004) Evaluation in macaques of HIV-1 DNA vaccines containing primate CpG motifs and fowlpoxvirus vaccines co-expressing IFNgamma or IL-12. *Vaccine* **23** 188-197.
66. Dale CJ, Zhao A, Jones SL, Boyle DB, Ramshaw IA, Kent SJ (2000) Induction of HIV-1-specific T-helper responses and type 1 cytokine secretion following therapeutic vaccination of macaques with a recombinant fowlpoxvirus co-expressing interferon-gamma. *J.Med.Primatol.* **29** 240-247.
67. Day CL, Lauer GM, Robbins GK, McGovern B, Wurcel AG, Gandhi RT, Chung RT, Walker BD (2002) Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J.Virol.* **76** 12584-12595.
68. De Felice M, Turco MC, Giarrusso PC, Corbo L, Pizzano R, Martinelli V, Ferrone S, Venuta S (1987) Differential regulatory role of monomorphic and polymorphic determinants of histocompatibility leukocyte antigen class I antigens in monoclonal antibody OKT3-induced T cell proliferation. *J.Immunol.* **139** 2683-2689.
69. De Rose R, Chea S, Dale CJ, Reece J, Fernandez CS, Wilson KM, Thomson S, Ramshaw IA, Coupar BE, Boyle DB, Sullivan MT, Kent SJ (2005) Subtype AE HIV-1 DNA and recombinant Fowlpoxvirus vaccines encoding five shared HIV-1 genes: safety and T cell immunogenicity in macaques. *Vaccine.* **23** 1949-1956.
70. Deleersnyder V, Pillez A, Wychowski C, Blight K, Xu J, Hahn YS, Rice CM, Dubuisson J (1997) Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J.Virol.* **71** 697-704.
71. Deng L, Nagano-Fujii M, Tanaka M, Nomura-Takigawa Y, Ikeda M, Kato N, Sada K, Hotta H (2006) NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J.Gen.Virol.* **87** 1703-1713.
72. Depraetere S, Leroux-Roels G (1999) Hepatitis C virus envelope proteins: immunogenicity in humans and their role in diagnosis and vaccine development. *Viral Hep Rev* **5** 113-146.
73. Diedrich G (2006) How does hepatitis C virus enter cells? *FEBS J.* **273** 3871-3885.
74. Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR (1995) Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* **346** 1006-1007.
75. Doherty PC, Allan W, Boyle DB, Coupar BE, Andrew ME (1989) Recombinant vaccinia viruses and the development of immunization strategies using influenza virus. *J.Infect.Dis.* **159** 1119-1122.
76. Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM (1994) Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J.Virol.* **68** 6147-6160.

77. Duenas-Carrera S (2004) DNA vaccination against hepatitis C. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **6** 146-150.
78. Duenas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Cesar Alvarez-Obregon J, Perez A, Acosta-Rivero N, Vazquez DM, Martinez G, Vina A, Pichardo D, Morales J (2002) Enhancement of the immune response generated against hepatitis C virus envelope proteins after DNA vaccination with polyprotein-encoding plasmids. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **35** 205-212.
79. Dueñas-Carrera S, Morales J, Acosta-Rivero N, Lorenzo LJ, Garcia C, Ramos T (1999) Variable level expression of hepatitis C virus core protein in a prokaryotic system, Analysis of the humoral response in rabbit. *Biotecnología Aplicada* **16** 226-231.
80. Duenas-Carrera S, Vina A, Garay HE, Reyes O, Alvarez-Lajonchere L, Guerra I, Gonzalez LJ, Morales J (2001) Immunological evaluation of Escherichia coli-derived hepatitis C virus second envelope protein (E2) variants. *J. Pept. Res.* **58** 221-228.
81. Duenas-Carrera S, Vina A, Martinez R, Alvarez-Lajonchere L, Alvarez-Obregon JC, Marante J, Perez A, Mosqueda O, Martinez G, Morales J (2004) Immunization with a DNA vaccine encoding the hepatitis-C-virus structural antigens elicits a specific immune response against the capsid and envelope proteins in rabbits and Macaca irus (crab-eating macaque monkeys). *Biotechnol. Appl. Biochem.* **39** 249-255.
82. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* **76** 5974-5984.
83. Eisen-Vandervelde AL, Waggoner SN, Yao ZQ, Cale EM, Hahn CS, Hahn YS (2004) Hepatitis C virus core selectively suppresses interleukin-12 synthesis in human macrophages by interfering with AP-1 activation. *J. Biol. Chem.* **279** 43479-43486.
84. Elliot LN, Lloyd AR, Ziegler JB, French RA (2006) Protective immunity against hepatitis C virus infection. *Immunol. Cell Biol.* **84** 239-249.
85. Engler OB, Schwendener RA, Dai WJ, Wolk B, Pichler W, Moradpour D, Brunner T, Cerny A (2004) A liposomal peptide vaccine inducing CD8+ T cells in HLA-A2.1 transgenic mice, which recognise human cells encoding hepatitis C virus (HCV) proteins. *Vaccine* **23** 58-68.
86. Eren R, Landstein D, Terkieltaub D, Nussbaum O, Zauberman A, Ben Porath J, Gopher J, Buchnick R, Kovjazin R, Rosenthal-Galili Z, Aviel S, Ilan E, Shoshany Y, Neville L, Waisman T, Ben Moshe O, Kischitsky A, Fong SK, Keck ZY, Pappo O, Eid A, Jurim O, Zamir G, Galun E, Dagan S (2006) Preclinical evaluation of two neutralizing human monoclonal antibodies against hepatitis C virus (HCV): a potential treatment to prevent HCV reinfection in liver transplant patients. *J. Virol.* **80** 2654-2664.
87. Esumi M, Rikihisa T, Nishimura S, Goto J, Mizuno K, Zhou YH, Shikata T (1999) Experimental vaccine activities of recombinant E1 and E2 glycoproteins and hypervariable region 1 peptides of hepatitis C virus in chimpanzees. *Arch. Virol.* **144** 973-980.
88. Evans MJ, von Hahn T, Tschernie DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446** 801-805.
89. Fachinger V, Schlapp T, Strube W, Schmeer N, Saalmuller A (2000) Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes. *J. Virol* **74** 7943-7951.
90. Falcon V, Garcia C, de la Rosa MC, Menendez I, Seoane J, Grillo JM (1999) Ultrastructural and immunocytochemical evidences of core-particle formation in the methylotrophic Pichia pastoris yeast when expressing HCV structural proteins (core-E1). *Tissue Cell* **31** 117-125.

91. Fan XG, Tang FQ, Yi H, Liu WE, Houghton M, Hu GL (2000) Effect of IL-12 on T-cell immune responses in patients with chronic HCV infection. *APMIS* **108** 531-538.
92. Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR, Mushahwar IK, Desai SM, Miller RH, Ogata N (1992) Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* **258** 135-140.
93. Farid A, Al Sherbiny M, Osman A, Mohamed N, Saad A, Shata MT, Lee DH, Prince AM, Strickland GT (2005) Schistosoma infection inhibits cellular immune responses to core HCV peptides. *Parasite Immunol.* **27** 189-196.
94. Ferenci P (2003) Peginterferon alfa-2a (40KD) (Pegasy) for the treatment of patients with chronic hepatitis C. *Int.J.Clin.Pract.* **57** 610-615.
95. Fiander AN, Tristram AJ, Davidson EJ, Tomlinson AE, Man S, Baldwin PJ, Sterling JC, Kitchener HC (2006) Prime-boost vaccination strategy in women with high-grade, noncervical anogenital intraepithelial neoplasia: clinical results from a multicenter phase II trial. *Int.J.Gynecol.Cancer* **16** 1075-1081.
96. Firbas C, Jilma B, Tauber E, Buerger V, Jelovcan S, Lingnau K, Buschle M, Frisch J, Klade CS (2006) Immunogenicity and safety of a novel therapeutic hepatitis C virus (HCV) peptide vaccine: a randomized, placebo controlled trial for dose optimization in 128 healthy subjects. *Vaccine* **24** 4343-4353.
97. Fischer HP, Willsch E, Bierhoff E, Pfeifer U (1996) Histopathologic findings in chronic hepatitis C. *J.Hepatol.* **24** 35-42.
98. Fournillier A, Gerossier E, Evlashev A, Schmitt D, Simon B, Chatel L, Martin P, Silvestre N, Balloul JM, Barry R, Inchauspe G (2007) An accelerated vaccine schedule with a poly-antigenic hepatitis C virus MVA-based candidate vaccine induces potent, long lasting and in vivo cross-reactive T cell responses. *Vaccine* **25** 7339-7353.
99. Fournillier JA, Cahour A, Escriou N, Girad M, Wychowski C (1996) Processing of the E1 glycoprotein of hepatitis C virus expressed in mammalian cells. *J.Gen.Virol.* **77 (Pt 5)** 1055-1064.
100. Gale M, Jr., Foy EM (2005) Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* **436** 939-945.
101. Gale MJ, Jr., Korth MJ, Katze MG (1998) Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin.Diagn.Virol.* **10** 157-162.
102. Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC (2003) L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** 4498-4503.
103. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR (1999) Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* **117** 933-941.
104. Goebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, Davis SW, Winslow JP, Paoletti E (1990) The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* **179** 247-263.
105. Goffard A, Callens N, Bartosch B, Wychowski C, Cosset FL, Montpellier C, Dubuisson J (2005) Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J.Virol.* **79** 8400-8409.

106. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D (2003) Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J.Virol.* **77** 5487-5492.
107. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, Murthy KK, Rice CM, Walker CM (2003) HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* **302** 659-662.
108. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM (1993) Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J.Virol.* **67** 1385-1395.
109. Gramenzi A, Andreone P, Loggi E, Foschi FG, Cursaro C, Margotti M, Biselli M, Bernardi M (2005) Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection. *J.Viral Hepat.* **12** 525-530.
110. Gruener NH, Lechner F, Jung MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, Sullivan J, Phillips R, Pape GR, Klennerman P (2001) Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J.Virol.* **75** 5550-5558.
111. Gruner NH, Gerlach TJ, Jung MC, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW, Hoffmann R, Zachoval R, Santantonio T, Cucchiaroni M, Cerny A, Pape GR (2000) Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J.Infect.Dis.* **181** 1528-1536.
112. Gumber SC, Chopra S (1995) Hepatitis C: a multifaceted disease. Review of extrahepatic manifestations. *Ann.Intern.Med.* **123** 615-620.
113. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1981) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamides gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **76** 4350--4354.
114. Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV (2003) Peginterferon-alpha2a (40 kDa) for chronic hepatitis C. *Expert.Opin.Pharmacother.* **4** 541-551.
115. Hadziyannis SJ, Sette H, Jr., Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H, Jr., Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM (2004) Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann.Intern.Med.* **140** 346-355.
116. Haqshenas G, Dong X, Ewart G, Bowden S, Gowans EJ (2007) A 2a/1b full-length p7 intergenotypic chimeric genome of hepatitis C virus is infectious in vitro. *Virology* **360** 17-26.
117. Harase I, Moriyama T, Kaneko T, Kita H, Nomura M, Suzuki G, Ohnishi H, Muto Y, Yazaki Y, Imawari M (1995) Immune response to hepatitis C virus core protein in mice. *Immunol.Cell Biol.* **73** 346-352.
118. Harrington LE, Most RR, Whitton JL, Ahmed R (2002) Recombinant vaccinia virus-induced T-cell immunity: quantitation of the response to the virus vector and the foreign epitope. *J.Virol* **76** 3329-3337.
119. Helle F, Wychowski C, Vu-Dac N, Gustafson KR, Voisset C, Dubuisson J (2006) Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *J.Biol.Chem.* **281** 25177-25183.
120. Herrera AM, Rodriguez EG, Hernandez T, Sandez B, Duarte CA (2000) A family of compact plasmid vectors for DNA immunization in humans. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **279** 548-551.
121. Hiranuma K, Tamaki S, Nishimura Y, Kusuki S, Isogawa M, Kim G, Kaito M, Kuribayashi K, Adachi Y, Yasutomi Y (1999) Helper T cell determinant peptide contributes to induction of

- cellular immune responses by peptide vaccines against hepatitis C virus. *J.Gen.Virol.* **80** (Pt 1) 187-193.
122. Hirsch MS, Nahmias AJ, Murphy FA, Kramer JH (1968) Cellular immunity in vaccinia infection of mice. Anti-thymocyte serum effects on primary and secondary responsiveness. *J.Exp.Med.* **128** 121-132.
 123. Honda A, Arai Y, Hirota N, Sato T, Ikegaki J, Koizumi T, Hatano M, Kohara M, Moriyama T, Imawari M, Shimotohno K, Tokuhisa T (1999) Hepatitis C virus structural proteins induce liver cell injury in transgenic mice. *J.Med.Virol.* **59** 281-289.
 124. Honda M, Brown EA, Lemon SM (1996) Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA.* **2** 955-968.
 125. Hoofnagle JH (1997) Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* **26** 15S-20S.
 126. Horn NA, Meek JA, Budahazi G, Marquet M (1995) Cancer gene therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. *Hum.Gene Ther.* **6** 565-573.
 127. Hruby DE (1990) Vaccinia virus vectors: new strategies for producing recombinant vaccines. *Clin.Microbiol.Rev.* **3** 153-170.
 128. Hruby DE, Ball LA (1982) Mapping and identification of the vaccinia virus thymidine kinase gene. *J.Virol.* **43** 403-409.
 129. Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM, Aguet M (1993) Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* **259** 1742-1745.
 130. Hwang SB, Lo SY, Ou JH, Lai MM (1995) Detection of Cellular Proteins and Viral Core Protein Interacting with the 5' Untranslated Region of Hepatitis C Virus RNA. *J.Biomed.Sci.* **2** 227-236.
 131. Hwang SB, Park KJ, Kim YS, Sung YC, Lai MM (1997) Hepatitis C virus NS5B protein is a membrane-associated phosphoprotein with a predominantly perinuclear localization. *Virology* **227** 439-446.
 132. Ikeda M, Yi M, Li K, Lemon SM (2002) Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J.Virol.* **76** 2997-3006.
 133. Inchauspe G, Feinstone S (2003) Development of a hepatitis C virus vaccine. *Clin.Liver Dis.* **7** 243-59, xi.
 134. Ishii K, Rosa D, Watanabe Y, Katayama T, Harada H, Wyatt C, Kiyosawa K, Aizaki H, Matsuura Y, Houghton M, Abrignani S, Miyamura T (1998) High titers of antibodies inhibiting the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* **28** 1117-1120.
 135. Jackson P, Petrik J, Alexander GJ, Pearson G, Allain JP (1997) Reactivity of synthetic peptides representing selected sections of hepatitis C virus core and envelope proteins with a panel of hepatitis C virus-seropositive human plasma. *J.Med.Virol.* **51** 67-79.
 136. Jones EV, Moss B (1984) Mapping of the vaccinia virus DNA polymerase gene by marker rescue and cell-free translation of selected RNA. *J.Virol.* **49** 72-77.
 137. Jones EV, Puckett C, Moss B (1987) DNA-dependent RNA polymerase subunits encoded within the vaccinia virus genome. *J.Virol.* **61** 1765-1771.

138. Kage M, Ogasawara S, Kosai K, Nakashima E, Shimamatsu K, Kojiro M, Kimura A, Fujisawa T, Matsukuma Y, Ito Y, Kondo S, Kawano K, Sata M (1997) Hepatitis C virus RNA present in saliva but absent in breast-milk of the hepatitis C carrier mother. *J.Gastroenterol.Hepatol.* **12** 518-521.
139. Kalkeri G, Khalap N, Garry RF, Fermin CD, Dash S (2001) Hepatitis C virus protein expression induces apoptosis in HepG2 cells. *Virology* **282** 26-37.
140. Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Hagiwara H, Mita E, Naito M, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T (1994) Buoyant density of hepatitis C virus recovered from infected hosts: two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation. *Hepatology* **19** 296-302.
141. Kato N (2001) Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med.Okayama* **55** 133-159.
142. Kato N, Sekiya H, Ootsuyama Y, Nakazawa T, Hijikata M, Ohkoshi S, Shimotohno K (1993) Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J.Virol.* **67** 3923-3930.
143. Kent S, De Rose R, Rollman E (2007) Drug evaluation: DNA/MVA prime-boost HIV vaccine. *Curr.Opin.Investig.Drugs* **8** 159-167.
144. Kent SJ, Zhao A, Best SJ, Chandler JD, Boyle DB, Ramshaw IA (1998) Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. *J.Virol.* **72** 10180-10188.
145. Kent SJ, Zhao A, Dale CJ, Land S, Boyle DB, Ramshaw IA (2000) A recombinant avipoxvirus HIV-1 vaccine expressing interferon-gamma is safe and immunogenic in macaques. *Vaccine* **18** 2250-2256.
146. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M (2004) HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* **305** 872-874.
147. Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, Chambers SP, Markland W, Lepre CA, O'Malley ET, Harbeson SL, Rice CM, Murcko MA, Caron PR, Thomson JA (1996) Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* **87** 343-355.
148. Kiszka I, Kmiecik D, Gzyl J, Naito T, Bolesta E, Sieron A, Singh SP, Srinivasan A, Trinchieri G, Kaneko Y, Kozbor D (2002) Effect of the V3 loop deletion of envelope glycoprotein on cellular responses and protection against challenge with recombinant vaccinia virus expressing gp160 of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J.Virol.* **76** 4222-4232.
149. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS (2000) Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J.Clin.Invest* **106** 1239-1249.
150. Koch JO, Bartenschlager R (1999) Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J.Virol.* **73** 7138-7146.
151. Koike K (2007) Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. *J.Gastroenterol.Hepatol.* **22 Suppl 1** S108-S111.
152. Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM (1996) Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J.Virol.* **70** 3363-3371.

153. Koziel MJ (1997) The role of immune responses in the pathogenesis of hepatitis C virus infection. *J.Viral Hepat.* **4 Suppl 2** 31-41.
154. Kremsdorf D, Brezillon N (2007) New animal models for hepatitis C viral infection and pathogenesis studies. *World J.Gastroenterol.* **13** 2427-2435.
155. Kudo-Saito C, Schlom J, Hodge JW (2004) Intratumoral vaccination and diversified subcutaneous/ intratumoral vaccination with recombinant poxviruses encoding a tumor antigen and multiple costimulatory molecules. *Clin.Cancer Res.* **10** 1090-1099.
156. Kumar S, Boyle DB (1990) Activity of a fowlpox virus late gene promoter in vaccinia and fowlpox virus recombinants. *Arch.Virol.* **112** 139-148.
157. Lai ME, Mazzoleni AP, Argioli F, De Virgilis S, Balestrieri A, Purcell RH, Cao A, Farci P (1994) Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet* **343** 388-390.
158. Lane JM, Goldstein J (2003) Adverse events occurring after smallpox vaccination. *Semin.Pediatr.Infect.Dis.* **14** 189-195.
159. Lanford RE, Chavez D, Notvall L, Brasky KM (2003) Comparison of tamarins and marmosets as hosts for GBV-B infections and the effect of immunosuppression on duration of viremia. *Virology* **311** 72-80.
160. Lanford RE, Lee H, Chavez D, Guerra B, Brasky KM (2001) Infectious cDNA clone of the hepatitis C virus genotype 1 prototype sequence. *J.Gen.Virol.* **82** 1291-1297.
161. Laporte J, Bain C, Maurel P, Inchauspe G, Agut H, Cahour A (2003) Differential distribution and internal translation efficiency of hepatitis C virus quasispecies present in dendritic and liver cells. *Blood* **101** 52-57.
162. Large MK, Kittlesen DJ, Hahn YS (1999) Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J.Immunol.* **162** 931-938.
163. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J (1998) The presence of active hepatitis C virus replication in lymphoid tissue in patients coinfectd with human immunodeficiency virus type 1. *J.Infect.Dis.* **178** 1189-1192.
164. Lauer GM, Barnes E, Lucas M, Timm J, Ouchi K, Kim AY, Day CL, Robbins GK, Casson DR, Reiser M, Dusheiko G, Allen TM, Chung RT, Walker BD, Klenerman P (2004) High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **127** 924-936.
165. Lauer GM, Ouchi K, Chung RT, Nguyen TN, Day CL, Purkis DR, Reiser M, Kim AY, Lucas M, Klenerman P, Walker BD (2002) Comprehensive analysis of CD8 (+)-T-cell responses against hepatitis C virus reveals multiple unpredicted specificities. *J.Virol.* **76** 6104-6113.
166. Lechmann M, Ihlenfeldt HG, Braunschweiger I, Giers G, Jung G, Matz B, Kaiser R, Sauerbruch T, Spengler U (1996) T- and B-cell responses to different hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C infection and in healthy anti-hepatitis C virus--positive blood donors without viremia. *Hepatology* **24** 790-795.
167. Lechmann M, Murata K, Satoi J, Vergalla J, Baumert TF, Liang TJ (2001) Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology* **34** 417-423

168. Lechner F, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR, Cerny A, Phillips R, Ferrari C, Pape GR, Klenerman P (2000a) CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur.J.Immunol.* **30** 2479-2487.
169. Lechner F, Sullivan J, Spiegel H, Nixon DF, Ferrari B, Davis A, Borkowsky B, Pollack H, Barnes E, Dusheiko G, Klenerman P (2000b) Why do cytotoxic T lymphocytes fail to eliminate hepatitis C virus? Lessons from studies using major histocompatibility complex class I peptide tetramers. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **355** 1085-1092.
170. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD (2000c) Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J.Exp.Med.* **191** 1499-1512.
171. Lechner S, Rispeter K, Meisel H, Kraas W, Jung G, Roggendorf M, Zibert A (1998) Antibodies directed to envelope proteins of hepatitis C virus outside of hypervariable region 1. *Virology* **243** 313-321.
172. Leroux-Roels G, Batens AH, Desombere I, Van Den SB, Vander SC, Maertens G, Hulstaert F (2005) Immunogenicity and tolerability of intradermal administration of an HCV E1-based vaccine candidate in healthy volunteers and patients with resolved or ongoing chronic HCV infection. *Hum.Vaccin.* **1** 61-65.
173. Leroux-Roels G, Depla E, Hulstaert F, Tobback L, Dincq S, Desmet J, Desombere I, Maertens G (2004) A candidate vaccine based on the hepatitis C E1 protein: tolerability and immunogenicity in healthy volunteers. *Vaccine* **22** 3080-3086.
174. Li S, Jones KL, Woollard DJ, Dromey J, Paukovics G, Plebanski M, Gowans EJ (2007) Defining target antigens for CD25+ FOXP3 + IFN-gamma- regulatory T cells in chronic hepatitis C virus infection. *Immunol.Cell Biol.* **85** 197-204.
175. Limbach KJ, Paoletti E (1996) Non-replicating expression vectors: applications in vaccine development and gene therapy. *Epidemiol.Infect.* **116** 241-256.
176. Lindenbach BD, Rice CM (2001) Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In:Fields Virology (eds Knipe DM, Howley PM), pp. 991-1042. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
177. Liu J, Manheimer E, Tsutani K, Gluud C (2003) Medicinal herbs for hepatitis C virus infection: a Cochrane hepatobiliary systematic review of randomized trials. *Am.J.Gastroenterol.* **98** 538-544.
178. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285** 110-113.
179. Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Albert ML, Rice CM (2004) Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* **103** 1026-1029.
180. Lorenzo LJ, Garcia O, Acosta-Rivero N, Duenas-Carrera S, Martinez G, Alvarez-Obregon J, Pichardo D, Ramos A, Guerra I, Morales J (2000) Expression and immunological evaluation of the Escherichia coli-derived hepatitis C virus envelope E1 protein. *Biotechnol.Appl.Biochem.* **32** (Pt 2) 137-143.
181. Lundin M, Monne M, Widell A, Von Heijne G, Persson MA (2003) Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J.Virol.* **77** 5428-5438.
182. Maertens G, Ducatteeuw A, Stuyver L, Vandenponseele P, Venneman A, Wyseur A, Bosman F (1993) Low prevalence of anti-E1 antibodies reactive to recombinant type 1b E1 envelope protein in type 2, 3, and 4 sera, but high prevalence in subtypes 1a and 1b. In:Viral Hepatitis and

- Liver Disease (eds Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T), pp. 314-316. Springer Verlag, Tokyo.
183. Maertens G, Priem S, Ducatteeuw A, Verschoorl E, Verstrepen B, Roskams T, Desmet V, Fuller S, Van Hoek K, Vandepoosele P, Bosman F, Buyse MA, van Doorn LJ, Heeney J, Kos A, Depla E (2000) Improvement of chronic active hepatitis C in chronically infected chimpanzees after therapeutic vaccination with the HCV E1 protein. *Acta Gastroenterol.Belg.* **63** 203-210.
 184. Majid AM, Ezelle H, Shah S, Barber GN (2006) Evaluating replication-defective vesicular stomatitis virus as a vaccine vehicle. *J.Virol.* **80** 6993-7008.
 185. Makimura M, Miyake S, Akino N, Takamori K, Matsuura Y, Miyamura T, Saito I (1996) Induction of antibodies against structural proteins of hepatitis C virus in mice using recombinant adenovirus. *Vaccine* **14** 28-36.
 186. Manabe S, Fuke I, Tanishita O, Kaji C, Gomi Y, Yoshida S, Mori C, Takamizawa A, Yosida I, Okayama H (1994) Production of nonstructural proteins of hepatitis C virus requires a putative viral protease encoded by NS3. *Virology* **198** 636-644.
 187. Manigold T, Shin EC, Mizukoshi E, Mihalik K, Murthy KK, Rice CM, Piccirillo CA, Rehermann B (2006) Foxp3+CD4+CD25+ T cells control virus-specific memory T cells in chimpanzees that recovered from hepatitis C. *Blood* **107** 4424-4432.
 188. Marais D, Passmore JA, Maclean J, Rose R, Williamson AL (1999) A recombinant human papillomavirus (HPV) type 16 L1-vaccinia virus murine challenge model demonstrates cell-mediated immunity against HPV virus-like particles. *J.Gen.Virol.* **80 (Pt 9)** 2471-2475.
 189. Martinez-Donato G, Acosta-Rivero N, Morales-Grillo J, Musacchio A, Vina A, Alvarez C, Figueroa N, Guerra I, Garcia J, Varas L, Muzio V, Duenas-Carrera S (2006) Expression and processing of hepatitis C virus structural proteins in *Pichia pastoris* yeast. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **342** 625-631.
 190. Martinez-Donato G, Vina A, Borges M, Martinez E, Morales-Grillo J (2000) Humoral immune response against a Hepatitis C Virus Envelope E2 variant expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnologia Aplicada* **17** 231-234.
 191. Matsumoto M, Hwang SB, Jeng KS, Zhu N, Lai MM (1996) Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology* **218** 43-51.
 192. Mayr A, Malicki K (1966) Attenuation of virulent fowl pox virus in tissue culture and characteristics of the attenuated virus. *Zentralbl.Veterinarmed.B* **13** 1-13.
 193. McHutchison J, Blatt L, Sedghi-Vaziri A, Russell J, Schmid P, Conrad A (1998) Is there an optimal time to measure quantitative HCV RNA to predict non-response following interferon treatment for chronic HCV infection? *J.Hepatol.* **29** 362-368.
 194. McLauchlan J (2000) Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J.Viral Hepat.* **7** 2-14.
 195. McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B (2002) Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J.* **21** 3980-3988.
 196. Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL, Kneteman NM (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat.Med.* **7** 927-933.
 197. Meunier JC, Engle RE, Faulk K, Zhao M, Bartosch B, Alter H, Emerson SU, Cosset FL, Purcell RH, Bukh J (2005) Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-

- particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102** 4560-4565.
198. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437** 1167-1172.
199. Miner JN, Weinrich SL, Hruby DE (1988) Molecular dissection of cis-acting regulatory elements from 5'-proximal regions of a vaccinia virus late gene cluster. *J.Virol.* **62** 297-304.
200. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C (1996) Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J.Clin.Invest* **98** 706-714.
201. Mockett B, Binns MM, Bourns ME, Skinner MA (1992) Comparison of the locations of homologous fowlpox and vaccinia virus genes reveals major genome reorganization. *J.Gen.Virol.* **73 (Pt 10)** 2661-2668.
202. Morales J, Vina A, Garcia C, Acosta-Rivero N, Duenas-Carrera S, Garcia O, Guerra I (1998) Sequences derived from the genome of the hepatitis C virus, and use thereof. (WO 98/25960).
203. Moss B (2001) Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In:Fields Virology (eds Knipe DM, Howley PM), pp. 2849-2883. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
204. Murata K, Lechmann M, Qiao M, Gunji T, Alter HJ, Liang TJ (2003) Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** 6753-6758.
205. Naas T, Ghorbani M, Alvarez-Maya I, Lapner M, Kothary R, De Repentigny Y, Gomes S, Babiuk L, Giulivi A, Soare C, Azizi A, Diaz-Mitoma F (2005) Characterization of liver histopathology in a transgenic mouse model expressing genotype 1a hepatitis C virus core and envelope proteins 1 and 2. *J.Gen.Virol.* **86** 2185-2196.
206. Nattermann J, Zimmermann H, Iwan A, Lilienfeld-Toal M, Leifeld L, Nischalke HD, Langhans B, Sauerbruch T, Spengler U (2006) Hepatitis C virus E2 and CD81 interaction may be associated with altered trafficking of dendritic cells in chronic hepatitis C. *Hepatology* **44** 945-954.
207. Nevens F, Roskams T, van Vlierberghe H, Horsmans Y, Sprengers D, Elewaut A, Desmet V, Leroux-Roels G, Quinaux E, Depla E, Dincq S, Vander SC, Maertens G, Hulstaert F (2003) A pilot study of therapeutic vaccination with envelope protein E1 in 35 patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **38** 1289-1296.
208. Oseroff C, Sette A, Wentworth P, Celis E, Maewal A, Dahlberg C, Fikes J, Kubo RT, Chesnut RW, Grey HM, Alexander J (1998) Pools of lipidated HTL-CTL constructs prime for multiple HBV and HCV CTL epitope responses. *Vaccine* **16** 823-833.
209. Pallaoro M, Lahm A, Biasiol G, Brunetti M, Nardella C, Orsatti L, Bonelli F, Orru S, Narjes F, Steinkuhler C (2001) Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. *J.Virol.* **75** 9939-9946.
210. Pancholi P, Liu Q, Tricoche N, Zhang P, Perkus ME, Prince AM (2000) DNA prime-canarypox boost with polycistronic hepatitis C virus (HCV) genes generates potent immune responses to HCV structural and nonstructural proteins. *J.Infect.Dis.* **182** 18-27.
211. Pancholi P, Perkus M, Tricoche N, Liu Q, Prince AM (2003) DNA immunization with hepatitis C virus (HCV) polycistronic genes or immunization by HCV DNA priming-recombinant

- canarypox virus boosting induces immune responses and protection from recombinant HCV-vaccinia virus infection in HLA-A2.1-transgenic mice. *J.Virol.* **77** 382-390.
212. Pape GR, Gerlach TJ, Diepolder HM, Gruner N, Jung M, Santantonio T (1999) Role of the specific T-cell response for clearance and control of hepatitis C virus. *J.Viral Hepat.* **6 Suppl 1** 36-40.
213. Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheux D, Blum HE, Bartenschlager R, Moradpour D (2004a) Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J.Biol.Chem.* **279** 40835-40843.
214. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlowsky JM (2004b) Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* **39** 5-19.
215. Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Vona G, Topilco A, Chretien Y, Koike K, Pessayre D, Chapman J, Barba G, Brechot C (2002) Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J.* **16** 185-194.
216. Peterson J, Green G, Iida K, Caldwell B, Kerrison P, Bernich S, Aoyagi K, Lee SR (2000) Detection of hepatitis C core antigen in the antibody negative 'window' phase of hepatitis C infection. *Vox Sang.* **78** 80-85.
217. Petit MA, Lievre M, Peyrol S, De Sequeira S, Berthillon P, Ruigrok RW, Trepo C (2005) Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients. *Virology* **336** 144-153.
218. Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, Strand D, Bartenschlager R (2002) Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J.Virol.* **76** 4008-4021.
219. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282** 938-941.
220. Pincus S, Tartaglia J, Paoletti E (1995) Poxvirus-based vectors as vaccine candidates. *Biologicals* **23** 159-164.
221. Poccia F, Agrati C (2003) Intrahepatic natural immunity and HCV immunopathogenesis. *Cell Death.Differ.* **10 Suppl 1** S9-S12.
222. Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA (2003) Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J.Virol.* **77** 4070-4080.
223. Polakos NK, Drane D, Cox J, Ng P, Selby MJ, Chien D, O'Hagan DT, Houghton M, Paliard X (2001) Characterization of hepatitis C virus core-specific immune responses primed in rhesus macaques by a nonclassical ISCOM vaccine. *J.Immunol.* **166** 3589-3598.
224. Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR (2001) Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J.Virol.* **75** 6095-6106.
225. Poynard T, Bedossa P, Opolon P (1997) Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* **349** 825-832.
226. Premkumar A, Wilson L, Ewart GD, Gage PW (2004) Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett.* **557** 99-103.

227. Prince AM, Brotman B, Huima T, Pascual D, Jaffery M, Inchauspe G (1992) Immunity in hepatitis C infection. *J.Infect.Dis.* **165** 438-443.
228. Prince AM, Huima-Byron T, Parker TS, Levine DM (1996) Visualization of hepatitis C virions and putative defective interfering particles isolated from low-density lipoproteins. *J.Viral Hepat.* **3** 11-17.
229. Prince AM, Shata MT (2001) Immunoprophylaxis of hepatitis C virus infection. *Clin.Liver Dis.* **5** 1091-1103.
230. Radaelli A, Nacsa J, Tsai WP, Edghill-Smith Y, Zanutto C, Elli V, Venzon D, Trynieszewska E, Markham P, Mazzara GP, Panicali D, De Giuli MC, Franchini G (2003) Prior DNA immunization enhances immune response to dominant and subdominant viral epitopes induced by a fowlpox-based SIVmac vaccine in long-term slow-progressor macaques infected with SIVmac251. *Virology.* **20;312** 181-195.
231. Ralph P, Nakoinz I (1974) Lipopolysaccharides inhibit lymphosarcoma cells of bone marrow origin. *Nature* **249** 49-51.
232. Ramalho F (2003) Hepatitis C virus infection and liver steatosis. *Antiviral Res.* **60** 125-127.
233. Ramirez JC, Gherardi MM, Esteban M (2000) Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *J.Virol.* **74** 923-933.
234. Ray RB, Ray R (2001) Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol.Lett.* **202** 149-156.
235. Reed KE, Gorbalenya AE, Rice CM (1998a) The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J.Virol.* **72** 6199-6206.
236. Reed KE, Rice CM (1998b) Molecular characterization of hepatitis C virus. *Curr.Stud.Hematol.Blood Transfus.* 1-37.
237. Reed KE, Rice CM (2000) Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **242** 55-84.
238. Rehmann B, Nascimbeni M (2005) Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat.Rev.Immunol.* **5** 215-229.
239. Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, Gojobori T, Maertens G, Mizokami M, Nainan O, Netesov S, Nishioka K, Shin i T, Simmonds P, Smith D, Stuyver L, Weiner A (1998) Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch.Virol.* **143** 2493-2503.
240. Robinson HL, Montefiori DC, Johnson RP, Manson KH, Kalish ML, Lifson JD, Rizvi TA, Lu S, Hu SL, Mazzara GP, Panicali DL, Herndon JG, Glickman R, Candido MA, Lydy SL, Wyand MS, McClure HM (1999) Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat.Med.* **5** 526-534.
241. Roccasecca R, Ansuini H, Vitelli A, Meola A, Scarselli E, Acali S, Pezzanera M, Ercole BB, McKeating J, Yagnik A, Lahm A, Tramontano A, Cortese R, Nicosia A (2003) Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J.Virol.* **77** 1856-1867.

242. Rocha M, Avenaud P, Menard A, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Magalhaes Queiroz DM, Megraud F (2005) Association of Helicobacter species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. *Gut* **54** 396-401.
243. Rodger AJ, Roberts S, Lanigan A, Bowden S, Brown T, Crofts N (2000) Assessment of long-term outcomes of community-acquired hepatitis C infection in a cohort with sera stored from 1971 to 1975. *Hepatology* **32** 582-587.
244. Roingeard P, Hourieux C, Blanchard E, Brand D, Ait-Goughoulte M (2004) Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol.Cell* **96** 103-108.
245. Roitt I (1988) Essential Immunology. Blackwell Scientific, Oxford, UK.
246. Rollier C, Drexhage JA, Verstrepen BE, Verschoor EJ, Bontrop RE, Koopman G, Heeney JL (2003) Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment. *Hepatology* **38** 851-858.
247. Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, Guenzi E, Cousens L, Chin M, Dong C, Weiner AJ, Lau JY, Choo QL, Chien D, Pileri P, Houghton M, Abrignani S (1996) A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93** 1759-1763.
248. Rosen HR, Miner C, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Conrad AJ, Bakke A, Bouwer HG, Hinrichs DJ (2002) Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. *Hepatology* **35** 190-198.
249. Rushbrook SM, Ward SM, Unitt E, Vowler SL, Lucas M, Klenerman P, Alexander GJ (2005) Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection. *J.Virol.* **79** 7852-7859.
250. Sagnelli E, Coppola N, Scolastico C, Filippini P, Santantonio T, Stroffolini T, Piccinino F (2000) Virologic and clinical expressions of reciprocal inhibitory effect of hepatitis B, C, and delta viruses in patients with chronic hepatitis. *Hepatology* **32** 1106-1110.
251. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239** 487-491.
252. Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J (2003) The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** 11646-11651.
253. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second Edition.
254. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74** 5463-5467.
255. Santolini E, Migliaccio G, La Monica N (1994) Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J.Virol.* **68** 3631-3641.
256. Santolini E, Pacini L, Fipaldini C, Migliaccio G, Monica N (1995) The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J.Virol.* **69** 7461-7471.
257. Sarcar B, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB (2004) Hepatitis C virus NS5A mediated STAT3 activation requires co-operation of Jak1 kinase. *Virology* **322** 51-60.

258. Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, Lopez-Diaz dC, Baixeras E, Labarga P, Garcia N, Borrascueta F, Prieto J (2002) Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J.Virol.* **76** 5062-5070.
259. Satoi J, Murata K, Lechmann M, Manickan E, Zhang Z, Wedemeyer H, Rehermann B, Liang TJ (2001) Genetic immunization of wild-type and hepatitis C virus transgenic mice reveals a hierarchy of cellular immune response and tolerance induction against hepatitis C virus structural proteins. *J.Virol.* **75** 12121-12127.
260. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **21** 5017-5025.
261. Schettler V, Monazahian M, Wieland E, Ramadori G, Grunewald RW, Thomssen R, Muller GA (2001) Reduction of hepatitis C virus load by H.E.L.P.-LDL apheresis. *Eur.J.Clin.Invest* **31** 154-155.
262. Scheuer PJ, Ashrafzadeh P, Sherlock S, Brown D, Dusheiko GM (1992) The pathology of hepatitis C. *Hepatology* **15** 567-571.
263. Schneider J, Gilbert SC, Blanchard TJ, Hanke T, Robson KJ, Hannan CM, Becker M, Sinden R, Smith GL, Hill AV (1998) Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat.Med.* **4** 397-402.
264. Sedegah M, Weiss W, Sacci JB, Jr., Charoenvit Y, Hedstrom R, Gowda K, Majam VF, Tine J, Kumar S, Hobart P, Hoffman SL (2000) Improving protective immunity induced by DNA-based immunization: priming with antigen and GM-CSF-encoding plasmid DNA and boosting with antigen-expressing recombinant poxvirus. *J.Immunol.* **164** 5905-5912.
265. Semmo N, Day CL, Ward SM, Lucas M, Harcourt G, Loughry A, Klenerman P (2005) Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology* **41** 1019-1028.
266. Shang D, Zhai W, Allain JP (1999) Broadly cross-reactive, high-affinity antibody to hypervariable region 1 of the hepatitis C virus in rabbits. *Virology* **258** 396-405.
267. Shata MT, Anthony DD, Carlson NL, Andrus L, Brotman B, Tricoche N, McCormack P, Prince A (2002) Characterization of the immune response against hepatitis C infection in recovered, and chronically infected chimpanzees. *J.Viral Hepat.* **9** 400-410.
268. Sheng Y, Mancino V, Birren B (1995) Transformation of Escherichia coli with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **23** 1990-1996.
269. Shirai M, Chen M, Arichi T, Masaki T, Nishioka M, Newman M, Nakazawa T, Feinstone SM, Berzofsky JA (1996) Use of intrinsic and extrinsic helper epitopes for in vivo induction of anti-hepatitis C virus cytotoxic T lymphocytes (CTL) with CTL epitope peptide vaccines. *J.Infect.Dis.* **173** 24-31.
270. Shirai M, Okada H, Nishioka M, Akatsuka T, Wychowski C, Houghten R, Pendleton CD, Feinstone SM, Berzofsky JA (1994) An epitope in hepatitis C virus core region recognized by cytotoxic T cells in mice and humans. *J.Virol.* **68** 3334-3342.
271. Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghayeb J, Reimann KA, Walker CM (2003) Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J.Exp.Med.* **197** 1645-1655.

272. Silim A, Thorsen J (1981) Hemorrhagic enteritis: virus distribution and sequential development of antibody in turkeys. *Avian Dis.* **25** 444-453.
273. Simmonds P (2004) Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J.Gen.Virol.* **85** 3173-3188.
274. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin I, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A (2005) Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42** 962-973.
275. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar IK (1995) Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat.Med.* **1** 564-569.
276. Sinha ND, Biernat J, McManus J, Koster H (1984) Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of beta-cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic Acids Res.* **12** 4539-4557.
277. Spada E, Genovese D, Tosti ME, Mariano A, Cucchini M, Proietti L, Giuli CD, Lavagna A, Crapa GE, Morace G, Taffon S, Mele A, Rezza G, Rapicetta M (2005) An outbreak of hepatitis A virus infection with a high case-fatality rate among injecting drug users. *J.Hepatol.* **43** 958-964.
278. Spangenberg HC, Viazov S, Kersting N, Neumann-Haefelin C, McKinney D, Roggendorf M, von Weizsacker F, Blum HE, Thimme R (2005) Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **42** 828-837.
279. Steffan A, Marianneau P, Caussin-Schwemling C, Royer C, Schmitt C, Jaeck D, Wolf P, Gendraut J, Stoll-Keller F (2001) Ultrastructural observations in hepatitis C virus-infected lymphoid cells. *Microbes.Infect.* **3** 193-202.
280. Steinkuhler C, Urbani A, Tomei L, Biasiol G, Sardana M, Bianchi E, Pessi A, De Francesco R (1996) Activity of purified hepatitis C virus protease NS3 on peptide substrates. *J.Virol.* **70** 6694-6700.
281. Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, Wieland S, Bukh J, Purcell RH, Schultz PG, Chisari FV (2002) Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99** 15669-15674.
282. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM (2003) Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* **38** 1437-1448.
283. Sugiyama K, Kato N, Ikeda M, Mizutani T, Shimotohno K, Kato T, Sugiyama Y, Hasumi K (1997) Hepatitis C virus in pelvic lymph nodes and female reproductive organs. *Jpn.J.Cancer Res.* **88** 925-927.
284. Tai CL, Chi WK, Chen DS, Hwang LH (1996) The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J.Virol.* **70** 8477-8484.
285. Takahashi K, Okamoto H, Kishimoto S, Munekata E, Tachibana K, Akahane Y, Yoshizawa H, Mishiro S (1992) Demonstration of a hepatitis C virus-specific antigen predicted from the putative core gene in the circulation of infected hosts. *J.Gen.Virol.* **73** (Pt 3) 667-672.
286. Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B (2000) Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat.Med.* **6** 578-582.

287. Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onishi E, Andoh T, Yoshida I, Okayama H (1991) Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J.Virol.* **65** 1105-1113.
288. Takehara T, Hayashi N, Miyamoto Y, Yamamoto M, Mita E, Fusamoto H, Kamada T (1995) Expression of the hepatitis C virus genome in rat liver after cationic liposome-mediated in vivo gene transfer. *Hepatology* **21** 746-751.
289. Tartaglia J, Pincus S, Paoletti E (1990) Poxvirus-based vectors as vaccine candidates. *Crit Rev.Immunol.* **10** 13-30.
290. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM (1999) Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* **285** 107-110.
291. Taylor J, Weinberg R, Languet B, Desmettre P, Paoletti E (1988) Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine* **6** 497-503.
292. Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM (2004) The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J.Biol.Chem.* **279** 48576-48587.
293. Tellinghuisen TL, Rice CM (2002) Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr.Opin.Microbiol.* **5** 419-427.
294. Tengelsen LA, Slabaugh MB, Bibler JK, Hruby DE (1988) Nucleotide sequence and molecular genetic analysis of the large subunit of ribonucleotide reductase encoded by vaccinia virus. *Virology* **164** 121-131.
295. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV (2002) Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99** 15661-15668.
296. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV (2001) Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J.Exp.Med.* **194** 1395-1406.
297. Thio CL, Gao X, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, O'Brien SJ, Karacki P, Astemborski J, Carrington M, Thomas DL (2002) HLA-Cw*04 and hepatitis C virus persistence. *J.Virol.* **76** 4792-4797.
298. Thio CL, Thomas DL, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, O'Brien SJ, Karacki P, Marti D, Astemborski J, Carrington M (2001) Racial differences in HLA class II associations with hepatitis C virus outcomes. *J.Infect.Dis.* **184** 16-21.
299. Thomson M, Nascimbeni M, Havert MB, Major M, Gonzales S, Alter H, Feinstone SM, Murthy KK, Rehermann B, Liang TJ (2003) The clearance of hepatitis C virus infection in chimpanzees may not necessarily correlate with the appearance of acquired immunity. *J.Virol.* **77** 862-870.
300. Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Kochel HG, Uy A (1992) Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med.Microbiol.Immunol.* **181** 293-300.
301. Troesch M, Jalbert E, Canobio S, Boulassel MR, Routy JP, Bernard NF, Bruneau J, Lapointe N, Boucher M, Soudeyns H (2005) Characterization of humoral and cell-mediated immune responses directed against hepatitis C virus F protein in subjects co-infected with hepatitis C virus and HIV-1. *AIDS* **19** 775-784.
302. Tseng CT, Klimpel GR (2002) Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J.Exp.Med.* **195** 43-49.

303. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** 680-685.
304. Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH, Jung MC, Schirren CA, Schraut W, Zachoval R, Pape GR, Diepolder HM (2003) Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* **37** 1189-1198.
305. Uprichard SL, Chung J, Chisari FV, Wakita T (2006) Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse cells. *Virology* **3** 89.
306. Vazquez MI, Esteban M (1999) Identification of functional domains in the 14-kilodalton envelope protein (A27L) of vaccinia virus. *J.Virol.* **73** 9098-9109.
307. Vazquez-Blomquist D (1998) Los poxvirus como vectores vivos: una promesa en la vacunación. *Biotechnologia Aplicada* **15** 1-14.
308. Vazquez-Blomquist D, Gonzalez S, Duarte CA (2002) Effect of promoters on cellular immune response induced by recombinant fowlpox virus expressing multi-epitope polypeptides from HIV-1. *Biotechnol.Appl.Biochem.* **36** 171-179.
309. Vazquez-Blomquist D, Iglesias E, Gonzalez-Horta EE, Duarte CA (2003) The HIV-1 chimeric protein CR3 expressed by poxviral vectors induces a diverse CD8+ T cell response in mice and is antigenic for PBMCs from HIV+ patients. *Vaccine* **22** 145-155.
310. Vazquez-Blomquist D, Quintana D, Duarte CA (2004) Modified-vaccinia-virus-Ankara (MVA) priming and fowlpox-virus booster elicit a stronger CD8+ T-cell response in mice against an HIV-1 epitope than does a DNA/poxvirus prime-booster approach. *Biotechnol.Appl.Biochem.* **39** 313-318.
311. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat.Med.* **11** 791-796.
312. Webster DP, Dunachie S, Vuola JM, Berthoud T, Keating S, Laidlaw SM, McConkey SJ, Poulton I, Andrews L, Andersen RF, Bejon P, Butcher G, Sinden R, Skinner MA, Gilbert SC, Hill AV (2005) Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.* **102** 4836-4841.
313. Wedemeyer H, Gagneten S, Davis A, Bartenschlager R, Feinstone S, Rehermann B (2001) Oral immunization with HCV-NS3-transformed Salmonella: induction of HCV-specific CTL in a transgenic mouse model. *Gastroenterology* **121** 1158-1166.
314. Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B (2002) Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J.Immunol.* **169** 3447-3458.
315. Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, Bonino F, Saracco G, Choo QL, Houghton M, . (1991) Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* **180** 842-848.
316. Wohnsland A, Hofmann WP, Sarrazin C (2007) Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin.Microbiol.Rev.* **20** 23-38.
317. Wolk B, Sansonno D, Krausslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D (2000) Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J.Virol.* **74** 2293-2304.

318. Wu GY, Konishi M, Walton CM, Olive D, Hayashi K, Wu CH (2005) A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology* **128** 1416-1423.
319. Wyatt CA, Andrus L, Brotman B, Huang F, Lee DH, Prince AM (1998) Immunity in chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus: role of minor quasispecies in reinfection. *J.Virol.* **72** 1725-1730.
320. Xie ZC, Riezu-Boj JJ, Lasarte JJ, Guillen J, Su JH, Civeira MP, Prieto J (1998) Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* **244** 513-520.
321. Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J (1997) Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94** 8738-8743.
322. Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, Hashimoto E, Lefkowitz JH, Ludwig J, Okuda K (1996) The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* **23** 1334-1340.
323. Yap CC, Ishii K, Aizaki H, Tani H, Aoki Y, Ueda Y, Matsuura Y, Miyamura T (1998) Expression of target genes by coinfection with replication-deficient viral vectors. *J.Gen.Virol.* **79** (Pt 8) 1879-1888.
324. Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M (1998) The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J.Virol.* **72** 6048-6055.
325. Yee LJ (2004) Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. *Genes Immun.* **5** 237-245.
326. Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, Wakita T, Lemon SM (2006) Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103** 2310-2315.
327. Yutani S, Yamada A, Yoshida K, Takao Y, Tamura M, Komatsu N, Ide T, Tanaka M, Sata M, Itoh K (2007) Phase I clinical study of a personalized peptide vaccination for patients infected with hepatitis C virus (HCV) 1b who failed to respond to interferon-based therapy. *Vaccine* **25** 7429-7435.
328. Zanotto C, Elli V, Basavecchia V, Brivio A, Paganini M, Pinna D, Vicenzi E, De Giuli MC, Radaelli A (2003) Evaluation in rabbits of different anti-SHIV vaccine strategies based on DNA/fowlpox priming and virus-like particle boosting. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **35** 59-65.
329. Zantinge JL, Krell PJ, Derbyshire JB, Nagy E (1996) Partial transcriptional mapping of the fowlpox virus genome and analysis of the EcoRI L fragment. *J.Gen.Virol.* **77** (Pt 4) 603-614.
330. Zeuzem S (2001) The kinetics of hepatitis C virus infection. *Clin.Liver Dis.* **5** 917-930.
331. Zhang H (2003) Lethality in mice infected with recombinant vaccinia virus expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int.* **2** 374-382.
332. Zhang J, Randall G, Higginbottom A, Monk P, Rice CM, McKeating JA (2004) CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J.Virol.* **78** 1448-1455.
333. Zibert A, Meisel H, Kraas W, Schulz A, Jung G, Roggendorf M (1997) Early antibody response against hypervariable region 1 is associated with acute self-limiting infections of hepatitis C virus. *Hepatology* **25** 1245-1249.

10. ANEXOS

Anexo 1

Secuencia del plasmidio pVACore

```

1      ATCGAATTCT TAGAGAGAGA AAGAGCAACC GGGCAGATTC CCTGTTGCAT AATTACAGCC GTCCTCCAGA ACCCGGACGC
TAGCTTAAAG ATCTCTCTCT TTCTCGTTGG CCCGTCTAAG GGACAACGTA TTAAGTGGCG CAGGAGGCTCT TGGCGCTGGC
      LeuSerPhe SerCysGly ProLeuAsnGly ThrAlaTyr AsnValGly AspGluLeuVal ArgValGly.
81     CATGCGCCAG GGCCCTGGCA GCGCCCCCTA GGGGGGGGCC GACGAGCGGA ATGTACCCCA TGAGGTGCGC GAAGCCGCAT
GTACGGCGCC CGGGGACCGT CGCGGGGGAT CCCCCCCGG CTGCTCGCCT TACATGGGGT ACTCCAGCCG CTTCGGCGTA
.HisAlaLeu AlaArgAlaAla GlyGlyLeu ProAlaGly ValLeuProIle TyrGlyMet LeuAspAla PheGlyCysThr.
161    GTGAGGGTAT CGATGACCTT ACCCAAATTA CCGGACCTAC GCCGGGGGTC AGTGGGGGCC CAACTAGGCC GAGAGCCACG
CACTCCATA GCTACTGGAA TGGGTTAAT CCGCTGGATG CGGCCCCAG TCACCCCGGG GTTGATCCGG GTTCCGGTGC
..LeuThrAsp IleValLys GlyLeuAsnArg SerArgArg ArgProAsp ThrProGlyTrp SerProArg SerGlyArg
241    GGGTGACAGG AGCCATCCTG CCCATCCCAT GCCCTCGTTA CCATAGAGGG GCCAAGGGTA CCCGGGCTGG GCCCAGGACC
CCCACTGCC GCGGACCGA GGGTAGGGTA CCGGAGCAAT GGTATCTCCC CGGTTCCCAT GGGGCCGACC CGGCTCCTGG
ProSerLeuLeu TrpGlyAla TrpGlyMet GlyGluAsnGly TyrLeuPro TrpProTyr GlyProGlnAla TrpSerArg.
321    TGCCTCCTGG CCGCGGAGCC TTGGGGATAG GTTGTGCGCT TCACAGAGT TGCAGCCGCT CGGAAGTCTT CCTAGTTCGG
ACGGCCGCC GCCGCTCGG AACCCATATC CAACAGCGGA AGGTGCTCCA ACGTGGCGA CGCTTCCGGT CGCTCAACGC
.GlyGluPro ArgArgAlaLys ProIlePro GlnArgArg GlyArgProGln SerArgGlu SerThrLys ArgThrAlaArg.
401    CGCACACCCA ACGTGGGGCC CCTGCAGCGC AACAGGTAAA CTCCACCAAC GATCTGACCA CCGCCCGGGA ACTTGACGCT
GCCGTGGGGT TGGACCCCGG GGACGCGCCG TTGTCCATTG GAGGTGGGTT CTAGACTGGT GCGCGGCCCT TGAACCTGCAG
..ValGlyLeu ArgProGly ArgArgProLeu LeuTyrVal GlyGlyVal IleGlnGlyGly GlyProPhe LysValAsp
481    CTGTGGGCGG CGGTGGGTGT TACGTTTGGT TTTTCTTTGA GGTTTAGGAT TCGTGCTCAT CTAGATTCCG TAGTGGCTGA
GACACCCGCC GCCAACCCA ATGCAAAACA AAAAGAAACT CCAAATCCTA AGCACGAGTA GATCTAAGCG ATCACCCGACT
GlnProArgArg AsnThrAsn ArgLysThr LysArgGlnPro LysProAsn ThrSerMet
561    GATCTGTGCA CTTTCGAGCTT ATTTATATTC CAAAAAATA AAATAAAAT TCAATTTTFA AGCTTTCCTACT AATTCCAAAC
CTAGACAGCT GAAGCTCGAA TAAATATAAG GTTTTTTTTT TTTATTTTAA AGTTAAAAAT TCGAAAGTGA TTAAGTTCGG
641    CCACCCGCTT TTTATAGTAA GTTTTTTCACC CATAAATAAT AAATAACAATA ATTAATTTCT CGTAAAAGTA GAAAATATAT
GGTGGGCGAA AAATATCATT CAAAAGTGG GTATTTATTA TTTATGTTAT TAATTAAGA GCATTTTCAT CTTTATATATA
TCTAATTTAT TGCACGGTAA GGAAGTAGAT CATAACTCGA GCATGGGAGA TCCCGTCGTT TTACAACGCTC GTGACTGGGA
721    AGATTAATA ACGTGCATT CCTTCATCTA GTATTGAGCT CGTACCCTCT AGGGCAGCAA AATGTTGCAG CACTGACCCT
801    AAACCCCTGG GTTACCCAAC TTAATCGCCT TGCAGCACAT CCCCCTTTCC CCAGCTGGCG TAATAGCGAA GAGGCCCGCA
TTTGGGACCG CAATGGGTTG AATTAGCGGA ACGTCGTGTA ACGTGGGAAA GGTTCGACCGC ATTTACTGCTT CTCGCGCGCT
881    CCGATCGCCC TTCCCAACAG TTGCGCAGCC TGAATGGCGA ATGGCGCTTT GCCTGGTTTC CGGCACCAGA AGCGGTGCCG
GGCTAGCGGG AAGGGTTGTC AACGCGTCGG ACTTACCCTG TACCGGCGAA CGGACCAAAG GCGGTGGTCT TCGCCACCGG
961    GAAAGCTGGC TGGAGTGGCA TCTTCTGAG CCGGATACTG TCGTCTGCC CTCAAACCTGG CAGATGCACG TTAAGCATGC
CTTTCGACCG ACCTCACGCT AGAAGGACTC CGGTATGAC AGCAGCAGGG GAGTTTGACC GTCTACCTGC CAATGCTACG
1041   GCCCATCTAC ACCAACGTAA CCTATCCCAT TACGGTCAAT CCGCCGTTTG TTCCACCGGA GAATCCGACG GGTGTTACT
CGGTAGATG TGGTTGCATT GGATAGGGTA ATGCGCAGTA GCGCGCAAAC AAGGGTGCCT CTTAGGCTGC CCAACAATGA
1121   CGCTCACATT TAATGTTGAT GAAAGCTGGC TACAGGAAGG CCAGACCGGA ATTATTTTGG ATGGCGTTAA CTGCGGCTTT
CGGAGTGTA ATTACAATA CTTTCGACCG ATGTCCTTCC GGTCTGCGCT TAATAAAAA TACCAGAAAT GAGCCGCAAA
1201   CATCTGTGGT GCAACGGGCG CTGGTCTGGT TACGGCCAGG ACAGTCTGTT GCCGCTGAA TTTGACTGTA GCGCATTTTT
GTAGACACCA CGTTGCCCGC GACCAGCCA ATGCGCGTCC TGTACGAAA CGGCAGACTT AAACCTGGACT CGCGTAAAAA
1281   ACGCGCCGGA GAAAACCGCC TCGCGGTGAT GGTGCTGCGT TGGAGTGACG GCAGTTATCT GGAAGATCAG GATATGTGGC
TGCGCGGCC CTTTTGGCGG AGCGCCACTA CCACGACGCA ACCTCACTGC CGTCAATAGA CTTTCTATGC CTATACACCG
1361   GGATGAGCGG CATTTTCCGT GACGTCTCGT TGCTGCATAA ACCGACTACA CAAATCAGCG ATTTCCATGT TGCCACTCGC
CCTACTCGCC GTAAAAGGCA CTGCAGACA ACGACGTATT TGGCTGATGT GTTTAGTCGC TAAAGGTACA ACGGTGAGCG
1441   TTTAATGATG ATTTACGCGC CGCTGTACTG GAGCTGAAG TTCAGATGTG CGGCGAGTTG CGTGACTACC TACGGCTAAC
AAATTACTAC TAAAGTCGGC GCGACATGAC CTCCGACTTC AAGTCTACAC GCCGCTCAAC GCACGTGATG ATGCCCATG
1521   AGTTTCTTTA TGGCAGGGT AAACGCAAGT CCGCAGCGCC ACCCGGCCCT TCGGCGGTGA AATATTCGAT GAGCGTGGT
TCAAAGAAAT ACCGTCCAC TTTGCGTCCA CCGCTCGCCG TGGCGCGGAA AGCCGCCACT TTAATGACTA CTCCGACCAC
1601   GTTATGCGCA TCGCTCACA CTACGTCTCA ACGTCGAAAA CCCGAAACTG TGGAGCGCCG AAATCCCGAA TCTCTATCTG
CAATACCGCT AGCGCAGTGT GATGCAGAGT TGCAGCTTTT GGGCTTTGAC ACCTCGCGGC TTTAGGGCTT AGAGATAGCA
1681   CGGCTGGTTG AACTGCACAC CGCCAGCGC ACGCTGATTG AAGCAGAAAG CTGCGATGTC CTGCGGCTAG AGGTGCGGAT
CGCCACCAAC TTGACGTGTG GCGGCTGCGC TGCAGCTAAC TTCGTCTCG GACGCTACAG CCAAAGGCGC TCCACGCCTA
1761   TGAATAATGC CTGCTGCTGC TGAACGGCAA GCCGTTGCTG ATTCGAGGGT TTAACCGTCA CGAGCATCAT CCTCTGCATG
ACTTTTACCA GACGACGACG ACTTGGCGTT CCGCAACGAC TAAAGTCCCG AATTGGCAGT GCTCGTAGTA GGAGACGTAC
1841   GTCAGGTCAT GGATGAGCAG ACGATGGTGC AGGATATCCT GCTGATGAAG CAGAACAAC TTAACGGCGT GCGCTGTCTG
CAGTCCAGTA CCTACTCGTC TGCTACCAGC TCCTATAGGA CGACTACTTC GTCTTGTGTA AATTGCGGCA CGGCACAAGC
1921   CATTATCCGA ACCATCCGCT GTGGTACACG CTGTGCGACC GCTACGGCCT GTATGTGGTG GATGAAAGCA ATATTGAAAC
GTAATAGGCT TGGTAGCGGA CACCATGTGC GACACGCTGG CGATGCGCGA CATACACCAC CTACTTCGGT TATAACTTTG
2001   CCACGGGATG CFCGCAATGA ATCGTCTGAC CGATGATCCG CGCTGGCTAC CGGCGATGAG CAAAGCGGTA ACCGGAATGG
GGTGCCTGAC CACGGTTACT TAGCAGACTG GCTACTAGGC GCGACCAGTG GCCGCTACTC GCTTGCAGT TGCCTTACC
2081   TGCAGCGCGA TCGTAATCAC CCGAGTGTGA TCATCTGGTC GCTGGGGAA GAATCAGGCC ACGCGCTAA TCACGACGCG
ACGTCCGCT AGCAATTAGT GGCTCACACT AGTAGACCAG CGACCCCTTA CTTAGTCCGG TGCCCGCAT AGTGCCTGCGC
2161   CTGTATCGCT GGATCAAATC TGTCGATCCT TCCCAGCCCG TGCAATGATA AGGCGCGGA GCCGACACCA CGGCCACCGA
GACATAGCGA CCTAGTTTAG ACAGCTAGGA AGGCGGGCC ACGTCATACT TCCGCGCCT CGGCTGTGGT GCGGCTGGCT
2241   TATTTTGGC CCGATGTACG CGCGCTGGA TGAAGACCG CCTTCCCGG CTGTGCCGAA ATGCTCCATC AAAAATGGC
ATAATAAACG GGCTACATGC GCGCGCACCT ACTTCTGGTC GGAAGGGCC GACACGGCTT TACCAGGTAG TTTTTTACC
2321   TTTTCGCTACC TGGAGAGACG CGCCCGCTGA TCCTTTGCGA ATACGCCAC GCGATGGGTA ACAGCTTTGG CGGTTTCGCT
AAAGCGATGG ACCTCTTACG CCGGGGACT AGGAAACGCT TATGCGGGTG CGCTACCAT TGTCAAGAAC TGCAAAGCGA
2401   AAATACTGGC AGGCGTTTCG TCAGTATCCC CGTTTACAGG CCGGCTTCGT CTGGGACTGG GTGGATCAGT CGCTGATTAA
TTTATGACCG TCCGCAAAGC AGTCATAGGG GCAAATCTCC CGCCGAAAGC GACCTGACC CACTAGTCA GCGACTAAT
2481   ATATGATGAA AACGGCAACC CGTGTCCGG TTAGCGGCTG GATTTTGGG ATACGCCGAA GATTCGAGCA TCTGTATGA
TATACTACTT TTGCGGTTGG GCACCAGCG AATGCCGCCA CTAAAACCG TATGCGGCTT GCTAGCGGTC AAGACATACT
2561   ACGGTCTGGT CTTTGGCCG CCGACGCGC ATCCAGCGCT GACGGAAGCA AAACACCAG AGCAGTTTTT CAGTTTCCGT
TGCCAGACCA GAAACGGCTG CCGTGCAGCA TAGTCCGGA CTGCTTCGT TTTGTGGTGC TCGTCAAATA CCGTCAAGCA
2641   TTATCCGGGC AAACCATCGA AGTGACCAG GAATACCTGT TCCGTACATG CGATAACGAG CTCCTGCACT GGATGGTGGC

```

Poxvirus recombinantes para antígenos del VHC

2721	AATAGGCCCG	TTTGGTAGCT	TCACTGGTGC	CTTATGGACA	AGGCAGTATC	GCTATTGCTC	GAGGACGTGA	CCTACCACCG
	GCTGGTAGGT	AAGCCGCTGG	CAAGCGGTGA	AGTGCCTCTG	GATGTGCGTC	CACAAGGTAA	ACAGTTGATT	GAACTGCCTG
	CGACCTACCA	TTCCGGCGACC	TTTCGCCACT	TCACGGAGAC	CTACAGCGAG	GTGTCCATT	TGTCAACTAA	CTTTACGGAC
2801	AACTACCGCA	GCCCGAGAGC	GCCGGGCAAC	TCTGGCTCAC	AGTACGCGTA	GTGCAACCGA	ACGCGACCCG	ATGGTCAAG
	TTGATGGCGT	CGGCCTCTCG	CGGCCGTTG	AGACCAGTG	TCATGCGCAT	CACGTTGGCT	TGCGCTGGCG	TACCAGCTTT
2881	GCCGGGCACA	TCAGCGCCTG	GCAGCAGTGG	CGTCTGGCGG	AAAACTCAG	TGTGACGCTC	CCCGCCGCTG	CCCGCCGCTG
	CGGCCCGTGT	AGTCGCGGAC	CGTCGTCACC	GCAGACCCTG	TTTTGGAGTC	ACACTGCGAG	GGCGCGCGCA	GGGTGCGGTA
2961	CCCGCATCTG	ACCACCAGCG	AAATGGATTT	TTGGTCGAG	CTGGGTAATA	AGCCTTGGCA	ATTTAAACCG	CAGTACGGT
	GGGCGTAGAC	TGGTGGTCGC	TTTACCTAAA	AACGTAGCTC	GACCCATTAT	TCGCCAACCG	TAAATTGGCG	GTCCAGTCCG
3041	TTCTTTTACA	GATGTGGATT	GGCGATAAAA	AACACTGCT	GACGCGGCTG	CGCGATCAGT	TCACCCGCTG	ACCGCTGGAT
	AAGAAAGTGT	CTACACTTAA	CCGCTATTTT	TTGTTGACGA	CTGGCGGAC	GCGCTAGTCA	AGTGGGCACG	TGGCGACTTA
3121	AACGACATTT	GCGTAAAGTGA	AGCGGACCCG	ATTGACCCTA	ACGCCTGGGT	CGAACGCTGG	AAGGGCGGCG	GCCATTACCA
	TTGCTGTAA	CGCATCTACT	TGCGTGGGCG	TAACTGGGAT	TGCCGACCCA	GCTTGGCGAC	TTCCGCGGCG	CGGTAAATGG
3201	GGCCGAAGCA	GCGTGTGGC	AGTGCACGCG	AGATACACTT	GCTGATGCGG	TGCTGATTAC	GACCCGCTAC	GCGTGGCAG
	CCGGCTTCGT	CGCAACAACG	TCACGTGCGG	TCTATGTGAA	CGACTACGCC	ACGACTAATG	CTGGCGAGTG	CGCACCGCTG
3281	ATCAGGGGAA	AACTTTATTT	ATCAGCCGGA	AAACCTACCG	GATTGATGGT	AGTGGTCAAA	TGGCGATTAC	CGTTGATGTT
	TAGTCCCTTT	TTGGAATAAA	TAGTCCGCTT	TTTGGATGGC	CTAACTACCA	TCACCAGTTT	ACCGCTAATG	ACCGCTAATA
3361	GAAGTGGCGA	GCGATACACC	GCATCCGGCG	CGGATTGGCC	TGAACTGCCA	GCTGGCGCAG	GTAGCAGAGC	GGGTAAACTG
	CTTACCCGCT	CGTATGTGG	CGTAGGCGCG	GCCTAACCCG	ACTTGGACGGT	CGACCGGCTC	CATCGTCTCG	CCCATTTGAC
3441	GCTCGGATTA	GGCCGCAAG	AAAACCTATC	CGACTCCGCT	GTTTGGACCG	GTTTGGACCG	CTGGGATCTG	CAGTGGTCTG
	CGAGCCTAAT	CCCGCGGTTT	TTTTGATAGG	GCTGGCGGAA	TGACGGCGGA	CAAACTGGC	GACCCTAGAC	GGTAACAGTC
3521	ACATGTATA	CCCCTACGTC	TTCCCGAGCG	AAAACGGTCT	GCGCTGCGGG	ACGCGCGAAT	TGAATTATGG	CCCAACAGGC
	TAGTACATATG	GGCATGTGCG	AAGGGCTCGC	TTTTGCCAGA	CGCGACGCCC	TGCCGCGCTA	ACTTAATAAC	GGGTGTGGTC
3601	TGGCGCGCGG	ACTTCCAGTT	CAACATCAGC	CGCTACAGTC	AACAGCAACT	GATGGAAACC	AGCCATCGCC	ATCTGCTGCA
	ACCCGCGCCG	TGAAGGTCAA	GTTGTAGTCG	GCGATGTCAG	TTGTGCTTGA	CTACTTTTGG	TCGGTAGCCG	TAGACGAGCT
3681	CGCGGAAGTA	GGCACATGGC	TGAATATCGA	CGGTTTCCAT	ATGGGGATTTG	GTGGCGACGA	CTCCTGGAGC	CCAGTACTAT
	GCGCCTTCTT	CCGTGTACCG	ACTTATAGCT	GCCAAAGGTA	TACCCCTAAC	CACCGCTGCT	GAGGACCTCG	GGCAGTCATA
3761	CGCGGGAATT	CAGCTGAGCG	CCCGTCGCTA	CCATTACCAG	TTGGTCTGGT	GTCAAAAATA	ATAATAACCG	GGCAGGGGGG
	GCCCGCTTAA	GTCGACTCGC	GGCCAGCGAT	CGTAATGGTC	AACCAGACCA	CAGTTTTTAT	TATTATTTGG	CCGCTCCCCC
3841	ATCCACTAGT	TCTAGAGCGG	CCGCCACCCG	GGTGGCGACT	CCGGAACCAA	TTACTGATAA	TGTAGAAGAT	CATACAGACA
	TAGGTGATCA	AGATCTCGCC	GGCGGTGGCG	CCACCGCTGA	GGCCTTGGTT	AATGACTATT	ACATCTTTCA	GTATGCTGTT
3921	CCGTACATA	CACTAGTGAT	AGCATTAAATA	ATCATCTGGA	ATCATCTGGA	GAATCCACAA	CAGACGAGAC	CTTCCGAAACA
	GGCAGTGAT	GTGATCACTA	TCGTAATTTAT	GTCATTCACG	TAGTAGACCT	CTTAGGTGTT	GTCGCTCTG	AGGCTTGGT
4001	ATTACTGATA	AAGAAGAAGA	TCATACAGTC	ACAGACACTG	TCTCATACAG	TACAGTAAGT	ACATCATCTG	GAATTTGTC
	TAAGTACTAT	TTCTTCTTCT	AGTATGTCAG	TGCTGTGAGC	ATGTATGTG	ATGTACTTCA	TGTAGTAGTA	CTTAACAGTG
4081	TACTAAATCA	ACCACCGATG	ATGCGGATCT	TTATGATACG	TACAATGATA	ATGATACAGT	ACCACCAACT	ACTGTAGCGG
	ATGATTTAGT	TGGTGGCTAC	TACGCTTAGA	AACTACTATG	ATGTTACTAT	TACTATGTCA	TGGTGGTTGA	TGACATCCCG
4161	GTAGTACAAC	CTCTATTAGC	AAATATAAAA	CAACAGGACTT	TGTAGAATAA	TTTTGGTATA	CCGCTAATTA	GTATTTGTCG
	CATCATGTTG	GAGATAATCG	TTAATATTTT	GGTCCCTGAA	ACATCTTTAT	AAACCATAAT	GGCGTAATTA	ATATAACAGC
4241	GCCGTGGCAA	TATTTCTGTAT	TACATATTTAT	ATATATAATA	AACGTTACG	TAAATACAAA	ACAGAGAAAC	AAGTCTAGAT
	CGGCACGGTT	ATAAGACATA	ATGTATAATA	TATATATTTAT	TTGCAAGTGC	ATTTATGTTT	TGCTCTTTGT	TTCCAGTACT
4321	TTTTGACTTA	CATAAATGTC	TGGGATAGTA	AAATCTATCA	TATTGAGCGG	ACCATCTGGT	TCAGGAAAGA	CAGCCATAGC
	AAAACCTGAAT	GTATTTACAG	ACCCTATCAT	TTTTAGATAGT	ATAACTCGCC	TGGTAGACCA	AGTCCTTTCT	GTCGGTATCG
4401	AAAAGACTA	TGGGAATATA	TTTTGATTTG	TGGTGTCCCA	CTCCACTAGA	TTTCTCTGTC	CTATGGAAAC	AGGAAGGTCT
	GTTTTCTGAT	ACCCTTATAT	AAACCTAAAC	ACCACAGGGT	ATGGTGATCT	AAAGGAGCAG	GATACCTTGC	TCTCCACAG
4481	GATTACCATT	ACGTTAACAG	AGAGGCCATC	TGGAAGGGAA	TACCCGCGCG	AAACTTTCTA	GAACATACTG	AGTTTTTAGG
	CTAATGGTAA	TGCAATTTGC	TCTCCGGTAG	ACCTTCCCTT	ATGGGCGGCG	TTTGAAAGAT	CTTGTATGAC	TCAAAAATCC
4561	AAATATTTAC	GGAACTTCTA	AAACTGCTGT	GAATACAGCG	GCTATAATAA	ATCGTATTTG	TGTATGGGAT	CTAACATCG
	TTTATAAATG	CCTTGAAGAT	TTTGCAGACA	CTTATGTGCG	CGATAAATTA	TAGCATAAAC	ACACTACCTA	GATTTGTAGC
4641	ATGGCGTTAG	AAGTCTTAAA	AAATACGTACC	TAAATGCCCTA	CTCGGTGTAT	ATAAGACCTA	CCTCTCTTAA	AATGGTTAG
	TACCCGCAATC	TTGAGAATTT	TTATGCATGG	ATTACGGAAAT	GAGCCACATA	TATTTCTGGAT	GGAGAGAAAT	TTACCAACTC
4721	ACCAAGCTCT	GCAATTAATGA	ATCGGCCAAC	GCGCGGGGAG	AGGCGGTTTG	CGTATTGGGC	GCTCTTCCGC	TTCCCTCGTC
	TGGTTCGAGA	CGTAAATTA	TAGCCGGTGG	GCGCCCCCTC	TCCGCAAAAC	GCAATAACCCG	CGAGAAGGCG	AAGGAGCCAG
4801	ACTGACTCGC	TGCGCTCGGT	CGTTCGGCTG	CGCGAGCGGG	TATCAGCTCA	CTCAAGGGCG	GTAAATACGGT	TATCCACAGA
	TGACTGAGCG	ACCGGAGCCA	GCAAGCCGAC	CGCCCTCGCC	ATAGTCGAGT	GAGTTTTCCG	CATTATGCCA	ATAGGTGCTC
4881	ATCAGGGGAT	AACCGAGGAA	AGAACAATGTC	AGCAAAAGGC	CAGCAAAAGC	CCAGGAACCG	TAAAAAGGCC	CGTTGTCTGG
	TAGTCCCTTA	TTGCGTCTCT	TC'TGTACAC	TGTTTTTCCG	GTCGTTTTCC	GGTCTTTGGC	ATTTTTCCCG	CGCAACAGCA
4961	CGTTTTTCCA	TAGGCTCCGC	CCCCCTGAC	AGCATCAACA	AAATCGACGC	TCAAGTCAGA	GGTGGCGAAA	CCCGACAGGA
	GCAAAAAGAT	ATCCGAGGCG	GGGGGACTGC	TCGTAGTGTT	TTTAGCTGCG	AGTTACGCTC	CCACCGCTTT	GGGCTGTCTC
5041	CTATAAAGAT	ACCAGGCGTT	TCCCCCTGGA	AGCTCCCTCG	TGCGCTCTCC	TGTTCCGACC	CTGCCGCTTA	CCGGATACCT
	GATATTTCTA	TGGTCCGCAA	AGGGGGACTC	TCGAGGGAGC	ACGCGAGAGG	ACAAGGCTGG	GACGGCGAAT	GGCCATGGAA
5121	GTCCCGCTTT	CTCCCTTCGG	GAAGCGTGGC	GCTTTCTCAT	AGCTCACGCT	GTAGGTATCT	CAGTTTCGGT	TAGGTCGGTT
	CAGGCGGAAA	GAGGGAAGCC	CTTCGCACCG	CGAAAGAGTA	TGAGTGCGA	CATCCATAGA	GTCAAGCCAC	ATCCAGCAAG
5201	GCTCCAAGCT	GGGCTGTGTG	CACGAACCCG	CCGTTACAGC	CGACCCTCG	GCCTTATCCG	GTAACACTCG	TCTTGAATCC
	CGAGGTTCGA	CCCACACAC	GTGCTTGGGG	GGCAAGTCCG	GCTGGCGACG	CGGAATAGGC	CATTGATAGC	GAAAGCTCAG
5281	AAACCGGTA	GACACGACTT	ATCGCCACTG	GCAGCAGCCA	CTGGTAACAG	GATTAGCAGA	CGGAGGTATG	TAGGCGGTCG
	TTGGGCCATT	CTGTGCTGAA	TAGCCGTGAC	CGTCTGCTG	GACCATTTGC	CTAATCGCTC	CGCTCCATAC	ATCCGCGACG
5361	TACAGAGTTC	TTGAAGTGGT	GGCCTAACCTA	CGGCTACACT	AGAAGGACAG	TATTTGGTAT	TTGCGCTCTG	CTGAAGCCAG
	ATGCTCTCAAG	AACTTCACCA	CCGGATTGAT	GCCGATGTGA	TCTTCTCTGC	ATAAACCTA	GACGCGGAGC	GACTTCTGGT
5441	TTACCTTCGG	AAAAAGGTT	GCTAGCTCTT	GATCCGCGAA	ACAAAACCC	GCTGGTAGCG	GTGGTTTTTT	TGTTTCCAAAG
	AATGGAAGCC	TTTTTCTCAA	CCATCGAGAA	CTAGGCCGTT	TGTTTGGTGG	CGACCATCGC	CACCAAAAAA	ACAAACGTTT
5521	CAGCAGATTA	CGCCGAGAAA	AAAAGGATCTA	CAGAAGATC	CTTTGATCTT	TTCTACGGGG	TCTGACGCTG	AGTGGAACTG
	GTCCGCTAAT	GCGCGTCTTT	TTTTCTTAGA	GTTCTTCTAG	GAACCTAGAA	AAGATGCTAT	AGACTGCGAG	TCACCTTGGT
5601	AAACTCACGT	TAAGGGATTT	TGGTCAATGAG	ATTATCAAAA	AGGATCTTCA	CCTAGATCCT	TTTTAAATTA	AAATGAAGTT
	TTTGAAGTCA	ATCCCTTAAA	ACCAGTACTC	TAAATGTTTT	TCCTAGAAGT	GGATCTAGGA	AAATTTAAT	TTTACTTCAA
5681	TAAATCAAT	CTAAAGTATA	TATGAGTAAA	CTTTGGTCTGA	CAGTTACCAA	TGCTTAATCA	GTGAGGCACC	TATCTCAGCG
	AATTTAGTTA	GATTTTCATAT	ATACTCATTT	GAACAGACT	GTCATGTTT	ACGAATTAGT	CACTCCGTTG	ATAGAGTCCG
5761	ATCTGTCTAT	TTGCTTCATC	CATAGTTGCC	TGACTCCCGC	TCGTGTAGAT	AACTACGATA	CGGGAGGGCT	TACCATCTGG
	TAGACAGATA	AAGCAAGTAG	GTATCAACGG	ACTGAGGGGC	AGCACATCTA	TTGATGCTAT	GCCTCCCGA	ATGGTAGACC
5841	CCCCAGTGT	GCAATGATAC	CGCGAGACCC	ACGCTCACCG	GCTCCAGATT	TATCAGCAAT	AAACCAGCCA	GCCGGAAGGG
	GGGTCACGA	CGTTACTATG	GCGCTCTGGG	TGCGAGTGGC	CGAGGTCTAA	ATAGTCTGTA	TTTTGGTCCGT	GCGCCTTCCC

5921	CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTAAT AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAAGTAGT
6001	GGCTCGCGCT TTCACCAGGA CGTTGAAATA GCGCGAGGTA GGTCAGATAA TTAACAACGG CCC TTCGATC TCATTCATCA
	TCGCCAGTTA ATAGTTTGGC CAACGTTGTT GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTGGTTTG GTATGGCTTC
	AGCGGTCAAT TATCAAACGC GTTGCAACAA CGGTAACGAT GTCCGTAGCA CCACAGTCCG AGCAGCAAAAC CATACCGAAG
6081	ATTCAGCTCC GGTCCCAAC GATCAAGCGC AGTTACATGA TCCCCATGTT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTG
	TAAGTCGAGG CCAAGGGTTG CTAGTTCCGC TCAATGTACT AGGGGGTACA ACACGTTTTT TCGCCAATCG AGGAAGCCAG
6161	CTCCGATCGT GTFCAGAAAT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC
	GAGGTAGCA ACAGTCTTCA TTCAACCGGC GTCACAATAG TGAGTACCAA TACCCTCGTG ACGTATTAAG AGAATGACAG
6241	ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GCGGACCCAG
	TACGGTAGGC ATTCTACGAA AAGACACTGA CCATCATGA GTTGGTTCAG TAAGACTCTT ATCACATACG CGCTGGCTC
6321	TTGCTCTTGC CCGCGCTCAA TACGGGATAA TACC CGCCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGA AAAACGTT
	AACGAGAACG GCGCGCAGTT ATGCCCTATT ATGGCGCGGT GTATCGTCTT GAAAATTTTCA CGAGTAGTAA CCTTTTGC AA
6401	CTTCGGGGCC AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTGTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT
	GAAGCCCGC TTTTGAGAGT TCCTAGAATG TACCACAATC TAGGTCAAGC TACATTGGGT GAGCAGCTGG GTTGACATGA
6481	TCAGCATCTT TTACTTTTAC CAGCGTTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAAATGCC GCAAAAAAGG GAATAAGGGC
	AGTCGTAGAA AATGAAAGTG GTGCGAAAAGA CCCACTCGTT TTTGTCTCTC CGTTTTACGG CGTTTTTTTC CTATATCCCG
6561	GACACGGAAA GTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTAITGAA GCATTTATCA GGGTTATAG GGTATGAGCG
	CTGTGCCCTT ACAACTTATG AGTATGAGAA GGA AAAAGTT ATAATAACTT CGTAAATAGT CCCAATAACA GAGTACTCGC
6641	GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAAATAGG GGTTCGCGCC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
	CTATGTATAA ACTTACATAA ATCTTTTTAT TTGTTTTATC CCAAGGCGCG TGTAAAGGGG CTTTTTACGCT CTATGACGAG
6721	TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GGCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTCGCGC GTTTCGGTGA
	ATTCTTTGGT AATAATAGTA CTGTAAATGG ATATTTTTAT CCGCATAGTG CTCCGGGAAA GCAGAGCGCG CAAGACCAT
6801	TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGACGCT CCGGAGACG GTCTGTAAGC GTCTGTAAGC GGATGCCGCG AACAGACAAG
	ACTGCCACTT TTGGAGACTG TGTACGTCGA GGGCCTCTGC CAGTGTGCAA CAGACATTCC CCTACGGCCC TCGTCTGTTT
6881	CCCGTCAGGG CCGCTCAGCG GGTGTTGGCG GGTGTCCGGG CTGGGTTAAC TATGCGGCAT CAGAGCAGAT TGTACTGAGA
	GGCGAGTCCC GCGCAGTCGC CCACAAACCGC CCACAGCCCC GACCGAATTG ATACGCCGTA GTCTCTGCTA ACATGACTCT
6961	GTGCACCATA TCGCGTGTGA AATACCGCAC AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGCCATTCCG CATTCAGGCT
	CACGTGGTAT AGCCACACT TTATGGCGTG TCTACGCATT CCTCTTTTTT GGCGTAGTCC GCGGTAAAGC GGAAGTCCGA
7041	GCCCAACTGT TGGGAAGGGC GATCGGTGCG GGCCTCTTCG CTATTACGCC AGTTCGACGAT TGTCTAGATT GTCAAGATT
	CGCGTTGACA ACCCTTCCC GTCAGCCACGC CCGGAGAAGC GATAATGCGG TCAGTCTGCTA ACAAGTACTA CCGTCTCTAAA
7121	ATATATCTGG AGGTTACAAC AATAGTAGTG TAGTTAATGT AATATCGAAT CTAGTCCTTA GCTATAATCT GATATATGAT
	TATATAGAAC TCCAATGTTG TTATCATCAC ATCAATTACA TTATAGCTTA GATCAGGAAT CGATATTAGG CTATATACTA
7201	GAATGGACCA AATTATCATC ATTAACACTT CCTAGAATTA ATCCCCTCT ATGGTCAGCG CATAATAAAT TATATGTAGG
	CTTACCTGGT TTAATAGTAG TAAATTTGTA GGATCTTAAT TAGGGCGAGA TACCAGTCCG GTATTATTTA ATATACATCC
7281	AGGAGGAATA TCTGATGATG TTCGAACTAA TACATCTGAA ACATACGATA AAGAAAAAGA TTGTTGGACA TTGGATAATG
	TCCTCCTTAT AGACTACTAC AAGCTTGATT ATGTAGACTT TGTATGCTAT TTCTTTTTCT AACAACTGT AACCTATTAC
7361	GTCACGTGTT ACCACGCAAT TATATAATGT ATAAATCGCA ACCGATTAAA CATAAATATC CATTGGAAAA AACACAGTAC
	CAGTGACAAA TGGTGCGTTA ATATATTACA TATTTACGCT TGGCTAATTT GTATTATAG GTAACCTTTT TTGTGTCATG
7441	ACGAATGATT TTCTAAAGTA TTTGAAAAGT TTTATAGGTA GTTGATAGAA CAAAATACAT AATTTTGTAA AAATAAATCA
	TGCTTACTAA AAGATTTTAT AAACCTTTCA AAATATCCAT CCAACTATCT GTTTTATGTA TTA AAAACATT TTTATTTAGT
7521	CTTTTTATAC TAATATGACA CGATTACCAA TACTTTTTGT ACTAATATCA TTAGTATAAC CTACACCTTT TCCTCAGACA
	GAAAAATATG ATTATACTGT GCTAATGTTT ATGAAAACAA TGATTATAGT AATCATATGC GATGTGGAAA AGGAGTCTGT
7601	TCTAAAAAAA TAGGTGATGA TGCAACTCTA TGATGTAATC GAAATAATAC AAATGACTAC GTTGTATTGA GTGCTTGGTA
	AGATTTTTTT TCCCACTACT ACGTTGAGAT ACTACATTAG CTTTATTATG TTTACTGATG CAACAATACT CACGAAACCT
7681	TAAGGAGCCC AATTCATTAT TCTTTTTAGC TGCTAAAAGC GAGCTCTTGT ATTTTGATAA TTATACCAAG GATAAAATAT
	ATTCCTCGGG TTAAGGTAAT AAGAAAATCG ACGATTTTCG CTGCAGAACA TAAAAC TATT AATATGGTTC CTATTTTATA
7761	CTTACGACTT TCCATACGAT GATCTAGTCA CAACATACAC AATTAATCA TTAGCTGCTA GAGATGCCGG TACTATGTA
	GAATGCTGAG AGGTATGCTA CTAGATCAAT GTTGATAGTG TTAATTTAGT AACTGACGAT CTCTACCGCC ATGAATACAT
7841	TGTGCATTCT TTATGACATC AACTACAAAT GACACTGATA AAGTAGATTA TGAAGAATAC TCCACAGATG TGATTGTAAT
	ACACGTAAAG AATACTGTAG TTGATGTTTA CTGTGACTAT TTCATCTAAT ACTTCTTATG AGGTGTCTCA ACTGAATTT
7921	TACAGATAGT GAATCGACTA TAGACATAAT ACTATCTGGA TCTACACATT CACCAGAAAC TAGTTCGTAG AAACGAGGG
	ATGTCTATCA CTTAGCTGAT ATCTGTATTA TGATAGACCT AGATGTGTA GGTGCTTTG ATCAAGACTC TTTGGTCTCC
8001	ATATAGATAA TTTTAATTGC TCGTCCGAT TCGAAAATCG GGGCCCCCCC TCGAGGTGCA CGGTATGCAT AAGCTTGTATA
	TATATCTATT AAAATTAACG AGCAGCCATA AGCTTTAGCG CCGGGGGGG AGCTCCAGCT GCCATAGCTA TTCGAACTAT
8081	TCGAATTCCT GCAGCCC AGCTTAAGGA CGTCCGGG

Anexo 2

Secuencia del plasmidio pVACRE

1	ATCGAATTCA AAGCTTATCC TCGAGTCCAR TTGCATGCAG CGGTAAGCCT GTGCTCCACG CCCCCACAT ACATCCGAAC
	TAGCTTAAAGT TTCGAATAGG AGCTCAGGTY AACCTACGTC GCCATTCCGA CACGAGGTGC GGGGGGTGTA TGTAGGCTTG
	* G R T W N C A A T L R H E V G G V Y M R V
81	CTTGAAGATG G TAAAGTTGA CAGTGCAGGG GTAATGCCAA AGCCTGTATG GGTAGTGCAC CAAGCACTTA GGTGTCAACC
	K A F T I T F N V T C P Y H W L R Y P Y D V L C R P T L W
161	AAGGCCCAA ACCACATTTG GTGTAAGTGG CCTCGGGGTG CTTGCGGAAG CAATCCGTAG GGCAGGTCAA GGTGTTGTTA
	TTCCGGGGTT TGGTGTAAC CACATTCACC GGAGCCCCAC GAACGCTTC GTTAGGCATC CCGTCCAGTT CCACAACAAT
	. P G L L G C K T Y T A E P H K R F C D T P C T L T N N G .
241	CCGACCCCTC CGATGTTATA CCGAGGGGCC CCGCAGCTCT TGGTGAACCC AGTGCTATTC ATCCATGTAC AGCCAAACCA
	GGCTGGGGAG GCTACAATAT GCCTCCCGGG GCGGTGCAGA ACCACTTGGG TCACGATAAG TAGGTACATG TCGTGGTTGGT
	.. V G G I N Y P P G G C T K T F G T S N M W T C G F W
321	GTGTCGCCAG GCGCGCCGCG TGTTGTTAAG GAGCAGCACG TCCGTCTCAT TCTCCCCCA GTTATACGTA GCGACGCCGG
	CAACGGGTGCG CCGCGCGCGC ACAACAATTC TCGTCTGTGC AGGCAGAGTA AGAGGGGGGT CAATATGCAT CCTCGGCTC
	N G L P P R T N N L L L V D T E N E G W N Y T P V G S .
401	AACGATCGGT GGTCCCCACG ACAACGGGGC TTGGAGTGAA ACAATACACT GGACCACACA CCTCCGCGC GGTAGCAGTA
	TTGCTAGCCA CCAGGGGTGC TGTTGCCCGG APTCTACT TGTATTGTGA CCGTGGTGTG GGAGGGCGCG CCGTGGCTAT
	. R D T T G V V V P S P T F C Y V P G C V E A A P V I G .

Poxvirus recombinantes para antígenos del VHC

481 CCACACGGTT GAGGTGCGTA GTGCCAGCAA TAGGGCCTCT GGTCCAAGCT GCGCGGCTCA GCGTAAGTAA TGGGGCCCA
GGTGTGCCAA CTCACCGCAT CACGGTCGTT ATCCCGGAGA CCAGGTTTCA GCGCCCGAGT CGCATTTCAT ACCCCGGGGT
.. C P Q P A Y H W C Y P R Q D L S R P E A Y T I P G W
561 CCCCTGGTGC AACGTATCAA TGGGGCGGCA GCTGGCCATG CGATCTGAGC ATCCGGACGA GTTGAACCTG TGCACGTAAA
GGGGACCAGC TTGCATAGTT ACCCCGCGCT CGACCCTGAC GTAGACTGCG TAGGCCCTGCT CAACTTGGAC ACGTGCATTT
G Q D F T D I P R C S A M R D S C G S S N F R H V Y F
641 ACAACGCAGC AAGGAACCCG GTCTGGAGGG AGTCGTTGCA GTTCAGGGCA GTCCGGTTAA TATGCCAGCT GCCGTGGTA
TGTTGCGTGC TTCCTTGGGC CAGACTCTCC TCAGCAACGT CAAGTCCCGT CAGGCCAATT ATACGGTCTGA CGGCCAACAT
. L A A L F G T Q L S D N C N L A T R N I H W S G N T N
721 TTTACAAGCT GGATTTTCTG ACTCGGCCCA GATGTAAAGA GGCCCGTAAA CTGGCTGACG CCGCGGGCTG CCGTCCCGCC
AAATVLTGCA CCTAAAAGAC TGAGCCGGGT CTACATTTCT CCGGGCAATT GACCAGTGC GGCGCCCGAC GGCAGGGGGG
.. V L Q I K Q S P G S T F L G T F Q S V G R A A T G G
801 TGTCACGTAG GTTCCCCTCC CGTCAACGCC GGCAAAAGAT AGCATCACAA TCAAAAACCTT GGCCAGTTCC CCCACCATGG
ACAGTGCATC CAAGGACGAG GCGATTGCGC CCGTTTCTCA TCGTAGTGTG AGTTTTGGAA CCGGGTCAAG GGGTGGTACC
T V Y T G T G D V G A F L L M V I L V K A W N G V M S
881 AGTAGTAGGC AAGGCCCGCT AGGACTCCCC AGTGGGCCCC CGCTACCATG TCCACGACGG CTTGTGGGAT CCGGAGTAAC
TCATCATCCG TTCGGGGGCA TCCTGAGGGG TCACCGGGG GCGATGGTAC AGGTGCTGCC GAACACCCTA GGCCTCATTG
. Y Y A L G A L V G W H A G A V M D V V A Q P I R L L Q
961 TGCGATACCA CTAGGGCTGT TGAAGGTGAC CAGTTTCACTA TCATATCCCA GGCCATGCGG TGACCTGATA CCGTCCCGGG
ACGTATAGGT GATCCCGACA ACTTCCACTG WTCAAGTAGT AGTATAGGGT CCGGTACGCC ACTGACTAT ACTGAGCTG GACCCGGCC
.. S V V L A T S P S W N M M D W A M R H G S V H G P
1041 ATAGATTGAG CAGTTGCACT CTTGTGCTGT CTCATGCCGG CGAGGCGAGA AGGTGAACAG CTGGGAAAAC AGGAAAACAG
TATCTAACCT GTCAAACGTC GGACACGACA GAGTACGGCC GCTCCGCTTC TCCAATTGTC GACCCTTGTC TCCTTTTGTG
Y I S C N C D Q A T E H R R P S F T F L Q S V T L G C A G C A A G C A C T
1121 ATCCCGCAGG ATCCCCACCG TACATAGCCG AGCAGAGAGC AGCCGCCCCA ACAGAGCAAT CGACGTGGCG TCGTATTGTC
TAGGGTCTCT TAGGGGTGCG ATGTATCGCC TCGTCTCTCG TCGGCGGGGT TGCTCGTTTA GCTGCACCCG GTCGCACAG
. G C L D G V Y M A S C L A A A G V L L D V H R R I T T
1201 GTGGTGGGGA CGCTGGCATT CTTGGCCGCG AGTGTGGGGG TGAGCGCTAC CCAGCAGCGG GAGGTGTTGT CCGTCCCGAAC
CACCACCCCT GCGACCGTAA GGACCCGCGC TCACACCCCT ACTCGCATG GGTGCTGCGC CTCACAAACA GCGAGGGCTTG
.. T P V S A N R A A L T P T L A V W C R S T N D E R V
1281 GCAGGGCAGC CATCCGGGGG TGTGCATGAT CATGTGCTCT GCCTCATACA CAATGCTTGA GTTGGAGCAG TCGTTCGTGA
CGTCCCGTGC GTAGGCCCCC ACACGTAATA GTACAGCAGA CCGAGTATGT GTTACGAAC TCAACCTCGT AGCAAGCACT
C P V C G P T H M I M D D A E Y V I S S N S C D N T V
1361 CATGTTACAC CCCGGACGCG TTGCGCACTT CATAGCCGGA AACTGGGATG GTCAAACAGG ACAGCAAAGC CAAAAGGAAG
GTACCATGTT GGGCTTCGCG AACCGTGAAG GTATCCCGCT TTGACCCCTAC CAGTTTGTCC TGTCGTTTCC GTTTCTCTC
. H Y V G S A N R V E Y A S V P I T L C S L L A L L F L
1441 AGAGAGAAAG AGCAACCGGG CAGATTCCCT GTTGCATAAT TCACGCCGTC CTCAGAAACC CCGACGCCAT GCGCCAGGGC
TCTCTCTTTC TCGTTGGCCC GTCTAAGGGA CAACGTATTA AGTGCGGCAG GAGGTCTTGG GCCTGGCGTA CCGCGTCCCG
.. S F S C G P L N G T A Y N V G D E L V R V G H A L A
1521 CCTGGCAGCG CCCCTAGGG GGGCGCCGAC GAGCGGAATG TACCCATGA GGTCCGGGAA GCCGCATGTT AGGGTATCGA
GGACCCGTGC GGGGATCCCC CCGCCGGTAC ATGGGGTACT ATGGGGTACT CCGCCCGCTT CCGCCGTACG CCGCCATGCT
R A A G G L P A G V L P I Y G M L D A F G C T L T D I
1601 TGACCTTACC CAAATATCCG GACCTACGCC GGGGGTCACT GGGGCCCAA CTAGGCCGAG AGCCACGGGG TGACAGGAGC
ACTGGAATGG GTTTAATGCG CTGGATGCGG CCCCAGTCA CCCCAGTCA GATCCGGTCC TGCTGGCCCC GCTGTCTCCG
. V K G L N R S R R R P D T P G W S P R S G R P S L L W
1681 CATCTGCCCC ATCCCATGCC CTCGTTACCA TAGAGGGGCC AAGGGTACCC GGGCTGGGCC CAGGACCTGC CCTCGGGCCG
GTAGGACGGG TAGGGTACGG GAGCAATGGT ATCTCCCGGG TTCCCATGGG CCCGACCCGG GTCTGGAGC GGAGCCCGCT
.. G A W G M G E N G Y L P W P Y G P Q A W S R G E P R
1761 GCGAGCCTTG GGGATAGGTT GTCGCCTTCC ACGAGGTTGC GACCGCTCGG AAGTCTTCTT AGTTGCGCGC ACACCCAAAC
CGCTGCAAC CCCTATCCAA CAGCGGAAGG CTGGTCCAAAG CTTGGCGAGC TTCAGAAGGA TCAACCGCGG TGTGGGTTGG
R A K P I P Q R R G R P Q S R E S T K R T A R V G L R
1841 TGGGGCCCTT GCGCGGCAAC AGGTAACATC CACCAACGAT CTGACCACC CCCGGGAAT TGACGTCTCT TGGGGCGGGC
ACCCCGGGGA CGCGCCGTTG TCCATTTGAG GTGGTTGCTA GACTGGTGGC GGGCCCTTGA ACTGCAGGAC ACCCGCCGCC
. P G R R P L L Y V G G V I Q G G G P F K V D Q P R R N
1921 TTGGTGTATC GTTTGGTTTT TCTTTGAGGT TTAGGATTCC TGCTCATCTA GATTGCGTAG TGGCTGAGT CTGTCGACTT
AACCCAAATG CAAACCAAAA AGAAAACCTCA AATCCTAAGC AACAGTAGAT CTAAGCCGATC GACACTCTA GACACTGAAA
.. T N R K T K R Q P K P N T S M
2001 CGAGCTTATT TATATCCAAA AAAAAAAA TAAAAATTCA ATTTTTAAGC TTTCACTAAT TCCAAACCA CCGCTTTTTT
GCTCGAATAA ATATAAGGTT TTTTTTTTTT ATTTTTAAGT TAAAAATTCG AAAAGTATTA AGGTTTTGGG GGGCGAAAAA
2081 ATAGTAAGTT TTTCACCCAT AAATAATAAA TACAATAATT AATTTCTCGT AAAAGTAGAA AATATATTCT AATTTATTGC
TATCATTCAA AAAGTGGGTA TTTATTATTT ATGTTATTAA TTAAGAGCA TTTTCACTCT TTATATAAGA TTAATAACG
2161 ACGGTAAGGA AGTAGATCAT AACTCGAGCA TGGGAGATCC CGTCGTTTTA CAACGTGCTG ACTGGGAAAA CCGTGGCGTT
TGCCATTCTC TCATCTAGTA TTGAGTCTGT ACCCTTAGG GCAGCAAAAT GTTGACGAC TGACCCTTTT GGGACCGCAA
2241 ACCCAAATTA ATCGCCTTGC AGCACATCCC CTTTTCGCCA GCTGGCGTAA TAGCGAAGG GCCCGCACCG ATCGCCCTTC
TGGGTTGAAT TAGCGGAACG TCGTGTAGGG GGAAAGCCGT CGACCAGCAT ATCGCTTCTC CCGGCGTGGC TAGCGGGAAG
2321 CCAACAGTTC CCGACCTTGA ATGGCGAATG CGCCTTTGCC TGTTTCCGG CACCAGAAGC GGTGCCGGAA AGCTGGCTGG
GGTTGTCAAC GTCTGGACT TACCCTTATC GCGGAACCG ACCAAGGCC GTGGTCTTCT CACCGCCCTT TCGACCCGAC
2401 AGTGGCATCT TCCTGAGGCC GATACTGTCC TCGTCCCTTC AAACTGGCAG ATGCACGGTT ACGATGCGCC CATCTACACC
TCACGCTAGA AGGACTCCGG CTATGACAGC AGCAGGGGAG TTTGACCGTC TACGTGCCAA TGCTAGCAGG GTAGATGTGG
2481 AACGTAACCT ATCCCAATTG GGTCATCCCG CGTGTGTTTC CCACGGAGAA TCCGACGGGT TGTACTCCG TCACATTFAA
TTGCATTGGA TAGGGTAATG CCAGTTAGGC GGCAAAACAG GGTGCCTCTT AGGCTGCCCC ACAATGAGCG AGTGTAAATT
2561 GTTTGATGAA AGTGGCTACT AGGAAGGCCA GACGCGAATT ATTTTTGATG CCGTAACTC GCGTTTTACT CTGTTGGTGA
ACAACACTTT TCGACCGATG TCCTTCCGGT CTGCGCTTAA TAAAAACTAC CGCAATTGAG CCGCAAAGTA GACACCAAGT
2641 ACGGGCGCTG GGTGCGTTAC GGCCAGGACA GTCGTTTGGC GTCTGAATTT GACCTGAGCG CATTTTTTACG CGCCGGAGAA
TGCCCGCGAC CCAGCCAAATG CCGGTCCTGT CAGCAAAACG CAGACTTAAA CTGGACTCGC GTAAAAATGC GCGGCTCTT
2721 AACCCGCTCG CCGTGTATGG GCTGCGTTGG AGTGACGGCA GTTATCTGGA AGATCAGGAT ATGTGCGCGA ATGTGCGGAT
TTGGCGGAGC GCCACTACCA CGACGCAACC TCACTGCCGT CAATAGACCT TCTAGTCTTA TACCCGCTT ACTCGCGGTA
2801 TTTCCGTTAC GTCTGCTTGC TGCAATAAAC GACTACACAA ATCAGCGATT TCCATGTTTC CACTCGCTTT AATGATGATT
AAAGGCACTG CAGGCAACG ACGTATTGTT CTGATGTGTT TAAGTCTTAA AGGTACAACG AGGTACAACG GTGAGCGGAA TTACTACTAA
2881 TCAGCCGCGC TGTACTGGAG GCTGAAGTTC AGATGTGCGG CGAGTTGCGT GACTACCTAC GGGTAACAGT TTCTTTATGG
AGTCGGCGCG ACATGACCTC CGACTTCAAG TCTACACGCC GCTCAACGCA CTGATGGATG CCCATTGTCA AAGAAAATAC

2961	CAGGTGAAA	CGCAGGTCGC	CAGCGGCACC	GCGCCTTTCG	GCGGTGAAAT	TATCGATGAG	CGTGGTGGTT	ATGCCGATCG
	GTCCCACCTTT	CGTCCAGCG	GTCCCGTGG	CXCGGAAAGC	CGCCACTTTA	ATAGTACTCT	GCACCACCAA	TACGGCTAGC
3041	CGTCTCAACG	CGTCTCAACG	TGCAAAAACC	GAAACTGTGG	AGCGCCGAAA	TCCCAGATCT	CTATGCTGCG	GTGGTTGAAC
	GCAGTGTGAT	GCAGAGTTGC	AGCTTTTGGG	CTTTTGACACC	TCGCGGCTTT	AGGGCTTAGA	GATAGCAGCG	CACCAACTTG
3121	TGCACACCCG	CGACGGCACG	CTGATTGAAG	CAGAAGCCCTG	CGATGTCGGT	TTCCCGCAGG	TGCCGGATTGA	AAATGGTCTG
	ACGTGTGGCG	GCTGCCGTGC	GACTAACTTC	GTCTTCCGAG	GCTACAGCCA	AAGGCGCTCC	ACGCCTAACT	TTTACCAGAC
3201	CTGCTGTCTG	ACGGCAAGCG	GTTGCTGATT	CGAGGCGTTA	ACCGTCACGA	GCATCATCCT	CTGATGGTGC	AGGTCAATGA
	GACGACGACT	TGCCGTTCCG	CAACGACTAA	GCTCCGCAAT	TGGCAGTGCT	CGTAGTAGGA	GCAGTACCAG	TCCAGTACCT
3281	TGAGCAGACG	ATGGTGCAGG	ATATCCTGCT	GATGAAGCAG	AAACAATTTA	ACGCCGTGCG	CTGTTCCGAT	TATCCGAACC
	ACTCGTCTGC	TACCACGTCG	TATAGGACGA	CTACTTCGTC	TTGTTGAAAT	TGCCGCACGC	GACAAGCGTA	ATAGGCTTGG
3361	ATCCGCTGTG	GTACACGCTG	TGCGACCCTG	ACGGCCTGTA	TGTGGTGGAT	GAAGCCAATA	TTGAAACCCA	CGCGATGGT
	TAGGCGACAC	CATGTGCGAC	ACGCTGGCGA	TGCCGGACAT	ACACCACCTA	CTTCGGTTAT	AACTTTGGGT	GCCGTACCAC
3441	CCAATGAATC	GTCTGACCGA	TGATCCGCGC	TGGCTACCGG	CGATGAGCGA	ACGCGTAACG	CGAATGGTGC	AGCGCGATCG
	GGTTACTTAG	CGACTGGCT	ACTAGGCGCG	ACCGTAGGCC	GCTACTCGCT	TGCCCATTTG	GCTTACCACG	TCCGCGTAGC
3521	TAATCACCCG	AGTGTGATCA	TCTGGTCCGT	GGGGAATGAA	TCAGGCCACG	GCGCTAATCA	CGACGCGCTG	TATCGCTGGA
	ATTAGTGGGG	TCACACTAGT	AGACCAGCGA	CCCTTACTTT	AGTCCGGTGC	CGCGATTAGT	GCTGCCGCGC	ATAGCCGACT
3601	TCAAATCTGT	GATCCTTCC	CGCCCGATG	AGTATGAAGG	CGGCGGAGCC	GACACCACGG	CTACCCGATA	TATTTGCCCT
	AGTTTLAGACA	GCTAGGAAGG	GCGGGCCACG	TCATACTTCC	GCCGCTCCGG	CTGTGGTGGC	GGTGGCTATA	ATAAACGGGC
3681	ATGTACGCGC	CGGTGGATGA	AGACCAGCCC	TTCCCGGCTG	TGCCGAAAATG	GTCCATCAAA	AAATGGCTTT	CGTACTCTGG
	TACATGGCGC	CGCACCCTACT	TCTAGTCCGG	AAGGGCCGAC	ACGGCTTTTAC	CAGGTAGTTT	TTTACCAGAA	GATACCAGGC
3761	AGAGACGCGC	CCGCTGATCC	TTTGCGAATA	CGCCACCGCG	ATGGGTAACA	GTCTTGGCGG	TTTCGCTAAA	TACTGGCAGG
	TCCTCTGCGC	GCGGACTAGG	AAACGCTTAT	CGGGGTGCGC	TACCATTGT	CAGAACCCGC	AAAGCGATTT	ATGACCCTGC
3841	CGTTTCTGTA	GATCCTCCG	TTACAGGGCG	GCTTCTGCTG	GGACTGGGTG	GATCAGTCCG	TGATTAATA	TGATGAAAAC
	GCAAAGCAGT	CATAGGGGCA	AATGTCCCCG	CGAAGCAGAC	CCTGACCAC	CTAGTCAGCG	ACTAATTTAT	ACTACTTTTG
3921	GGCAACCCGT	GGTCCGCTTA	CGGCGGTGAT	TTTGGCGATA	CGCCGAAAGCA	TCGCCAGTTT	TGATAGAAC	GTCTGTCTTT
	CCGTGGGCTA	CGACCCGAAT	GCCGCCACTA	AAACCCGCTA	GCGGCTTGCT	AGCGGTCAAG	ACATACTTTC	CACACCAGAA
4001	TGCCGACCCG	ACGCCGCATC	CAGCCGTGAC	GGAAGCAAAA	CACCAGCAGC	AGTTTTTCCA	GTTCCGTTTA	TCCGGGCAAA
	ACGGCTGGCG	TGCCGCGTAG	GTCCGCGACTG	CCCTTCGTTTT	GTTGGTCGTC	TCAAAAAGGT	CAAGGCAAA	AGGCCCGTTT
4081	CCATCGAAGT	GACCCGCGAA	TACCTGTTCC	GTACATGCGA	TACAGAGCTC	CTGCACCTGA	TGGTGGCGCT	GGATGGTAA
	GGTAGCTTCA	CTGGTCTGCT	ATGGACAAGG	CAGTATCGCT	ATTGCTCGAG	GACGTGACCT	ACCACCOCGA	CCTACCATT
4161	CCGCTGGCAA	CGGTTGAAGT	GCCTCTGGAT	GTCCCTCCAC	AAGGTAAAAC	GTTGATTGAA	CTGCCTGAAC	TACCCGAGCC
	GGCGACCGTT	GCCCACTTCA	CGGAGACCTA	CAGCGAGGTG	TTCCATTTGT	CAACTAACTT	GACGGACTTG	ATGGCGTCGG
4241	GGAGAGCGCC	GGCAACTCT	GGCTCACAGT	ACGCGTAGTG	CAACCAGAAG	CGACCGCATG	GTCAGAAGCC	GGGCACATCA
	CCTCTCGCGG	CCCGTTGAGA	CCGAGTGTCA	TGCCCATCAC	GTTGGCTTGC	GCTGGCGTAC	CAGTCTTCCG	CCCGTGTAGT
4321	GCCGCTGGCA	CGAGTGGCGT	CTGGCGGAAA	ACCTCAGTGT	GACGCTCCCC	GCCGCGTCCC	ACGCCATCCC	GCATCTGACC
	CGCGGACCGT	CGTACCCGCA	GACCGCTTTT	TGGAGTCACA	CTGCGAGGGG	CGGCCGAGGG	TGCCGTAGGG	CGTAGACTGG
4401	ACCAGCGAAA	TGGATTTTTG	CATCGAGCTG	GGAATAAAGC	GTTGGCAAAT	TAACCGCCAG	TCAGGCCTTT	TTTCACAGAT
	TGTTCCGTTT	ACCTAAAAAC	GTAGCTAAGG	CCATTATTCC	CAACCGTTAA	ATTGGCGGTC	AGTCCGAAAG	AAAGTCTCTA
4481	GTGGATTGGC	GATAAAAAAC	AACTGCTGAC	GCCGCTCGCC	GATCAGTTCA	CCCGTGCACC	GCTGGATAAC	GACATTGGCG
	CACCTAACCG	CTATTTTTTG	TTGACGACTG	CGCGCAGCGG	CTAGTCAAAT	GGGCACGTGG	CGACCTATFG	CTGTAAACCG
4561	TAAGTGAAGC	GACCCGCATT	GACCCTAACG	CCTGGGTCGA	ACGCTGGAAG	GCGCGCGGCG	ATTACCAGGC	CGAAGCAGCG
	ATTCACTTCG	CTGGGCGTAA	CTGGGATTGC	GGACCCAGCT	TGCGACCTTC	CGCCGCCCGG	TAATGGTCCG	GCTTCCGTCG
4641	TTGTTGCAGT	CGACGGCAGA	TACACTTGCT	GATGCGGTG	TGATTACGAC	CGCTCACGCG	TGGCAGCATC	AGGGGAAAA
	AACAACGTCA	GCTGCCGTCT	ATGTGAACGA	CTAGCCACG	ACTAATGCTG	GCGAGTGGCG	ACCGTCTGAG	TCCCTTTTTG
4721	CTTATTTATC	AGCCCGAAAA	CCTACCGGAT	TGATGGTAGT	GGTCAAATGG	CGATTACCGT	TGATGTTGAA	GTGGCGAGCG
	GAATAAATAG	TCCGCCTTTT	GGATGGCCTA	ACTACCATCA	CCAGTTTACC	GCTAATGGCA	ACTACAACCT	CACCCGCTCG
4801	ATACACCGCA	TCCGGCGCGG	ATTGGCCTGA	ACTGCCAGCT	GGCGCAGGTA	GCGAGCGGCG	TAAACTGGCT	CGGATTAGGG
	TATGTGGCGT	AGCCCGCGCC	TAACCGGACT	TGACGGTCGA	CCGCGTCCAT	CGTCTCGCCC	ATTTGACCGA	GCCTAATCCC
4881	CCGCAAGAAA	ACTATCCCGA	CCGCTTACT	GCCGCTGT	TTGACCGCTG	GGATCTGCCA	TTGTGACAGA	TGTATAACCC
	GGCGTTCTTT	TGATAGGGCT	GCGGGAATGA	CGGCGGACAA	AACTGGCGAC	CCTAGACGGT	AACAGTCTGT	ACATATGGGG
4961	GTACGTCTTC	CGGAGCGAAA	ACGGTCTCGG	CTGCGGGACG	CGCGAATGGA	ATTATGGCCC	ACACCAGTGG	CGGCGGACT
	CATGCAGAAG	GGCTCGCTTT	TGCCAGACGC	GACGCGCTGC	GCGCTTAACT	TAATACCAGG	TGTGGTCACC	GCGCCGCTGA
5041	TCCAGTTCAA	CATCAGCCCG	TACAGTCAAC	AGCAACTGAT	GGAACCACAG	CATCGCCATC	TGCTGCACCG	GGAAGAAGGC
	AGGTCAAAGT	GTAGTCGGCG	ATGTCAAGTTG	TCGTTGACTA	CCCTTGGTGC	GTAGCGGTAG	ACGACGTGCG	CCTTCTTCCG
5121	ACATGGCTGA	ATATCGACGG	TTTCCATATG	GGGATTGGTG	GCGACGACTC	CTGGAGCCCG	TCAGTATCGG	CGGAATTCAG
	TGTACCCGAT	TATAGCTGCC	AAAGGTATAC	CCCTAACCCAC	CGTCTGCTGAG	GACCTCGGGC	AGTCATAGCC	GCCTTAAAGT
5201	CTGAGCGCGG	GTCCGTACCA	TACACAGTTG	GTCTGGTGTG	AAAAATAATA	ATAACCGGGC	AGGGGGGATC	CACTAGTTCT
	GACTCGCGCG	CAGCGATGGT	AATGGTCAAC	CAGACCACAG	TTTTTATTAT	TATTGGCCCG	TCCCCCCTAG	GTGATCAAGA
5281	AGAGCCGCGG	CCACCGCGGT	GGCGACTCCG	GAACCAATTA	CTGATAATGT	AGAAGATCAT	ACAGACACCG	GCATACACAC
	TCCTCGCCGG	GGTGGCGCCA	CCGCTGAGGC	CTTGGTTAAT	GACTATTACA	TCCTTAGTA	TGCTGTGGC	AGTGTATGTG
5361	TAGTGATAGC	ATTAATACAG	TAAGTGCATC	ATCTGGAGAA	TCCACAACAG	ACGAGACTCC	GGAACCAAT	ACTGATAAAG
	ATCACTATCG	TAATTTATGC	ATTCCACGTAG	TAGACCTCTA	AGGTGTGTC	TGCTCTGAGG	CCTTGGTTAA	TGACTATTTT
5441	AAGAAGATCA	TACAGTCACA	GACACTGTCT	CATACACTAC	AGTAAGTACA	TCATCTGGAA	TTGTCACCTAC	TAATCAACC
	TTCTTCTAGT	ATGTCAGTGT	CTGTGACAGA	GTATGTGATG	TCATTCATGT	AGTAGACTTT	ACAGTGATG	ATTTAGTTGG
5521	ACCGATGATG	CGGATCTTTA	TGATACGTAT	AATGATAATG	ATACAGTACC	ACCAACTACT	GTAGGCGGTA	GTACAACCTC
	TGGCTACTAC	GCTTAGAAAAT	ACTATGCATG	TTACTATTAC	TATGTCATGG	TGGTTGATGA	CATCCGCCAT	CATGTTGGAG
5601	TATTAGCAAT	TATAAAACCA	AGGATTTTGT	AGAATAATTT	GGTATTACCG	CATTAAATTA	ATTTCCGGCC	GTCGCAATAT
	ATAATCGTTA	ATATTTTGGT	TCCTGAAACA	TCCTTATAAA	CCATAATGGC	GTAATTAATA	TAAACAGCCG	CACCGTTATA
5681	TCGTGATATC	ATATTTATATA	TATAATAAAC	CACTCAGCTAA	ATACAAAAAC	GAGAACAAG	TCTAGATTTT	TGACTTACAT
	AGACATAATG	TATAATATAT	ATATTATTGT	GAGTGCTATT	TATGTTTTGT	CTCTTGTTTT	AGATCTAAAA	ACTGAAATGA
5761	AAATGTCTGG	GATAGTAAAA	TCTATCATAT	TGAGCGGACC	ATCTGGTTCA	GGAAAGACAG	CCATAGCCAA	AAGACTATGG
	TTTACAGACG	CTATCATTTT	AGATAGTATA	ACTCGCCTGG	TAGACCAAGT	CCTTTTCTGT	GGTATCCGTT	TTCTGTACAC
5841	GAATATATTT	GATTTGTGG	TGTCCCATAC	CACTAGATTT	CCTCGTCTTA	TGGAACGAGA	AGGTGTCTGT	TACCATTACG
	CTTATATAAA	CCTAAACACC	ACAGGGTATG	GTGATCTAAA	GGAGCAGGAT	ACCTTGTCT	TCCACAGCTA	ATGGTAAATG
5921	TTAACGAGAA	GCCCATCTGG	AAGGGAATAC	CCGCGGAAAA	CTTTCAGTAA	CATACTGAGT	TTTTAGGAAA	TATTTACCGA
	AAATGTCTCT	CCGGTAGACC	TTCCCTTATG	GGCGGCTTT	GAAAGATCTT	GTATGACTCA	AAAACTCTT	ATAAATGCC
6001	ACTTCTAAAA	CTGCTGTGAA	TACAGCGCGT	ATTAATAAATC	GTATTTGTGT	GATGGATCTA	AACATCGATG	GCGTTAGAAG
	TGAAGATTTT	GACGACACTT	ATGTCGCGGA	TAATTTATTAG	CATAAACACA	CTACCTAGAT	TTGTAGCTAC	CGCAACTCTC
6081	TCTTAAAAAT	ACGTACCTAA	TGCCCTACTC	GGTGTATATA	AGACCTACCT	CTCTTAAAAAT	GGTGTAGACG	AACTCTGCA
	AGAATTTTTA	TGCATGGATT	ACGGAATGAG	CCACATATAT	TCGGATGGA	GAGAATTTTA	CCAACCTG	TTCGAGACGT
6161	TTAATGAATC	GCCCAACCGG	CGGGGAGAGG	CGGTTTCCGT	ATTGGGCGCT	CTTCGCTTC	CTCCTCACT	GACTCGCTGC

Poxvirus recombinantes para antígenos del VHC

6241	AATTACTTAG	CCGGTTGCGC	GCCCCTCTCC	GCCAAACGCA	TAACCCGCGA	GAAGGCGAAG	GAGCGAGTGA	CTGAGCGACG
	GCTCGGTCGT	TCGGCTGCGG	CGAGCGGTAT	CAGCTCACCT	AAAGGCGGTA	ATACGGTTAT	CCACAGAATC	AGGGGATAAC
	CGAGCCAGCA	AGCCGACGCC	GCTCGCCATA	GTCGAGTGTG	TTTCCGCCAT	TATGCCAATA	GGTGTCTTAG	TCCCCTATTG
6321	GCAGAAAGAA	ACATGTGAGC	AAAAGGCCAG	CAAAAAGGCCA	GGAAACCGTAA	AAAGGCCCGCG	TTGCTGGCGT	TTTTCCATAG
	CGTCCTTTCT	TGTACACTCG	TTTTCCGGTC	GTTTTCCGGT	CCTTGGCATT	TTTTCCGGCC	AACGACCCGA	AAAAGGTATC
	GCTCCGCCCC	CCTGACGAGC	ATCACAAAAA	TTCCAGCTCA	AGTCAGAGGT	GGCGAAAACCC	GACAGGACTA	TAAAGATAAC
6401	CGAGGCGGGG	GGACTGCTCG	TAGTGTTTTT	AGCTGCGAGT	TCAGTCTCCA	CCGCTTTGGG	CTGCTCTGAT	ATTTCTATGG
	AGGGGTTTTCC	CCCTGGAAAG	TCCCTCGTGC	GCTCTCTGTC	TCCGACCCTFG	CCGCTTACCG	GATACCTGTC	GCTCCFTTCC
	TCCGCAAAGG	GGGACCTTCG	AGGGAGCAGC	CGAGAGGATA	AGGCTGGGAC	GGCGAATGGC	CTATGGACAG	CGCGAAAAGAG
6561	CCTTCGGGAA	GGCTGGCGCT	TTCTCATAGC	TCACGCTGTA	GGTATCTCAG	TTGCGGTAG	GTCGTTCCGT	CCAAGCTGGG
	GGAAAGCCCTT	CGCACCCGCA	AAGAGTATCG	AGTGGACAT	CCATAGAGTC	AAGCCACATC	CAGCAAGCGA	GGTTCGACCC
	CTGTGTGCAC	GAACCCCCCG	TTCCAGCCGA	CCGCTGCGCC	TTATCCGGTA	ACTATCGTCT	TGAGTCCAAC	CCGGTAAAGAC
	GACACACGTG	CTTGGGGGGG	AAGTCCGGCT	GGCGACGCGG	AATAGGCCAT	TGATAGCAGA	ACTCAGGTTG	GGCCATTCTG
6721	ACGACTTATC	GGCACTGGCA	GCAGCCACTG	GTAACAGGAT	TAGCAGAGCG	AGGTATGTAG	CGGCTGTAC	AGAGTCTTTG
	TGCTGAATAG	CGGTGACCGT	CGTCGGTGAC	CATTGTCTTA	ATCGTCTCGC	TCCATACATC	CGCCACGATG	TCTCAAAGAAC
	AAGTGGTGGC	CTAACTACGG	CTACACTAGA	AGGACAGTAT	TTGGTATCTG	CGCTCTGCTG	AAGCCAGTTA	CCTTCGGAAA
6801	TTACCACCGG	GATGTGATCC	TCCTGCATA	TGATCTTTTC	CCATAGAGAC	GCGAGACGAC	TTCCGTCAAT	GGAAGCCCTT
	AAGAGTTGGT	AGCTCTTGTAT	CCGGCAAACA	AACCACCGCT	GGTAGCGGTG	GTTTTTTTGT	TTGCAAGCAG	CAGATTACGC
	TTCTCAACCA	TCGAGAACTA	GGCCGTTTGT	TTGGTGGCGA	CCATCGCCAC	CAAAAAACA	AACGTTCCGT	GTCCTAATGCG
6961	GCAGAAAAAA	AGGTCTCAA	GAAGACTCCT	TGATCTTTTC	TACGGGGTCT	GACGCTCAGT	GGAAACGAAA	CAGTGTATA
	CGTCTTTTTT	TCCTAGAGTT	CTTCTAGGAA	ACTAGAAAAG	ATGCCCCAGA	CTGCGAGTCA	CCTTGCTTTT	GAGTGAATT
	GGGATTTTGG	TCATGAGATT	ATCAAAAAG	ATCTTCACCT	AGATCCTTTT	AAATTAAGAA	TGAAGTTTTA	AATCAATCTA
7041	CCGTAAAACC	AGTACTCTAA	TAGTTTTTCC	TAGAAAGTGA	TCTAGAAAA	TTTAAATTTT	ACTTCAAAAT	TTAGTTAGTA
	AAGTATATAT	GAGTAAACTT	GGTCTGACAG	TTACCAATGC	TTAATCAGTG	AGGCACCTAT	CTCAGCGATC	TGCTATTTTC
	TTCATATATA	CTCATTGTAA	CCAGACTGTC	AATGGTTACG	AATTAGTCAC	TCCGTGGATA	GAGTCGCTAG	ACAGATAAAG
7201	GTTTCATCCAT	AGTTGGCTGA	CTCCCCGTGC	TGTAGATAAC	TACGATACGG	GAGGGCTTAC	CATCTGGCCC	CAGTGTCTGA
	CAAGTAGGTA	TCAACGGACT	GAGGGGCGC	ACATCTATTG	ATGCTATGCC	CTCCCCGAATG	GTAGACCGGG	GTCACGACGT
	ATGATACCOC	GAGACCCACG	CTCACC GGCT	CCAGATTTAT	CAGCAATAAA	CCAGCCAGCC	GGAAAGGGCC	AGCCGAGAAG
	TACTATGGCG	CTCTGGGTGC	GAGTGGCCGA	GGTCTAAATA	TCTGTTATTT	GGTCCGGTCG	CCTTCCCGCC	TCGCGTCTTC
7361	TGGTCTGCA	ACTTTATCCG	CCTCCATCCA	GTCTATTAAT	TGTTGCCGGG	AAGCTAGAGT	AAGTAGTTCG	CCAGTTAATA
	ACCAGGACGT	TGAATATAGC	GGAGGTAGGT	CAGATAATTA	ACAACGGCCG	TTCCGATCTCA	TTTTCATCAAG	GGTCAATTAT
	GTTTGGCCAA	CGTTGGTTGCC	ATTGCTACAG	GTCACGCTCG	TCCGTTGGTA	TCCGTTGGTA	TGGCTTCAAT	TGGCTCCGGT
	CAAACCGGTT	GCAACAACCG	TAACGATGTC	CGTAGCACC	CAGTCCGAGC	AGCAAACCAT	ACCGAAGTAA	GTCGAGGCCA
7521	TCCCAACGAT	CAAAGCCGAGT	TACATGATCC	CCCATGTTGT	GCAAAAAAGC	GTTTAGCTCC	TTCCGGTCTC	CGATCGTTGT
	AGGGTTGCTA	TCTCCGCTCA	ATGTACTAGG	GGGTACAACA	CGTTTTTTTC	CCAAATCGAGG	AAGCCAGGAG	GCTAGCAACA
	CAGAAGTAAG	TGGCCCGCAG	TGTTATCACT	CATGGTTATG	GCAGCACTGC	ATAATTCTCT	TACTGTCATG	CCATCCGTAA
	GTCTTCATTC	AACCGGGCTC	ACAATAGTGA	GTACCAATAC	CGTCGTGACG	TATTAAGAGA	ATGACAGTAC	GTTAGGCATT
7681	GATGCTTTTC	TGTGACTGGT	GAGTACTCAA	CAAAAGTCAT	CTGAGAATAG	TGTATGCGGG	GACCCGAGTTG	CTGTGGCCCG
	CTACGAAAAG	ACACTGACCA	CTCATGAGTT	GGTTCAGTAA	GACTCTTATC	ACATACGCCC	CTGGCTCAAC	GAGAACGGGC
	GGCTCAATAC	GGGATAAATC	CGCGCCACAT	AGCAGAAGTT	TAAAAGTGTCT	CATCATTGGA	AAACGTTCTT	CGGGCCGAAA
	CGCAGTTATG	CGCTTATATG	CGCGCGTGTG	TCGCTCTGAA	ATTTTACAGA	GTAGTAACTT	TTTGCAAGAA	AGCCCGCTTT
7841	ACTCTCAAGG	ATCTTACCGC	TGTTGAGATC	CAGTTCGATG	TAACCACCTC	GTGCACCCAA	CTGATCTTCA	GCATCTTTTA
	TGAGAGTTC	TAGAATGGCG	ACAACCTTAG	GTCAAGCTAC	ATTGGGTGAG	CACGTGGGTT	GACTAGAAGT	CGTAGAAAAA
	CTTTCAACAG	CGTTTCTGGG	TGAGCAAAAA	CAGGAAGGCA	AAATGCCGCA	AAAAGGGGAA	TAAAGGGCGC	GAGGAAATGT
	GAAAGTGGTC	GCAAAGACCC	ACTCGTTTTT	GTCTTCCGT	TTTACGGCGT	TTTTTCCCTT	ATTCCCGCTG	TGCCTTTACA
8001	TGAATACTCA	TACTCTTCTT	TTTTCAATAT	TATTGAAGCA	TTTATCAGGG	TTATTGTCCT	ATGAGCGGAT	ACATATTTGA
	ACTTATGAGT	ATGAGAAGGA	AAAAGTTATA	ATAACTTCGT	AAATAGTCCC	AAATAACAGAG	TACTCGCCTA	TGATATAAAT
	ATGTATTTAG	AAAATAAACC	AAATAGGGGT	TCCGCGCACA	TTTCCCGCAA	AAGTGCCACC	TGACGTCTAA	GAAACCATTA
	TACATAAATC	TTTTTATTTG	TTTATCCCCA	AGGCGCGTGT	AAAGGGGCTT	TTCCAGGTGG	ACTGCAGATT	CTTTGGTAAAT
8161	TTATCATGAC	ATTAACCTAT	AAAATAGGC	GTATCCAGAG	GCCCTTTTCT	CTCCGCGGTT	TCCGGTATGA	TCCGTAAGAA
	AATAGTACTG	TAAATGGATA	TTTTTATCCG	CATAGTGTCT	CGGGAAAGCA	GAGCGCGCAA	AGCCACTACT	GCCACTTTTG
	CTCTGACACA	TGCAGCTCCC	GGAGACGGTC	ACAGCTTGTC	TGTAAGCCGA	TGCCGGGAGC	AGACAAGCCC	GTCAGGGCCG
	GAGACTGTGT	ACGTCGAGGG	CCTCTGCCAG	TGTCGAACAG	ACATTCCGCT	ACGGCCCTCG	TCTGTTCCGG	CAGTCCCAGG
8321	GTCAGCGGGT	GTTGGCGGGT	GTCCGGGCTG	GCTTAACTAT	GCGGCATCAG	AGCAGATTGT	ACTGAGAGTG	CACCATATGC
	CAGTCGCCCA	CAACCGCCCA	CAGCCCGCAG	CGAATTGATA	CGCCGTAGTC	TCCGCTAACA	TGACTCTACG	GTTGGTATACG
	GGTGTGAAAT	ACCCACACAG	TGCGTAAGGA	GAAATAACCG	CATCCAGGCG	CATTCCGCTT	TCAGGCTGCG	CAACTGTTGG
	CCACACTTTA	TGGCGTGTCT	ACGCATTCTT	CTTTTATGCG	GTAGTCCGCG	GTAAGCCGTA	AGTCCGACCC	GTTGACAACC
	GAAGGGCGAT	CGGTGCGGGC	CTCTTCGCTA	TTACGCCAGT	CGCAGATTGT	TCATGATGCG	AAGATTATA	TATCTGGAGG
	CTTCCCGCTA	GCCACGCCCG	GAGAAGCGAT	AATCCGGTCA	GCTGCTAACA	AGTACTACCG	TTCTAAATAT	ATAGACCTCC
8561	TTACAACAAT	AGTAGTGTAG	TTAATGTAAT	ATCGAATCTA	GTCCTTAGCT	ATAATCCGAT	ATATGATGAA	TGGACCAAAT
	AATGTTGTGA	TCATCACATC	AATTACATTA	TAGCTTAGAT	CAGGAATCGA	TATTAGGCTA	TATACTACTT	ACCTGGTTTA
	TATCATCATT	AAACATTCCT	AGAATTAATC	CCGCTCTATG	GTCAGCGCAT	AATAAATTAT	ATGTAGGAGG	AGGAATATCT
	ATAGTAGTAA	TTTGTAAAGGA	TC'TTAATTAG	GGCGAGATAC	CAGTCGCGTA	TTATTTAATA	TACATCCTCC	TCTTATAGA
	GATGATGTTT	GACTAATAC	ATCTGAACAC	TACGATAAAG	AAAAGATTG	TTGGACATTG	GATAATGGTC	ACGTGTATACC
	CTACTACAAG	CTTGATTATG	TAGACTTTGT	ATGCTATTTT	TTTTTCTAAC	AACCCTGTAAC	CTATTACCAG	TGCACAATGG
8801	ACGCAATTTAT	ATAATGTATA	AATGCGAACC	GATTAACAAT	AAATATCCAT	TGGAAAAAAC	ACAGTACACG	AATGATTTTC
	TGCGTTAATA	TATTACATAT	TTACGCTTGG	CTAATTTGTA	TTTATAGGTA	ACCTTTTTTG	TGCTATGTGC	TTACTAAAAA
	TAAAAGTATT	GGAAAGTTTT	ATAGGTAGTT	GATAGAACAA	AATACATAAT	TTTTGAAAAA	TAAATCACTT	TTTATACTAA
	ATTTCAATAA	CCTTTCAAAA	TATCCATCAA	CTACTTGTGT	TTATGTATTA	AAACATTTTT	ATTTAGTGAA	AAATATGATT
8961	TATGACACGA	TATCCAATAC	TTTTGTTACT	ATAATCACTA	GTATACGTA	CACCTTTTTT	TCAGACATCT	AAAAAAATAG
	ATACTGTGCT	AATGGTTATG	AAAACAATGA	TTATAGTAAT	CATATGCGAT	GTGGAAAAGG	AGTCTGTAGA	TTTTTTTATC
	GTGATGATGC	AAC'TCATGA	TGTAATCGAA	ATAATCAAAA	TGACTACGTT	GTTATGAGTG	CTTGGTATAA	GGAGCCCAAT
	CTACTACTAG	TGAGATACT	ACATTAGCTT	TATTTAGTTT	TATTTAGTTT	CAATACTCAC	GAACCATATT	CTCCGGGTTA
9121	TCCATTATTC	TTTTAGCTGC	TAAAAGCGAC	GTCTTGTATT	TTGATAATTA	TACCAAGGAT	AAAATATCTT	ACGACTCTCC
	AGGTAATAAG	AAAATCGACG	ATTTTCGCTG	GAAACATAAA	AACTATTAAAT	ATGGTTCCTA	TTTTATAGAA	GCTGAGAGG
	ATACGATGAT	CTAGTTACAA	CTATCACAAT	TAAACTATTG	ACTGCTAGAG	ATGCCGGTAC	TTATGTATGT	TGATCTTTTA
	TATGCTACTA	GATCAATGTT	GATAGTGTTA	ATTTAGTAACT	TGACGATCTC	TACGGCCATG	AATACATACA	CGTAAGAAAT
	TGACATCAAC	TACAAAATGAC	ACTGATAAAG	TAGATTATGA	AGAATACTCC	ACAGAGTTGA	TTGTAATAAC	AGATAGTAAA
	ACTGTAGTTG	ATGTTTTACTG	TGACTATTTT	ATCTAATACT	TCTTATGAGG	TGCTCTCACT	AACATTTATG	TGACTCACTT
9361	TCGACTATAG	ACATAAATACT	ATCTGGATCT	ACACATTTAC	CAGAAACTAG	TTCTGAGAAA	CCAGAGGATA	TAGATAATTT
	AGCTGATATC	TGTATTATGA	TAGACCTAGA	TGTGTAAGTG	GTCCTTGTATC	AAGACTCTTT	GGTCTCCTAT	ATCTATTAATA


```

9441 TAATTGTCG TCGGTATTG AATCGCGG CCCCCCTCG AGGTCGACGG TATCGATAAG CTTGATATCG AATTCCTGCA
9521 ATTAACGAGC AGCCATAAG TTTAGCGCCC GGGGGGAGC TTCAGCTGCC ATAGCTATTG GAACTATAGC TTAAGGACGT
GCC
CGG

```

Anexo 3

Secuencia del plasmidio pFPCoE1

```

1 GGGAGGCGCT ATCAGCTGTA TTTATATTCC AAAAAAAAAA AATAAAATTT CAATTTTTAG AATTCGAGGC CAGATTTACT
81 CCCTCCGGAG TAGTCGACAT AAATATAAGG TTTTTTTTTT TTATTTTAAA GTTAAAAATC TTAAGCTCCG GTCTAAATGA
TGCTTTATAA CACTTGCTTG TACCGATCCC AAAAATACCA TAATCTATTG TCTGGAAATA TAATGTAATG AGTTTTTTGTA
ACGAAATATT GTGAACGAAC ATGGCTAGGG TTTTATAGGT ATTAGATAAC AGACCTTATT ATTACATTTA TCAAAAACAT
161 TGTGGTTTTT ATAGAGAAAT ACAAATATTT AGGTTATTA CAATTAATGA AAATTAAGTA TTTGTATTCC AGCTTATAAC
ACACAAAAAA TATCTCTTTA TGTTTATAAA TCCAATAAAT GTTTAATACT TTTAATTCAT AAACATAAGG TCGAAATATTG
241 AATTAATCAA TATGGAATC AAAGTAGAAT CGATCAATAA TAACCTTTGT AAGCTAAGTT ACGAAGATAT AGAAATATT
TTAATAAGTT ATACCTTTAG TTTTATCTTA GCTAGTTATT ATTGAAAAA TTCTGATCAA TGCCTTCTATA TCTTTAATAA
321 ATGATGAAAG AAAATGAATA CATAAATGCT ACAAGGTTAT GTAGTTCTAG AGGAAGAGAT ATATTAGATT GGATGAGTAA
TACTACTTTC TTTTACTTAT GTATTTACGA TGTTCCAAATA CATCAAGATC TCCTTCTCTA TATAATCTAA CCTACTCATT
401 GGAGTCCGTA GTAGAATTA TAAATGAATT AGACAGGATA AATAGATCAT GCAATGACTA CTACGATTAT AGGCGAATAG
CCTCAGGAGG CATCTTAATT ATTTACTTAA TCTGTCTCAT TTATCTAGTA CGTTACTGAT GATGCTAATA TCCCCTTATC
481 TATTAAATGT GGTATCGGAC AGCGAAACAA GTGAATTGTA CGTCCACCAG GACCTTATAT TACATATTTT ACATTGGATT
ATAATTTTACA CCATAGCCTG TCGCTTTGTT CACTTAACAT GCAGGTGGCG CTGGAATATA ATGTATAAAG GTTAACTTAA
561 TCTCCTCTAT TTTCTTTGAA GGTAGTAAAG TTTATAAATA GTTACATACA AGATTCTTAT CAATTAGAAT ATGAGCTAAT
AGAGGAGATA AAAGAAACTT CCATCATTTT AAATATTAT CAATGTATGT TCTAAGAATA GTTAACTTTA TACTCGATTA
641 ACATAAAAAA AGTTTAATGG ATCAGTTAAA AGAAATAATA CTGTAAACG ATGATAACAA TATGGGCGCG GTCCAGCTT
TGTATTTTTT TCAAAATACC TAGTCAATTT TCTTTATTAT GACAATTTGC TACTATTGTT ATACCCGGGC CATGGGTCGA
721 TTTGTTCCCT TTAGTGAGGG TTAATTTGCG GCTTGGCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA TTGTTATCCG
AAACAAGGGA AATCACTCCC AATTAACGCG CGAACCCGAT TAGTACCAGT ATCGACAAAG GACACATTTT AGCAATAGGC
801 CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT
GAGTGTAAAG GTGTGTGTA TGCTCGGCT TCGTATTTC CAATTCGGAC CCCACGGATT ACTCACTCGA TTGAGGTGTA
881 AATTCGGTTG CACTACTGCG CCGCTTTCCA GTCGGGAAC GTGTCTGTC AGCTGCATTA ATGAATCGCG CAACGCGCGG
TTAACGCAAC GCGAGTGACG GCGGAAAGGT CAGCCCTTG GACAGCAGCG TCGACGTAAT TACTTAGCCG GTTGCGCGCC
961 GGAGAGCGCG TTTGCGTATT GGGCGCTCTT CCGCTTCTC GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CGGTGCTTCC GCTGCGGCGT
CCTCTCCGCC AAACGCATAA CCCGCGAGAA GCGAAGGAG CGAGTGACTG AGCGACGCGA GCCAGCGCGT GCGAGCGCGA
1041 GCGGTATCAG CTCACTCAA GCGGTAAATA CCGTTATCCA CAGAATCAGG GGATAACGCA GGAAGAACA TGTGAGCAA
CGCCATAGTC GAGTGAGTTT CCGCCATTAT GCCAATAGGT GTCTTAGTCC CCTATTGCGT CCTTTCTTGT ACACTCGTTT
1121 AGCCAGCAA AGGCCAGGA ACCGTA AAAA GCGCGCTTG GTGGCTTTT TCCATAGGCT CCGCCCTTCT GACGAGCATC
TCCGGTCTGT TTCCGGTCTT TGGCATTTTT CCGGCGCAAC GACCCGAAA AGGTATCCGA GCGGGGGGA CTGCTCGTAG
1201 ACAAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCCC TGAAGCTCC
TGTTTTTAGC TCGGAGTTCA GTCTCCACCG CTTTGGGCTG TCCTGATAT TCTATGGTCC GCAAAGGGGG ACCTTCGAGG
1281 CTCGTGCGCT CTCTGTTC GACCCTGCG CTTACCAGG ACCTGTCCCG CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC
GAGCACGCGA GAGGACAAGG CTGGGACGCG GAATGGGCTA TGACAGGCG GAAAGAGGGA AGCCCTTCG ACCCGGAAG
1361 TCATAGCTCA CCGTGTAGGT ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG TGTGCACGAA CCCCCTCT
AGTATCGAGT GCGACATCCA TAGAGTCAAG CCACATCCAG CAAGCGAGGT TCGACCCGAC ACACGTGCTT GGGGGGCAAG
1441 AGCCCGACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT ATCGTCTTGA GTCCAACCG GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGGAGCA
TCGGGCTGGC GACCGGGAAT AGGCCATTGA TAGCAGAACT CAGGTTGGGC CATTCTGTGC TGAATAGCGG TGACCCTCGT
1521 GCCACTGGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGCG GTGCTACAGA GTTCTTGAAG TGTGCGCTA ACTACCGCTA
CGGTGACCAT TGTCCTAATC GTCTCGCTCC ATACATCCCG CACGATGTCT CAAGAACTTC ACCACCGGAT TGATGCCGAT
1601 CACTAGAAGG ACAGTATTTG GTATCTGCGC TCTGCTGAAG CCAGTTAACC TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC TCTTGATCCG
GTGATCTTCC GTGCATAAAC CATAGACGCG AGACGACTTC GTCAATGGA AGCCTTTTTC TCAACCATCG AGAACTAGGC
1681 GCAAAACAAAC CACCGCTGGT AGCGGTGGTT TTTTGTGTTG CAAGCAGCAG ATTACGCGCA GAAAAAAGG ATCTCAAGAA
CGTTTGTGTT GTGGCGACCA TCGCCACCAA AAAAACAAC GTTCGTCGTC TAATGCGCGT CTTTTTTTCC TABAGTCTT
1761 GATCCTTTGA TCTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGA ACGAAAACCT ACGTTAAGGG ATTTTGTGCA TGAGATTATC
CTAGGAAACT AGAAAAGATG CCCCAGACTG CGAGTCACTT TGCTTTTGTAG TGCAATTTCC TAAAACCACT ACTCTAATAG
1841 AAAAAGGACT TTCACCTAGA TCTTTTAAA TTA AAAATGA AGTTTTAAAT CAATCTAAG TATATATGAG TAAACTTGGT
TTTTTCTAG AAGTGGATCT AGGAAAATTT AATTTTTACT TCAAAATTTA GTTAGATTTC ATATATACTC ATTTGAACCA
1921 CTGACAGTTA CCAATGCTTA ATCAGTGAGG CACCTATCTC AGCGATCTGT CTATTTCTGT CATCCATAGT TGCCTGACTC
GACTGTCAAT GGTACGAAT TAGTCACTCC GTGGATAGAG TCGCTAGACA GATAAAGCAA GTAGGTATCA ACGGACTGAG
2001 CCCGTCTGTG AGATAACTAC GATACGGGAG GCTTACCAT CTGGCCCCAG TGCTGCAATG ATACCCGCGA ACCCAGCTC
GGGAGCACA TCTATTGATG CTATGCCCTC CCGAATGGTA GACCGGGGTC ACGACGTTAC TATGGCGCTC TGGGTGCGAG
2081 ACCGGCTCCA GATTTATCAG CAATAAACA GCCAGCCGGA AGGGCCGAGC GCAGAAGTGG TCCTGCAACT TTATCCGCT
TGCCGAGGTT CTAATAGTCT GTTATTTGGT CCGTCCGGCT TCCCCTGCTG CGTCTTACC AGGACGTTGA AATAGGCGGA
2161 CCATCCAGTC TATTAATTTG TGCCGGGAAG CTAGAGTAAG TAGTTGCGCA GTTAATAGTT TGCACAACGT TGTGTCATT
GGTAGGTCAG ATAATTAACA ACGCCCTTTC GACTCATTTT ATCAAGCCGT CAATTAACA ACGCGTTGCA ACAACGGTAA
2241 GCTACAGGCA TCGTGGTGT CAGCTCTGCG TTTGGTATGG CTTCATTTCAG CTCCGGTTC CAACGATCAA GCGGAGTTAC
CGATGTCCTG AGCACCACAG TGCGAGCAGC AAACCATACC GAAGTAAGTC GAGGCCAAGG GTTGCTAGTT CCGCTCAATG
2321 ATGATCCCCC ATGTTGTGCA AAAAAGCGGT TAGCTCTTCT GGTCTCCGA TCGTTGTGAG AAGTAAGTTG CCGCAGTGT
TACTAGGGGG TACAACACGT TTTTTCGCA ATCAGGGAAG CAGGAGGCT AGCAACAGTC TTCATTCAAC CGCGTCAACA
2401 TACTACTCAT GGTATGGA GCATGCATA ATTCTCTTAC TGTATGCCA TCCGTAAGAT GCTTTTCTGT GACTGTGTGAG
ATAGTAGAT CAATACCCT CGTGACGTAT AGTAGAATG ACAGTACCGT AGGCATTCTA CCGAAAAGACA CTGACCCTC
2481 TACTCAACCA AGTCAATTCT AGAATAGTGT ATGCGGCGAC CGAGTTGCTC TTGCCCAGCG TCAATAGCGG ATAAACCCG
ATGAGTTGGT TCACTAAGAC TCTTATCACA TACCGCGCTG GCTCAACGAG AACGGGCGCG AGTTATGCCC TATATGCGG
2561 GCCACATAGC AGAACTTTAA AAGTGTCTCAT CATTGAAAA CGTTCTTCGG GCGAAAAACT CTCAGGATC TTACCCTGT
CGGTGTATCG TCTTGAATTT TACAGGATA GTAACCTTTT CGAAGAAGCC CCGCTTTTGA GAGTTCCTAG AATGGCGAGA
2641 TGAGATCCAG TTCGATGTA CCCACTCGTG CACCACAATG ATCTTCAGCA CCGTTTACTT TCCACAGCTT TCTGGGTGA
ACTCTAGGTC AAGCTACATT GGGTGTGAC GTGGGTTGAC TAGAAGTCTG AGAAAAAGAA AGTGGTGCBA AACGCCCACT
2721 GCAAAAACAG GAAGGCAAAA TGCCGCAAAA AAGGGAATAA GGGCGACACG GAAATGTTGA ATACTCATAC TCTTCTTTT

```

Poxvirus recombinantes para antígenos del VHC

2801 CGTTTTTGFC CTTCCGTTTT ACGCCGTTTT TTCCCTTATT CCCGCTGTGC CTTTACAAC TATGAGTATG AGAAGGAAAA
TCAATATTTA TGAAGCATTT ATCAGGGTTA TTGCTCTCAT AGCGGATACA TATTTGAATG TATTTAGAAA AATAAACAAA
AGTTTATAATA ACTTCGTAAA TAGTCCCAAT TAGTCCCAAT ATAAACTTAC ATAAAATCTTT TTATTTGTTT
2881 TAGGGGTTCC GCGCACATTT CCCCAGAAA GCGCCACTAA ATTGTAAGCG TTAATATTTT GTTAAAATTC GCGTTAAATT
ATCCCAAGG CCGCTGTAAA GGGGCTTTTC ACGGTGGATT TAACATTCCG AATTATAAAA CAATTTTAA GCGAATTTAA
2961 TTTGTTAAAT CAGCTCATTT TTTAAACCAAT AGGCCGAAAT CGGCAAAAATC CTTTATAAAT CAAAAGAAAT GACCAGATA
AAACAATTTA GTCCAGTAAA AAATTGTTTA TCCGGCTTTA GCCGTTTTAG GGAATATTTA GTTTTCTTAT CTGGCTCAT
3041 GGGTTGAGTG TGTTCACAGT TTGGAACAAG AGTCCACTAT TAAAGAACGT GGACTCCAAC GTCAAAGGGC GAAAACCTGT
CCCAACTCAC AACAAAGTCA AACCTTGTTT TCAGGTGATA ATTTCTTGCA CCTGAGGTG CAGTTTTCCCG CTTTTTGGCA
3121 CTATCAGGGC GATGGCCAC TACGTGAAC ATCACCCATA TCAAGTTTTT TGGGGTCGAG GTGCCGTAAA CCGCTAAATC
GATAGTCCCG CTACCCGGTG ATGCCTTGG TAGTGGGATT AGTTCAAAAA ACCCCAGCTC CACGGCATTT CGTGTATTAG
3201 GGAAACCCTAA AAGGAGCCCC CGATTTAGAG CTTGACGGGG AAAGCCGGCG AACGTGGCGA GAAAGGAAAG GAAGAAAGCG
CCTTGGGATT TCCCTCGGGG GCTAAATCTC GAATCCGCC TTTCCGGCCG TTGCACCGCT CTTTCTCTCC TTCTTTCCG
3281 AAAGGAGCGG CCGTACGGC GCTGGCAAGT GTAGCGGTCA CGCTGCGCT AACCACCACA CCGCCCGCGC TTAATCGGCC
TTTCTCTCGC CGCGATCCCG CGACCGTTCA CATCGCCAGT GCGACGCGCA TTGGTGGTGT GGGCGGCGCG AATTACGCGG
3361 GGTACAGGGC GCGTCCCAT CGCCATTCAG GCTGCGCAAC TGTGGGAAAG GGGCATCGGT GCGGGCCTCT CCGCTATTAC
CGATGTCGCG CCGTAGGGT GCGGTAAGTC GACGCGTTC ACAACCCCTT CCGTAGCCA CCGCCGGGAA TCGCTAATG
3441 GCCAGCTGGC GAAAGGGGGA TGTGCTGCAA GGCGATTAAG TTGGGTAACG CCAGGGTTTT CCCAGTCACG ACGTTGTAAA
CGGTGACCGC CTTTCCCCCT ACACGACGTT CCGCTAATTC AACCCATTGC GGTCCAAAAA GGGTCAGTGC TCACAACATT
3521 ACGACGGCCA GTAGCGCGC GTAATACGCA TCACTTAGG GCGAATTGGA GCTCCACCGC GGAATATCTA TTAAAAGAA
TGCTGCCGGT CACTCGCGCG CATTATGCTG AGTGATATCC CGCTTAACCT CGAGGTGGCG CCTTATAGAT AATTTTCTTA
3601 TGCGAGACAC GGCATCGCAA AGAGCGGAAG CTATTGAATC AGCGATGCGA GTTATAGATG AAAAAATTAC TGGTATGAAA
ACCGTCTGTG CCGTAGCGTT TCTCGCCTTC GATAACTTAG TCGCTACGCT CAATATCTAC TTTTAAATG ACCACTACTT
3681 ACAAATGGA ATTTGGTTACC CCACGAAATA AAATACAACA TACTTGAATA TATAGGCAAT AAAGAGCTTG ACATCGCATC
GTTTTTACTT TAAACCAATGG GGTGCTTTAT TTTATGTTGT ATGAACCTAT ATATCCGTTA TTTCTCGAAG TGTAGCGTAG
3761 TATGAAATAA AATACAACAT ACTTGAATAT ATAGGCAATA TAGAGCTTGA CATCACATCT ATGAAATAAA ATATTTTTTA
ATACTTTATT TTATGTTGTA TGAACCTATA TATCCGTTAT TTCTCGAAGT GTAGTGTAGA TACTTTATTT TAATAAAAA
3841 TAACATAATA TATATTTTGA TATAGAAAAA TCTAGTCATG AATATGGTAC AAACAGAAAT ATTGAAGGTG ATAAGCTTTA
ATTGATTTAT ATATAAAACT ATATCTTTTT AGATCAGTAC TTATACCATG TTTGTCTTTA TAACTTCCAC TACTCAGAA
3921 TATAGCAATA TAGAAGTAAA CATAGGCAAA ACAAGTATTC TAATAGATAT TTTGCTAACT ATGTAGTACA ATATAAGTAT
ATATCGTTAT ATCTTCATTT GTATCCGTTT TGTTCATAAG ATTTATCTATA AAACGATTGA TACATCATGT TATATTCATA
4001 ATTAATTTTG TTACCGGTGTC GTCTTAATCA ATAAAACGTA AAGCCGTTA TTAACATAT ATAAAATATC TGATTATCGT
TAATTTAAAC AATGGCACAG CAGAATTAGT TATTTTGCAT TTTCCGCAAT AATTTGTATA TATTTATAGG ACTAATAGCA
4081 GATATATGAT AAATATTGCC TTTATGATGA AAGAAAGATA GAGCGGTGAC TAAAAAATA AACAAATAAG TGACTAAATT
CTATATACTA TTTATAACGG AATACTACAT TTTTCTAT ATTTTCTAT CTTCCACATG ATTTTCTTAT TTGTTTATTC ACTGATTTAA
4161 ATAATATAAT GGGCAATCTT ACATCTTTAT TTCAACGACT AGTAAATACT TTTATCATAG CGATTGTCGG AATCTTCCGA
TATTATATTA CCGCTTAAGA TGTAGAAATA AAGTTGCTGA TCATTTATGA AAATAGTATC GCTAACAGCG TTAGAAGCCT
4241 AGAAGAAAGC GGTATGTTG TGGAAAGTGA TTTGTTGAA TCTTAGGCA CCGGAGATTG CCGGACGAA TTAGCACGCC
TCTTCTTTCG CCAATACAAC ACCTTCCACT AATACAACIT AAGAATCGCT GGCCTCTAAC CGCCTTGCCT ATGCTGCGGG
4321 ATATCCACG CGTGTTCAT CCAGGTATCT TCGGGGATT CAACAACATA GTCATCAACC AGCGGACGAC CAGCCGGTTT
TATAGGGTGC CGACAAGTTA GGTCCATAGA ACGCCATAAA GTTGTGTAT CAGTAGTTGG TCGCCTGTCT GTCGGCCAAA
4401 TGCGAAGATG GTGACAAAGT CCGCTTTTGG ATACATTTCA CGAATCGCAA CCGCAGTACC ACCCGTATCC ACCAGGTAT
ACGCTTCTAC CACTGTTTCA CGCGAAAACC TATGTAAGT GCTTAGCGTT GGCCTCATGG TGGCCATAGG TGGTCCAGTA
4481 CAATAACGAT AACCCCTTCG CCATCGCCTT CTGCGCGTTT AGCACTTTA AGCTCGCGT GGTGTGCTG ATCGTAGCTG
GTTATGCTA CTTCCGAAAG GGTAGCGGAA GACGCGCAA GTCGTGAAAT TCGAGCGCGA CCACAGCAC TAGCATCCAC
4561 GAAATACAAA CCGTATCGAC ATGACGAATA CCCAGTTCAC GCGCCAGTAA CGCACCCGGT ACCAGACCCG CACGGCTTAC
CTTTATGTTT GCCATAGCTG TACTGCTTAT GGGTCAAGTG CCGGTGCATT CCGTGGGCGA TGGTCTGGCG GTCCGCAATG
4641 GGCAATAATG CCTTCCATT GTTCAGAAGG CATCAGTCCG CTGCGAGTT TACGTGCATG GATCTGCAAC ATGTCCCAGG
CCGTTATTAC GGAAGGTTAA CAAGTCTTCC GTAGTCAGCC GAACGCTCAA ATGCACGTAC CTAGACGTTG TACAGGGTCC
4721 TGACGATGA TTTTTCGCTC ATGCTCGATG GCAATAAAT TTCTACTTTT AGAATATATT TTTACTTTT ACAGCTTTAG
ACTGCTACAT AAAAAGCGAG TACGAGCTCA CGTTATTTAA TCTTATATAA AAGATGAAAA TGCTCGAAAC GCTTCGAATC
4801 ATCTAGAAAA ACTAGTCACT TATGCCATGG CATGCTGACG GTCGACGGT CCGGAGTAAC TGCGATAACA CTAGGGCTGT
TAGATCTTTT TGATCAGTGA ATACGGTACC GTACAGCGTC

I R L L Q S V V L A T

4881 TGAAGTGAC CAGTTCAATC TCATATCCCA GGCCATGCGG TGACCTGATA CGTGGCCGGG ATAGATTGAG CAGTTGCAGT
ACTTCCACTG GTCAAAGTAGT AGTATAGGGT CCGGTACGCC ACTGGACTAT GCACCCGCCCT TATCTAATC GTCAACGTCA
S P S W N M M M D W A M R H G S V H G P Y I S C N C D .
4961 CCTGTGCTGT CTCATGCGCG CGAGGCGAGA AGGTGAACAG CTGGGAAACG AGGAAAACAG ATCCGCAGAG ATCCCCACG
GGACACGACA GAGTACCGCC GCTCCGCTCT TCCACTTGTG GACCCCTTGC TCTTTTTGTC TAGGGCTCTC TAGGGGGTGC
. Q A T E H R R P S F T F L Q S V L F V S G C L D G V Y .
5041 TACATAGCGG AGCAGAGAGC AGCCGCCCA ACAGCAAAAT CGACGTGGCG TCGTATTGTC GTGGTGGGGA CGTGGCATT
ATGTAATCGCC TCGTCTCTCG TCGCGGGGGT TGCTCGTTTA GCTGCACCCG AGCATAACAG CACCACCCCT GCGACCCGTA
. M A S C L A A A G V L L D V H R R I T T T P V S A N .
5121 CCTGGCCCGC AGTGTGGGGG TTAGCGCTAC CCAGCAGCGG GAGGTGTTGT CCTCCGAAAC CGAGGCGACG CATCCGGGGG
GGACCGGCGC TCACACCCCC ACTCGCGATG GGTCTGCGCC CTCCACAACA GGAGGGCTTG CGTCCCGTGC GTAGGCCCCC
R A A L T P T L A V W C R S T N D E R V C P V C G P T .
5201 TGTGCATGAT CATGCTGCTT GCCTCATAA CAATCGTTGA GTTGGAGCAG TCGTTCTGTA CATGGTACAC CCGGACCGG
ACACGTACTA GTACAGCAGA CCGAGTATGT GTTACGAACT CAACCTCGTC AGCAAGCACT GTACCATGTG GGGCTGCGC
. H M I M D D A E Y V I S S N S C D N T V H Y V G S A N .
5281 TTGCGCACTT CATAGGCGGA AACTGGGATG GTCAAAACAG ACAGCAAAGC CAAAAGGAAG AGAGAGAAAG AGCAACCCGG
AACGCGTGAA GTATCCGCTT TTGACCTTAC CAGTTTGTCC TGTCGTTTTC GTTTTCTTTC TCTCTCTTTC TCGTTGGCCC
. R V E Y A S V P I T L C S L L A L L F L S F S C G P .
5361 CAGATTCCCT GTTGCAATAT TCACGCCGCT CTCGCAACC CCGACGCCAT GCGCCAGGGC CCTGGCAGCG CCCCATTGG
GTCTAAGGGA CAACGTATTA AGTGGCGCAG GAGGTCTTGG GCCTGCGGTA CGCGGTCCCG GGACCGTCCG GGGGGATCCC
L N G T A Y N V G D E L V R V G H A L A R A A G G L P .
5441 GGGCGCCGAC GAGCGGAATG TACCCCATGA GGTCTGGCGAA CCGCATGTG AGGGTATCGA AGGGTATCGA CAAATACGC
CCCGCGGCTG CTCGCCCTTAC ATGGGTTACT CCAGCCGCTT CGCGGTACAC TCCCATAGCT ACTGGAATGG GTTTAATGCG
. A G V L P I Y G M L D A F G C T L T D I V K G L N R S .
5521 GACCTACGCC GGGGTCAGT GGGGCCCAA CTAGGCGCAG AGCCACGGGG TGACAGGACC CATCCTGCCC ATCCNTRCC
CTGGATGCGG CCCCAGTCA CCCCAGGGTT GATCCGGCTC TCGGTGCCCC ACTGCTCTCG GTAGGACGGG TAGGGTACGG
. R R R P D T P G W S P R S G R P S L L W G A W G M G

5601 CTCGTTACCA TAGAGGGGCC AAGGGTACCC
GAGCAATGGT ATCTCCCCGG TTCCCATGGG
E N G Y L P W P Y G