



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Aspectos moleculares de la respuesta antiviral contra el virus de la hepatitis C importantes para el desarrollo de vacunas



María Soledad Llanes^a, Natalia Soledad Palacios^a, Magalí Piccione^a, María Guillermina Ruiz^a y Carla Layana^{a,b,*}

^a Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales, Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

^b Centro Regional de Estudios Genómicos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 24 de septiembre de 2013

Aceptado el 23 de diciembre de 2013

On-line el 14 de febrero de 2014

Palabras clave:

Hepatitis C

Vacunas

Tratamiento

R E S U M E N

La hepatitis C es una enfermedad viral hepática causada por un hepacivirus de la familia *Flaviviridae*, el cual posee un genoma de molécula única de ARN altamente variable. Codifica 10 proteínas necesarias para infectar las células y multiplicarse dentro de ellas. Su replicación se da únicamente en los hepatocitos. Debido a su gran variabilidad genómica y a la ausencia de síntomas de la enfermedad, se dificulta realizar un tratamiento temprano y acertado. En este trabajo se analiza el mecanismo molecular mediante el cual el virus infecta los hepatocitos y desarrolla la enfermedad. Particularmente, analizamos las alternativas terapéuticas, discutiendo la posibilidad de mejorar el tratamiento con el uso de nuevas vacunas específicas. Destacamos el uso de nuevas terapias basadas en ácidos nucleicos, principalmente vectores de ADN. Durante los próximos años, una vez que este tipo de tratamiento sea evaluado adecuadamente en ensayos clínicos y se equilibren los costos, constituirá una alternativa a los métodos convencionales muy beneficiosa.

© 2013 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Molecular aspects of the antiviral response against hepatitis C virus implicated in vaccines development

A B S T R A C T

Hepatitis C is a contagious liver disease caused by hepacivirus of the *Flaviviridae* family. It has a RNA genome, a unique highly variable molecule. It encodes ten proteins which are necessary to infect cells and multiply. Replication occurs only in hepatocytes. Because of its wide genomic variability and the absence of symptoms, it is difficult to make an early diagnosis and successful treatment. In this review we analyze the molecular mechanism by which the virus infects the hepatocytes and causes the disease. We focused the analysis on different therapies, with the possibility of improving treatment with the use of new specific vaccines. We highlight the use of new therapies based on nucleic acids, mainly DNA vectors. In the near future, once this treatment is adequately evaluated in clinical trials, and the costs are calculated, it could be a very beneficial alternative to conventional methods.

© 2013 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

La hepatitis C es una enfermedad viral contagiosa que afecta el hígado. El virus de la hepatitis C (VHC) fue descubierto en el año 1989 por Choo et al.¹ como un nuevo virus productor de hepatitis no A y no B. Se la considera la principal causa de infección

postransfusión. Las complicaciones a largo plazo incluyen infección crónica (80% de los infectados), cirrosis, insuficiencia hepática, carcinoma hepatocelular y muerte en el 30% los casos (fig. 1)^{2,3}.

El VHC es transmitido principalmente por contacto con sangre infectada y rara vez por transmisión sexual o vertical, de madre a hijo (<6%). En este último caso el porcentaje aumenta en mujeres con alta viremia o cuando coexiste con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Debido al uso de la misma vía de transmisión, la coinfección por VHC y VIH es muy frecuente⁴. Tanto la infección aguda como la crónica cursan de forma asintomática

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: layanacar@gmail.com (C. Layana).

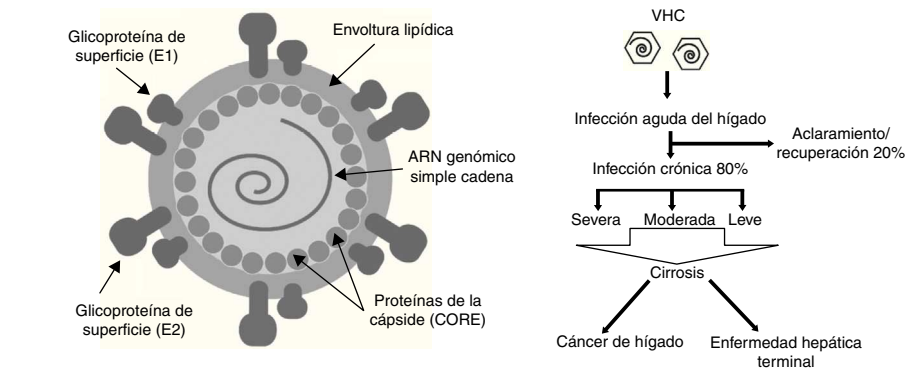


Figura 1. Estructura del virus de la hepatitis C e infección. A) Estructura de la partícula del virus de la hepatitis C: la proteína core del VHC interactúa con el ARN genómico viral para formar una nucleocápside. En la membrana se encuentran las glicoproteínas E1 y E2, asociadas con la envoltura por medio de lípidos generados por el huésped. B) Evolución de la infección por VHC en el organismo. En el 80% de los casos la infección progresa a crónica. Modificado de Sharma².

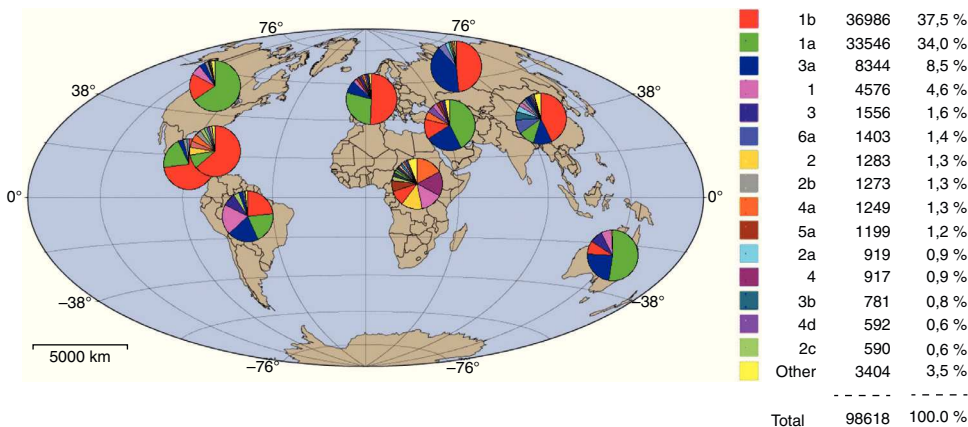


Figura 2. Distribución geográfica mundial de los diferentes genotipos del VHC. Se observa la distribución geográfica en las distintas regiones de las secuencias con diferentes genotipos del VHC. Puede apreciarse el predominio del genotipo 1b en el sur y este de Europa y en Japón, mientras que el genotipo 1a se ubica en el norte de Europa y América. A la derecha de la figura se muestra el porcentaje total de cada genotipo; los genotipos 1a y 1b abarcan más del 70% del total. De <http://VHC.lanl.gov>.

o con síntomas inespecíficos (fatiga, náuseas, anorexia, mialgias, artralgias, debilidad y pérdida de conocimiento). Esta es la principal razón por la cual se dificulta realizar un tratamiento temprano, y con frecuencia se la llama «enfermedad silenciosa»².

El VHC es un hepacivirus de la familia *Flaviviridae*. Su genoma consiste en una cadena simple de ARN con polaridad positiva de aproximadamente 9.600 nucleótidos, que contiene un único y largo marco de lectura (ORF), el cual codifica 10 proteínas. La heterogeneidad genética se puede clasificar en 4 niveles, dando lugar a tipos, subtipos, aislados y cuasiespecies. El grado de homología intergenómica da lugar al genotipo, en el cual, si existe homología del genoma entre el 66-69%, se llama tipo (indicado con un número arábigo); dentro de un mismo tipo, si la homología es del 77-80%, se clasifica en subtipo (indicado con la letra después del genotipo); si dentro de un mismo subtipo existe una homología del 81-90%, se denominan aislados. El grado de homología intragenomas del 91-99% da lugar a cuasiespecies, resultantes de la acumulación de las mutaciones durante la replicación viral dentro del huésped (tabla 1)⁵.

Hay 6 genotipos de VHC (del 1 al 6), muchos subtipos (a, b, c, etc.) y aproximadamente 100 cadenas diferentes, basándose en la heterogeneidad de secuencias del genoma del virus. Una alta tasa de error de la polimerasa, un ciclo corto de replicación y un genoma pequeño son factores que contribuyen a la generación de estas variantes del virus, las cuales difieren en sus propiedades biológicas: virulencia, tropismo celular y capacidad de evadir el sistema inmune⁶.

La frecuencia de los diversos genotipos varía de un país a otro (fig. 2). Los genotipos 1, 2 y 3 tienen distribución mundial, pero su prevalencia relativa varía de un área geográfica a otra. El genotipo 1a se localiza predominantemente en el norte de Europa y América del Norte, y el 1b predomina en el sur y este de Europa y Japón. El genotipo 2 es menos común que el genotipo 1, y se encuentra más frecuentemente en Europa que en América del Norte. El genotipo 3 es endémico en el sureste de Asia. El genotipo 4 es característico del este medio de Egipto y el centro de África. El genotipo 5 es casi exclusivo del sur de África. El genotipo 6 está distribuido

Tabla 1
Variabilidad genética del VHC. Clasificación según el porcentaje de homología

	% de homología	Símbolo	Origen
Genotipo	66-69	Número (1-6)	Heterogeneidad del virus
Subtipo	77-80	Letra minúscula	Virus relacionados dentro del mismo genotipo
Aislado	81-90	–	Especies del mismo subtipo en distintos individuos
Cuasiespecies	91-99	–	Mutaciones en el individuo durante la replicación viral

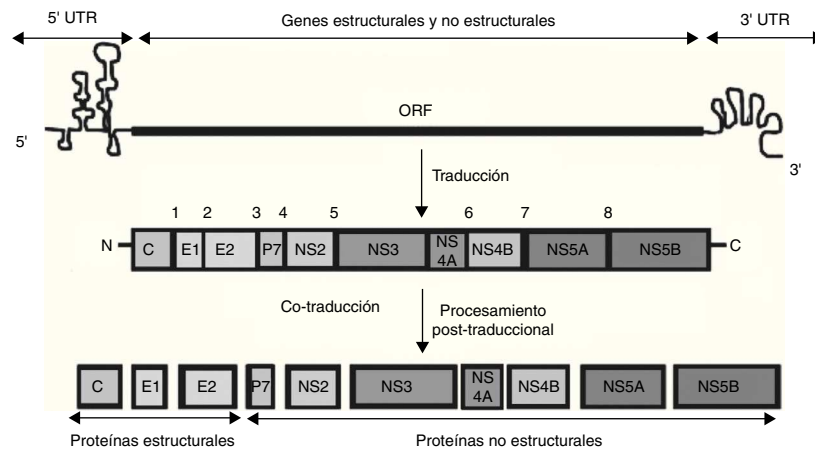


Figura 3. Representación esquemática del genoma del VHC. El ARN viral consiste en una región 5' no traducida (UTR) que contiene el sitio de entrada interno al ribosoma (IRES), seguido por la región codificante para genes estructurales y no estructurales y el 3' UTR. VHC se traduce como una poliproteína que se procesa proteolíticamente por proteasas virales y del huésped. Las proteínas estructurales se encuentran en el extremo amino terminal, mientras que las proteínas no estructurales se ubican en el extremo C-terminal. La proteína p7 (canal de iones o viroporina) se encuentra en la unión de las proteínas estructurales y no estructurales. Los números indican los sitios de clivaje postraduccion: del 1 al 4 son clivados por la peptidasa del huésped, el 5 por la auto proteasa NS2 y del 6 al 8 por la proteasa/helicasa NS3/4A. Modificado de Sharma².

principalmente en Asia. La variabilidad genética viral genera diferentes respuestas frente a la terapia^{3,7}.

Estructura molecular del virus de la hepatitis C

El genoma del VHC está formado por una cadena simple de ARN que codifica solo una poliproteína de 3.011 aminoácidos. El proceso de traducción se lleva a cabo mediante un mecanismo independiente del CAP (7-metil guanosina trifosfato) a través de un sitio interno de entrada ribosomal (IRES). La proteína generada es posteriormente procesada y genera 10 proteínas funcionales para la replicación y producción viral². La peptidasa del huésped es responsable de clivar en los sitios 1, 2, 3 y 4 (fig. 3). La proteína viral NS2 corta en el sitio 5, y la proteasa NS3 es responsable del clivaje del resto de las proteínas³.

Las proteínas se clasifican en estructurales y no estructurales (tabla 2). Entre las estructurales se encuentran la proteína core (C), que forma la cápsida viral, y 2 glicoproteínas de superficie, E1 y E2. Dentro de las proteínas no estructurales se encuentran un canal iónico (p7), una autoproteasa (NS2), una proteasa/helicasa (NS3/4A), un posible organizador del complejo de replicación (NS4B), una proteína reguladora pleiotrópica (NS5A) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5B). Adicionalmente puede producirse una undécima proteína (ARFPs) de función desconocida, codificada por un marco de lectura alternativo (+1) del genoma viral. Esta secuencia se superpone con la secuencia codificante de la proteína core⁷.

La proteína core forma la cápsida viral altamente conservada. Adicionalmente al rol del ensamblaje de la partícula viral, esta muestra múltiples funciones biológicas en la célula huésped, incluyendo la regulación transcripcional de genes, apoptosis, alteración

de las señales del interferón (INF), transformación celular e interferencia en el metabolismo lipídico. Estudios previos sugieren que muchos de estos efectos biológicos de la proteína core proveen ventajas de supervivencia al virus³.

Las proteínas E1 y E2 son componentes estructurales del virus, y ambas son requeridas para la entrada a la célula huésped vía unión a su receptor². E2 posee una región hipervariable, lo que crea problemas para generar un anticuerpo neutralizante efectivo. Asimismo, se demostró que E2 puede interactuar con la proteína celular PKR (proteína quinasa activada por ARN), una molécula de señalización clave en la vía antiviral de producción de INF³.

Por su parte, la proteína p7 funciona como un canal de iones que se inserta en la membrana celular del huésped. Se demostró que una mutación en esta proteína evita la infección, lo que indica que cumple un rol esencial en el ciclo de vida del virus⁸.

La proteína NS2 es una serina proteasa integral de membrana, es fosforilada por la proteína quinasa CK2, y está involucrada en la modulación de la apoptosis celular y transcripción⁹.

La proteína no estructural NS3/4A posee múltiples funciones, está implicada en la modulación de la actividad de la célula huésped e interfiere en la respuesta inmune innata. Adicionalmente, NS3 activa a la caspasa 8, que desencadena el proceso de apoptosis^{10–12}.

NS5A es una proteína asociada a la membrana, posee una estructura que le permite interactuar con otras proteínas y ARN virales, es fosforilada por una serina quinasa celular y tiene la capacidad de modular la transformación celular, la regulación transcripcional y la apoptosis. También interactúa con otros factores celulares para suprimir la eficacia antiviral del INF. Finalmente, NS5B tiene la estructura típica de una polimerasa y es la responsable de la replicación viral de ARN que involucra múltiples proteínas³.

Tabla 2

Función de las proteínas del VHC. Las proteínas se clasifican en estructurales y no estructurales, cada una posee una función específica en el ciclo de vida del virus

	Proteína	Función
Estructurales	Core (c)	Cápsida viral. En el huésped, regulación transcripcional y apoptosis
	E1	Glicoproteína de superficie; participa en la entrada del virus a la célula huésped
	E2	Glicoproteína de superficie; participa en la entrada del virus a la célula huésped
No estructurales	P7	Canal iónico
	NS2	Serina proteasa; corta en el sitio de clivaje entre NS2 y NS3
	NS3/4A	Proteasa/helicasa; cliva en los sitios entre NS3 y NS4A, NS4A y NS4B, NS4B y NS5A, NS5A y NS5B
	NS4B	Forma parte del complejo de replicación
	NS5A	Regulatoria
	NS5B	ARN polimerasa dependiente de ARN

Respuesta inmunitaria frente al virus de la hepatitis C

Una vez que el virus penetra en el organismo se dirige hacia los hepatocitos, donde puede desarrollarse. La entrada del VHC a los hepatocitos depende de una serie compleja de interacciones con sus células diana, a través de proteínas de superficie celular, entre las que destacamos al receptor LDL, las proteínas CD-81 y SR-B1, y el par claudina-occludina. Se ha demostrado que para reducir la entrada del VHC a los hepatocitos es necesario el uso combinado de anticuerpos que bloquean la unión de VHC a CD-81, SR-B1 y claudina 1¹³. Estos resultados ponen de manifiesto la complejidad del proceso de neutralización del VHC y la necesidad de una estrategia terapéutica combinada para lograr este objetivo de manera eficaz.

Otra estrategia de neutralización estudiada es el uso de anticuerpos contra las glicoproteínas E1 y E2, terapia que puede llegar a generar la resolución de la enfermedad^{14,15}.

Dentro de los primeros minutos posteriores a la activación del sistema inmune innato se liberan una gran variedad de moléculas, citoquinas (INF- α , INF- γ), interleucina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que activan y atraen a otras células, incluyendo las células del sistema inmune adaptativo. La eficiencia de la activación de las células *natural killer* (NK) puede ser un factor crítico para determinar si el virus se elimina o persiste. Un estudio dirigido por Salim Khakoo y Mary Carrington¹⁶ proporcionó la primera evidencia de que ciertos receptores inhibidores de NK influyen en la posibilidad de eliminar la hepatitis C aguda.

La eliminación de la primera célula infectada es la manera de limitar el daño causado por el VHC y representa la respuesta inmune innata. El virus interfiere con la principal vía de señalización usada por los interferones α y β para transmitir el mensaje dentro de una célula infectada. Los interferones se encuentran entre las citoquinas más potentes y actúan a través de la vía de señalización JAK-STAT. Esta vía se encuentra en todos (o la mayoría) de los tipos celulares. La proteína core del VHC inhibe la inducción de genes estimulados por INF- α y β (ISG)^{17,18}. Esta característica del virus contribuye a la resistencia observada contra la terapia con INF- α .

Cuando la respuesta inmune innata no consigue la eliminación del virus, las células T CD4⁺ toman el control. Estas ayudan a otras células, como a las células B (productoras de anticuerpos) y células T CD8⁺ (atacan a las células infectadas) a erradicar el virus. Una fuerte respuesta de células T CD8⁺ citotóxicas (CTL) está relacionada con la erradicación del virus. Esto fue evidenciado en un estudio hecho en chimpancés, donde los que mostraron una vigorosa respuesta CTL fueron los únicos capaces de resolver la enfermedad¹⁹. Estudios en humanos confirman esta relación inversa entre la persistencia de la enfermedad y el grado de respuesta CTL²⁰. En los pacientes con infección crónica parece ser que los epítomos mutados no pueden ser reconocidos por las células T CD8⁺, razón por la cual la enfermedad no puede ser contrarrestada.

La respuesta inmune mediada por anticuerpos es poco clara, en oposición a lo que ocurre con el virus de la hepatitis B, donde los anticuerpos aseguran la neutralización. El rol de los anticuerpos en la protección de la infección frente al VHC es complejo y determinados anticuerpos consiguen el control de la infección; sin embargo, para llegar a la neutralización in vitro es necesario el uso combinado de múltiples anticuerpos.

El primer anticuerpo detectado frente a la exposición al VHC es anti-NS3 y anti-core, y posteriormente aparecen anticuerpos contra NS4 y contra las proteínas de superficie E1 y E2. Tanto en humanos como en chimpancés la supresión o eliminación del VHC viene acompañada de una reducción en los anticuerpos específicos. Asimismo, se determinó que los anticuerpos anti-E2 y anti-E1 no se relacionan con la neutralización del virus, y más aún, se encontró la presencia de anti-E2 en todos los pacientes y chimpancés virémicos²¹.

Mientras que los anticuerpos parecen ejercer una presión selectiva sobre el VHC, la capacidad de terminar la infección sigue siendo incierta, debido a la existencia de diferentes cepas y genotipos.

Terapia convencional contra el virus de la hepatitis C

El primer tratamiento que mostró efectividad contra el VHC involucra la administración sistemática de INF- α . A través de los años, el tratamiento para la hepatitis C fue desarrollando modificaciones con el uso de los interferones pegilados. Estos son más estables y poseen una larga vida biológica. Se sabe que el INF activa varios mecanismos antivirales directos e indirectos, pero no se conoce el mecanismo molecular in vivo. En combinación con esta terapia, se administra ribavirina, análogo de purina, con un amplio espectro de actividad antiviral. La administración de ribavirina, en combinación con INF pegilado α para pacientes infectados con VHC, resulta en un incremento del rango de respuesta viral persistente (RVP). El mecanismo, o vías involucradas, que lleva a efectos anti-VHC no se conocen completamente².

Hay varios factores que influyen en la obtención de una RVP, y dentro de los factores propios del huésped podemos destacar: edad, sexo, raza, índice de masa corporal (IMC), resistencia a la insulina, presencia de esteatosis hepática, coinfección con otros virus, etc. Asimismo, influyen los antecedentes clínicos de los pacientes: personas con VHC crónica y anemia, insuficiencia renal, hepatitis autoinmune, cirrosis descompensada, embarazo, enfermedad cardiopulmonar severa, depresión no controlada o hipotiroidismo no tratado, no son buenas candidatas para el tratamiento⁴. La presencia de polimorfismos de nucleótidos (*single nucleotide polymorphism* [SNP]) localizados en el gen IL28B del cromosoma 19 (rs12979860) son altamente predictores del aclaramiento o eliminación del virus de la hepatitis C. Se ha establecido que, para el genotipo 1 del VHC, la homocigosis para el alelo C se asocia con una mayor respuesta al tratamiento en comparación con los heterocigotos C/T o los homocigotos T/T. La frecuencia del alelo difiere según los antecedentes étnicos de los pacientes, y es más común en individuos con ancestros asiáticos > europeos > hispanos > africanos²². Asimismo, se encontró que el polimorfismo es menos relevante en el caso de los genotipos 2 y 3 del virus; en contraste, el genotipo 4 se comporta de manera similar al 1²³.

Los factores del propio VHC relacionados con una RVP son la carga viral inicial y el genotipo²⁴. Los genotipos pueden ser, en parte, predictores independientes de la respuesta a la terapia con INF, y es más probable que los pacientes infectados con genotipos 2 y 3 tengan una respuesta favorable al tratamiento que los infectados por el genotipo 1a y 1b^{4,25}.

El tratamiento con INF pegilado y ribavirina (INF + RBV) está asociado con numerosos efectos adversos. Los más comunes son: síndrome pseudogripal, manifestaciones psiquiátricas, reacciones autoinmunes y toxicidad hematológica. Aunque los efectos adversos pueden ser superados exitosamente en muchos casos, aproximadamente del 20 al 40% de los pacientes requieren que la dosis de INF pegilado o ribavirina sea reducida o temporalmente interrumpida^{26,27}. A pesar de sus efectos adversos es la terapia actualmente más utilizada; en pacientes con hepatitis C crónica logra recuperar la rigidez hepática normal, siendo más efectiva en pacientes que logran una RVP²⁸.

En los últimos años se ha evaluado la posibilidad de utilizar, para el tratamiento, antivirales de acción directa (DAA), principalmente inhibidores de proteasas indispensables para el ciclo de vida del virus. Particularmente se evaluaron inhibidores de proteasas NS3/4; 2 de ellos, boceprevir y telaprevir, han sido recientemente aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento y son actualmente utilizados²⁵. Las nuevas terapias combinan el tratamiento convencional (INF + RBV) con

Tabla 3

Vacunas en fase de experimentación clínica. Existen diferentes opciones de vacunas terapéuticas contra el VHC en experimentación clínica, desde vacunas de proteínas y péptidos, hasta vacunas de vectores como las de ADN

Vacuna	Tipo	Ventajas/desventajas	Fase clínica	Referencia
Recombinante E1 y E2	Proteínas estructurales	Aumenta la respuesta de la terapia convencional y atenúa la infección primaria	Fase I	36,37
Recombinante E1 truncada	Proteínas estructurales	Mejora la histología del hígado. No disminuye los niveles de ARN viral. Respuesta celular y humoral	Fase I	40–42
GI5005	Proteínas: fusión core-NS3	Potencia la respuesta innata, reduce la carga viral y aumenta la eficacia de la terapia convencional	Fase Ib/II	43
IC41	Péptidos	Respuesta T específica y reducción del ARN de HCV en combinación con la terapia convencional	Fase II	45,46
Derivados de core	Péptidos	Disminuye la carga viral, respuesta T específica	Fase I	47,48
TG4040	Vectores (virus de Ankara modificado)	Se observa una disminución de la carga viral, alta respuesta TCD8+	Fase I	49
CICGB 230(E1 + E2 + proteína core recombinante)	ADN	Anticuerpos neutralizantes, mejora la histología del hígado sin disminuir la viremia	Fase I	53
Chron Vac C (NS3/4A)	ADN	Disminución de la carga viral a altas dosis	Fase I/IIa	54

el uso de DAA; el objetivo es aumentar la efectividad y poder reducir los tiempos de tratamiento para reducir al mínimo los efectos adversos producidos. Los tratamientos con inhibidores de proteasas de primera generación son engorrosos para los pacientes y requieren la toma de varios comprimidos al día²⁹. Actualmente están en fase de experimentación nuevos inhibidores de proteasas de segunda generación (la mayoría moléculas macrocíclicas) que tratan de solucionar estos aspectos negativos y minimizar los efectos adversos. Se ha demostrado una mayor eficacia en el tratamiento contra el genotipo 1 del VHC, aunque todavía tienen una eficacia limitada contra otros genotipos³⁰. Además de los inhibidores de proteasas, están en estudio otros DAA, inhibidores de NS5A e inhibidores de la ARN polimerasa (nucleósidos y no nucleósidos) en varios estadios de experimentación, y se espera que puedan ser utilizados como fármacos más eficientes en futuros tratamientos³¹.

Terapias innovadoras: mayor eficiencia en la erradicación del virus

El desarrollo de una vacuna efectiva contra el VHC representa un auténtico desafío debido a la gran variabilidad genética del virus. Sumado a esto, se sabe que este virus tiene la capacidad de inhibir la respuesta inmune innata y atenuar la respuesta de células T y B³². Actualmente se están realizando numerosos ensayos clínicos de fase 1 y fase 2, lo que representa un futuro prometedor en vacunas terapéuticas y profilácticas. En la [tabla 3](#) se resumen las principales características de las vacunas en ensayos clínicos que se discutirán a continuación.

Vacunas de la cubierta proteica

Debido a que la composición proteica de la cubierta del VHC varía de un virus a otro, se dificulta el desarrollo de una vacuna específica, pero la existencia de anticuerpos contra proteínas de la envoltura viral permite atenuar la infección primaria y mejorar la respuesta a la terapia convencional³³. Se ha observado que las proteínas de superficie E1 y E2 generan protección contra VHC en chimpancés^{32,34,35}. Este resultado es alentador y ha incentivado la realización de estudios en humanos.

Existe una vacuna profiláctica que consiste en un heterodímero proteico recombinante gpE1/gpE2 con el adyuvante MF59 junto con un oligonucleótido CpG^{36,37}. Esta vacuna se evaluó en un estudio de fase 1 en 60 individuos sanos, los cuales desarrollaron sin excepción anticuerpos anti-VHC y proliferación de linfocitos T. La inducción de anticuerpos y linfocitos T específicos en todos los pacientes fue independiente de la dosis administrada, y la vacuna fue adecuadamente tolerada³⁸. Esta vacuna es utilizada junto con INF pegilado

y ribavirina como una terapia en los pacientes que no responden a la terapia convencional³⁹.

Otra vacuna que posee como blanco las proteínas de cubierta de VHC es la de la proteína E1 recombinante truncada en el extremo C-terminal (en el aminoácido 135) en adyuvante de alumbre. Existen 2 trabajos en los cuales se tomaron 20 individuos sanos y 34 con infección crónica sin tratamiento previo. Los resultados mostraron, en algunos individuos, una mejora en la histología del hígado sin disminuir los niveles de ARN de VHC. La vacuna indujo anticuerpos y linfocitos T específicos^{40,41}. Dicho estudio progresa en el seguimiento de 122 pacientes que recibieron inyecciones durante 3 años, en el cual se observa inducción de la respuesta inmunológica celular y humoral a pesar de no prevenir el daño hepático⁴².

Vacunas de proteínas

Como vacuna terapéutica se utilizan células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, muerta por calor, que expresa la proteína de fusión core NS3 (GI5005). Como respuesta a esta terapia se observa un aumento de las células dendríticas y de la respuesta innata y celular específica³⁹. Se evaluó en un estudio clínico en fase 1b a GI5005 como monoterapia y se observó que los individuos tratados presentaban una reducción de la carga viral, ausente en los que recibieron placebo⁴³. En un ensayo en fase 2 GI5005 se combinó con la terapia estándar en 66 pacientes con VHC-1 crónica. Esta terapia combinada es significativamente más efectiva que la terapia convencional⁴³.

Ensayos preclínicos realizados en ratones mostraron que las proteínas core de VHC truncadas estimulan respuesta de células B y T más potentes que la proteína completa. Otros estudios apoyan esta idea debido a que la proteína core truncada es capaz de penetrar en el núcleo. El diseño de una vacuna basada en proteínas core truncadas es posible y prometedor⁴⁴. Sin embargo, estos resultados deben ser cuidadosamente analizados y se deberán realizar primero estudios en primates para evaluar la inducción de una respuesta adecuada.

Vacunas de péptidos

IC41

Consiste en 5 péptidos sintéticos de core, NS3 y NS4 con un adyuvante de poli-L-arginina para aumentar la respuesta del INF- γ conservado en los genotipos 1 y 2^{33,39}. En estudios de fase 2 la vacuna fue tolerada y un gran número de pacientes desarrollaron respuestas Th1/Tc1 (INF- γ) específicas para VHC y una baja proliferación de células T específicas⁴⁵. Asimismo, se observó que un tercio de los pacientes tratados presentaron una respuesta sostenida de células T que se extendió hasta 6 meses luego de la última

vacunación. Esta terapia combinada con INF + RBV mostró un alto nivel de eliminación del virus, y en aquellos pacientes que desarrollaron RVP se encontró una fuerte respuesta de linfocitos T específicos⁴⁶.

En el año 2009 se reportó un estudio de fase 1 en el cual se utiliza una vacuna de péptido core la cual fue bien tolerada e indujo la actividad de CD8+ péptido específica y respuesta citotóxica en 15 de 25 pacientes⁴⁷. En un estudio realizado en Japón con vacunas peptídicas (cuatro péptidos A24 CD8+) se trató a 12 pacientes con VHC-1b que no respondieron al tratamiento convencional. La mayoría desarrolló respuestas T específicas, en algunos individuos se detectó una disminución dependiente de la dosis de los niveles de alanina transaminasa sérica y ARN del VHC⁴⁸.

Vacunas de vectores

El uso de vectores virales mostró ser un potente inductor de la respuesta de células T en chimpancés, por lo que representan una opción terapéutica interesante.

Virus de Ankara modificado

TG4040 es una vacuna terapéutica que utiliza el virus de Ankara modificado (MVA), una cepa altamente atenuada de poxvirus que codifica las proteínas NS3/4/5B. Esta vacuna se evaluó en un ensayo con 15 pacientes, y en 6 de estos disminuyó la carga viral, en asociación a una respuesta significativa de células T CD8+⁴⁹.

En ensayos preclínicos se evaluó MVA recombinante que codifica NS3/4/5B en ratones, y se observó una fuerte y duradera respuesta tanto de células T CD8+ como CD4+⁵⁰. En otro estudio se vacunó a chimpancés con MVA recombinante que codifica core E1-E2 y NS3 de VHC, induciendo fuertes respuestas de células T CD8+ y de citoquinas Th1/Th2, y desarrollo de anticuerpos específicos. Sin embargo, no presentaron protección contra la infección crónica⁵¹.

ADN

Las vacunas de ADN están compuestas por plásmidos bacterianos que codifican el antígeno de interés bajo el control de promotores eucarióticos. Presentan una serie de ventajas sobre las vacunas convencionales o de proteínas recombinantes, entre las que destacan rápido diseño, fácil manipulación y aislamiento, posible producción a gran escala, alta seguridad, ausencia de problemas de empaquetamiento (como sí poseen las proteínas) y relativo bajo costo. La efectividad no es elevada, pero se están estudiando nuevas formas de administración con el fin de mejorarla, y no se han registrado grandes efectos adversos en humanos⁵².

En la actualidad se está evaluando la utilización de 2 vacunas terapéuticas basadas en ADN para lograr la erradicación del VHC: CICGB-230 y ChronVac-C. La primera contiene un plásmido que expresa los antígenos estructurales y la proteína core recombinante. Se evaluó en individuos que no respondieron al tratamiento convencional, y se observó la presencia de anticuerpos neutralizantes y una débil respuesta de células T específicas para core. A pesar de que no disminuyó la viremia, la histología del hígado mejoró notablemente⁵³. La segunda vacuna consta de un plásmido que expresa los antígenos NS3/4A y está siendo evaluada en un estudio de fase 1/2a en pacientes sin tratamiento previo. La vacuna no presentó efectos adversos y el 67% de los pacientes que recibieron las dosis más altas mostraron una disminución de la carga viral⁵⁴. En un estudio reciente se probó la administración de esta vacuna mediante electroporación in vivo en pacientes con infección crónica por el genotipo 1 del VHC⁵⁵. Este método de administración genera un aumento de la captación y expresión del ADN y una respuesta inflamatoria local, y asimismo se observó una fuerte respuesta de células T. En pacientes en tratamiento con INF + RBV produjo la eliminación del virus. Aunque estos resultados aún son preliminares,

ya que el número de casos analizados es bajo y las condiciones muy variables, son muy alentadores.

Además de las vacunas de vectores en fase de experimentación clínica, vale la pena mencionar 2 estrategias aún en ensayos preclínicos. Una de ellas utiliza adenovirus recombinantes para expresar las proteínas estructurales y no estructurales. Poseen la ventaja frente a péptidos sintéticos de poder expresar cualquier proteína viral y no tener limitaciones por clase de molécula HLA^{56,57}. Se han realizado ensayos en ratones y en chimpancés con adenovirus que expresan NS3-NS5B, y en ambos casos se obtuvo una fuerte respuesta de células T CD8+⁵⁸⁻⁶⁰. Los vectores de adenovirus que codifican proteínas core y NS3 de VHC son útiles para estimular la respuesta celular inmune específica de protección³⁹.

Por otro lado, se están estudiando las partículas tipo virus (VLP). Son partículas retrovirales que poseen la envoltura nuclear de un virus heterólogo, en este caso E1 y E2 de VHC, y albergan un genoma defectuoso. Inducen una neutralización efectiva de los anticuerpos, al igual que el virus VHC³⁴. Una vacuna basada en VLP haría posible la distribución de anticuerpos neutralizantes y epítomos de células T específicas para core recreando los viriones antigénicos maduros³⁹. Es una propuesta alentadora, ya que se ha observado una respuesta exitosa para el virus de la hepatitis B y el virus del papiloma humano^{61,62}. Esta estrategia fue analizada en ratones y en chimpancés, donde indujo la respuesta celular y humoral para proteínas estructurales del VHC y maduración de células dendríticas⁶³⁻⁶⁶.

Discusión

Vacunas: ¿profilaxis o alternativas terapéuticas?

A pesar de los avances en el conocimiento del VHC, sobre la estructura, el genoma, el ciclo de vida, así como los distintos estudios desarrollados sobre las diferentes etapas de la enfermedad, aún no se ha conseguido una terapia efectiva en todos los casos. El genotipo y la replicación viral son los principales factores a la hora de estimar la RVP para determinar qué tipo de tratamiento se llevará a cabo. Los objetivos del tratamiento contra la hepatitis C crónica son la erradicación del virus y la interrupción de la progresión de la enfermedad del hígado. La terapia convencional (INF + RBV) es la más utilizada, a pesar de tener muchos efectos adversos y ser económicamente muy costosa. Esta ha sido ampliamente mejorada con el uso de DAA, ya que se obtienen mayores respuestas. La tendencia de los tratamientos es evaluar los casos individualmente, analizando factores genéticos del huésped (IL28B) y ajustando los tiempos del tratamiento para cada caso en particular con el objetivo de minimizar los efectos adversos. Hasta el momento no se ha encontrado una mejor opción que pueda utilizarse en la mayoría de los casos.

En los estudios realizados en los últimos años se ha demostrado que las vacunas son buenas alternativas terapéuticas, aunque todavía no se ha llegado a obtener una vacuna preventiva frente al VHC. Las vacunas de proteínas son muy efectivas, incluso en pacientes que no muestran respuesta a la terapia convencional. Estas inducen la inmunidad de células T específicas a través de la presentación directa del antígeno al receptor de células T vía moléculas HLA. Su limitación radica en la alta variabilidad existente en la población de HLA, por lo que la eficiencia estaría restringida solo a un grupo de pacientes. Las vacunas de vectores como el adenovirus plantean una solución a estos inconvenientes de las vacunas de proteínas, pero aún están en estadios preclínicos. Las vacunas de ADN poseen ventajas sobre las de proteínas y menor cantidad de efectos adversos. Actualmente tienen baja efectividad, aunque existe la posibilidad de aumentar su eficacia con el desarrollo de técnicas alternativas de administración, como la electroporación, que mejoren la captación y la expresión del ADN.

Actualmente el uso de vacunas mejora los tratamientos, aumentando la respuesta y disminuyendo los efectos adversos. Se espera que cada región pueda desarrollar un tratamiento particular teniendo en cuenta la prevalencia geográfica de distribución del virus, los factores genéticos de la población y las alternativas terapéuticas (INF + RBV, DAA, vacunas, etc.). El objetivo es obtener un tratamiento combinado que genere la máxima efectividad de respuesta con los mínimos efectos adversos.

El desarrollo de nuevos estudios sobre estas y sobre nuevas terapias, de la mano de campañas efectivas de prevención, podrá disminuir de manera sustancial los casos graves de enfermedad por el VHC. Asimismo se genera la expectativa de llegar a obtener una vacuna profiláctica en los próximos años.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244:359–62.
- Sharma SD. Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. *Indian J Med Res*. 2010;131:17–34.
- Jang JY, Chung RT. Chronic hepatitis C. *Gut Liver*. 2011;5:117–32.
- Wilkins T, Malcolm JK, Raina D, Schade RR. Hepatitis C: Diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. 2010;81:1351–7.
- Márquez-Rosales MG, Santoscoy-Tovar FA, Montoya-Fuentes H. Frecuencia y distribución de genotipos del virus de la hepatitis C en población mexicana seleccionada. *Rev Mex Pat Clin*. 2008;55:79–87.
- Fishman S, Branch A. The quasispecies nature and biological implications of the hepatitis C virus. *Infect Genet Evol*. 2009;9:1158–67.
- Cannon NA, Donlin MJ, Fan X, Aurora R, Tavis JE. Hepatitis C virus diversity and evolution in the full open-reading frame during antiviral therapy. *PLoS ONE*. 2008;3:0002123.
- Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, et al. 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*. 2003;100:11646–51.
- Franck N, le Seyec J, Guguen-Guillouzo C, Erdtmann L. Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome. *J Virol*. 2005;79:2700–8.
- Prikhod'ko EA, Prikhod'ko GG, Siegel RM, Thompson P, Major ME, Cohen JL. The NS3 protein of hepatitis C virus induces caspase-8-mediated apoptosis independent of its protease or helicase activities. *Virology*. 2004;329:53–67.
- Breiman A, Grandvaux N, Lin R, Ottone C, Akira S, Yoneyama M, et al. Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKe. *J Virol*. 2005;79:3969–78.
- Loo YM, Owen DM, Li K, Erickson AK, Johnson CL, Fish PM, et al. Viral and therapeutic control of IFN- β promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:6001–6.
- Krieger SE, Zeisel MB, Davis C, Thumann C, Harris HJ, Schnober EK, et al. Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-Claudin-1 associations. *Hepatology*. 2010;51:1144–57.
- Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang E, Tarr AW, Stamatakis Z, et al. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med*. 2008;14:25–7.
- Pestka JM, Zeisel MB, Bläser E, Schürmann P, Bartosch B, Cosset FL, et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis B and therapeutic control of IFN- β promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:6025–30.
- Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. 2004;305:872–4.
- Heim MH, Moradpour D, Blum HE. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the jak-STAT pathway. *J Virol*. 1999;73:8469–75.
- De Lucas S, Bartolomé J, Carreño V. Hepatitis C virus core protein down-regulates transcription of interferon-induced antiviral genes. *J Infect Dis*. 2005;191:93–9.
- Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*. 1999;10:439–49.
- Cucchiariini M, Kammer AR, Grabscheid B, Diepolder HM, Gerlach TJ, Grüner N, et al. Vigorous peripheral blood cytotoxic T cell response during the acute phase of hepatitis C virus infection. *Cell Immunol*. 2000;203:111–23.
- Prince AM, Brotman B, Lee DH, Ren L, Moore BS, Scheffel JW. Significance of the anti-E2 response in self-limited and chronic hepatitis C virus infections in chimpanzees and in humans. *J Infect Dis*. 1999;180:987–91.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009;461:399–401.
- Thompson A. Genetic factors and hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 2012;142:1335–9.
- Cisneros-Garza LE. Nuevos avances en el manejo de la hepatitis C. *Salud Publica Mex*. 2011;53:S52–60.
- Buti M, Homs M. Nuevos agentes para el tratamiento de la hepatitis C. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:147–50.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347:975–82.
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: A randomised trial. *Lancet*. 2001;358:958–65.
- Macías J, Rivero A, Cifuentes C, Camacho A, Neukam K, Rivero-Juárez A, et al. Sustained virological response to pegylated interferon plus ribavirin leads to normalization of liver stiffness in hepatitis C virus-infected patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31:424–9.
- Hézode C. Boceprevir and telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C: Safety management in clinical practice. *Liver Int*. 2012;32:32–8.
- Hunt D, Pockros P. What are the promising new therapies in the field of chronic hepatitis C after the first-generation direct-acting antivirals? *Curr Gastroenterol Rep*. 2012;15:1–10.
- Au JS, Pockros PJ. Novel therapeutic approaches for hepatitis C. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;95:78–88.
- Houghton M. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses. *Immunol Rev*. 2011;239:99–108.
- Halliday J, Klennerman P, Barnes E. Vaccination for hepatitis C virus: Closing in on an elusive target. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10:659–72.
- Ray R. Progress toward development of a hepatitis C vaccine with broad shoulders. *Sci Transl Med*. 2011;3:94ps33.
- Choo QL, Kuo G, Ralston R, Weiner A, Chien D, van Nest G, et al. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:1294–8.
- Vajdy M, Selby M, Medina-Selby A, Coit D, Hall J, Tandeske L, et al. Hepatitis C virus polyprotein vaccine formulations capable of inducing broad antibody and cellular immune responses. *J Gen Virol*. 2006;87 Pt 8:2253–62.
- Houghton M, Abrignani S. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature*. 2005;436:961–6.
- Frey SE, Houghton M, Coates S, Abrignani S, Chien D, Rosa D, et al. Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine*. 2010;28:6367–73.
- Torresi J, Johnson D, Wedemeyer H. Progress in the development of preventive and therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *J Hepatol*. 2011;54:1273–85.
- Leroux-Roels G, Depla E, Hulstaert F, Tobback L, Dincq S, Desmet J, et al. A candidate vaccine based on the hepatitis C E1 protein: Tolerability and immunogenicity in healthy volunteers. *Vaccine*. 2004;22:3080–6.
- Nevens F, Roskams T, van Vlierberghe H, Horsmans Y, Sprengers D, Elewaut A, et al. A pilot study of therapeutic vaccination with envelope protein E1 in 35 patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38:1289–96.
- Wedemeyer H, Mazur W, Nevens F, Horsmans Y, Adler M, Blum H, et al. Factors influencing progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: Results of the 3-year T2S-918-HCV study with HCV E1 therapeutic vaccination. *J Hepatol*. 2008;48:S27–8.
- Habersetzer F, Baumert TF, Stoll-Keller F. Gl-5005, a yeast vector vaccine expressing an NS3-core fusion protein for chronic HCV infection. *Curr Opin Mol Ther*. 2009;11:456–62.
- Zhu W, Chang Y, Wu C, Han Q, Pei R, Lu M, et al. The wild-type hepatitis C virus core inhibits initiation of antigen-specific T- and B-cell immune responses in BALB/c mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17:1139–47.
- Klade CS, Wedemeyer H, Berg T, Hinrichsen H, Cholewinska G, Zeuzem S, et al. Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with the peptide vaccine IC41. *Gastroenterology*. 2008;134:1385–95.
- Wedemeyer H, Schuller E, Schlaphoff V, Stauber RE, Wiegand J, Schiefke I, et al. Therapeutic vaccine IC41 as late add-on to standard treatment in patients with chronic hepatitis C. *Vaccine*. 2009;27:5142–51.
- Yutani S, Komatsu N, Shichijo S, Yoshida K, Takedatsu H, Itou M, et al. Phase I clinical study of a peptide vaccination for hepatitis C virus-infected patients with different human leukocyte antigen-class I-A alleles. *Cancer Sci*. 2009;100:1935–42.
- Gowans EJ, Roberts S, Jones K, Dinatale I, Latour PA, Chua B, et al. A phase I clinical trial of dendritic cell immunotherapy in HCV-infected individuals. *J Hepatol*. 2010;53:599–607.
- Honnet G, Veron L, Olivier D, Grellier B, Marie-Bastien B, Bonfils E, et al. Phase 1 clinical trial with a novel HCV therapeutic vaccine TG4040: Interim results of biomarker and immunomonitoring analyses. *Hepatol*. 2009;50:413A.
- Fournillier A, Gerossier E, Evlashev A, Schmitt D, Simon B, Chatel L, et al. 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*. 2007;25:7339–53.
- Rollier CS, Paranhos-Baccala G, Verschoor EJ, Verstrepen BE, Drexhage JA, Fagrouch Z, et al. Vaccine-induced early control of hepatitis C virus infection

- in chimpanzees fails to impact on hepatic PD-1 and chronicity. *Hepatology*. 2007;45:602–13.
52. Saade F, Petrovsky N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11:189–209.
 53. Alvarez-Lajonchere L, Shoukry NH, Grá B, Amador-Cañizares Y, Helle F, Bédard N, et al. Immunogenicity of CIGB-230, a therapeutic DNA vaccine preparation, in HCV-chronically infected individuals in a phase I clinical trial. *J Viral Hepat*. 2009;16:156–67.
 54. Sallberg M, Frelin L, Diepolder H, Jung MC, Mathiesen I, Fons M, et al. A first clinical trial of therapeutic vaccination using naked DNA delivered by in vivo electroporation shows antiviral effects in patients with chronic hepatitis C. Presented at 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Copenhagen, Denmark, 23–26 April 2009.
 55. Weiland O, Ahlen G, Diepolder H, Jung MC, Levander S, Fons M, et al. Therapeutic DNA vaccination using in vivo electroporation followed by standard of care therapy in patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Mol Ther*. 2013;21:1796–805.
 56. Arribillaga L, de Cerio AL, Sarobe P, Casares N, Gorraiz M, Vales A, et al. Vaccination with an adenoviral vector encoding hepatitis C virus (HCV) NS3 protein protects against infection with HCV-recombinant vaccinia virus. *Vaccine*. 2002;21:202–10.
 57. Matsui M, Moriya O, Abdel-Aziz N, Matsuura Y, Miyamura T, Akatsuka T. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with replication-defective recombinant adenovirus. *Vaccine*. 2002;21:211–20.
 58. Capone S, Meola A, Ercole BB, Vitelli A, Pezzanera M, Ruggeri L, et al. A novel adenovirus type 6 (Ad6)-based hepatitis C virus vector that overcomes preexisting anti-ad5 immunity and induces potent and broad cellular immune responses in rhesus macaques. *J Virol*. 2006;80:1688–99.
 59. Fattori E, Zampaglione I, Arcuri M, Meola A, Ercole BB, Cirillo A, et al. Efficient immunization of rhesus macaques with an HCV candidate vaccine by heterologous priming-boosting with novel adenoviral vectors based on different serotypes. *Gene Ther*. 2006;13:1088–96.
 60. Folgori A, Capone S, Ruggeri L, Meola A, Sporeno E, Ercole BB, et al. A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med*. 2006;12:190–7.
 61. Giannini SL, Hanon E, Moris P, van Mechelen M, Morel S, Dessy F, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*. 2006;24(33–34):5937–49.
 62. Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2002;2:395–403.
 63. Murata K, Lechmann M, Qiao M, Gunji T, Alter HJ, Liang TJ. Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:6753–8.
 64. Elmowalid GA, Qiao M, Jeong SH, Borg BB, Baumert TF, Sapp RK, et al. Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:8427–32.
 65. Baumert TF, Vergalla J, Sato J, Thomson M, Lechmann M, Herion D, et al. Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology*. 1999;117:1397–407.
 66. Barth H, Ulsenheimer A, Pape GR, Diepolder HM, Hoffmann M, Neumann-Haefelin C, et al. Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. *Blood*. 2005;105:3605–14.