



CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE LA RESPOSTA  
CD4<sup>+</sup> ASSOCIADA A RESOLUCIÓ DE LA INFECCIÓ PEL  
VIRUS DE LA HEPATITIS C I RESTAURACIÓ  
FUNCIONAL DE LIMFÒCITS T CD4<sup>+</sup> ESPECÍFICS DE  
NS3 EN INFECCIÓ PERSISTENT

TESI DOCTORAL

Marta Bes Maijó

Laboratori de Seguretat Transfusional  
Banc de Sang i Teixits de Catalunya

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Universitat Autònoma de Barcelona

**Directors de Tesi Doctoral,**

Dra. Sílvia Sauleda Oliveras

Dr. Juan Ignacio Esteban Mur

Barcelona, 2012



Universitat Autònoma  
de Barcelona

Facultat de Biociències  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE LA RESPOSTA  
CD4<sup>+</sup> ASSOCIADA A RESOLUCIÓ DE LA INFECCIÓ PEL  
VIRUS DE LA HEPATITIS C I RESTAURACIÓ  
FUNCIONAL DE LIMFÒCITS T CD4<sup>+</sup> ESPECÍFICS DE  
NS3 EN INFECCIÓ PERSISTENT

Memòria presentada per **Marta Bes Maijó** per optar al grau  
de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona

**Directors de Tesi Doctoral,**

Dra. Sílvia Sauleda Oliveras      Dr. Juan Ignacio Esteban Mur

Tesi Doctoral realitzada en el Laboratori de Seguretat Transfusional del Banc de Sang i  
Texits de Catalunya sota la direcció de la Dra. Sílvia Sauleda Oliveras i del Dr. Juan  
Ignacio Esteban Mur i la tutoria del Dr. Pedro Suau León

---

Marta Bes Maijó

---

Dra. Sílvia Sauleda

---

Dr. Juan Ignacio Esteban

---

Dr. Pedro Suau

Barcelona, 2012

## AGRAÏMENTS

Amb aquestes línies vull mostrar el meu sincer agraïment a totes les persones que m'han acompanyat en aquest llarg camí i que han contribuït directa o indirectament en aquesta tesi.

En primer lloc voldria donar les gràcies a la Sílvia Sauleda i al Juan Ignasi Esteban, els meus directors de tesi, per haver confiat en mi en tot moment i haver-me donat la oportunitat de realitzar la tesi doctoral. Gràcies per transmetre'm les ganes i la il·lusió per la investigació i per orientar-me en el món científic. Sense el vostre suport incondicional, la vostra paciència i els vostres coneixements aquesta tesi no hagués estat possible. Moltes gràcies.

En segon lloc, vull donar les gràcies al Dr. Lluís Puig i al Dr. Ramon Pla per permetre'm realitzar la tesi en el Banc de Sang i Teixits de Catalunya.

A Maria Piron, gràcies per acollir-me tant bé al laboratori en els meus inicis, per tot el que m'has ensenyat, la veritat és que ets un exemple a seguir i un dels meus referents. Per la paciència, pels consells, per la constància, per les lectures tant de la tesi com d'articles, per l'amistat.

A Natàlia Casamitjana, pels consells, per saber escoltar, per donar-me suport, per les correccions infinites, per l'amistat.

Noies, és un plaer treballar amb vosaltres i ara que no estem físicament juntes dir-vos que us trobo molt en falta. Moltes gràcies de tot cor.

A Isabel Campos, la persona que m'ha donat suport moral durant la segona etapa de la tesi. Gràcies per escoltar-me i ajudar-me en els moments difícils, per les teves visites continuades al "soterrani" perquè no em sentís tant sola, per les ganes de treballar, per la implicació en els projectes, per l'energia que desprens, per la professionalitat, per l'amistat. Moltes gràcies per estar tan pendent de mi i cuidar-me en aquest tram final.

Als tècnics de laboratori de recerca que han anat passant durant aquest llarg trajecte, gràcies per la vostra professionalitat i els bons moments passats. A l'Angie i l'Anna per les ganes immensurables d'aprendre i treballar i el bon humor que desprenen, és un plaer treballar amb vosaltres. A la Belen per l'energia, la vitalitat i el somriure que va transmetre durant l'any que va estar al laboratori. A l'Arturo, pels moments divertidíssims que ens va fer passar. I com no, a les

meves companyes i amigues, a l'Enri i la Marta Espelt, amb qui hem compartit tants bons moments, tan fora com dins del laboratori.

A totes les meves companyes del “laboratori de PCR”, la Mar, l'Àstrid, la Marian Muñoz, la Montse Gabarró, la Marta López i a les noies del “laboratori de serologia”, la Mari, la Marta Espasa, la Montse Roldán, la Teresa, la Cris, la Marian Martínez i la Betty, i com no a les nostres secretàries, la Pili i l'Elena. Mil gràcies per destinar una mica del vostre temps a buscar les mostres que tant us demano, per haver-me donat un cop de mà quan ho necessitava i pels soparets que ens hem pegat.

A la Laia, a la Cecília i al Marcel, els companys del Laboratori d'Immunohematologia, pels cafès i les xerrades.

No vull oblidar-me dels membres del laboratori de malalties hepàtiques del Institut de Recerca Vall d'Hebron, i especialment del Josep Quer i la Maria Cubero. Josep moltes gràcies per la teva disponibilitat i pel teu afany incondicional per la recerca. I com no, a la Maria Homs i al David Tabernero amb els qui he tingut el plaer de realitzar algun que altre estudi. Gràcies a tots.

Vull mencionar a tots els companys del “mòdul blau”, la Laura, el Salva, la Macarena, la Meri i especialment a la Maria Torrents, que molt altruïstament realitza les extraccions als pacients de trasplantament hepàtic. Gràcies per obrir-me les portes.

Al Juan Pablo del laboratori d'Enginyeria Química a la UAB per poder realitzar paral·lelament un procés d'expansió cel·lular a major escala. La veritat és que va ser un plaer treballar amb tu, i vaig aprendre molt sobre monitorització de cultius.

Vull agrair-li al Marco Fernández de la unitat de Citometria de l'Hospital Germans Trias i Pujol els seus ensenyaments en l'apassionant món de la citometria.

Als membres de la UCTS de l'Institut de Recerca i Vall d'Hebron, especialment a l'Àlex Bote i a Rosa Arjona, pels seus consells tant en citometria com en seqüenciació.

A tots els metges del Servei de Medicina Interna-Hepatologia de l'Hospital Vall d'Hebron per les seves ensenyances i la seva col·laboració, i en especial al Dr. Victor Vargas pel interès en l'estudi d'hepatitis B oculta, que tot i que no figuri en aquesta tesi, estem molts orgullosos dels resultats i de la publicació associada.

El meu agraïment a l'Alicia, l'Imma Ponte i el Pere Suau per haver-me format en els meus inicis en el món de la investigació. Vaig aprendre molt de vosaltres. Moltes gràcies.

A tots els donants de sang i pacients que de forma desinteressada han participat en els estudis que componen aquesta tesi.

Deixant una mica de banda la ciència, vull dedicar unes línies als meus amics "del poble". Què seria la vida sense els soparets, les festetes i els viatgets que anem fent? Gràcies a tots per la vostra amistat.

Finalment, el meu especial agraïment a la meva família. Als meus pares, Miquel i M<sup>a</sup> Pilar, per haver-me donat tot el necessari i més per arribar on sóc, això no hagués estat possible sense el vostre esforç. Gràcies per confiar en mi. A la meva germana Gemma, sempre disposada a escortar i ajudar. Recordaré sempre les nits fent les últimes revisions mentre tu estaves lluitant desesperadament per aprovar l'examen del PER, quines nits...i, com no, el vas aprovar!! És que tens molta sort!. Sempre t'ho dic, però com tu dius, la sort s'ha de buscar i tu ho saps fer molt bé. Gràcies també per ajudar-me a editar la tesi. Al meu germà Miquel, que tot i que em dóna més d'un mal de cap, me l'estimo moltíssim. Als meus avis, padrins i tiets gràcies pel vostre interès i els ànims. I com no, a Fran, per la paciència que ha tingut amb mi, sobretot aquesta última etapa. Pels ànims i la confiança dipositada, per cuidar-me i per estar al meu costat.

Gràcies a tots!!!

## PRÒLEG

La present tesi presentada com a compendi de publicacions s'ha organitzat estructuralment d'acord amb les recomanacions recollides en el Marc Regulador d'Estudis de Doctorat RD 1393/2007 de la Universitat Autònoma de Barcelona. Segons el punt II.18.2 del marc citat, es recomana que la tesi contingui com a apartats una introducció en la que es presentin els treballs i es justifiqui la unitat temàtica de la tesi; un resum global dels resultats i la discussió dels mateixos; unes conclusions finals; i una còpia dels treballs ja publicats i admesos per la Subcomissió de Postgrau per formar part de la tesi.

S'ha afegir, a més, un apartat de materials i mètodes on es descriu detalladament alguns processos experimentals d'especial rellevància i els quals estan parcialment explicats als articles originals, així com un tercer estudi que correlaciona l'efecte de les variants genètiques del gen de la IL28B sobre les respostes de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques del VHC. Aquest últim article va ser escrit pel doctorand durant la última fase de l'elaboració de la tesi, enviat a publicar, que complementa la informació obtinguda en els articles presentats en aquesta tesi.

## ABREVIATURES

<b>7-AAD</b>	<i>7-Amino-actinomycin D; 7-amino-actinomicina D</i>
<b>ALT</b>	Alanina transaminasa
<b>APC</b>	<i>Allophycocyanin; Aloficocianina</i>
<b>APCs</b>	<i>Antigen Presenting Cells; cèl·lules presentadores d'antigen</i>
<b>AST</b>	Aspartat transaminasa
<b>CBA</b>	<i>Cytometric Bead Array</i>
<b>CD</b>	Cèl·lules dendrítiques
<b>CFSE</b>	<i>Carboxy-Fluorescein diacetate Succinidyl Ester</i>
<b>ChLIA</b>	<i>Chemiluminescent Immunoassay; Immunoassaig quimioluminiscent</i>
<b>CIFN</b>	<i>Interferon consensus; Interferó consens</i>
<b>CMSP</b>	Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>CsB</b>	Ciclosporina B
<b>CTL</b>	<i>Cytotoxic T lymphocyte; Limfòcit T citotòxic</i>
<b>EIA</b>	<i>Enzymatic Immunoassay; Immunoassaig enzimàtic</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Assaig per immunoabsorció lligat a enzims</i>
<b>ELISpot</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting; Selecció de cèl·lules activades per fluorescència</i>
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein Isothiocyanate; Isotiocianat de fluoresceïna</i>
<b>HLA</b>	<i>Human leucocyte antigen; Antigen leucocitari humà</i>
<b>ICS</b>	<i>Intracellular Cytokine Staining; Marcatge intracel·lular de citoquines</i>
<b>IFN</b>	<i>Interferon; Interferó</i>
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ISG</b>	<i>Interferon Stimulated Genes; Gens d'estimulació de l'interferó</i>
<b>LIPA</b>	<i>Line Probe Assay; Assaig de sonda lineal</i>
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex; Complex major d'histocompatibilitat</i>

<b>NAT</b>	<i>Nucleic Acid Amplification Test; Test d'amplificació d'àcids nucleics</i>
<b>NK</b>	<i>Natural Killer cells; Cèl·lules assassines naturals</i>
<b>NR</b>	No responedor
<b>NS</b>	<i>Non Structural; Proteïnes no estructurals</i>
<b>PCR</b>	<i>Polimerase Chain Reaction; Reacció en cadena de la polimerasa</i>
<b>PD-1</b>	<i>Programmed cell Death protein 1</i>
<b>PE</b>	<i>Phycoerythrin; Ficoeritrina</i>
<b>PHA</b>	<i>Phytohemato-glutinin; Fitohematoglutinina</i>
<b>RBV</b>	Ribavirina
<b>RIBA</b>	<i>Recombinant Immunoblot Assay; Assaig d'immunoblot recombinant</i>
<b>RR</b>	Recidivants
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; Reacció en cadena de polimerasa amb la transcripció reversa</i>
<b>RVS</b>	Resposta viral sostinguda
<b>SEB</b>	<i>Staphylococcus aureus Entereotoxin B; Entereotoxina B d'<i>Staphylococcus aureus</i></i>
<b>SOD</b>	Superòxid dismutasa
<b>T<sub>CM</sub></b>	Cèl·lules T de memòria central
<b>TCR</b>	<i>T Cell Receptor; Receptor de cèl·lules T</i>
<b>T<sub>EM</sub></b>	Cèl·lules T de memòria efectora
<b>Th</b>	<i>Helper T cells; cèl·lules T col·laboradores</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll Like Receptor; receptor del tipus "toll like"</i>
<b>TMA</b>	<i>Transcription-Mediated Amplification; Amplificació mitjançant transcripció</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor; Factor de necrosi tumoral</i>
<b>Treg</b>	Cèl·lules T reguladores
<b>UTR</b>	<i>Untranslated Region; Regió no traduïda</i>
<b>VHB</b>	Virus de l'hepatitis B
<b>VHC</b>	Virus de l'hepatitis C
<b>VIH</b>	Virus de la immunodeficiència humana



# ÍNDEX

Agraïments	1
Pròleg	4
Abreviatures	5
<b>1. INFECCIÓ PEL VIRUS DE L'HEPATITIS C</b>	<b>10</b>
1.1. Genoma viral	11
1.2. Prevalença i vies de transmissió del virus	13
1.3. Epidemiologia	13
1.4. Història natural de la infecció	14
1.5. Història natural de la reinfecció de l'empelt postrasplantament hepàtic	15
1.6. Diagnòstic i monitorització de la infecció per virus de l'hepatitis C	16
1.6.1. Mètodes de detecció dels marcadors virals	17
1.6.2. Mètodes d'avaluació del dany hepàtic	19
1.6.3. Algoritme de cribatge pel VHC al Banc de Sang i Teixits de Catalunya	19
1.7. Immunitat innata i adquirida en la infecció pel VHC	21
1.7.1. Immunitat innata: sistema de l'interferó	21
1.7.2. Immunitat adaptativa	22
1.8. Mecanismes de persistència viral	25
1.8.1. Mecanismes d'evasió de la resposta immune innata	25
1.8.2. Mecanismes d'evasió de la resposta immune adaptativa	26
1.9. Mecanismes de tolerància dels limfòcits T CD4 <sup>+</sup> i VHC	30
1.10. Altres aspectes immunològics rellevants en la infecció pel VHC	31
1.10.1. Activació de limfòcits T CD4 <sup>+</sup>	32
1.10.2. Regulació de l'homeòstasi de les cèl·lules T	33
1.10.3. Caracterització fenotípica de les cèl·lules T	34
1.11. Tractament antiviral del VHC	36
1.11.1. Tractament antiviral estàndard en pacients naïve	36
1.11.2. Tractament antiviral en pacients no responedors o amb recidives	38
1.11.3. Tractament de l'hepatitis C després del trasplantament hepàtic	38
1.11.4. Noves teràpies	39
1.11.4.1. Inhibidors específics del VHC	39
1.11.4.2. Agents immunomoduladors	44
1.11.4.3. Immunoteràpia amb cèl·lules humanes	49

<b>2. ESTUDI 1: Resposta de les cèl·lules T específiques del virus de l'hepatitis C en donants de sang amb patró de RIBA-3 indeterminat: proves confirmatòries d'exposició al VHC</b>	<b>52</b>
2.1. Hipòtesi, objectius i disseny de l'estudi	53
2.2. Resum dels resultats	55
2.3. Manuscrit original	58
<b>3. ESTUDI 2: Reversió de l'estat disfuncional de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques de NS3 en pacients amb infecció persistent pel VHC</b>	<b>68</b>
3.1. Hipòtesi, objectius i disseny de l'estudi	69
3.2. Resum dels resultats	72
3.3. Manuscrit original	78
<b>4. DISCUSSIÓ</b>	<b>90</b>
4.1. Problemàtica dels donants de sang amb patró d'immunoblot pel VHC indeterminat	91
4.2. ELISpot IFN- $\gamma$ : prova confirmatòria d'exposició viral	92
4.3. Rellevància de la curació espontània de la infecció detectada per memòria immune cel·lular	94
4.4. Mecanismes immunològics de persistència viral i reversió de l'anèrgia de les cèl·lules T	95
4.5. Potencial ús de cèl·lules T CD4 <sup>+</sup> específiques de NS3 en immunoteràpia adaptativa	99
4.6. Projectes en desenvolupament i futurs	100
<b>5. CONCLUSIONS</b>	<b>102</b>
<b>6. MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>104</b>
6.1. Tests serològics	105
6.2. Determinació de l'ARN viral	109
6.3. Determinació del genotip i del serotip viral	109
6.4. Genotipatge HLA de classe I i II	110
6.5. Pèptids sintètics i proteïnes recombinants del VHC	111
6.6. Cèl·lules emprades	112
6.6.1. Purificació de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica	112
6.6.2. Purificació de cèl·lules CD4 <sup>+</sup> i cèl·lules presentadores d'antigen	113

<b>6.7.</b>	Cultius cel·lulars	114
<b>6.7.1.</b>	Cultius limfocitaris	114
<b>6.7.2.</b>	Cultius de cèl·lules presentadores d'antigen	115
<b>6.8.</b>	Identificació, selecció i expansió de cèl·lules T CD4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> específiques del VHC	115
<b>6.8.1.</b>	Expressió de la molècula CD154 en superfície dels limfòcits CD4 <sup>+</sup>	115
<b>6.8.2.</b>	Selecció de cèl·lules T CD4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> específiques del VHC per FACS	116
<b>6.8.3.</b>	Expansió de cèl·lules T CD4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> específiques del VHC	116
<b>6.9.</b>	Assaig d'ELISpot IFN-γ	117
<b>6.10.</b>	Citometria de flux	119
<b>6.10.1.</b>	Marcatge de superfície	121
<b>6.10.2.</b>	Quantificació de citocines solubles mitjançant CBA	122
<b>6.10.3.</b>	Assajos de proliferació cel·lular per dilució del CFSE	124
<b>6.10.4.</b>	Reexpressió de CD154 i detecció de citocines intracel·lulars	126
<b>6.11.</b>	Anàlisi estadística	126
<b>6.12.</b>	Aspectes ètics	126
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>127</b>
<b>8.</b>	<b>ANNEX</b>	<b>154</b>
<b>8.1.</b>	<b>ESTUDI 3: IL28B genetic variation and hepatitis C virus specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in anti-HCV positive blood donors</b>	<b>155</b>

# 1. INTRODUCCIÓ: INFECCIÓ PEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

La infecció pel virus de l'hepatitis C (VHC) és una de les principals causes de malaltia hepàtica crònica amb una estimació de 180 milions de persones infectades al món. El virus de l'hepatitis C no es va descobrir fins a la dècada dels 80, possiblement degut al caràcter silenciós de la primoinfecció, l'evolució asimptomàtica cap a la cronificació o bé degut a què les vies de contagi més comuns (transfusions de productes hematològics i l'ús de drogues intravenoses) existeixen des de fa relativament poc temps. Al 1989, i gràcies a tècniques de clonació molecular, es va caracteritzar el genoma del VHC <sup>1</sup>. Des de llavors s'han realitzat molts progressos en l'epidemiologia, la patogènia, el diagnòstic, i la teràpia del virus.

### 1.1. Genoma viral

El VHC és un virus ARN de cadena simple (ssARN) pertanyent al gènere dels Hepadnavirus i a la família dels *Flaviviridae*. El genoma del VHC conté 9.600 nucleòtids i un fragment obert de lectura que codifica per a una poliproteïna de 3011 aminoàcids, la qual és proteolíticament digerida per proteases virals i de l'hoste, donant lloc a 10 proteïnes virals (Fig. 1).

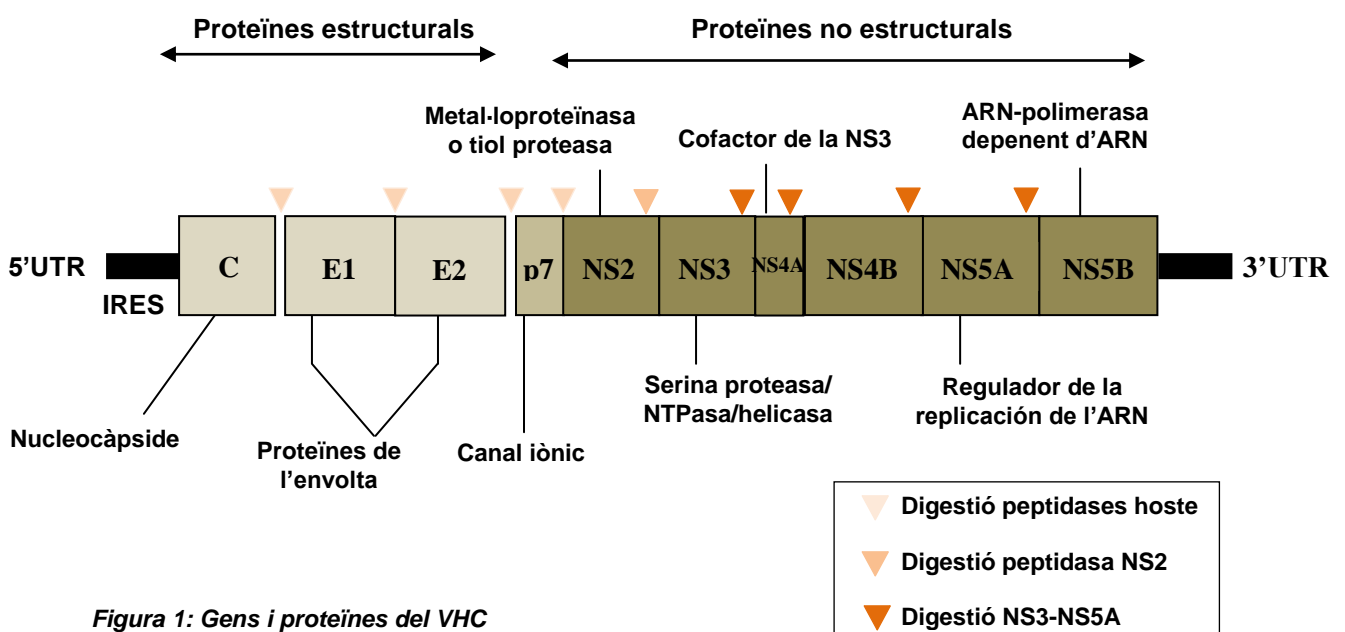


Figura 1: Gens i proteïnes del VHC

L'extrem amino terminal codifica per les proteïnes estructurals del core i les glicoproteïnes E1 i E2. A continuació hi ha una petita proteïna integral de membrana, la p7, la qual sembla que actua com a canal iònic. La resta del genoma viral codifica per les proteïnes no estructurals

(NS) NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B, les quals coordinen els processos intracel·lulars del cicle de vida del virus. Les proteïnes estructurals madures s'obtenen per digestions de peptidases entre C/E1, E1/E2 i E2/p7. Per tal d'obtenir la regió no estructural, la digestió entre p7/NS2 també és duta a terme per senyals de peptidases. El processament proteolític de la regió NS té lloc per l'acció de dos enzims virals, la NS2 autoproteasa; la NS3-4A serina proteasa (Fig. 1). La proteïna NS3 és una serina proteasa i una helicasa i la proteïna NS5B és una ARN polimerasa dependent d'ARN, que no presenta activitat correctora, donant lloc a una elevada diversitat genètica del virus, dins dels quals podem diferenciar quatre estats jeràrquics: genotips, subtipus, aïllats i quasiespècies <sup>2</sup>.

En el VHC es distingeixen 6 genotips principals (1 - 6), les seqüències dels quals difereixen entre ells un 20 - 35%. A la vegada, hi ha més de 80 subtipus (10 - 25% de diferències en seqüència) i en cada individu infectat el virus circula en forma de quasiespècies virals, que són el conjunt de seqüències genòmiques semblants però no idèntiques, degut a la elevada taxa mutacional (1 de cada 1000 bases per any) <sup>3</sup>. La distribució genotípica del VHC depèn principalment de la via de transmissió viral i de l'àrea geogràfica. Els genotips 1a, 1b, 2a, 2b i 3a del VHC constitueixen el 90% de les infeccions pel VHC en Amèrica, Europa, Xina, antiga Unió Soviètica, Japó, Austràlia i Nova Zelanda. A Espanya, s'ha descrit que un 65,5 % de la població infectada presenta un genotip 1 (el subtipus 1b amb més freqüència) <sup>4</sup>. El genotip 3 és altament prevalent a les zones del Nepal, Bangladesh, Índia i Pakistan. A Egipte existeix una elevada prevalença de genotip 4 a l'igual que a l'Àfrica central. A Sud-àfrica, el genotip 5 és el causant del 50% de les infeccions pel VHC. Per últim, el genotip 6 es troba especialment al sud-est asiàtic. Cal remarcar també l'existència de diferències dins de la mateixa àrea segons els diferents grups poblacionals. Un clar exemple és que als països occidentals destaca la prevalença del genotip 3a entre els joves, especialment entre aquells que són usuaris de droga via parenteral <sup>5</sup>.

El VHC replica principalment al citoplasma de l'hepatòcit infectat, tot i que s'ha aïllat seqüències procedents del VHC en cèl·lules dendrítiques <sup>6</sup> i s'ha demostrat l'existència de replicació viral en cèl·lules limfoides <sup>7</sup>.

## 1.2. Prevalença i vies de transmissió del virus

La prevalença d'infecció per virus C a Espanya és del 2,5%<sup>8</sup> i les vies de transmissió més habitual són per via parenteral (sang, hemoderivats, ús compartit de xeringues entre drogoaddictes, transmissió nosocomial intra-hospitalària); transmissió vertical (mare-fill) on s'estima que hi ha un 5-10% de risc de transmissió viral en cas de mares portadores (anti-VHC positiu i ARN positiu en sang); transmissió horitzontal (contacte amb individus infectats) amb una seroprevalença de 3-4%; transmissió sexual amb un 5% de seroprevalença<sup>8</sup>.

## 1.3. Epidemiologia

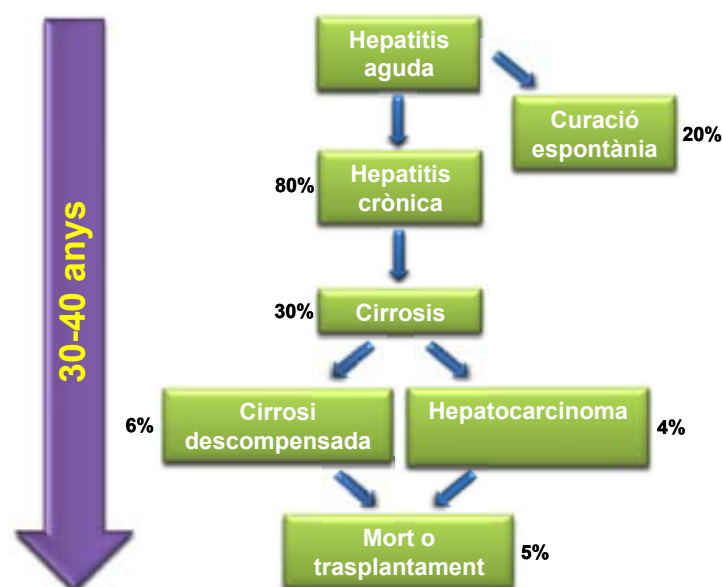
Abans dels anys 90, les transfusions sanguínies i l'ús d'hemoderivats eren les principals causes de transmissió del VHC (2-10% de les unitats sanguínies estaven infectades pel VHC)<sup>9</sup>. Conseqüentment, molts receptors de productes i pacients hemofílics que rebien concentrats de factors de coagulació van ser infectats (a Catalunya el 80% dels pacients amb coagulopaties congènites que van rebre factors de coagulació abans dels anys 90 es van infectar pel VHC). No obstant, la implementació dels processos d'inactivació viral (1987) i el cribatge de les unitats sanguínies amb tests anti-VHC de primera generació (1990) i segona generació (1992) van reduir dràsticament la transmissió associada a transfusió en països desenvolupats.<sup>8</sup> Actualment amb la implementació de les tècniques NAT per la detecció de l'ARN viral el risc residual de transmetre una hepatitis C per hemoderivats sanguinis s'estima que és de 0,1-2,33 per milió de donacions.<sup>10</sup>

Un altre factor de risc molt important als anys 80 va ser l'ús de drogues intravenoses (prevalença del 50-90% d'exposició viral en drogoaddictes)<sup>11,12</sup>. Actualment, la prevalença d'infecció dins d'aquesta població ha disminuït degut possiblement als programes de metadona i es situa al voltant del 40%<sup>8</sup>. Pel que respecta a les infeccions nosocomials, hi ha un risc important associat a diferents procediments mèdics (endoscòpies gastrointestinals, vials multidosi contaminats, intervencions quirúrgiques invasives...) <sup>13,14</sup>. L'any 2008 es va publicar un estudi epidemiològic retrospectiu de 109 casos d'infecció aguda pel VHC diagnosticats a 18 centres hospitalaris espanyols entre 1998 i 2005 on van observar que el 67% de les infeccions

agudes pel VHC s'havien originat durant un període d'ingrés hospitalari, 9% per ús de drogues intravenoses, 6% per ferides accidentals i 5% per contactes sexuals.<sup>14</sup>

#### 1.4. Història natural de la infecció

Després de l'exposició viral es produeix la fase aguda de la infecció, la qual és asimptomàtica en el 80% dels casos fet que dificulta el diagnòstic. Normalment la infecció es detecta en la fase crònica mitjançant anàlisi clínics rutinaris o bé en el moment de fer una donació de sang.<sup>15</sup> El VHC evadeix amb èxit la resposta immunitària multiespecífica en el 80% dels pacients, els quals evolucionen cap a una cronificació de la infecció (20% restant eliminen espontàniament el virus). De fet, l'hepatitis crònica C no és conseqüència de la destrucció directa dels hepatòcits per part del virus, sinó més bé es deu a una resposta immunitària dèbil que no és suficientment efectiva com per a eliminar els virus del seu reservori, però sí que és capaç de desenvolupar la progressiva inflamació crònica del fetge. En el 30-40% dels pacients, la lesió hepàtica evoluciona cap a cirrosi, malaltia hepàtica terminal i/o hepatocarcinoma entre els 20 - 40 anys posteriors a la infecció<sup>15</sup>, mentre que la resta dels pacients s'estabilitzen i l'evolució de la lesió hepàtica és mínima (Fig. 2).



**Figura 2: Història natural de la infecció pel VHC.** Lim J K. Yale J Biol Med. 2001; 74: 229-237



Actualment, l'hepatocarcinoma degut a infecció pel VHC s'ha convertit en una de les principals causes de trasplantament hepàtic a Europa i als Estats Units.<sup>16,17</sup> Això es deu en part, a la falta d'un tractament antiviral eficaç, principalment en pacients amb el genotip 1 i a la inexistència d'una vacuna protectora.

La història natural de la infecció és difícil d'estudiar degut a una sèrie de factors: 1) el moment de l'exposició viral; 2) la infecció crònica és normalment asimptomàtica; 3) és una malaltia de llarga evolució i, per tant, requereix varies dècades per determinar els "endpoints"; 4) manca de biòpsies hepàtiques abans de les evidències clíniques de dany hepàtic; 5) la majoria de pacients estan sotmesos a teràpia antiviral. No obstant, si que s'han pogut realitzar diversos estudis retrospectius i prospectius per tal d'entendre millor la variabilitat entre individus pel que respecta al "timing" entre la infecció viral i el desenvolupament de la cirrosi hepàtica. S'han determinat molts factors, alguns virals i d'altres relacionats amb l'hoste, que estan clarament associats amb la progressió de la fibrosi hepàtica: l'edat d'infecció, el sexe masculí, l'edat del pacient, el consum d'alcohol, la coinfecció amb el VIH, nivells baixos de CD4<sup>+</sup> (<200 cèl/μl), coinfecció amb el VHB i la raça afroamericana<sup>18-19</sup>. Pel que respecta als factors virals, a diferència de la resposta al tractament antiviral, no sembla que hi hagi una relació directa entre el dany hepàtic i la càrrega viral, el genotip viral o la presència de quasiespècies virals<sup>18,19</sup>.

### **1.5. Història natural de la reinfecció de l'empelt postrasplantament hepàtic**

Tal i com hem mencionat anteriorment, la cirrosi deguda a la infecció pel VHC suposa la principal indicació de trasplantament hepàtic a Europa (30-50%).<sup>20</sup> La recurrència de la infecció viral i reinfecció de l'empelt es produeix de forma universal i precoç<sup>21</sup>. Això no és d'estranyar ja que la majoria dels pacients tenen, en el moment del trasplantament, nivells de virèmia elevats, bé perquè no han estat tractats o bé degut a la manca d'una resposta viral sostinguda al tractament antiviral. La reinfecció ja es produeix a partir de la reperfusió de l'empelt, i a les 72 hores del postrasplantament ja s'aconsegueixen nivells d'ARN viral similars als observats abans del trasplantament<sup>21</sup>. Un 20-30% dels pacients, desenvolupen cirrosi durant els 5 primers anys de la cirurgia<sup>20</sup>, sent la taxa de descompensació de la cirrosi del 65% en 3 anys

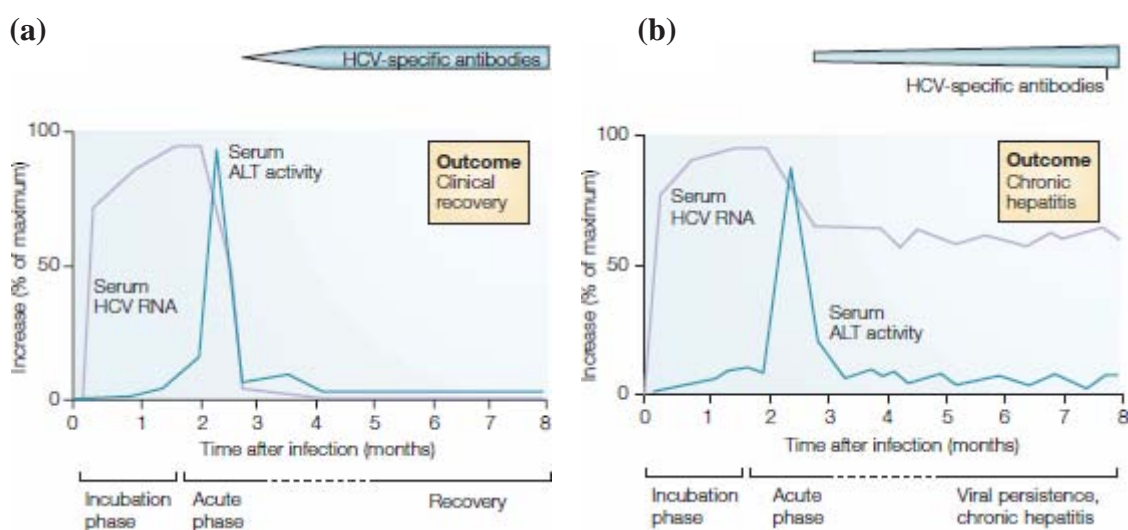
<sup>22,23</sup>

A l'igual que en individus immunocompetents, en individus immunosuprimits existeixen una sèrie de factors implicats en la progressió de la lesió hepàtica i en la recidiva agressiva <sup>24</sup>; 1) fetges procedents de donants cadavèrics majors de 50 anys; 2) temps prolongat d'isquèmia durant la intervenció quirúrgica; 3) infecció per citomegalovirus; 4) diabetis *mellitus*; 5) immunosupressió; 6) coinfecció amb el VIH. En canvi, no s'ha observat una associació entre el genotip del VHC o la càrrega viral i la gravetat de la recidiva. <sup>24</sup>

### 1.6. Diagnòstic i monitorització de la infecció per virus de l'hepatitis C

La fase aguda de la infecció pel VHC és difícil de diagnosticar degut a l'evolució asimptomàtica en el 70% dels pacients, la inexistència d'una prova serològica fiable i específica per a la quantificació d'anticossos IgM i degut a què la majoria dels marcadors virals són comuns entre l'hepatitis aguda i la crònica. Aproximadament el 25% dels pacients amb hepatitis C aguda presenten icterícia i del 10-20% desenvolupen símptomes gastrointestinals (nàusees, vòmits o dolor abdominal) acompanyats d'elevació de les transaminases.

Dels individus infectats pel VHC, el 70-80% evolucionen cap a infecció persistent mentre que el 20-30% restant resolen espontàniament la infecció. La figura 3 mostra la seqüència temporal d'aparició d'anticossos, marcadors de replicació i l'alteració enzimàtica durant la infecció aguda amb evolució cap a resolució espontània (a) o amb evolució cap a persistència viral (b).



**Figura 3. Cinètica dels marcadors del VHC després de la infecció.** Seqüència temporal d'anticossos anti-VHC, ARN VHC i ALT durant la infecció aguda amb evolució cap a resolució espontània (a) o cap a persistència viral (b). [Rehermann B and Nascimbeni M. *Nature Immunology Reviews* 2005; 5: 215-229].

Els anticossos anti-VHC es detecten entre la setmana 6-8 després de l'exposició viral, generalment coincidint amb una elevació de les transaminases, tot i que cal destacar que fins a un 3% dels pacients amb hepatitis crònica C poden no seroconvertir. La presència d'ARN circulant es pot detectar ja a partir de la segona setmana de l'exposició aconseguint nivells de replicació màxims abans de l'aparició dels signes biològics d'hepatitis aguda. L'ARN viral desapareix ràpidament en pacients que resolen espontàniament la infecció o descendeix fins a establitzar-se en pacients que evolucionen cap a hepatitis crònica. Durant la infecció crònica els nivells d'ARN són molt estables i no mantenen cap relació amb la gravetat de la lesió hepàtica<sup>27,28</sup>. En pacients que experimenten una resolució espontània els nivells d'anticossos van disminuint gradualment al llarg del temps, fins desaparèixer al cap d'una dècada de l'exposició viral.

### **1.6.1. Mètodes de detecció dels marcadors virals**

#### **A. Detecció d'anticossos anti-VHC**

La detecció d'anticossos en sèrum es realitza mitjançant tècniques d'immunoassaig enzimàtic (EIA) de tercera generació basats en captura d'anticossos enfront a epítops presents a les proteïnes recombinants virals (core, NS3, NS4 i NS5) fixades a microplaques o microesferes<sup>25,26</sup>. En individus immunocompetents amb hepatitis crònica la sensibilitat i l'especificitat d'aquesta tècnica és >99%<sup>25</sup>. No obstant, existeix un període finestra de 4-8 setmanes des de l'exposició viral fins a la seroconversió que no poden detectar els immunoassajos enzimàtics. A part, aquests tests poden generar falsos negatius en pacients immunodeprimits degut a la disminució del títol d'anticossos<sup>26</sup>. Els resultats positius d'EIA es confirmen mitjançant assajos específics d'immunoblot, els quals contenen els mateixos antígens del VHC que el test EIA, disposats separatament sobre una tira junt amb superòxid dismutasa per a detectar anticossos no específics. Un resultat positiu d'immunoblot queda definit per la reactivitat enfront a dos o més antígens del VHC. La reactivitat enfront a un únic antigen es considera un resultat indeterminat, mentre que l'absència de reactivitat enfront als antígens virals o la reactivitat solament enfront a SOD es considera un resultat negatiu. Els immunoblots presenten

generalment menor sensibilitat però major especificitat que el mètode EIA, per tant, resulta perfecte com a test confirmatori <sup>26</sup>.

### **B. Determinació de l'ARN VHC circulant**

L'assaig més específic per a la determinació de la infecció viral és la detecció de l'ARN VHC mitjançant tècniques de PCR o d'amplificació isotèrmica mitjançant transcripció (TMA) <sup>26-30</sup>. La determinació de l'ARN circulant pot ser qualitativa (present o absent) o quantitativa (nombre de còpies virals expressat en unitats internacionals). Existeixen dos tècniques d'amplificació per a la detecció qualitativa de l'ARN viral, basades en PCR i TMA <sup>26,27,30</sup>. Degut a la seva elevada especificitat (>99%) i el baix límit de detecció que presenten (50 UI/ml i 10 UI/ml, respectivament), són tècniques especialment útils per detectar períodes finestra (presència d'ARN VHC sense seroconversió) o presència de virèmia en pacients immunodeprimits.

El mètode de la PCR quantitativa és útil per a predir la resposta al tractament i les recurrències, tot i que la virèmia no correlaciona amb la severitat de l'hepatitis i la progressió de la fibrosi <sup>28</sup>. Existeixen diferents tècniques comercials disponibles per a la quantificació de l'ARN viral amb un límit inferior de detecció de 20-615 UI/ml, una especificitat >98-99% i normalment són independents del genotip viral <sup>29-30</sup>.

### **C. Determinació del genotip viral**

El coneixement del genotip viral és essencial per a la predicció de la resposta i la monitorització del tractament antiviral. El mètode de referència és la seqüenciació directa de les regions NS5B, E1 o E2 del genoma viral circulant, seguit de l'alineament i l'anàlisi filogenètic amb seqüències consens. No obstant, en clínica s'utilitza mètodes comercials basats en la seqüenciació de la regió 5' no codificant o en la hibridació inversa del producte amplificat amb sondes específiques de genotip de la mateixa regió fixada a un suport de nitrocel·lulosa. Els dos mètodes detecten correctament els 6 genotips principals, tot i que no aconsegueixen identificar el subtipus en el 10-25% dels casos (a la pràctica clínica no té rellevància). També hi ha tècniques de detecció de serotip del VHC basades en EIA competitiu. No obstant, aquesta tècnica només permet identificar el genotip en el 90% dels pacients immunocompetents, tot i

que no és infreqüent la reactivitat mixta enfront a més d'un serotip i la tècnica no permet identificar el genotip real del virus circulant<sup>25,26,29</sup>.

### 1.6.2. Mètodes d'avaluació del dany hepàtic

Per a determinar el grau de dany hepàtic normalment s'utilitza la biòpsia hepàtica tot i que presenta limitacions tals com la variabilitat entre mostres i la severitat entre els possibles efectes secundaris, principalment en pacients amb coagulopaties o ascitis<sup>31-33</sup>. Actualment s'estan avaluant altres tècniques no invasives per determinar el dany hepàtic, tals com els marcadors serològics, els mètodes radiològics o els estudis genètics<sup>34</sup>. Els marcadors bioquímics utilitzats per a l'avaluació del dany hepàtic són la bilirubina i l'albumina<sup>35</sup>. Pel que respecta als mètodes d'imatges cal destacar l'elastografia hepàtica (Fibroscan)<sup>36</sup>.

### 1.6.3. Algoritme de cribatge pel VHC al Banc de Sang i Teixits de Catalunya

Actualment, el mètode de cribatge pel VHC al Banc de Sang i Teixits de Catalunya és la determinació d'anticossos anti-VHC per EIA i, en cas positiu, la realització del RIBA com a tècnica confirmatòria. Simultàniament es determina l'ARN VHC en mostra individual mitjançant la tecnologia TMA (límit de detecció 3,6 UI/ml). Un resultat positiu de TMA és confirmat mitjançant una PCR "in house" específica del VHC amb un límit de detecció de 17 IU/ml. L'algoritme utilitzat en el Banc de sang i Teixits de Catalunya pel cribatge de VHC està especificat a la figura 4.

#### **Interpretació de l'algoritme:**

1. Resultats negatius d'anti-VHC i d'ARN VHC, el donant no presenta infecció pel VHC i el producte és apte per a la transfusió.
2. Resultats positius d'anticossos per EIA acompanyats d'una càrrega viral positiva (TMA positiu) estem davant d'una infecció crònica pel VHC. Només en els casos amb resultats de donacions prèvies de laboratori negatius i ALT elevades estarem parlant d'una infecció aguda pel VHC. Al donant se l'exclou definitivament com a donant de sang.

3. Resultats positius d'EIA amb càrrega viral negativa (TMA negatiu). En aquests casos es realitza un test confirmatori de RIBA:

- a) Si el RIBA és negatiu, el pacient es considera no infectat pel VHC i fals positiu d'EIA. Pot tornar a donar sang.
- b) Si el RIBA és positiu el pacient representa un dels 20-30% dels casos de resolució espontània de la infecció. S'exclou definitivament de la donació.
- c) Si el RIBA és indeterminat pot ser una resolució espontània del VHC amb pèrdua d'anticossos o bé un fals positiu de la tècnica. S'exclou permanentment al donant de sang.

4. Resultats negatiu d'anticossos (EIA negatiu) i ARN VHC positiu estem davant d'un període finestra de VHC, és a dir, d'una infecció recent que encara no ha seroconvertit i s'exclou definitivament al donant.

Els punt 2, 3 i 4 anteriorment citats segueixen la normativa dels Bancs de Sang del Real Decret 1088/2005 i es confirmen, amb la mesura del possible, amb una segona mostra del donant.

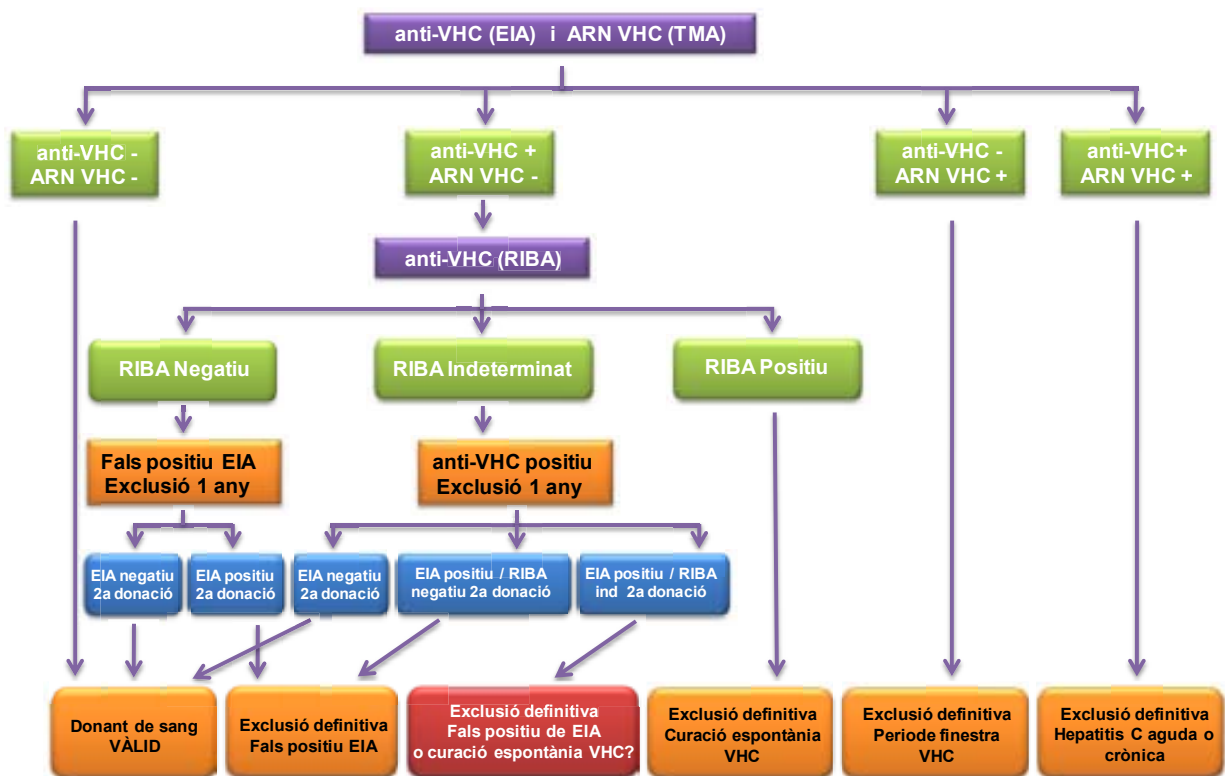


Figura 4. Algorisme de cribatge pel VHC al Banc de Sang i Teixits de Catalunya

### 1.7. Immunitat innata i adquirida en la infecció pel VHC

La relació entre el VHC i l'hoste és dinàmica; el virus intenta silenciar la seva presència per poder coexistir, mentre que el sistema immunitari de l'hoste intenta eliminar la infecció viral sense autolesionar-se. El balanç entre aquestes dos forces biològiques depèn de la cinètica de replicació del virus, així com de la qualitat i la quantitat de la resposta del sistema immunitari.

#### 1.7.1. Immunitat innata: sistema de l'interferó

El sistema del interferó tipus I, el qual involucra principalment IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ , és un sistema de defensa intracel·lular universal i poderós enfront als diferents virus <sup>37</sup> (Fig. 5). La via de senyalització dels IFN- $\alpha/\beta$  activa l'expressió de més de 300 gens implicats en l'estimulació d'IFN (ISGs) els quals presenten funcions antivirals, antiproliferatives i immunomoduladores. Les proteïnes induïdes per l'IFN inclou enzims, factors de transcripció, glicoproteïnes de superfície cel·lular, citocines, quimiocines i un elevat nombre de factors que encara no han estat caracteritzats <sup>38</sup>. En la figura 5 s'esquematitza el procés d'activació del sistema de l'interferó tipus I com a resposta inicial hepàtica de l'hoste enfront la infecció pel VHC <sup>38-40</sup>.

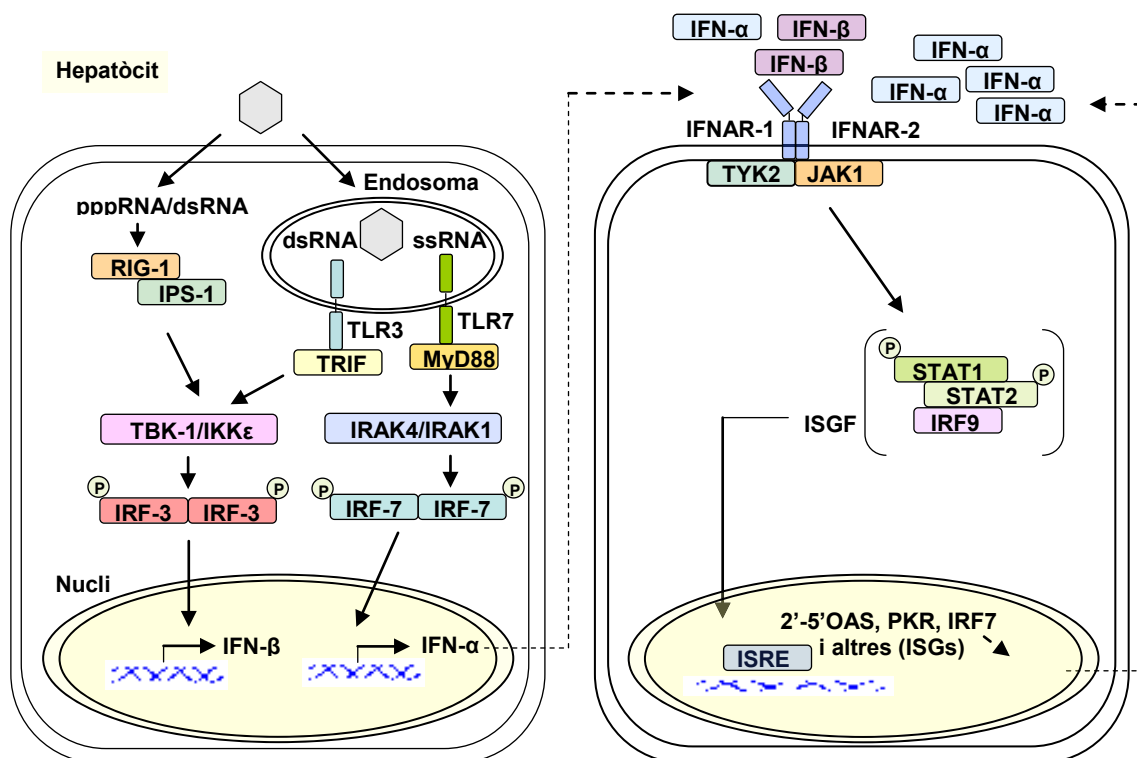
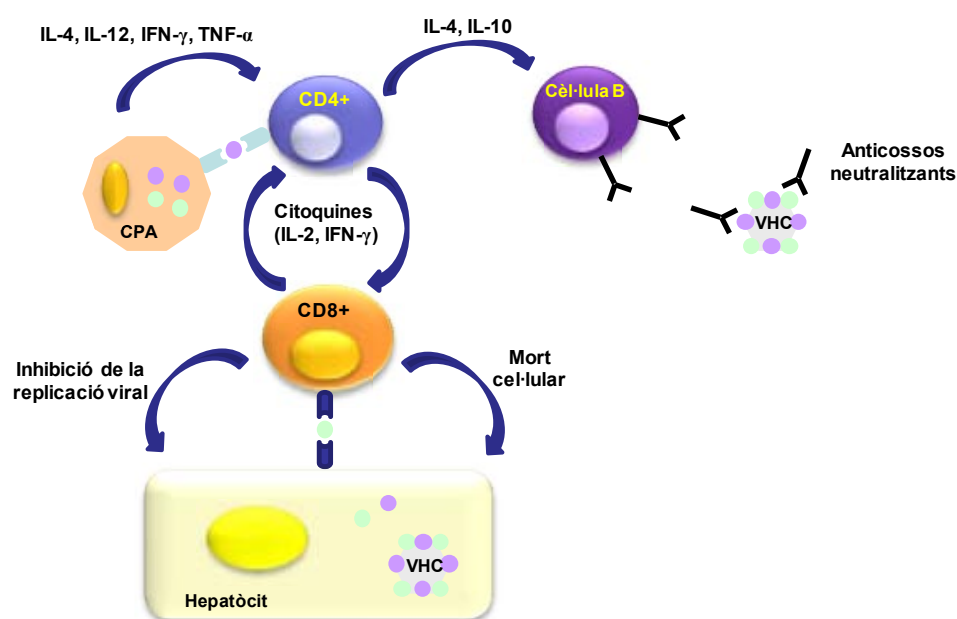


Figura 5: Resposta immune innata. Via senyalització de l'IFN- $\alpha/\beta$ .

### 1.7.2. Immunitat adaptativa

Diversos estudis han demostrat que les respostes de les cèl·lules  $CD4^+$  i  $CD8^+$  específiques del VHC són essencials per a l'eliminació viral (Fig. 6) <sup>41-45</sup>. Les cèl·lules  $CD8^+$  són les principals cèl·lules efectores amb capacitat antiviral. Aquestes reconeixen de manera antigen específica els pèptids virals presentats per les molècules HLA de classe I, presents a la superfície de les cèl·lules infectades, i activen tant els mecanismes antivirals amb capacitat citolítica (eliminació dels hepatòcits infectats) com no citolítica (secreció d'IFN- $\gamma$  i de TNF- $\alpha$ , que eliminen o suprimeixen la replicació viral sense generar la mort de l'hepatòcit infectat). Per altra banda, les cèl·lules  $CD4^+$  reconeixen els pèptids virals presentats per les molècules HLA de classe II, presents a la superfície de les cèl·lules presentadores d'antigen, tot començant un procés d'expansió i diferenciació clonal cap a cèl·lules  $CD4^+$  helper tipus Th1 (productores d'IL-2, d'IFN- $\gamma$  i de TNF- $\alpha$ ) i Th2 (productores d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6 i d'IL-10). Les citocines Th1 produïdes pels limfòcits  $CD4^+$  són essencials per a la inducció i el manteniment de les respostes  $CD8^+$  citotòxiques, mentre que les citocines tipus Th2 estimulen la producció d'anticossos per part de les cèl·lules B. En individus immunocompetents, tot i la presència d'anticossos enfront a les proteïnes virals, aquests no són neutralitzants i, per tant, no poden eliminar el virus ni protegir de reexposicions futures.

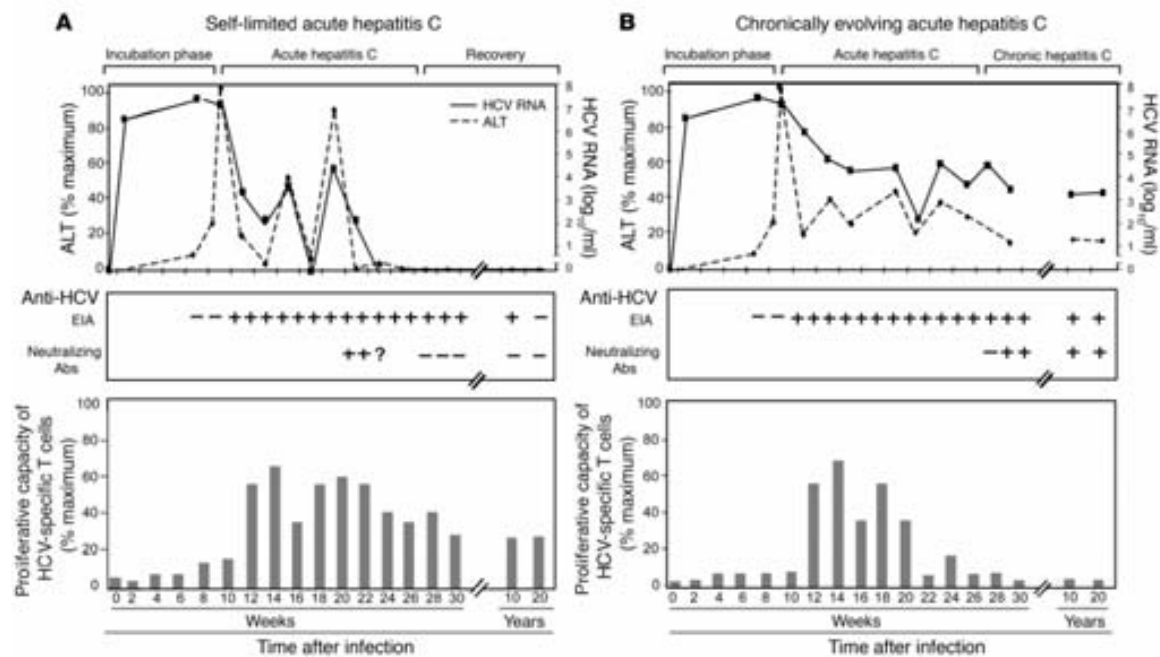


**Figura 6: Immunitat adaptativa en la infecció pel VHC**



### A. Fase aguda en la infecció pel VHC

El perfil de resposta immune enfront al VHC ha estat àmpliament estudiat en humans i ximpanzés, i ha permès determinar la correlació entre el tipus i el vigor de la resposta i la persistència o resolució de la infecció <sup>41-63</sup> (Fig. 7).



**Figura 7: Curs clínic i virològic de la infecció aguda per VHC. a)** Evolució cap a la resolució espontània de la infecció. **b)** Evolució cap a la persistència viral. [Rehermann B. *J Clin Invest* 2009; 119(7): 1745-1754].

En l'hepatitis aguda, la replicació es detecta ja des de la primera setmana de la infecció, arribant al seu pic màxim a les quatre setmanes. La resposta CD8 citotòxica coincideix amb l'elevació de les transaminases (ALT) a les 6 – 8 setmanes de la infecció. Inicialment es tracta de limfòcits CD8<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> que no produeixen interferó, molt eficaços en la destrucció dels hepatòcits infectats però, per si sols, incapaços de controlar el nivell de replicació viral i acabar amb la infecció. Quasi simultàniament, apareix una resposta CD4<sup>+</sup> potent i multispecífica, productora de citocines tipus Th1 (IFN- $\gamma$  i IL-2), que coincideix amb una disminució de la càrrega viral, normalització de les transaminases i un canvi fenotípic (pèrdua d'expressió de CD38) i funcional (producció d'IFN- $\gamma$ ) en els limfòcits CD8<sup>+</sup> <sup>43,49</sup>. Els perfils d'activació gènica dels hepatòcits en fase aguda de ximpanzés infectats, mostren una correlació directa entre l'expressió de gens induïts per l'IFN- $\gamma$  e l'inhibició de la replicació viral, que suggereix que el

VHC és susceptible a les citocines alliberades pels limfòcits CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, i especialment a l'IFN- $\gamma$ <sup>47,51</sup>. La persistència de la resposta CD4<sup>+</sup> Th1 s'associa amb l'erradicació completa de la infecció i, per tant, la resolució espontània (Fig. 7a), mentre que l'absència d'una resposta CD4<sup>+</sup> Th1 o una marcada reducció en la intensitat de resposta genera la reaparició viral i la instauració de la infecció persistent (Fig. 7b)<sup>37</sup>.

En els pacients que resolen la infecció, tant la resposta CD4<sup>+</sup> Th1 com la resposta CD8<sup>+</sup>, es manté de forma indefinida, mentre que el nivell d'anticossos anti-VHC disminueix progressivament fins desaparèixer durant la primera o la segona dècada postexposició<sup>37</sup>. Això explica la freqüent detecció de resposta immune cel·lular en pacients seronegatius amb elevat risc d'exposició viral<sup>60,61</sup> i especialment en dones de pacients portadors (anti-VHC positiu i ARN VHC positiu)<sup>61,62</sup>, confirmant que l'exposició i resolució espontània de la infecció pel VHC és molt més freqüent del que els tests serològics poden detectar. La immunitat generada en individus amb infecció resolta espontàniament no protegeix totalment de la reinfecció, tot i que sembla que presenten menys risc a la reinfecció que els individus que mai han estat infectats pel virus<sup>63</sup>.

### **B. Infecció crònica C**

La infecció persistent es caracteritza per la compartimentarització intrahepàtica de limfòcits CD8<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> disfuncionals<sup>64</sup>, amb fenotip anèrgic<sup>65-67</sup> (incapacitat de produir IFN- $\gamma$  i IL-2) capaços de reconèixer i destruir els hepatòcits infectats, i la presència de limfòcits T CD8<sup>+</sup> específics d'antigen amb funció reguladora / inhibidora<sup>65</sup>. En sang perifèrica i fetge, hi ha presència de limfòcits CD4<sup>+</sup> anèrgics amb poca resposta secretora Th1 (IFN- $\gamma$  i IL-2) o Th2 (IL-10 i IL-4)<sup>52,66</sup>, i poca capacitat proliferativa per l'alteració de la producció d'IL-2<sup>59</sup>, i un excés de limfòcits T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> amb activitat reguladora<sup>67</sup>. La incapacitat de l'hoste per controlar la replicació viral en la infecció crònica C és sorprenent, ja que l'expressió hepàtica de molècules d'HLA, molècules d'adhesió i Fas està augmentada i hauria d'afavorir la citòlisi dels hepatòcits infectats. Tot i que la resposta immune específica és massa dèbil per eliminar la infecció, és suficientment activa per induir lesió hepatocel·lular de lenta evolució. Això és possible ja que la capacitat citolítica de les cèl·lules T específiques del VHC és relativament fàcil d'induir amb petites dosi d'antigen i no requereix l'activació completa dels limfòcits T<sup>65</sup>.

### 1.8. Mecanismes de persistència viral

El mecanisme determinants de la persistència del VHC és desconegut. El VHC utilitza diverses estratègies per evadir els mecanismes de defensa intracel·lular entre ells l'acció de l'interferó  $\alpha/\beta$ , tant endogen com exogen, mitjançant una complexa combinació de processos que inclouen la interferència de les cascades de senyalització, la modulació de l'acció efectora i la contínua variació genètica (quasiespècies virals). Això permet la persistència i replicació intracel·lular del virus sense la destrucció de l'hepatòcit infectat, tot i que no explica la persistència de la infecció després de la instauració de la resposta immune adaptativa.

#### 1.8.1. Mecanismes d'evasió de la resposta immune innata

Una de les estratègies que utilitza el VHC per evadir els mecanismes de defensa intracel·lular és la inhibició de la via de síntesis de l'interferó  $\alpha/\beta$  mitjançant una complexa combinació de processos<sup>37-40</sup> (Fig. 8).

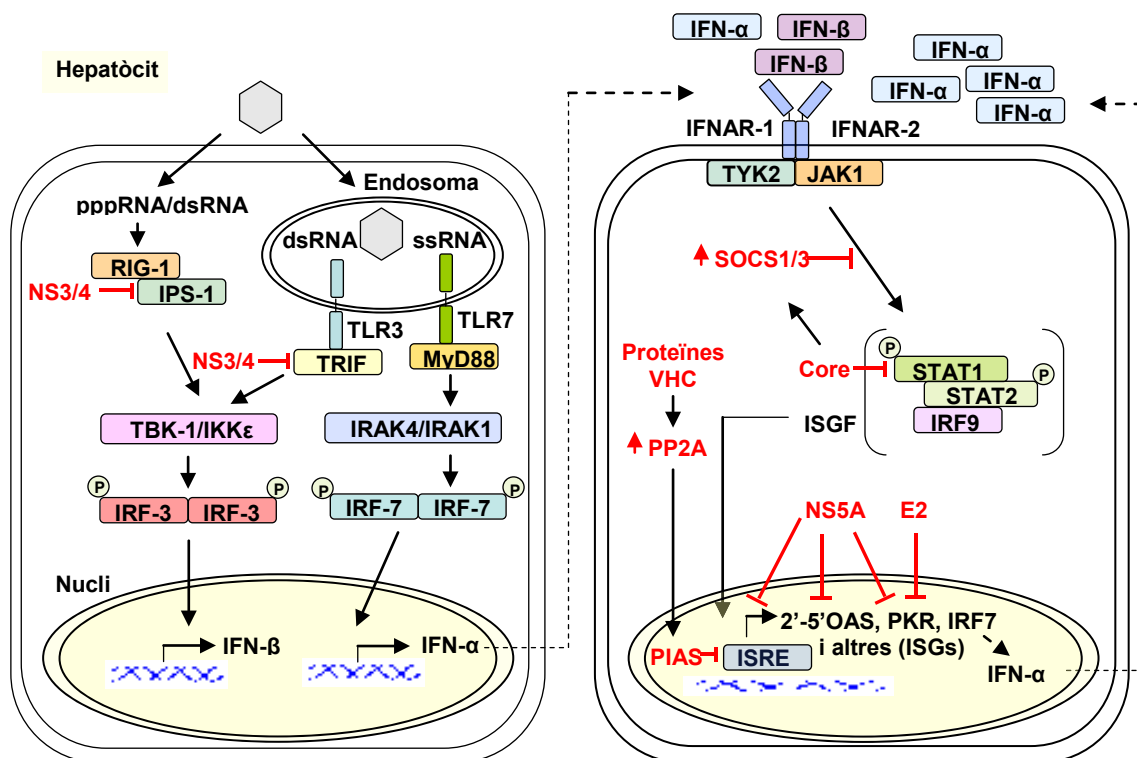


Figura 8: Mecanismes d'evasió de la resposta immune innata pel virus

Totes aquestes estratègies d'escapament viral s'han identificat bioquímicament o mitjançant cultius cel·lulars transfectats, i per tant, s'hauria de comprovar directament al fetge infectat. Tal i com explicarem posteriorment, els nous inhibidors de les proteïnes virals que estan actualment en fases de desenvolupament podrien no solament inhibir el processament de la poliproteïna viral, sinó que també podrien restaurar la resposta immune innata.

## **1.8.2. Mecanismes d'evasió de la resposta immune adaptativa**

### ***A. Mecanismes d'escapament mutacional***

El VHC presenta una elevada taxa mutacional degut a l'elevada velocitat de replicació i la carència d'activitat correctora de l'ARN polimerasa viral. Això genera que el virus aïllat d'un sol individu presenti una gran diversitat de subtipus virals anomenades quasiespècies, les seqüències de les quals varien en pocs nucleòtids. Aquest fet provoca canvis en els epítops reconeguts tant per les cèl·lules B com per les cèl·lules T, i en conseqüència, els anticossos i els limfòcits CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> específics del virus no són capaços de reconèixer i neutralitzar els nous mutants<sup>68,69</sup> (Fig. 9). Un estudi molt recent mostra que les mutacions virals es produeixen més freqüentment en epítops MHC de classe I<sup>70</sup>. Molts estudis han demostrat l'aparició de mutants d'escapament enfront a la resposta CD8<sup>+</sup><sup>71-74</sup>, tot i que aquests apareixen i queden fixats durant la infecció aguda degut a l'alteració funcional precoç de la resposta citotòxica<sup>74</sup>. A més, la glicoproteïna E2 es caracteritza per presentar a l'extrem N-terminal una regió amb una taxa mutacional altíssima, anomenada regió hipervariable (HVR-1), la qual confereix propietats d'escapament del sistema immunitari de l'hoste<sup>70</sup>.

### ***B. Exhaustiment de la resposta de les cèl·lules T***

Un altre dels mecanismes d'evasió del VHC a la resposta immune adaptativa pot ser l'alteració primària en la inducció de la resposta de les cèl·lules T, o l'esgotament d'una resposta cel·lular inicialment vigorosa<sup>42-55</sup>. Els mecanismes responsables d'ambdós alteracions no estan clars, tot i que es suggereix que la presentació de l'antigen per part de les cèl·lules dendrítiques i els macròfags estaria deteriorada resultant en l'activació poc efectiva de les cèl·lules T<sup>75,76</sup>. Recordar que les cèl·lules dendrítiques reconeixen els antígens estranys i propis als teixits

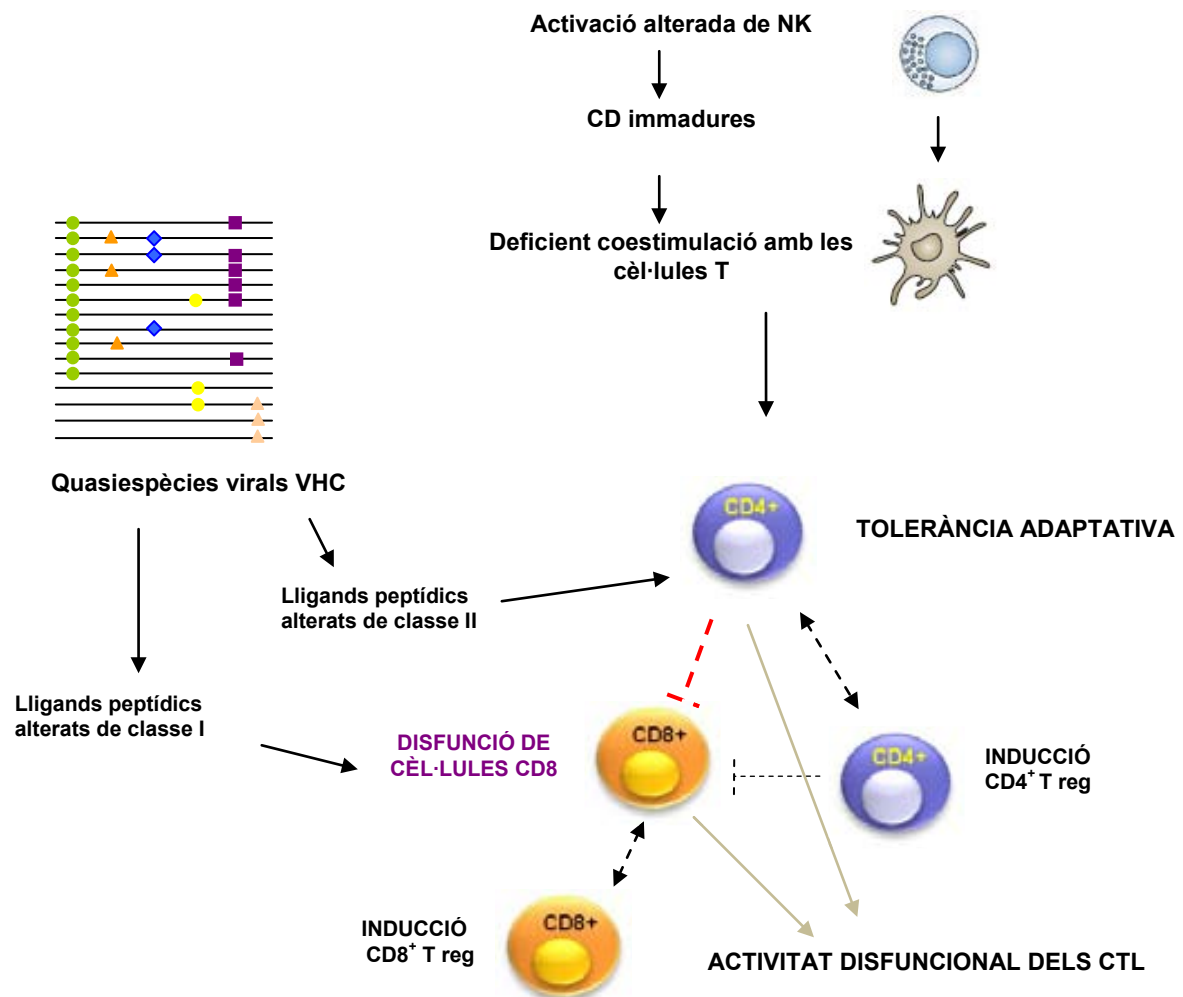
perifèrics, els capturen i els processen, migren cap als teixits limfoides, expressen les molècules coestimuladores, i presenten els pèptids a través de les molècules HLA de classe I i II generant l'activació de la resposta CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> respectivament. Aquests antigens exògens provinents de patògens indueixen a les cèl·lules dendrítiques un procés de maduració caracteritzat per gran capacitat migratòria, la presentació de l'antigen i l'activació dels limfòcits T. Les CD madures a part d'expressar les molècules coestimuladores necessàries per presentar correctament l'antigen e induir una resposta cel·lular eficaç, són capaces de secretar TNF- $\alpha$  i IL-12 que facilita la polarització de la resposta cel·lular del tipus Th1, és a dir, productora d'IFN- $\gamma$  i d'IL-2<sup>77, 78</sup>, i resistència a la infecció viral<sup>79</sup>. Estudis realitzats *in vivo* amb cèl·lules dendrítiques de sang perifèrica de pacients amb la infecció persistent, demostren una capacitat alloestimuladora deficient, correlacionada amb la disminució en la secreció d'IFN- $\gamma$  i d'IL-12<sup>80-82</sup>. Varis estudis també demostren que la proteïna del core bloqueja la maduració de les CD i provoca una activació anormal dels limfòcits CD4<sup>+</sup><sup>80</sup>, al igual que suprimeix la inducció de la resposta T citotòxica. A més, la proteïna del core s'uneix al receptor del complement C1q present a les cèl·lules T i als macròfags, disminuint la síntesi d'IL-12 en macròfags i disminuint la proliferació, producció d'IL-2 i d'IFN- $\gamma$  per part dels limfòcits T específics<sup>83</sup>. Altres estudis han demostrat que aquestes cèl·lules T específiques disfuncionals expressen el receptor d'inhibició PD-1 a la superfície<sup>84</sup>, el qual és el resultat de l'estimulació antigènica persistent i disminueix quan apareixen canvis en els epítops de les cèl·lules T degut a mutants del VHC. La interacció del PD-1 amb el seu lligand, PD-L1 (expressat en cèl·lules endotelials, cèl·lules Kupffer, cèl·lules estrellades i hepatòcits exposats a IFN tipus I en el fetge), inhibeix la seva funció efectora i indueix l'apoptosi de les cèl·lules T<sup>85</sup>. Per altra banda un excés de l'estímul antigènic en condicions subòptimes de coestimulació podria donar lloc a la depleció de cèl·lules T específiques del virus com ja s'ha demostrat en el cas del virus de la coriomeningitis limfocítica (LCMV)<sup>86</sup> en ratolins adults o la ràpida inducció de la mort cel·lular induïda per activació, en aquest cas en el fetge<sup>87</sup>.

### C. Anèrgia funcional

El mecanisme possiblement més important d'evasió del sistema immune és l'anèrgia funcional de les cèl·lules T específiques del VHC. Les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> presenten alteracions en la capacitat de proliferació, citotòxica, i de secreció d'IFN- $\gamma$  i de TNF- $\alpha$  després de l'estimulació antigènica, presentant un fenotip "atordit" (de l'anglès, *stunned*). Aquesta disfunció dels limfòcits CD8<sup>+</sup> ja s'observa des de les primeres etapes de la fase aguda independentment de l'evolució de la infecció<sup>88-92</sup>. No obstant, en pacients amb un curs autolimitat de la infecció, la recuperació de les funcions de les CD8<sup>+</sup> s'associen en el temps amb un significat descens de la virèmia i la resolució de la malaltia. En contra, la funció de les CD8<sup>+</sup> es manté suprimida en pacients que evolucionen cap a la cronificació<sup>92</sup>. De forma interessant, aquestes alteracions funcionals de les CD8<sup>+</sup> específiques del VHC també s'associen amb un fenotip de diferenciació immadur<sup>93</sup>. A més, les cèl·lules CD8<sup>+</sup> intrahepàtiques específiques del VHC també estan alterades en la seva capacitat de síntesi d'IFN- $\gamma$ , tot i que s'acumulen en grans quantitats al fetge<sup>58</sup>. Hi ha més evidències de què les cèl·lules T reguladores (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) contribueixen a la disfunció de les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> específiques del VHC, tot i que es desconeix el mecanisme<sup>65, 67</sup>. També s'ha identificat una població de cèl·lules T reguladores CD8<sup>+</sup> intrahepàtiques productores d'IL-10 les quals podrien afavorir la persistència viral, però evitant la progressió de la fibrosi<sup>65, 94</sup>.

En resum, diferents mecanismes poden contribuir a l'evasió de la resposta immune adaptativa per part del virus. No obstant, hi ha evidències de què la instauració precoç de la tolerància de la resposta CD4<sup>+</sup> juga un paper molt important en la persistència viral. De fet, les característiques de la resposta immune durant la infecció crònica (persistència CD8<sup>+</sup> de memòria amb alteració funcional i fenotip anèrgic incapaces d'induir noves respostes citotòxiques i esgotament de les respostes CD8<sup>+</sup>) són similars a les d'altres infeccions cròniques establertes en absència de limfòcits T CD4<sup>+</sup> *helper*, la presència i activitat dels quals és imprescindible per mantenir una resposta CD8<sup>+</sup> efectora, mantenir la supervivència cel·lular en presència de l'antigen persistent i permetre l'expansió d'una resposta de memòria enfront a la reexposició de l'antigen<sup>95-102</sup>. En ximpanzés curats espontàniament, s'ha demostrat que la neutralització de limfòcits CD8<sup>+</sup> mitjançant anticossos monoclonals allarga la virèmia després

de la reinoculació, però la infecció es resol després de la reparació espontània al fetge de  $CD8^+$  específics del virus <sup>103</sup>. En canvi, en el mateix model experimental, l'ablació dels  $CD4^+$  dona lloc a la infecció persistent després de la reinoculació viral <sup>104</sup>.



**Figura 9. Mecanismes d'evasió de la resposta immune adaptativa pel VHC**

Les causes que podrien determinar l'absència d'una resposta  $CD4^+$  eficaç podrien ser diverses:

1. La presentació de l'antigen per cèl·lules no professionals en absència d'una coestimulació apropiada donaria lloc a un defecte primari en la inducció d'una resposta Th adequada, tot i que en la majoria de les infeccions agudes sembla desenvolupar-se una resposta Th amb capacitat de controlar la replicació de forma transitòria <sup>42, 44, 50</sup>.

2. L'excés d'estimulació antigènica en condicions subòptimes de coestimulació donaria lloc a la delecció de la resposta Th específica d'antigen <sup>100</sup>. No obstant, la dèbil resposta Th in *vitro* durant la infecció persistent no es deu a la delecció o ignorància de la resposta CD4<sup>+</sup>. La disminució de la càrrega viral durant el tractament antiviral <sup>105-108</sup> o durant les primeres fases després del transplantament hepàtic <sup>109, 110</sup> és suficient per a la ràpida reparició de la resposta efectora CD4<sup>+</sup> Th1 en la majoria dels casos.

### 1.9. Mecanismes de tolerància dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> i VHC

S'ha descrit que l'inducció de la tolerància perifèrica enfront a l'antigen exogen podria instaurar-se per dos mecanismes <sup>111-115</sup>:

1. Expansió de limfòcits T reguladors (Treg) específics d'antigen
2. Inducció d'anèrgia perifèrica específica d'antigen

En el cas de la infecció pel VHC, una de les hipòtesis és que l'anèrgia perifèrica es produeix per la interacció del receptor antigènic del limfòcit CD4<sup>+</sup> amb lligands peptídics alterats (LPA) <sup>116</sup>. Aquests no són més que mutants agonistes parcials o antagonistes d'epítops antigènics en els que un canvi d'aminoàcid permet la seva unió al receptor però no l'activació completa de la cèl·lula. L'activació incompleta dona lloc a un estat d'anèrgia caracteritzat per la pèrdua de capacitat proliferativa i de secreció d'IL-2, que impedeix l'expansió clonal de la cèl·lula tot i la presència d'IL-2 exògena. Les cèl·lules anèrgiques, tot i la seva incapacitat per a l'expansió clonal, poden mantenir certa funció efectora (secreció d'IL-10), i mantenir capacitat citolítica <sup>116,117</sup>. Per altra banda, els limfòcits CD4<sup>+</sup> toleritzats per epítops mutats tenen capacitat reguladora i suprimeixen la resposta de les cèl·lules *naïve* o de memòria de forma antigen-específica i dosis-dependent. També poden exercir supressió creuada i suprimir la resposta de limfòcits T enfront a altres epítops copresentats per la mateixa cèl·lula presentadora d'antigen <sup>118,119</sup> i la cèl·lula anèrgica pot adquirir fenotip regulador o induir-lo a altres cèl·lules durant la seva interacció amb la cèl·lula dendrítica.

Tenint en compte la ràpida replicació del VHC i la seva extrema variabilitat genètica, l'estructura en quasiespècies, i la contínua generació d'epítops mutants amb activitat agonista parcial o antagonista, la instauració de la tolerància adaptativa de la resposta CD4<sup>+</sup> en la infecció pel



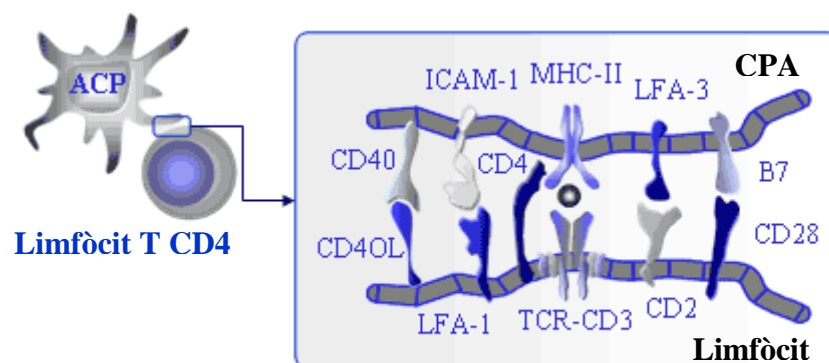
VHC sembla inevitable. De fet, sembla existir una correlació evident entre el tamany del inòcul infectant i, per tant, el grau de la seva complexitat genètica i l'evolució de la infecció, de forma que un elevat percentatge de pacients exposats a inòculs petits, redueixen al màxim la diversitat de la població viral infectant i resolen la infecció espontàniament. Així, s'ha observat resposta immune cel·lular específica d'antígens (principalment proteïnes no estructurals virals), en absència de seroconversió o virèmia en drogoaddictes, personal sanitari, nou-nats de mares portadores o contactes sexuals de persones infectades <sup>120,121</sup>. En aquestes situacions, l'homogeneïtat de la població viral que inicia la infecció impediria generar la diversitat suficient per a induir tolerància enfront a una resposta CD4<sup>+</sup> multispecífica que eradicaria la infecció ràpidament.

S'han descrit epítops mutants antagonistes o inductors de secreció d'IL-10 tant en proteïnes estructurals com en no estructurals del VHC així com presència de limfòcits T reguladors, tant CD4<sup>+</sup> com CD8<sup>+</sup>, en pacients amb infecció persistent <sup>122</sup>. L'aparició de mutants inductors d'anèrgia en algun dels epítops immunodominant d'una proteïna estructural com la NS3 té un efecte dramàtic sobre la resposta Th1 global enfront al virus <sup>123-126</sup>.

## 1.10. Altres aspectes immunològics rellevants en la infecció pel VHC

### 1.10.1. Activació de limfòcits T CD4<sup>+</sup>

L'activació dels limfòcits T *naïve* es produeix després del reconeixement per part del TCR/CD3 de la molècula HLA i el pèptid presentat per les cèl·lules presentadores d'antigen juntament amb altres processos, com són l'activació d'altres molècules coestimuladores presents a la membrana, les quals són necessàries per a la correcta activació del limfòcit T (Fig. 10) <sup>126-128</sup>.



**Figura 10: Molècules que participen en la sinapsi entre el limfòcit T i la cèl·lula presentadora d'antigen.** [Muñoz E, Peña J].

Per a l'activació del limfòcit T CD4<sup>+</sup> són necessàries dues senyals; la primera senyal, és la que indueix el receptor del limfòcit T (TCR) amb el complex MHC-Ag, que juntament amb la molècula d'adhesió LFA-1, indueix l'expressió del CD154 (CD40L) a la cèl·lula T responedora; en segon lloc, el CD40L interacciona amb el CD40 present a la membrana de les CPA generant l'estimulació bidireccional, és a dir, transmeten senyals d'activació al limfòcit T i activant la cèl·lula presentadora d'antigen i induint la síntesi de molècules B7 (CD80 i CD86). Les molècules B7 s'uneixen amb el CD28 de les cèl·lules T<sup>128-133</sup> i produeixen la segona senyal necessària per a l'activació completa del limfòcit i evitar així la inducció d'anèrgia cel·lular. No obstant, hi ha molècules relacionades amb el CD28, tals com el CTLA-4 (CD152), que també s'expressen a la superfície del limfòcit T i són lligands de les molècules B7. El CTLA-4 s'uneix a les molècules B7 amb una afinitat 20 vegades superior al CD28, i indueix senyals inhibidores a les cèl·lules T activades. Aquesta interacció fa que les cèl·lules T siguin menys sensibles a ser estimulades i limita la producció d'IL-2, evitant així la seva proliferació.

La interacció CD40/CD40L és imprescindible per l'activació de les CD4<sup>+</sup>, ja que la carència d'interacció resulta en una expansió ineficient de cèl·lules T específiques d'antigen, en una reducció en la producció d'IL-12 per cèl·lules dendrítiques i macròfags i la polarització de la resposta immune cap a un tipus Th2<sup>134-137</sup>. Estudis *in vivo* han demostrat que els limfòcits T CD4<sup>+</sup> dels pacients en tractament amb RBV presenten un augment de l'expressió del CD154 en la superfície, fet que es correlaciona amb l'augment de l'activitat CTL així com l'efecte antiviral important de la ribavirina<sup>138</sup>.

### 1.10.2. Regulació de l'homeòstasi de les cèl·lules T

Els mecanismes homeostàtics controlen el tamany del *pool* de cèl·lules T madures, originant un progressiu augment del nombre de limfòcits T en l'etapa de joventut seguit d'un manteniment constant en l'etapa adulta, per tant, la proporció de cèl·lules T amb fenotip *naïve* vs. madur reverteix gradualment amb l'edat degut a l'exposició antigènica. La proliferació de les cèl·lules T perifèriques es pot produir inclús en absència d'activació per tal de mantenir el *steady-stage*, i s'anomena proliferació basal o espontània. Pel manteniment de l'homeòstasi es requereix un equilibri molt delicat entre els mecanismes que regulen la proliferació i la mort cel·lular. Les citocines amb cadena  $\gamma$ c, concretament la IL-7 i la IL-15, i els contactes amb els complexos MHC que presenta pèptids propis juguen un paper decisiu en l'homeòstasi, tant de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> com de CD8<sup>+</sup>, i tant en cèl·lules de memòria com en *naïve*<sup>139-143</sup>.

Els antígens patogènics activen els limfòcits T *naïve* induint l'expansió massiva durant uns dies, la qual va acompanyada de l'adquisició de les funcions efectores requerides per l'eliminació del patogen. Les cèl·lules T *naïve* (CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>) abans de veure l'antigen presenten un elevat nombre de receptors de la IL-7 (IL-7R $\alpha$ ) a la superfície cel·lular a través dels quals mantenen la supervivència cel·lular. Amb l'activació antigènica, s'indueix la producció de la IL-2 la qual inhibeix la transcripció i traducció del IL-7R $\alpha$ , tot i que indueix la síntesi d'altres receptors de citocines, tals com la IL-2R $\alpha$  (CD25), la IL-4R $\alpha$  (CD124) i la IL-15R $\alpha$ . Per tant, durant l'etapa de resposta cel·lular efectora per part de les cèl·lules T, aquestes sobreviuen gràcies a la IL-2 i la IL-15, i no pas per la via de senyalització de la IL-7. La majoria de cèl·lules efectores moren al cap de poques setmanes, coincidint amb la resolució de la infecció, però una petita fracció sobreviuen gairebé indefinidament com a cèl·lules T de memòria<sup>139, 140</sup>. Aquestes cèl·lules T de memòria, tornen a presentar un elevat nombre d'IL-7R i una disminució del IL-15R.

### **Cèl·lules T CD8<sup>+</sup> de memòria**

L'estimulació antigènica via TCR no sembla ser important en la supervivència de les cèl·lules CD8<sup>+</sup> de memòria. En canvi, si sembla estar regulada per les citocina IL-15 i en menys freqüència, per la IL-7. Estudis recents han demostrat que la proliferació homeostàtica basal està controlada principalment per la IL-15<sup>144</sup>. Aquest model s'ha confirmat en tres estudis, on la inhibició selectiva de la via de senyalització del receptor de la IL-7 en les cèl·lules CD8<sup>+</sup> madures, no permetia l'activació del dímer STAT5 i conseqüentment la transcripció i expressió del Bcl-2, i en canvi, les cèl·lules CD8<sup>+</sup> antigen específiques i de memòria proliferaven igualment<sup>143-146</sup>.

#### **A. Cèl·lules T CD4<sup>+</sup> de memòria**

A l'igual que en les CD8<sup>+</sup> de memòria i a diferència de les cèl·lules CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> *naïve*, la senyal del TCR pel contacte amb les MHC és irrellevant per mantenir l'homeòstasi de les cèl·lules CD4<sup>+</sup> específiques d'antigen i de memòria<sup>144</sup>. Tot i que al principi les cèl·lules CD4<sup>+</sup> de memòria es creia que proliferaven independentment de les citocines  $\gamma$ c, actualment es coneix amb certesa que la IL-7 manté la supervivència d'aquestes i sembla ser imprescindible pel manteniment de la homeòstasi en condicions de limfopènia<sup>144,146</sup>. Estudis recents mostren que les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques d'antigen necessiten contacte amb la IL-7 i la IL-15 per mantenir la proliferació homeostàtica basal i també la supervivència a llarg temps<sup>141,146,148</sup>.

#### **1.10.3. Caracterització fenotípica de les cèl·lules T**

L'expressió de les molècules de superfície de les cèl·lules T *naïve* es veuen alterades a mesura que esdevenen cèl·lules de memòria (Taula 1). Aquests canvis inclouen molècules d'adhesió, receptors de citocines que afecten la migració limfocitària, factors i receptors que promouen la supervivència de les cèl·lules de memòria, proteïnes involucrades en funcions efectores<sup>151</sup>. Alguns canvis també incrementen la sensibilitat de les cèl·lules T de memòria específiques d'antigen.

Taula 1. Fenotipatge de les cèl·lules T naïve i de memòria (central i efectora)

Molècula	Cèl. naïve	Cèl. memòria central	Cèl. memòria efectora	Comentaris
CD44	+	+++	+++	Molècula d'adhesió cel·lular
CD45RO	+	+++	+++	Modula la via senyalització del receptor TCR
CD45RA	+++	+++	+	Modula la via senyalització del receptor TCR
CD62L	+++	+++	-	Receptor per a buscar nòduls limfàtics
CCR7	+++	+++	-	Receptor de citocina per a buscar nòduls limfàtics
CD69	-	-	+++	Antigen d'activació
Bcl-2	++	+++	+/-	Promou la supervivència cel·lular
FasL	-	+	+++	Molècula efectora en cèl·lules assassines
CD122	+/-	++	++	Part del receptor de la IL-2 i la IL-15
CD25	-	-	++	Part del receptor de la IL-2
CD127	++	+++	-	Part del receptor de la IL-7
CXCR4	+	++	+	Receptor de la quimiocina CXCL12; controla la migració tissular
CCR5	+	+++	++	Receptor de les quimiocines CCL3 i CCL4; migració tissular

Les cèl·lules CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> de memòria es poden diferenciar en dos tipus de subpoblacions; cèl·lules de memòria central i cèl·lules de memòria efectora <sup>149-151</sup>.

1. **Cèl·lules de memòria central (T<sub>CM</sub>)**, caracteritzades per presenta la molècula CD45RO en superfície i expressar els receptors de *homing* als nodes limfàtics, el CCR7 i la integrina CD62L <sup>152-155</sup>. Aquestes cèl·lules de memòria central són molt sensibles a l'activació pel TCR, i per tant, ràpidament expressen el CD40L com a resposta. No obstant, tarden més temps a diferenciar-se cap a cèl·lules efectoras (en el cas de les CD4 no estan polaritzades cap al tipus Th1 o Th2), tot i que de seguida expressen IL-2 i tenen una vida mitja molt més llarga que les cèl·lules de memòria efectora <sup>153</sup>.

2. **Cèl·lules de memòria efectora (T<sub>EM</sub>)**, caracteritzades per madurar ràpidament cap a cèl·lules T efectoras i secreten grans quantitats d'IL-4, d'IL-5 i d'IFN-γ en resposta a l'estimulació antigènica. No presenten el receptor de citocines CCR7 i progressivament

també van perdre la molècula d'adhesió CD62L. No obstant, expressen nivells elevats d'integrines  $\beta 1$  i  $\beta 2$ , així com receptors de citocines inflamatòries. Les cèl·lules efectores, presenten un temps de vida mitja més curt.

Un estudi molt recent en el qual comparen perfils d'expressió gènica en cèl·lules TCM purificades versus cèl·lules TEM de sang perifèrica humana, revela que les cèl·lules TEM mostren una sobreexpressió dels gens implicats en la resposta immune (IFN- $\gamma$ , el IL-17R, el graenzim A, B i K, el CCL4 i el CCL20) així com dels gens pro-apoptòtics (FasL i galectina-1), mentre que les cèl·lules TCM expressen més gens anti-apoptòtics (RelA, TOSO, CD27, STAT5a i pim-2) així com gens implicats en la supervivència i quiescència (LKLf i el ING1).<sup>15</sup>

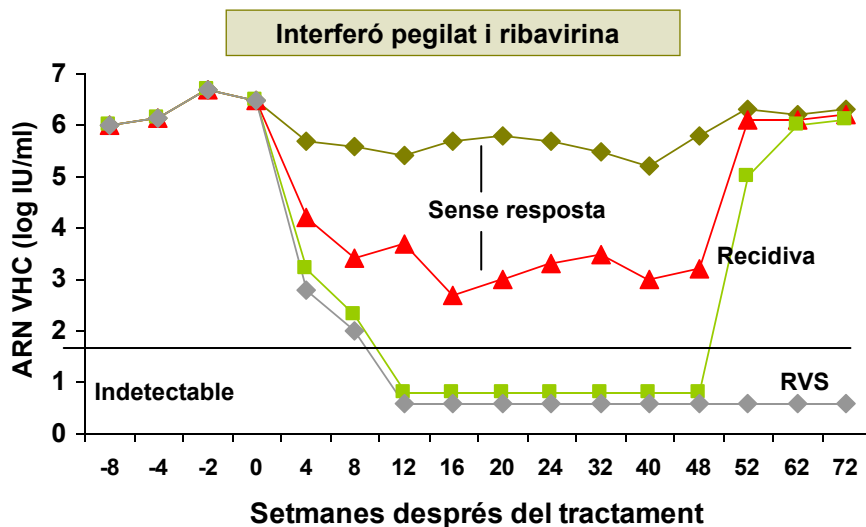
## **1.11. Tractament antiviral del VHC**

### **1.11.1. Tractament antiviral estàndard en pacients naïve**

El tractament estàndard actual de l'hepatitis C consisteix en l'administració d'interferó alfa pegilat (Peg-IFN- $\alpha$ ) i ribavirina (RBV; dosi depenent del pes). La taxa de resposta depèn, entre d'altres factors, del genotip viral. Així doncs, els pacients amb genotips 1 i 4 són els més resistents al tractament combinat, amb un 40-60% de resposta viral sostinguda (RVS) després de 48 setmanes de tractament<sup>155-156</sup> (la resposta viral sostinguda es defineix com l'absència de ARN VHC en sèrum i normalització de les transaminases després de 6 mesos postractament, figura 11). Els genotips 2 i 3 són més sensibles, amb taxes de RVS properes al 80-90% i pautes de tractament més curtes (24 setmanes)<sup>155,156</sup>. La resposta al tractament depèn també d'altres factors virològics (la càrrega viral basal, les quasiespècies virals i les mutacions en les regions genòmiques del VHC) i de factors de l'hoste (l'edat, el sexe, l'estadi de fibrosi, factors metabòlics, l'origen ètnic, factors ambientals, coinfecció amb el VIH, alcoholisme, nivells de ALT, adherència al tractament...)<sup>157</sup>.

Els efectes secundaris són freqüents i obliguen a modificar les dosi dels antivirals en aproximadament un 42% dels individus, i fins un 14% han de suspendre el tractament definitivament<sup>155,156</sup>. Els efectes secundaris més freqüentment associats a l'IFN són el síndrome pseudo-gripal, l'alopecia, la depressió i l'hipertiroïdisme sostingut. Pel que respecta a

la ribavirina, són l'anèmia, i en menor freqüència, la faringitis, l'insomni, el prurito, el rash i les nàusees.



**Figura 11: Patrons de resposta viral durant el tractament amb PegIFN- $\alpha$  i ribavirina.** La línia gris representa un perfil de resposta viral sostinguda al tractament antiviral (RVS), és a dir, ARN viral indetectable durant el tractament i durant els 6 mesos posteriors; la línia verd clara representa un perfil de resposta recidivant, és a dir, negativització de l'ARN durant el temps del tractament i reaparició de la replicació viral durant els 6 primers mesos postractament, i les línies verd i vermella representen perfils de pacients no-responedors al tractament (no responedors totals i parcials respectivament), ja que no aconseguen negativitzar l'ARN viral. [Feld J. *Nature* 2005; 436: 967-972].

Recentment, la tecnologia dels microxips ha permès identificar un polimorfisme en el gen IL-28B del cromosoma 19, *rs12979860*, el qual codifica per a l'IFN lambda 3, com a factor predictiu de resposta al tractament antiviral combinat<sup>158,159</sup>. El genotip CC del polimorfisme *rs12979860* s'associa a nivells de RVS superior als genotips TT o CT en pacients amb genotip 1, tant en caucàsics com en hispànics (82% i 78% RVS respectivament en pacients homozigòtics CC vs. 33% i 22% respectivament de RVS en pacients homozigòtics TT). En pacients afroamericans, tot i que la taxa de RVS ja és inferior als caucàsic i hispànics, el genotip CC també s'associa a factor predictiu positiu (52% d'afroamericans amb genotip CC pel polimorfisme *rs12979860* presenten RVS respecte al 18% dels genotips CT i 16% dels genotips TT)<sup>158,159</sup>. Per tant, la detecció del polimorfisme en el gen IL28B serà una nova eina decisòria per al tractament dels pacients no cirròtics.

### 1.11.2. Tractament antiviral en pacients no responedors o amb recidives

Actualment no existeixen unes recomanacions terapèutiques clares a l'hora de plantejar el retractament de pacients NR i recidivants al tractament estàndard. S'han realitzat estudis on pacients NR a monoteràpia amb IFN- $\alpha$  presenten unes taxes de RVS al retractar-se amb PEG-IFN- $\alpha$  i ribavirina i del 10-12% de RVS en pacients tractats anteriorment amb teràpia combinada amb IFN- $\alpha$  no pegilat i ribavirina <sup>160,161</sup>. No obstant, aquests valors són molt variables en funció del genotip viral i del dany hepàtic. Aquests pacients retractats amb PEG-IFN- $\alpha$  i RBV amb genotip 2 i 3 presenten taxes de RVS del 37%, mentre que els individus infectats amb el genotip 1 la taxa de RVS és nul·la. A més, les taxes de RVS en pacients NR no cirròtics són significativament superiors a les observades en cirròtics (32% vs 0%, respectivament) <sup>162</sup>. Si la recurrència va ocórrer després de tractaments de PEG-IFN + RBV, no es té clara quina és la millor estratègia. Instaurar un tractament més llarg podria ser una opció vàlida, especialment amb pacients amb fibrosi hepàtica avançada, tot i que les taxes de RVS són minses, del 14-16% <sup>163</sup>.

### 1.11.3. Tractament de l'hepatitis C després del trasplantament hepàtic

La reinfecció de l'empelt es produeix de forma universal en pacients amb trasplantament hepàtic, i degut a la immunosupressió, la resolució espontània de la infecció és molt excepcional. Una de les estratègies consisteix en el tractament precoç postrasplantament durant les 2-6 primeres setmanes després de la cirurgia, quan no hi ha evidències clíniques ni histològiques d'hepatitis sobre l'empelt. Des d'un punt de vista teòric aquesta seria una bona opció de tractament ja que intentaria eliminar la infecció abans de l'aparició de la lesió histològica, la qual progressa molt ràpidament cap a cirrosi en aquest grup de pacients. El tractament antiviral amb PEG-IFN- $\alpha$  + RBV és molt poc eficaç en la fase aguda de la infecció en aquests individus immunosuprimits, obtenint taxes de RVS al voltant del 18% en pautes de tractament de 48 setmanes <sup>164</sup>. Aquests nivells de resposta tant baixos es deuen principalment a la baixa tolerabilitat (dosi subòptimes) i als nombrosos efectes secundaris (anèmia hemolítica, leucopènia, plaquetopènia i astènia) <sup>164</sup>.



Degut als resultats poc esperançadors, el tractament s'inicia després de varis mesos postrasplantament, quan ja s'ha constatat una lesió histològica significativa, la tolerància sembla ser major després del primer any postrasplantament, els nivells d'immunosupressió són menors i la càrrega viral més baixa, obtenint unes taxes de RVS del 39% (rang del 26-50%) amb tractaments de 48 setmanes amb PEG-IFN + RBV <sup>165,166</sup>.

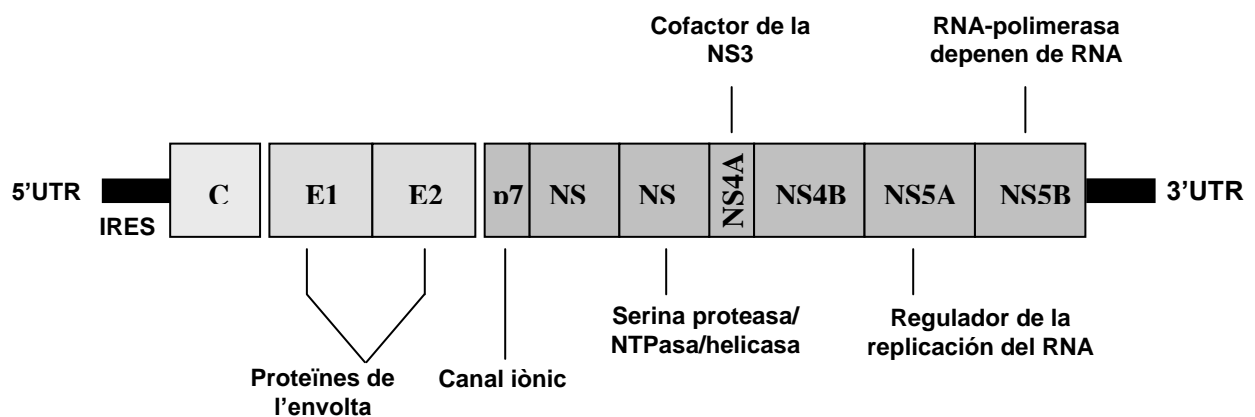
#### **1.11.4. Noves teràpies**

Degut a l'eficàcia limitada del tractament actualment disponible (principalment enfront al genotip 1 i 4) i els efectes secundaris que genera, s'estan investigant activament nous tractaments que substituïxin o reforcin el tractament estàndard actual. Els estudis es troben en diferents fases de desenvolupament, des de l'etapa preclínica més preliminar, fins a la fase IV els més avançats.

##### **1.11.4.1 Inhibidors específics del VHC**

Els avenços en el coneixement de l'estructura cristal·lina, la funcionalitat de varies de les proteïnes virals així com el coneixement de les diferents fases de replicació viral, han permès el desenvolupament de molècules petites amb capacitat d'inhibir l'activitat dels enzims vírics, de bloquejar proteïnes estructurals del virus o d'inhibir la traducció viral. Les dianes han estat preferentment la regió IRES, molt conservada, on s'uneix el ribosoma per tal d'iniciar la traducció de la poliproteïna, les proteïnes de l'envolta (E1/E2), la NS3 proteasa amb el seu cofactor (NS4A), i la NS5B, corresponent a l'ARN polimerasa, tot i que també s'han realitzat estudis per bloquejar la proteïna p7, que té capacitat de formar canals iònics o la NS5A (Fig. 12).

També s'han desenvolupat inhibidors de les ciclosporines, que són proteïnes essencials per a la replicació viral ja que actuen com a cofactors de la NS5B ARN polimerasa.



**Figura 12: Principals dianes terapèutiques del VHC.**

### **A. Agents antivirals basats en àcids nucleics**

Actualment s'estan dissenyant àcids nucleics sintètics (riboenzims, oligonucleòtids antisentit i ARN d'interferència) amb diana a diferents parts del genoma del VHC, tot i que els resultats preliminars són poc prometedors degut a la poca eficàcia antiviral que presenten <sup>167-170</sup>.

### **B. Inhibidors de la NS3/4A proteasa**

Tal i com hem explicat anteriorment, la NS3/4A proteasa és un membre de la família de les quimiotripsines serines proteases i té la funció de digerir proteolíticament la poliproteïna per tal de generar els components virals implicats en la replicació de l'ARN. Hi ha varis inhibidors de la NS3/4 serina proteasa en desenvolupament clínic amb elevat potencial antiviral i dos d'ells en fases de comercialització (Taula 2).

El Telaprevir (VX-950) és un inhibidor específic de la proteasa que mostra una activitat antiviral molt potent, tant sol com en combinació amb el PEG-IFN- $\alpha$  i ribavirina <sup>171</sup>. La triple teràpia (Telaprevir/PEG-IFN- $\alpha$ /RBV) presenta una taxa de RVS 25% superior a la observada amb el tractament estàndard (PEG-IFN- $\alpha$ /RBV) durant 48 setmanes (triple teràpia 67% RVS i doble teràpia sense Telaprevir 41% RVS) i del 20% en tractaments de 24 setmanes (triple teràpia 61% i doble teràpia 41%) en pacients *naïve* i genotip 1 <sup>172,173</sup>. El telaprevir és pot utilitzar com a teràpia de rescat en pacients genotip 1 no responedors o recidivants al tractament convencional amb Peg-IFN + RBV <sup>174,175</sup>. Així els pacients recidivants a la teràpia convencional

presenten un 88% de RVS amb la triple teràpia Telaprevir/IFN/RBV (24% grup control IFN/RBV); els pacients no responedors a tractament previ presentaven una taxa de RVS del 33% (5% retractament IFN/RBV)<sup>174</sup>. Pel que respecta al genotip 2 i 3 del VHC, el tractament convencional ja és molt eficaç i sembla que el teleprevir únicament és eficaç en pacients genotip 2<sup>176</sup>. Tot i els resultats prometedors del telaprevir en quant a l'activitat antiviral, tant en pacients *naïve* com no responedors o recidivants, s'hauria de tenir en compte que un 21% dels pacients abandonen el tractament degut a efectes secundaris importants, com és el *rash* de grau 3 (en 4% pacients), problemes gastrointestinals o anèmies (11% d'abandonament en tractament PR) i és un inhibidor específic del genotip 1 viral<sup>172-176</sup>.

El Boceprevir (SCH 503034) és un altre inhibidor específic de la NS3/4A proteasa d'administració oral en fase de comercialització<sup>177-181</sup>. Presenta una activitat antiviral molt potent en pacients VHC genotip 1. L'estudi en fase clínica SPRINT-2 demostra que la triple teràpia Boceprevir/PEG-IFN- $\alpha$ /RBV en pacients *naïve* genotip 1 presenta una taxa de RVS del 68% en pacients d'origen caucàssic i un 53% en pacients afroamericans (40% i 23% de RVS en el grup control respectivament)<sup>179</sup>. En pacients no responedors al tractament convencional, la taxa de RVS és del 66% en tractaments triple (21% RVS en grup control)<sup>178, 189</sup>. A l'igual que el telaprevir, el boceprevir presenta molts efectes secundaris<sup>178,179</sup>, genera resistències durant la primera setmana de tractament antiviral<sup>181</sup> i és un inhibidor específic de genotip 1. Tant el telaprevir com el boceprevir actuen independentment del polimorfisme IL28B, per tant són una bona teràpia de rescat per aquells pacients crònics *naïve* amb polimorfisme no-CC pel gen IL28B *rs12979860*.

A part d'aquests dos inhibidors existeixen una bateria de fàrmacs inhibidors de la NS3/4A proteasa que estan en fases més o menys avançades (Taula 2). El problema principal dels inhibidors de la NS3/4A proteasa és que, tot i que presenten una activitat antiviral molt potent, presenten una barrera genètica molt dèbil, i moltes vegades, una única mutació en el genoma viral confereix resistència al fàrmac. A més, són específics de genotip 1 i, tot i què és el genotip predominant i el més resistent a la teràpia estàndard, impossibilita el retractament de pacients amb altres genotip. A part, efectes adversos important tals com el *rash* s'haurien de controlar, ja que és produeix, i no amb percentatges insignificants.

### **C. Inhibidors de la NS5A**

La NS5A és una proteïna no estructural del VHC essencial per a la replicació viral i està molt conservada en els diferents genotips viral, fent que teòricament un inhibidor d'aquesta proteïna pugui ser eficaç en tots els pacients<sup>187</sup>.

### **D. Inhibidors de la NS5B**

L'ARN polimerasa dependent d'ARN és una altra diana terapèutica molt atractiva i actualment s'estan desenvolupant inhibidors anàlegs de nucleòsids/nucleòtids o molècules no anàlegs de nucleòsids.

#### **- Anàlegs de nucleòsids**

R7128 s'administra com a pro-fàrmac i és un potent inhibidor selectiu de la NS5B polimerasa. Dades preliminars del tractament triple (R7128/PEG-IFN- $\alpha$ /RBV) en fase II, mostren una disminució de la càrrega viral de 5,1 log al cap de 28 dies, en pacients *naïve* i genotip 1, i no sembla que generi efectes adversos importants<sup>188</sup>.

#### **- No anàlegs de nucleòsids**

Els inhibidors de l'ARN-polimerasa no anàlegs de nucleòsids s'uneixen al·lostèricament a diferents llocs de la superfície enzimàtica alterant la seva estructura i funcionalitat. Actualment hi ha diferents fàrmacs en fase II (Taula 2), els quals han demostrat eficàcia antiviral elevada durant els primers dies de tractament, especialment el HCV-796 i el BI 207127<sup>190-193</sup>. Tots estan ben tolerats i presenten pocs efectes secundaris a curt termini. No obstant, sí que s'ha observat *rash* moderat en pacients tractats amb BI 207127<sup>193</sup>. En contra del que es podia esperar, la majoria dels inhibidors no anàlegs de nucleòsids, presenten una eficàcia selectiva cap al genotip 1 del VHC, i especialment cap al genotip 1b<sup>190-193</sup>.

### **E. Inhibidors de ciclosporines**

Les ciclosporines són proteïnes intracel·lulars ubiquitinitzades involucrades en el procés de plegament proteic. El DEBIO-25 és el inhibidor de la CsB (cofactor de la NS5B ARN dependent

de l'ARN polimerasa) en fase de desenvolupament més avançada (Taula 2)<sup>194</sup>. No presenta activitat immunosupresiva i és d'administració oral. Els resultats dels estudis en fase IIa mostren una disminució de la càrrega viral de 4,7 log en el dia 29 de la triple teràpia PEG-IFN $\alpha$ /Ribavirina i DEBIO-25 en pacients *naïve* i genotip 1, i una disminució de 5,9 log en genotip 3<sup>195</sup>. També existeix un derivat de la ciclosporina A, el SCY-635 amb bons resultats preliminars<sup>196</sup>. El SCY-635 presenta una forta activitat sinèrgica amb els inhibidors de proteasa, amb inhibidors de polimerasa i amb el IFN- $\alpha$  i la ribavirina<sup>196</sup>. Per tant, els inhibidors de les ciclosporines serien bons candidats per a pacients amb genotip viral 3 no responedors al tractament estàndard degut a què no són selectius de genotip.

**Taula 2: Inhibidors específics del VHC**

Nom del fàrmac	Companyia Farmacèutica	Fase clínica	Referència
<b>Agents antivirals basats en àcids nucleics</b>			
<b>Ribozomes</b>			
RPI. 13919	Ribozyme Pharmaceuticals	Anul·lat	167
<b>Oligonucleòtids antisentit</b>			
ISIS 14803	ISIS Pharmaceuticals	Anul·lat	168
<b>ARN interferència</b>			
siARN consens		Preclínica	169,170
<b>Inhibidors de la proteasa NS3/4A</b>			
Telaprevir (VX-950)	Vertex Pharmaceuticals	IV	171-176
Boceprevir (SCH 503034)	Schering-Plough	IV	177-181
TMC-435	Tibotec / Medivir	II	182
MK 7009	Merck Sharpe and Dohme	II	183
Danoprevir (ITMN-191)	Intermune / Roche	II	184
BI-201335	Boehringer Ingeheim	II	185
Narlaprevir (SCH 900518)	Schering-Plough	II	186
<b>Inhibidors de la NS5A</b>			
BMS-790052	Bristol-Myers Squibb	II	187
<b>Inhibidors de la NS5B</b>			
<b>Inhibidors nucleòsids</b>			
R7128 (PSI6130)	Roche / Pharmasset	II	188
IDX184	Idenix	II	189
<b>Inhibidors no nucleòsids</b>			
HCV-796		II	190
PF-868554	Pfizer	II	191
GS 9190	Gilead	II	192
BI 207127	Boehringer Ingeheim	II	193
<b>Inhibidors de les ciclosporines</b>			
DEBIO 025	Debiopharm	II	194,195
SCY-635	Scynexis	I	196

### 1.11.4.2 Agents immunomoduladors

Actualment està cobrant especial rellevància l'estudi d'immunoteràpies que puguin modular la resposta immune de l'hoste o restaurar l'estat funcional de les cèl·lules T per tal de modificar el curs clínic de la infecció (Fig. 13).

Les principals estratègies d'immunoteràpia són:

- a) Vacunes terapèutiques realitzades amb antígens i epítops immunodominants del VHC.
- b) Antagonistes dels factors inhibidors de les cèl·lules T.
- c) Anticossos neutralitzants anti-VHC per bloquejar la infecció *de novo* dels hepatòcits.
- d) Administració de citocines recombinants amb activitat antiviral i/o immunomoduladora.
- e) Agonistes dels receptors "Toll like".
- f) Altres agents immunomoduladors.

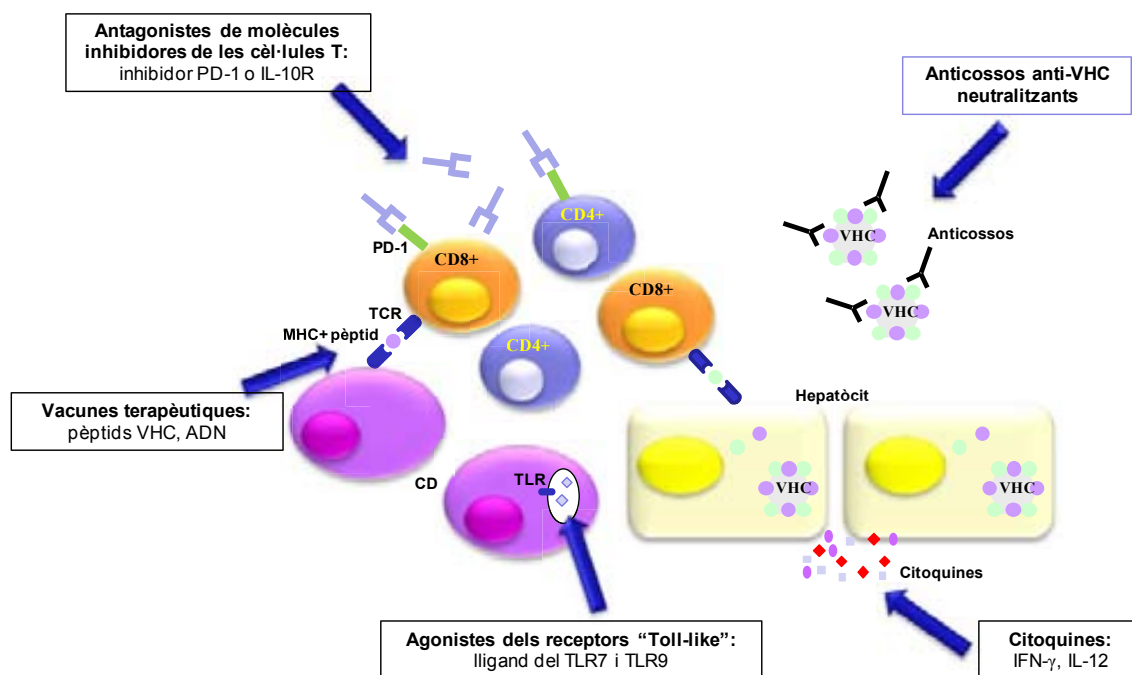


Figura 13. Estratègies d'immunoteràpia pel tractament de l'hepatitis crònica C.

### A. Vacunes terapèutiques

En la infecció pel VHC els anticossos anti-VHC no són neutralitzants (a diferència de la infecció per VHB), mentre que la resposta immune cel·lular tipus Th1 potent i multispecífica (principalment enfront a les proteïnes no estructurals) és essencial pel control de la infecció. Amb aquestes premisses, es podria pensar que la inducció de la resposta cel·lular específica del VHC abans de la infecció viral seria una estratègia ideal per protegir-nos de la cronificació de la infecció. Per altra banda, també es pot buscar una vacuna terapèutica pel tractament de persones ja infectades, la qual hauria de tenir la capacitat de revertir el fenotip disfuncional de les cèl·lules T dels pacients amb infecció persistent. Per a desenvolupar vacunes terapèutiques primerament s'han d'identificar els antígens del VHC o epítops de les cèl·lules CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> apropiats així com el vector. Per la qual cosa, s'han estudiat diferents estratègies: subunitats proteiques, partícules similars als virus, vacunació amb anticossos, vacunació peptídica i vectors virals recombinants.

Actualment, les vacunes amb fase clínica més avançada són les formades per pèptids virals. El IC41, és una vacuna formada per 7 pèptids sintètics del VHC que inclou epítops immunodominants de les cèl·lules T (4 MHC classe I i 3 MHC de classe II)<sup>197-199</sup>. El IC41 ha demostrat seguretat en 128 individus sans (HLA-A2<sup>+</sup>) i capacitat d'induir tant la resposta específica del VHC de memòria central, com la resposta de les cèl·lules CD8<sup>+</sup> efectores (producció d'IFN- $\gamma$ )<sup>197</sup>. Adicionalment, pot generar la reversió del fenotip CD8<sup>+</sup> anèrgic en pacients amb infecció persistent tot i que no disminueix la replicació viral ni en monoteràpia ni amb tractaments combinats amb PEG-IFN- $\alpha$  i ribavirina<sup>198,199</sup>. En fase clínica II, també està en desenvolupament la vacuna peptídica GI-5005. Estudis preclínic amb ratolins van mostrar que la immunització amb el llevat recombinant (*Saccharomyces cerevisiae*) que expressa la proteïna de fusió NS3-Core (GI-5005), és capaç d'induir limfoproliferació específica de VHC així com la resposta CTL associada a un patró Th1 de secreció de citocines<sup>200</sup>. Després de comprovar la seguretat i la tolerabilitat de la vacuna en pacients amb hepatitis crònica C i genotip 1, es va observar l'eficàcia de la vacuna en pacients *naïve* (70% negativització de l'ARN a la finalització del tractament antiviral triple a la setmana 48 vs. 50% RVS 48 en placebo), però no en pacients no responedors al tractament estàndard (32% resposta en ambdós grups)<sup>201</sup>.

### **B. Antagonistes de les molècules inhibidores presents a les cèl·lules T**

Les cèl·lules T reguladores (Treg), les citocines inhibidores (IL-10), i els receptors inhibidors expressats en la superfície de les cèl·lules T (PD-1 i Tim-3) sembla que són factors que indueixen l'estat anèrgic o disfuncional dels limfòcits T específics de VHC en infecció crònica<sup>205</sup>. Amb aquest plantejament, el bloqueig d'aquests factors inhibidors és una estratègia interessant pel tractament de les infeccions virals. Tal i com hem explicat anteriorment el PD-1 és una molècula que s'expressa en grans quantitats als limfòcits T disfuncionals degut a què la interacció del PD-1 amb el seu lligand (PD-L1) inhibeix la proliferació de les cèl·lules T així com la seva funció efectora<sup>205-207</sup>. El bloqueig de la senyalització de PD-1 pot restaurar funcionalment les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> específiques d'antigen disfuncionals i reduir la càrrega viral amb ratolins que presenten la infecció pel LCMV<sup>208</sup>. Tot i que encara no s'han realitzat estudis d'immunoteràpia en pacients o en ximpanzés amb infecció crònica C, si que hi ha varis estudis que demostren que el bloqueig de PD-1 *in vitro* augmenta la intensitat de les respostes de les cèl·lules T específiques del VHC<sup>208-212</sup>, que l'expressió de PD-1 és reversible en absència d'estimulació antigènica<sup>210</sup> i que el bloqueig simultani de PD-1 i CTLA-4 exerceix un efecte sinèrgic en la restauració funcional de les cèl·lules CD8<sup>+</sup> específiques del VHC intrahepàtiques<sup>210</sup>.

Un altre factor inhibitori és la IL-10, la qual suprimeix la resposta efectora de les cèl·lules T, així doncs el bloqueig de la IL-10 és una altra possible diana terapèutica d'interès<sup>213</sup>. Aquesta estratègia s'ha provat en un model de ratolí amb infecció per LCMV, i l'administració d'anti-IL-10L resulta en un increment de producció d'IFN- $\gamma$  i la resolució de la infecció viral<sup>213-215</sup>.

Recentment s'ha identificat un altre marcador, el Tim-3 que està sobreexpressat en cèl·lules CTL PD-1<sup>+</sup> específiques de VHC, i el bloqueig simultani d'aquestes dos molècules resulta en un augment de la capacitat citotòxica dels limfòcits T citotòxics específics del VHC en línies cel·lulars d'hepatòcits<sup>216</sup>.



### C. Anticossos neutralitzants del VHC

Actualment també estan en marxa assajos en pacients trasplantats per evitar la recurrència del VHC amb l'ús d'anticossos, tot i que estudis amb el HepXtm-C i el HCV-AB68 ja s'han cancel·lat degut a la poca eficàcia <sup>217,218</sup>. Actualment s'estan desenvolupant el bavituximab, que és un anticòs monoclonal anti-fosfofosferines, i actua estimulando les cèl·lules del sistema immune, destruir les partícules virals i les cèl·lules infectades. Estudis en fase clínica realitzats en població coinfectada VHC i VIH mostren bona tolerabilitat i seguretat del fàrmac <sup>219</sup>.

### D. Cítocines: Nous interferons

Actualment, l'interferó  $\alpha 2a/2b$  pegilat juntament amb la ribavirina és el tractament estàndard per la infecció pel VHC tot i que els baixos nivells resposta en pacients genotip 1 o trasplantats hepàtics i els efectes secundaris que genera complicant l'adherència al tractament, fan necessari el desenvolupament de formes d'interferó més efectives i menys tòxiques (Taula 2). El interferó *consensus* (CIFN) semblava que fos una bona alternativa tot i que estudis comparatius realitzats en pacients *naïve* genotip 1 no mostren diferències significatives en quant a l'activitat antiviral i el perfil de seguretat entre els dos tipus d'interferons <sup>220,221</sup>. A més, no representa cap avantatge respecte a l'interferó pegilat en quant a efectes adversos. En fase clínica avançada també hi ha l'albinterferó- $\alpha 2b$ , molècula d'interferó- $\alpha 2b$  fusionada a una molècula d'albúmina. Diferents estudis mostren que l'activitat antiviral de l'albinterferó és similar o inclús menor que la PEG-IFN (48% vs 51% RVS, respectivament) en pacients *naïve* genotip 1 <sup>222,223</sup>, i l'únic avantatge que mostra respecte a l'IFN- $\alpha$  convencional, és que presenta un temps de vida mitja de 150 hores, fet que permetria l'administració d'una única dosi cada 2-4 setmanes i no setmanalment. També s'estan realitzant estudis per determinar l'activitat antiviral i la seguretat de l'IL-29, interferó lambda tipus III <sup>225</sup>, així com d'interferons gamma <sup>226</sup>.

### **E. Agonistes dels receptors “Toll-like”**

Els receptors “*toll like*” (TLR) són molècules expressades principalment en les cèl·lules del sistema immune que reconeixen patrons moleculars de microorganismes invasors i indueixen la síntesi de citocines i quimiocines pro-inflamatòries. Fins ara es coneixen 10 molècules (TLR 1-10) i 4 d'elles sembla que estan implicades en processos virals. El TLR 3 detecta l'ADN de doble cadena, els TLR 7 i 8 detecten cadenes d'ARN viral i el TLR 9 detecta seqüències d'ADN metil·lat (CpG). L'estimulació del TLR apropiat mitjançant agonistes podria induir i restaurar la resposta innata i adaptativa específica del virus. No obstant, tot i les perspectives inicials, molècules activadores del TLR7, TLR8 i el TLR9 tals com el CPG 10101 i el ANA245 s'estan desenvolupant sense èxit (Taula 3) <sup>227-231</sup>.

### **F. Altres agents immunomoduladors**

A part de la bateria d'immunomoduladors que hem descrit anteriorment, n'hi ha d'altres tals com el thymalfasin que és un pèptid de 28 aas tímics que actua estimulants la producció de cèl·lules sanguínies blanques i la polarització cap a cèl·lules CD4<sup>+</sup> Th1, tot i que no s'han obtingut bons resultats en pacients NR al tractament convencional <sup>232</sup>. La “ALINIA” (nitrazoxanida) és un fàrmac aprovat per tractar la diarrea i augmenta l'activitat antiviral de l'interferó en un sistema de replicació del VHC <sup>233</sup>. Inicialment, l'activitat antiviral de l'alínia es va observar en pacients genotip 4 del virus augmentant la taxa de RVS en triple tractament sense percebre efectes adversos addicionals <sup>234</sup>. També estan en estudis clínics activadors de la via de l'IFN (ME-3738) <sup>235</sup>, activadors de les cèl·lules Th via STAT-3 (SCV-07), estimuladors de la síntesi de cèl·lules immunes (IM862) i d'altres (Taula 3).

**Taula 3: Agents immunomoduladors de la infecció pel VHC**

Nom del fàrmac	Companyia Farmacèutica	Fase clínica	Referència
<b>Vacunació terapèutica</b>			
IC41	Intercell	II	197-199
GI-5005	GlobelImmune	II	200,201
TG4040	Transgene	I	202
HCV Core ISCOMATRIX™	Chiron / Novartis	I	203
CIGB-230		I	204
<b>Anticossos</b>			
Bavituximab	Peregrine Pharmaceuticals	I	219
<b>Nous Interferons</b>			
Interferó consensus (CIFN)	Intermune	IV	220,221
Albinterferon $\alpha$ -2b	Novartis	III	222,223
Locteron (BLX-883)	Octopus/Biolex	II	224
Interferon lambda (IL-29)	Bristol-Myers	II	225
Interferon gamma 1b	Actimmune/Intermune	II	226
<b>Agonistes dels toll-like receptors</b>			
Resiquimod (R-848)	InvivoGen	II	229
ANA773	Anadys	II	230
IMO-2125	Idera Pharmaceuticals	I	231
<b>Altres agents immunomoduladors</b>			
Thymalfasin (tymosin alfa-1)	SciClone / Sigma	III	232
ALINIA (nitazoxanide)	Romark	II	233,234
ME-3738	Merck	II	235
SCV-07	SciClone	II	
Oglufanide disodum (IM862)	Implicit Bioscience	II	
EMZ720	Transition Therapeutics	II	
CF102		I	236
CYT-107	Cytheris	I	

#### 1.11.4.3 Immunoteràpia amb cèl·lules humanes

En els últims anys s'ha avançat molt en l'ús d'immunoteràpies adaptatives basades en la transferència de cèl·lules virus-específiques seleccionades i expandides *in vitro* pel tractament del CMV i el Epstein Barr Virus<sup>237,238</sup>, així com pel tractament d'alguns tipus de càncer<sup>239-241</sup>.

##### **A. Immunoteràpia amb cèl·lules dendrítiques pulsades amb antígens del VHC**

Actualment s'estan avaluant diferents estratègies innovadores mitjançant la vacunació terapèutica amb cèl·lules dendrítiques. L'estimulació *ex vivo* i la maduració de les cèl·lules dendrítiques en presència de la proteïna del core, alguns pèptids o de la NS3, indueix una resposta cel·lular i humoral molt potent en ratolins.<sup>242,243</sup> També s'estan realitzant estudis

preclínic de vacunes amb cèl·lules dendrítiques transfectades amb un adenovirus que conté els gens que codifiquen per a la proteïna NS3, la qual indueix una resposta cel·lular CD4<sup>+</sup> *helpertipus* Th1 i una resposta CD8<sup>+</sup> citotòxica en ratolins i disminueix els nivells d'ARN viral en fetge<sup>244</sup>. No obstant, un estudi en fase clínica I realitzat en pacients amb infecció crònica C mostra que, tot i que la seguretat de la immunoteràpia amb cèl·lules dendrítiques pulsades amb pèptids del VHC, aquesta és incapaç de disminuir la virèmia i d'induir respostes CD8<sup>+</sup> efectores<sup>245</sup>.

### **B. Immunoteràpia adaptativa amb cèl·lules CD56<sup>+</sup>**

Estudis recents han demostrat que les cèl·lules CD56<sup>+</sup> tenen un paper essencial en el control de la infecció pel VHC, ja que són limfòcits especialment abundants al fetge i poden inhibir la replicació del VHC en hepatòcits humans mitjançant la síntesi d'IFN- $\gamma$  i l'activació de la via JAK/STAT<sup>246,247</sup>. Estudis *in vitro* també han demostrat que les cèl·lules CD56<sup>+</sup> obtingudes de CMSP es poden expandir durant 28 dies en presència d'IL-2 i anticòs anti-CD3 amb medi X-VIVO 15 i sèrum autòleg i que aquestes cèl·lules inhibeixen la replicació viral i mostren capacitat anti-HCC<sup>247</sup>. Aquestes troballes han permès el disseny d'un estudi en fase clínica I, que consisteix en la reinfusió de cèl·lules CD56<sup>+</sup> (NK i NKT) extretes prèviament del fetge trasplantat i expandides *in vitro* per tal d'evitar la recurrència agressiva del VHC postrasplantament hepàtic<sup>248</sup>. L'article descriu una metodologia d'immunoteràpia que consisteix en extreure els limfòcits del fetge del donant a través de la vena porta per perfusió abans de realitzar la cirurgia, i expandir-los 3 dies *in vitro* en presència d'IL-2. Tres dies després del trasplantament hepàtic s'inoculen, al receptor, 2-5x10<sup>8</sup> limfòcits expandits del donant, en els quals s'havia afegit OKT3 (anticòs monoclonal anti-CD3) un dia abans de la inoculació per tal d'inactivar les cèl·lules CD3<sup>+</sup> alloreactives i prevenir el rebuig *graft-vs-host*. 14 pacients van rebre la immunoteràpia, no van presentar efectes secundaris addicionals als normals i no es va observar recurrència de l'hepatocarcinoma durant els 23 mesos de seguiment. Els 5 pacients que van rebutjar la immunoteràpia es van considerar controls negatius.

Els limfòcits de sang perifèrica dels pacients trasplantats immunitzats presentaven una activitat citotòxica significativament superior als pacients controls. Addicionalment, el pacient immunitzat

amb la càrrega viral pretrasplantament més baixa, va controlar la infecció pel VHC (l'ARN VHC es va mantenir negatiu durant els 23 mesos de seguiment), mentre que un altre pacient va negativitzar l'ARN durant els primers 2 mesos postrasplantament però després va recidivar (en el grup control cap pacient va controlar la reinfecció viral). La resta de pacients immunitzats presentaven una càrrega viral inferior a la dels controls després de la reinfecció <sup>248</sup>.

### **C. Immunoteràpia amb cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> autòlogues**

Recentment s'ha publicat un article basat en teràpia gènica pel desenvolupament de tractaments antivirals, on explica com les cèl·lules immunes poden ser alterades genèticament per reconèixer cèl·lules autòlogues que expressen proteïnes virals <sup>249</sup>. La metodologia consisteix en la transfecció de CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> amb un vector adenoviral que conté el receptor de cèl·lules T NS3: 1073-1081 del VHC. Ambdós cèl·lules CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> transfectades presenten capacitat efectora i citotòxica, és a dir, sota estimulació peptídica o en cultius de cèl·lules hepàtiques VHC positives són capaces d'induir producció d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  i d'IL-2 de manera antigen específica <sup>249</sup>.

Així doncs, tot i que s'està investigant activament en el desenvolupament d'antivirals i estratègies d'immunoteràpia per disminuir les infeccions cròniques pel VHC, encara queda molt camí per recórrer.

## 2. ESTUDI 1

RESPOSTA DE LES CÈL·LULES T ESPECÍFIQUES  
DEL VIRUS DE L'HEPATITIS C EN DONANTS DE  
SANG AMB PATRÓ DE RIBA-3 INDETERMINAT:  
PROVES CONFIRMATÒRIES D'EXPOSICIÓ AL VHC

## 2. ESTUDI 1: RESPOSTA DE LES CÈL·LULES T ESPECÍFIQUES DEL VIRUS DE L'HEPATITIS C EN DONANTS DE SANG AMB PATRÓ DE RIBA-3 INDETERMINAT: PROVES CONFIRMATÒRIES D'EXPOSICIÓ AL VHC

### 2.1. Hipòtesi, objectius i disseny de l'estudi

#### Introducció

Els donants de sang són cribrats de rutina pel VHC, tant amb proves serològiques (detecció d'anticossos anti-VHC) com moleculars (ARN viral), permetint disminuir molt el risc de transmissió del VHC associat a transfusió. Hi ha un subgrup de donants que presenten respostes humorals dèbils (enfrent a un únic antigen, ELISA positiu/RIBA-3 indeterminat) en absència de virèmia detectable. Aquest resultat d'immunoblot indeterminat es desconeix si es degut a una reacció creuada amb anticossos no específics del virus i, per tant, considerar al donant com a fals positiu de la tècnica de cribatge, o per contra, la presència d'anticossos residuals són indicatius d'exposicions virals passades. En front aquesta situació, els Bancs de Sang es veuen obligats a rebutjar els productes sanguinis dels donants amb RIBA-3 indeterminat / ARN VHC negatiu i excloure al donant definitivament de la donació sense donar una raó versemblant del motiu d'exclusió.

Considerant que la resposta de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> específica del virus és essencial per a la curació espontània de la infecció i que aquesta es manté indefinidament al llarg del temps (a diferència dels anticossos) <sup>41-46, 52-53</sup>, creiem que es poden realitzar estudis funcionals addicionals que permetin discernir si els donants amb RIBA-3 indeterminat representen curacions espontànies amb pèrdua d'anticossos, o per contra, representen falsos positius de la tècnica de cribatge.

#### Hipòtesi

La detecció de resposta immune de les cèl·lules T específiques del VHC en donants de sang amb RIBA-3 indeterminat mitjançant la tècnica d'ELISpot IFN- $\gamma$  permetent diferenciar donants amb RIBA-3 indeterminat amb prèvies exposicions virals de falsos positius de la tècnica de cribatge d'anticossos.

## Objectius

1. Determinar la prevalença i el perfil de donant amb patró RIBA-3 indeterminat pel VHC.
2. Determinar la resposta immune cel·lular específica del VHC dels donants amb RIBA-3 indeterminat amb comparació amb individus en diferents estatus d'infecció pel VHC.
3. Establir un perfil de resposta CD4<sup>+</sup> Th associada a curació de la infecció i determinar l'antigen viral que permet discriminar millor entre resolució de la infecció i persistència viral.
4. Avaluar la utilitat de la tècnica d'ELISpot IFN- $\gamma$  com a prova confirmatòria d'exposició viral.

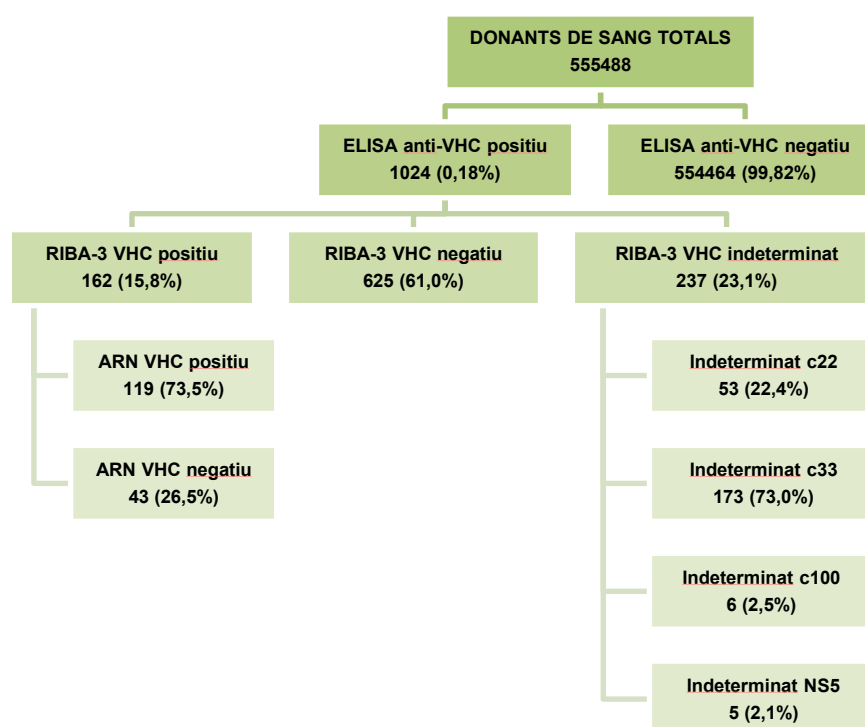
## Disseny de l'estudi

- L'estudi de prevalença de donants amb patró de RIBA-3 indeterminat es va realitzar sobre una població de 555488 donants de sang de Catalunya inclosos durant un període de dos anys (2006-2007) al Banc de Sang i Teixits de Catalunya.
- La resposta immune de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques d'antigen (core, NS3, NS3 helicasa) es va determinar en les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica d'una subpoblació de 27 donants amb patró de RIBA-3 indeterminat / ARN negatiu, 48 individus amb RIBA-3 positiu / ARN positiu (infecció persistent), 12 individus amb RIBA-3 positiu/ARN negatiu (curats espontanis) i 30 controls RIBA-3 negatius, mitjançant la tècnica d'ELISpot IFN- $\gamma$ .
- Per tal de complir amb el quart objectiu, els resultats obtinguts per ELISpot IFN- $\gamma$  es van confirmar mitjançant la quantificació de citocines solubles (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10) dels sobrenedants dels cultius estimulats mitjançant citometria de flux (CBA). Amb aquesta finalitat les comparacions es van realitzar en el grup de RIBA-3 indeterminats amb o sense resposta a ELISpot IFN- $\gamma$ .



## 2.2. Resum dels resultats

1. Al Banc de Sang i Teixits de Catalunya, la prevalença de donants amb patró de RIBA-3 indeterminat pel VHC va ser del 0,043%, és a dir, significativament superior a la obtinguda en donants amb RIBA-3 positiu independentment de l'evolució de la infecció (0,029%,  $p < 0,001$ ). El patró més comú va ser la reactivitat enfront a la proteïna no estructural NS3 (c33) i enfront a la proteïna estructural del core (c22) en un 73% i 22,4% dels casos respectivament (Fig. 14).

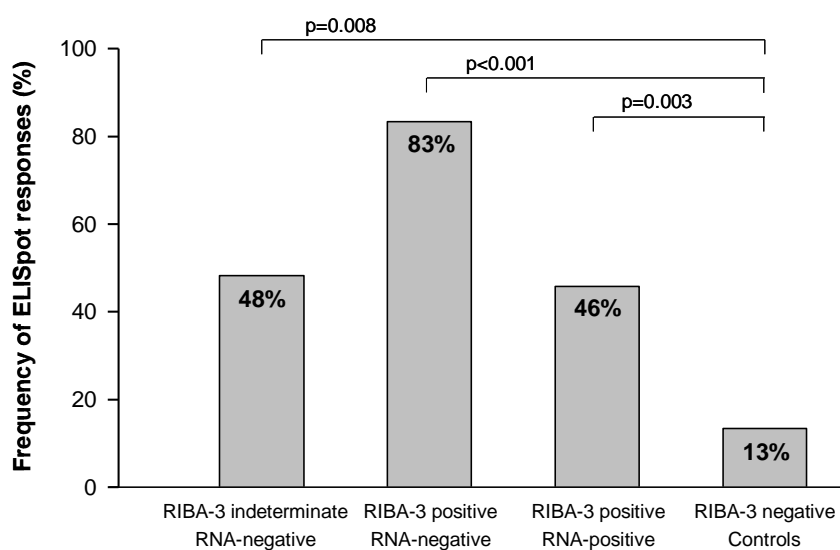


**Figura 14. Prevalença de la infecció pel VHC al Banc de Sang i Teixits de Catalunya.**

2. Únicament 1 donant dels 27 RIBA-3 indeterminats (4%) inclosos a l'estudi de resposta cel·lular presentava algun factor de risc associat a exposició viral a diferència del 42% dels donants RIBA-3 positius / ARN negatius ( $p=0,007$ ) o del 46% dels RIBA-3 positius / ARN positiu ( $p < 0,001$ ).

3. Els resultats de RIBA-3 indeterminat es van confirmar per l'assaig d'INNO-LIA obtenint una concordança del 89%.

4. El 48% dels donants amb RIBA-3 indeterminat eren capaços d'induir la producció d'IFN- $\gamma$ , enfront a una o més proteïnes virals, a diferència del 13% dels controls RIBA-3 negatius ( $p=0,008$ ), confirmant que aproximadament la meitat dels donants amb patró de RIBA-3 indeterminat i absència de virèmia representaven exposicions virals passades amb evolució cap a resolució espontània de la infecció i no pas falsos positius de la tècnica de criatge (Fig. 15).

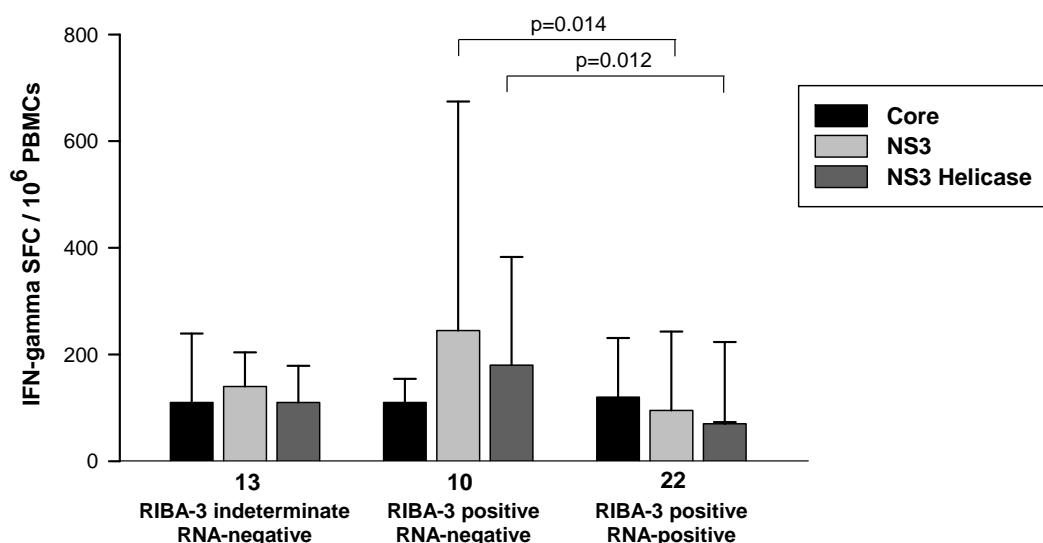


**Figura 15. Freqüència de resposta a ELISpot IFN- $\gamma$  dels diferents grups d'estudi.**

5. Les respostes de les cèl·lules T específiques del VHC es van produir tant en donants amb RIBA-3 indeterminat amb presència de reactivitat enfront a l'antigen c22 (core, 50%) com en donants amb anticossos reactius enfront a l'antigen c33 (NS3; 47%) tot i que la correlació entre la producció d'IFN- $\gamma$  induïda per l'antigen i el patró d'anticossos del RIBA-3 va ser baixa.

6. La magnitud de la resposta immune cel·lular (nombre cèl·lules productores d'IFN- $\gamma$ ) dels donants amb RIBA-3 indeterminat va ser similar a la obtinguda en RIBA-3 positius, independentment de l'absència o la presència de virèmia (Fig. 16).

7. Els donants amb RIBA-3 positiu / ARN negatiu presenten un nombre de cèl·lules productores d'IFN- $\gamma$  enfront a les proteïnes no estructurals del virus significativament superior als individus amb infecció persistent (RIBA-3 positiu / ARN negatiu) (mitjana CFS-IFN- $\gamma$ /10<sup>6</sup> CMSP: 245 vs. 80 enfront a la NS3,  $p=0,014$  i 180 vs. 65 enfront a la NS3 helicasa,  $p=0,012$ ). Per la qual cosa, la producció d'IFN- $\gamma$  enfront a la NS3, i concretament al domini de l'helicasa, és el factor discriminant entre resolució i persistència viral.



**Figura 16. Determinació de la resposta de les cèl·lules T específiques del VHC mitjançant l'assaig d'ELISpot IFN- $\gamma$ .** Les mitjanes de CFS-IFN- $\gamma$  per 10<sup>6</sup> CMSP es van comparar amb el test no paramètric de U Mann-Whitney.

8. Els resultats de citometria de flux van confirmar i validar la tècnica d'ELISpot IFN- $\gamma$  com a prova confirmatòria d'exposició viral ja que la quantitat d'IFN- $\gamma$  soluble en cultius de CMSP de donants amb RIBA-3 indeterminat i sense resposta a ELISpot va ser pràcticament nul·la comparada amb els indeterminats amb resposta a ELISpot, tant per a core (0 vs. 14,1 pg/ml respectivament,  $p=0,029$ ) com per a NS3 (7,7 vs. 12,2 pg/ml,  $p=0,048$ ).

En resum, la meitat dels donants amb patró de RIBA-3 indeterminat i ARN negatiu representen resolucions espontànies de la infecció pel VHC amb pèrdua d'anticossos i no falsos positius de la tècnica de criatge i la tècnica d'ELISpot IFN- $\gamma$  és pot utilitzar com a prova confirmatòria d'exposició viral.

## Hepatitis C virus (HCV)-specific T-cell responses among recombinant immunoblot assay-3–indeterminate blood donors: a confirmatory evidence of HCV exposure

Marta Bes, Juan Ignacio Esteban, Natàlia Casamitjana, Maria Piron, Josep Quer, María Cubero, Lluís Puig, Jaime Guardia, and Sílvia Sauleda

**BACKGROUND:** Blood donors are routinely screened for hepatitis C virus (HCV) infection. Some show weak anti-HCV responses, often restricted to a single antigen on confirmatory immunoblot (recombinant immunoblot assay [RIBA]) testing. The aim of this study was to investigate the extent to which such RIBA-indeterminate donors had previously been exposed to HCV.

**STUDY DESIGN AND METHODS:** T-cell responses to HCV recombinant proteins (core, NS3, and NS3 helix) were analyzed using an interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay and quantification of cytokines in culture supernatants in 27 RIBA-indeterminate donors, 60 RIBA-confirmed donors (48 with and 12 without HCV RNA), and 30 RIBA-negative donors.

**RESULTS:** HCV-specific T-cell responses were identified in 13 (48%) RIBA-indeterminate donors, 33 (55%) RIBA-confirmed donors, and 4 (13%) RIBA-negative controls ( $p = 0.008$  and  $p < 0.001$ , respectively). The magnitude of the T-cell response among indeterminate donors was similar to that of RIBA-confirmed donors for all HCV antigens and the specificity of the ELISpot results was confirmed by antigen-specific cytokine production (interleukin-2 and IFN- $\gamma$ ) in short-term culture supernatants.

**CONCLUSIONS:** These findings confirm that approximately half of RIBA-indeterminate donors have resolved a previous HCV infection and suggest that ELISpot might be a useful tool to clarify the status of such donors and help in their counseling and management.

The hepatitis C virus (HCV) is one of the leading causes of chronic liver disease with an estimated 200 million HCV-infected people worldwide. Since early 1990s, screening of blood products has prevented further spreading of the infection.<sup>1</sup>

Screening for HCV infection is based on enzyme immunoassays (EIAs) for qualitative detection of serum antibodies to HCV (anti-HCV). Positive EIA results are subsequently confirmed by a specific recombinant immunoblot assay (RIBA), in which antibody reactivity to four individual viral antigens immobilized on nitrocellulose strip is investigated. A positive result is defined when antibodies to two or more antigens are detected.

**ABBREVIATIONS:** CBA = cytometric bead array; ELISpot assay = enzyme-linked immunospot assay; PHA = phytohemagglutinin; S/CO = sample-to-cut-off; SFC(s) = spot-forming cell(s).

From the Transfusion Safety Laboratory, Banc de Sang i Teixits de Catalunya, Barcelona, Spain; Universitat Autònoma de Barcelona, UAB, Bellaterra, Spain; and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREhd), Liver Unit, Department of Medicine, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

Address reprint requests to: Sílvia Sauleda, PhD, Transfusion Safety Laboratory, Banc de Sang i Teixits de Catalunya, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain; e-mail: ssauleda@bstcat.net.

This work has been supported by a grant of the Spanish Ministry of Science and Education (SAF2006-03681), by a grant of the Spanish Ministry of Health (PI061244), by the Fundació Marató (TV3 052310), and by FIPSE (36623/06). CIBEREhd is funded by the Instituto de Salud Carlos III (Madrid, Spain).

Received for publication October 20, 2008; revision received November 26, 2008; and accepted December 13, 2008.  
doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02103.x

TRANSFUSION 2009;49:1296-1305.

Blood donors with chronic HCV infection remain positive by antibody testing (EIA and RIBA) and have detectable viral RNA in their blood. Positive antibody tests in the absence of circulating virus are seen in spontaneous resolvers who often lack a clinical history of acute infection. Finally, some blood donors are EIA positive but RIBA indeterminate, defined as response to a single HCV antigen usually in the absence of serum viral RNA. Whether such indeterminate donors have nonspecific antibodies cross-reactive to other viral antigens, or whether their responses represent a past recovered HCV infection, is unclear. In current practice, nonviremic RIBA-3-indeterminate donors are not further investigated, and although deemed noninfectious and likely false positive, they are not counseled but are permanently deferred from further donations.

Depending on the setting (inoculum's size, patient's age, sex, and immune status) acute HCV infection leads to persistent infection in 50 to 80 percent of patients. Both HCV-specific CD4 and CD8 T cells are considered essential for spontaneous HCV clearance.<sup>2,3</sup> Gene activation profiles of acute infected chimpanzee's liver<sup>4-7</sup> have shown a direct correlation between upregulation of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-induced genes and inhibition of viral replication, confirming the essential role of this cytokine in viral clearance. Sustained persistence of multispecific CD4+ Th1 response, targeting dominant epitopes within non-structural proteins, leads to viral eradication and resolution of infection.<sup>8-20</sup> After spontaneous resolution of infection, specific T-cell responses are maintained indefinitely, while antibodies progressively decline and eventually wane, decades after exposure.<sup>21</sup> This partially explains the frequent detection of cellular immune responses in seronegative individuals at risk.<sup>22-26</sup>

The aims of this study were to investigate to what extent RIBA-3-indeterminate results among Catalonian blood donors represent prior resolved HCV infection and to determine the utility of enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay as a simple method to identify those with previous HCV exposure.

## MATERIALS AND METHODS

### Serologic tests

Since January 2006 blood units collected at the Catalonian Blood Bank are screened for the presence of serum anti-HCV using a commercial chemiluminescent immunoassay (PRISM HCV ChLIA, Abbott Diagnostics, Wiesbaden-Delkenheim, Germany). Specimens repeatedly reactive on the screening test are confirmed with a third-generation immunoblot assay (RIBA HCV 3.0 SIA, Chiron Corp., Emeryville, CA), which detects antibodies directed to recombinant antigens c33c (from the NS3 region), NS5, synthetic peptides c100p and 5.-1-1 (both from the NS4 region), and c22p (from the core region).

According to the manufacturer's instructions a sample was considered RIBA-3 positive when antibody reactivity (1+ or greater) to two or more antigens was present, indeterminate when reactivity was restricted to a single antigen, and negative when no antigen-specific reactivity was observed. Specimens with RIBA-3-indeterminate results were further tested with another third-generation line immunoassay (INNO-LIA HCV Score, Innogenetics, Ghent, Belgium), which incorporates HCV antigens derived from structural (core: C1 and C2 and envelope 2 proteins), and nonstructural regions (NS3 helicase, NS4A, and NS5A recombinant proteins).

### HCV RNA detection and HCV genotyping and serotyping

Between January 2006 and March 2007, all blood donations were routinely tested for HCV RNA with an in-house real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in plasma minipools of 48 samples (low-end detection limit, approx. 816 IU/mL). Between April and December 2007, a commercial HCV transcription-mediated amplification system (Procleix Ultrio assay, Novartis, Emeryville, CA) was implemented (low-end detection limit, 3.6 IU/mL). Specimens initially reactive on screening were retested individually with the in-house RT-PCR (low-end detection limit, approx. 17 IU/mL).

In RIBA-3-positive and HCV RNA-positive donations, HCV genotype was determined using a commercial line-probe assay (INNO-LIPA HCV kit, Innogenetics) while in those with undetectable RNA the HCV serotype was tested using the Murex HCV Serotyping 1-6 assay (Abbott) according to the manufacturer's instructions.

### Subjects included for cellular immunity assessment

Of the entire donor population screened between January 2006 and December 2007, we selected 117 blood donors to study their HCV-specific T-cell response. This subset included 27 RIBA-3-indeterminate blood donors (ChLIA positive, RIBA-3 indeterminate, and HCV RNA negative), 48 blood donors with chronic infection (ChLIA positive, RIBA-3 positive, and HCV RNA positive), and 12 spontaneous resolvers (ChLIA positive, RIBA-3 positive but consistently negative for HCV RNA). As control subjects we enrolled 30 blood donors (12 repeatedly reactive on the screening test but who tested consistently negative on the two confirmatory tests [RIBA-3 and INNO-LIA] and 18 who tested negative on the screening test). None of the patients was coinfecting with HIV or HBV. All subjects gave their written informed consent and the study was approved by the Institutional Review Board on Clinical Research.

## HCV antigens

Purified recombinant HCV proteins, derived from genotype 1a sequence and expressed in *Escherichia coli* (core, amino acids 1-115; NS3, amino acids 1007-1534; and NS3 helicase, amino acids 1207-1488) were purchased from Mikrogen (Munich, Germany).

## Cell culture and cytokine analysis

Peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) were isolated on ficoll density gradients (BD Biosciences, San Diego, CA), washed twice in Hanks' buffered salt solution (GIBCO BRL, Grand Island, NY), and cryopreserved in medium containing 90 percent fetal calf serum (GIBCO BRL) and 10 percent dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). All functional assays were performed with cryopreserved PBMNCs. After being thawed, cells were cultured at  $10^6$  cells per mL in R10 (RPMI 1640 [GIBCO] supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum, 2 mmol/L L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin). After overnight rest at 37°C and 5 percent CO<sub>2</sub>, HCV antigens (2  $\mu$ g/mL) were added and cells were further incubated for 72 hours before testing for cytokine production. Control cultures included phytohemagglutinin (PHA) at 2  $\mu$ g per mL or medium alone.

After 72 hours, cell-free supernatants from HCV antigen-stimulated cells and controls were collected, aliquoted, and stored at -80°C. We used a cytometric bead array (CBA, Becton Dickinson, San Jose, CA) assay to quantify interleukin (IL)-2, IL-10, and IFN- $\gamma$  in culture supernatants. Data acquisition was performed by flow cytometry using a fluorescence-activated cell sorting machine (FACSCalibur, BD Biosciences), and data were analyzed with CBA software. Cytokine concentrations were determined by comparison with standard curves. Lower detection limits for the three cytokines were less than 3 pg per mL for IL-2 and IL-10 and less than 8 pg per mL for IFN- $\gamma$ .

## ELISpot assay

For IFN- $\gamma$  ELISpot assay, duplicates of  $1 \times 10^5$  PBMNCs per well were cultured in 96-well round-bottomed plates coated with anti-IFN- $\gamma$  monoclonal antibody (MoAb; 1-D1K, Mabtech, Nacka, Sweden) in R10 and with 2  $\mu$ g per mL HCV antigens, 2  $\mu$ g per mL PHA, or buffer control. After 48 hours at 37°C and 5 percent CO<sub>2</sub>, cells were removed by washing the plates five times with phosphate-buffered saline (PBS). One-hundred microliters of alkaline phosphatase-conjugated MoAb (7-B6-1, Mabtech) was added to each well (final concentration 1  $\mu$ g/mL) and incubated for 2 hours at room temperature. Unbound conjugate was removed by washing plates with PBS and

developed by incubating for 15 minutes with substrate solution (BCIP/NBT-plus, Mabtech). The color reaction was stopped by rinsing with tap water. After being dried, antigen-specific spot-forming cells (SFCs; in the presence of antigen minus SFC in buffer controls) were counted with an ELISpot reader (Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Germany). Results were expressed as the number of IFN- $\gamma$  SFCs per  $10^6$  PBMNCs (IFN- $\gamma$  SFCs/ $10^6$  PBMNCs). Assays with high background (mean 10 SFCs/well in buffer control wells) or no PHA response were excluded. A response was scored as positive when the number of IFN- $\gamma$  SFCs was greater than the mean response in the controls plus 2 standard deviations (SDs) for each protein and more than threefold above the background response (buffer control).

## Statistical analysis

Results are presented as means and SDs or medians and ranges. Fisher's exact test or the chi-square and t test were used for statistical comparison of rates and of means of normally distributed quantitative measures, respectively. Medians of IFN- $\gamma$  SFCs among groups and medians of cytokines concentration as measured by CBA were compared with nonparametric test (Mann-Whitney U test). p Values of less than 0.05 were considered significant. All calculations were performed with computer software (SPSS, Version 15.0, SPSS, Inc., Chicago, IL).

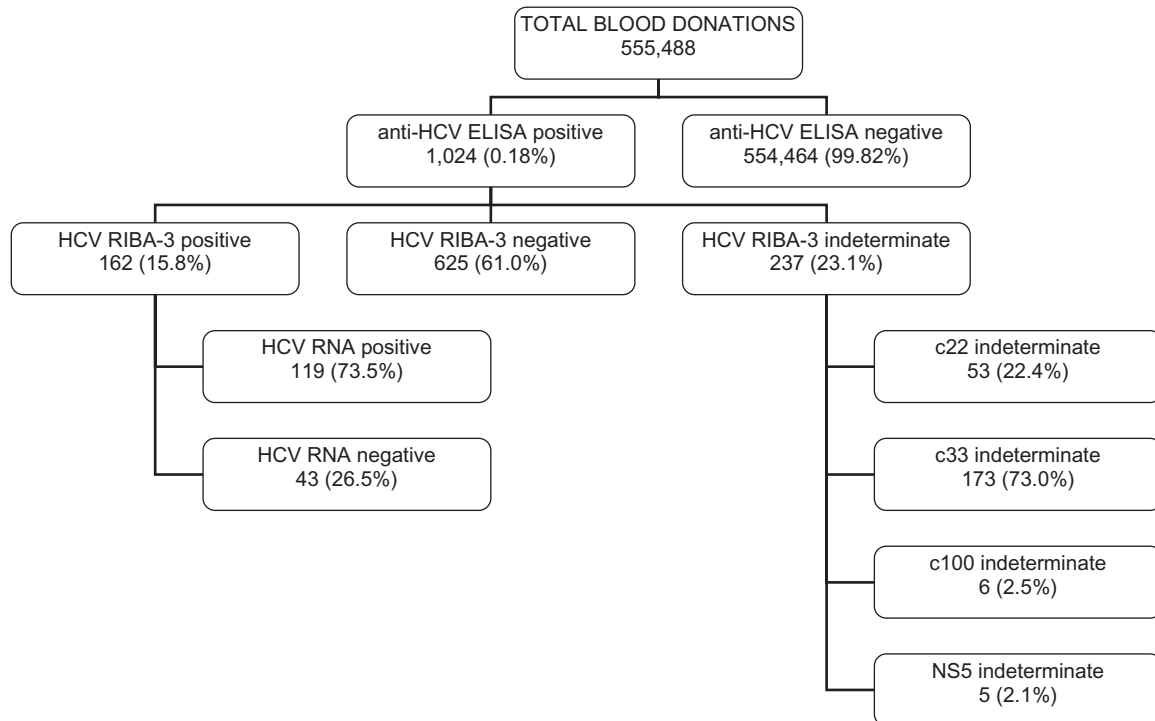
## RESULTS

### Prevalence of anti-HCV-positive/RIBA-3-indeterminate blood donors

Between January 2006 and December 2007, a total of 555,488 blood donors were screened for HCV antibodies and HCV RNA at the Catalan Blood Bank (Fig. 1). A total of 1,024 donations were initially reactive by PRISM assay, but only 162 were confirmed as anti-HCV positive by RIBA 3.0 (16%). However, an indeterminate RIBA-3 pattern (reactivity to a single antigen) was found in 237 samples (23%). Hence, the prevalence of RIBA-3-indeterminate patterns in our blood donor population was 0.043 percent, significantly higher than that of RIBA-3-positive donors (0.029%,  $p < 0.001$ ). The most common indeterminate patterns were isolated reactivity to NS3 (c33c) or core (c22p), in 73.0 and 22.4 percent of the cases, respectively, while single reactivities to NS4 (c100p/5-1-1) or NS5 were much less frequent (2.5 and 2.1%, respectively).

### Characteristics of RIBA-3-indeterminate blood donors

Twenty-seven (19 c33c reactive only and 8 with isolated c22p reactivity) of the 226 (12%) NS3 or core RIBA-3-



**Fig. 1. Prevalence of HCV infection in the Catalonian Blood Bank. Blood donations were screened with HCV enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and positive results were confirmed by HCV RIBA-3. Viral RNA was tested by PCR and transcription-mediated amplification system. All indeterminate blood donations were HCV RNA negative.**

indeterminate donors identified during the 2-year interval were enrolled in the present study and their results were compared to those observed among 60 RIBA-3–positive donors (12 with spontaneously resolved infection and 48 with chronic HCV infection) and to 30 RIBA-3–negative control donors (12 of them repeatedly reactive on the anti-HCV screening assay and 18 negative on both screening and confirmatory tests). As shown in Table 1, indeterminate donors did not differ from RIBA-confirmed or RIBA-negative donors with regard to age and sex.

Only 1 (4%) of the 27 indeterminate donors reported a potential risk factor for HCV exposure compared to 42 percent of the 12 RIBA-3–positive/HCV RNA–negative donors ( $p = 0.007$ ) and 46 percent of the HCV RNA–positive donors ( $p < 0.001$ ). Nine of the 12 (75%) spontaneous resolvers (RIBA-3 positive/HCV RNA negative) had been infected with serotype 1; no reactivity was found on the serotyping assay in the remainder. Among the 48 persistently infected donors (RIBA-3 positive/HCV RNA positive), HCV genotype 1 was found in 29 cases (60%), genotype 2 in 4 cases (8%), genotype 3 in 6 (13%), genotype 4 in 7 (15%), and genotype 6 in the remaining 2 donors (4%). Fifteen of the 27 indeterminate donors (56%) were followed up for at least 12 months and all remained RIBA-3 indeterminate, with the same antigen reactivity and with undetectable viral RNA.

When the samples from the 27 RIBA-3–indeterminate donors were tested with the INNO-LIA confirmatory assay, 3 gave discordant results, 2 of them being negative on INNO-LIA (1 c33c reactive and 1 c22p reactive only on RIBA-3) and 1 c22p reactive only being positive on INNO-LIA because of additional 1+ reactivity toward NS3 and NS4 antigens. The remainder gave the same indeterminate pattern (core or NS3 reactive only), for an overall concordance of 89 percent.

### HCV-specific CD4+ T-cell responses

#### *IFN- $\gamma$ ELISpot responses*

The threshold for a positive IFN- $\gamma$  ELISpot response was calculated with the seronegative controls (mean response plus 2 SD) and differed slightly for the different HCV proteins. It was set at 97 SFCs per  $10^6$  PBMCs for the core protein, 129 for the NS3, and 164 for NS3 helicase. As shown in Fig. 2, positive IFN- $\gamma$  response to at least one HCV protein was found in 13 of the 27 RIBA-3–indeterminate donors (48%) and in 4 of the 30 anti-HCV–reactive or nonreactive/RIBA-3–negative donors used as controls (13%;  $p = 0.008$ ). The difference between RIBA-3–indeterminate and RIBA-3–negative donors was more evident when the latter were separated according to whether they had been reactive on the screening test,

**TABLE 1. Baseline characteristics of study subjects at time of blood donation**

Characteristic	RIBA-3 indeterminate, HCV RNA negative	RIBA-3 positive, HCV RNA negative	RIBA-3 positive, HCV RNA positive	RIBA-3–negative controls
Number	27	12	48	30
Mean age (range), years	42 (21-64)	45 (27-61)	43 (23-63)	44 (19-63)
Sex males (%)	14 (61)	8 (67)	29 (60)	18 (60)
HCV RNA	Negative	Negative	Positive	Negative
Mean S/CO* (SD)	2.21 ± 0.8	4.88 ± 1.7†	6.80 ± 1.5†	1.88 ± 0.8‡
RIBA-3	Indeterminate	Positive	Positive	Negative
c22p	8	11	44	
1+	1	0	0	
2+	3	2	1	
3+	1	0	0	
4+	3	9	43	
c33c	19	10	45	
1+	2	0	1	
2+	12	7	1	
3+	1	1	3	
4+	4	2	40	
Risk factor				
IDU	0	3	15	0
Blood/blood products§	1	1	3	1
Surgical intervention	0	1	3	1
Sexual¶	0	0	0	0
Tattoo/piercing	0	0	1	0
No known risk factor reported	26	7	26	28

\* S/CO of the chemiluminescent anti-HCV screening test.

† Differences between RIBA-3–indeterminate, spontaneous resolvers and persistently infected blood donors were significant (p < 0.001).

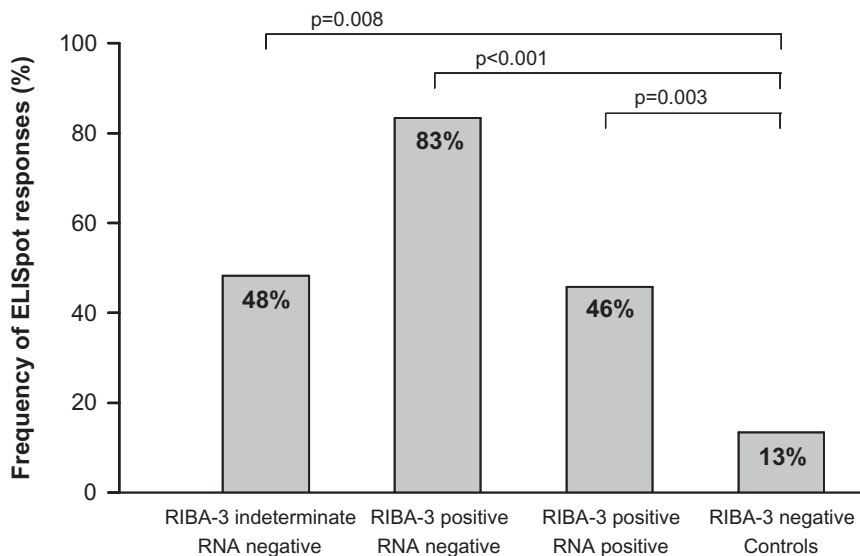
‡ Mean S/CO (±SD) of 12 blood donors repeatedly reactive on screening test but negative on RIBA-3.

§ Transfusion of blood or blood products before 1991.

|| Major surgical or invasive diagnostic or therapeutic procedure during hospitalization.

¶ Sexual intercourse with known HCV-infected partner.

IDU = intravenous drug use.



**Fig. 2. Frequency of ELISpot responses (IFN-γ production) in RIBA-3–indeterminate, RIBA-3–positive (HCV RNA–negative or –positive), and RIBA-3–negative blood donors in front of HCV recombinant antigens. Only p values for significant differences are depicted. The different proportion of positive ELISpot responses between RIBA-3–indeterminate donors (48%) and RIBA-3–positive HCV RNA–negative donors (83%) did not reach significance (p = 0.076).**



since a positive ELISpot response was detected in only one (6%) of those negative for anti-HCV in the screening test ( $p = 0.003$ ) and in 3 of the 12 (25%) anti-HCV-reactive/RIBA-negative donors ( $p = 0.291$ ). Among the 60 anti-HCV-confirmed donors (RIBA-3 positive), a positive ELISpot response was detected in 10 of the 12 HCV RNA-negative donors with a past resolved infection (83%) ( $p < 0.001$ ) and in 46 percent of persistently infected (HCV RNA-positive) donors ( $p = 0.003$ ).

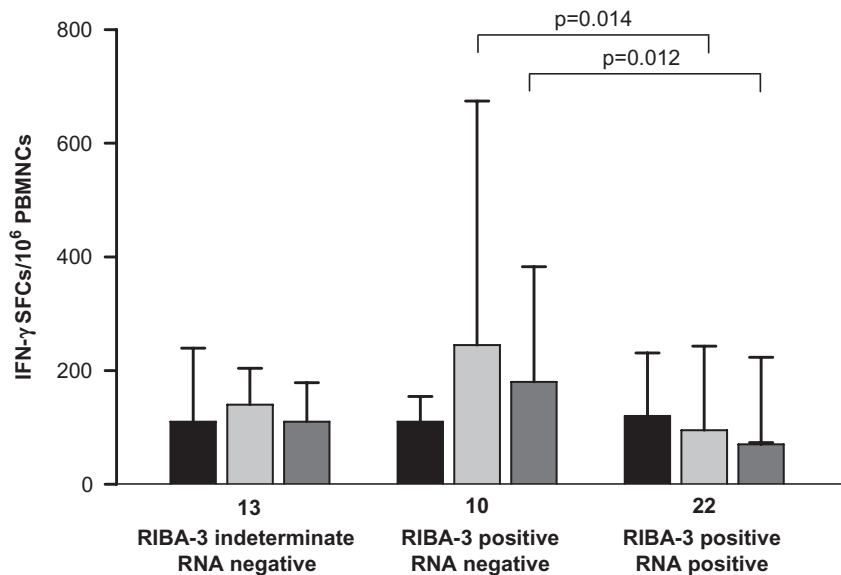
The HCV-specific T-cell responses in the ELISpot were as frequent in c22p (core)-reactive-only donors (50%) as in those with isolated reactivity to c33c (NS3; 47%). Five of 13 RIBA-3-indeterminate donors with a positive ELISpot test produced IFN- $\gamma$  in response to core protein only, another 5 to NS3 only, and 3 to both structural and nonstructural antigens. The antigen-inducing IFN- $\gamma$  production correlated poorly with the antibody pattern on RIBA-3. Of the 4 c22p-reactive-only donors with a positive ELISpot test, 1 responded to core antigen and 3 to NS3 antigens, and of the 9 c33c-reactive-only donors, 4 responded only to core, 2 to NS3, and 3 to both antigens. None of the two RIBA-3-indeterminate donors, who tested negative on INNO-LIA, had a positive ELISpot response. Interestingly, the only RIBA-3 c22p reactive only, who tested positive on INNO-LIA, showed a positive ELISpot response to NS3 but not to core.

As shown in Fig. 3, although the median number of SFCs per  $10^6$  PBMCs to nonstructural proteins was significantly greater among RIBA-3-positive/HCV RNA-

negative donors than in persistently infected donors (median, 245 vs. 80 and 180 vs. 65, to NS3 and NS3 helicase, respectively;  $p = 0.014$  and  $p = 0.012$ ), the magnitude of the IFN- $\gamma$  response to the different HCV antigens used in the ELISpot test was not different between the RIBA-3-indeterminate and RIBA-3-positive donors (irrespective of the HCV RNA status of the latter). Among indeterminate donors with positive ELISpot results, median numbers of IFN- $\gamma$  SFCs per  $10^6$  PBMCs were 110 (50-240) for the core protein, 140 (40-210) for NS3, and 110 (50-180) for the NS3 helicase. On the other hand, the breadth of the ELISpot response did not differ between RIBA-3 indeterminate, RIBA-3 positive/HCV RNA negative, and RIBA-3 positive/HCV RNA positive, since a multispecific ELISpot response (to both structural and nonstructural antigens) was seen in 23, 50, and 27 percent of donors in the three groups, respectively.

#### Soluble cytokine production assessed by CBA

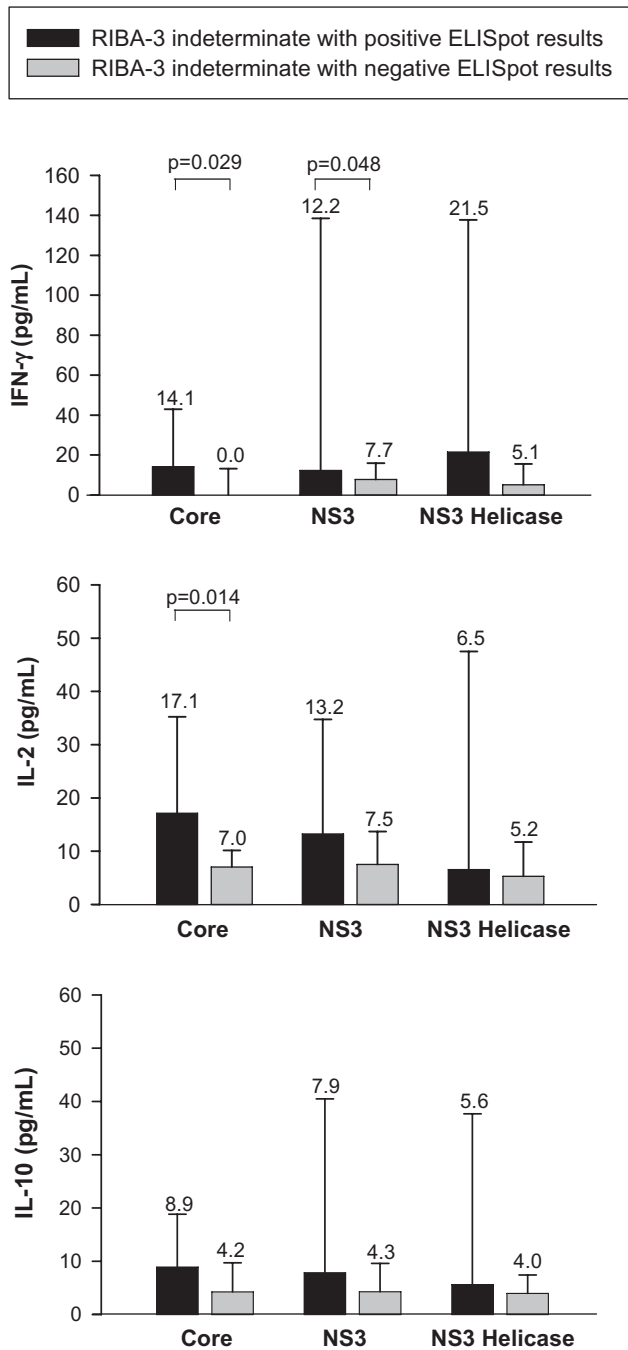
To confirm and extend the results of the ELISpot testing, we quantified cytokine levels in cell culture supernatants after 72 hours of stimulation with HCV antigens or medium alone in all study subjects. Among RIBA-3-indeterminate donors, levels of IFN- $\gamma$ , IL-2, and IL-10 were compared between those with and without a positive ELISpot response. As shown in Fig. 4, no significant IFN- $\gamma$  production was detected among indeterminate donors without an ELISpot response, whereas in those with a positive ELISpot response, significant IFN- $\gamma$  production was detected in response to core (14.1 pg/mL, 0-44) and NS3 (12.2 pg/mL, 0-140). Response to NS3 helicase antigens was higher in ELISpot responders without significance (21.5 pg/mL, 0-142). IL-2 levels were significantly higher among indeterminate donors with ELISpot response only after core stimulation (17.1 pg/mL, 0-36 vs. 7 pg/mL, 0-11, respectively;  $p = 0.014$ ). Levels of the immunosuppressive cytokine IL-10 did not differ significantly between indeterminate donors with or without ELISpot response, although the overall production of IL-10 after stimulation with core and NS3 antigens tended to be higher among ELISpot responders than in ELISpot nonresponder donors.



**Fig. 3.** HCV-specific T-cell responses as determined by IFN- $\gamma$  ELISpot assay. PBMCs were stimulated using structural protein (core (●)) and non-structural protein (NS3 (□)/NS3 helicase (■)) as described under Materials and Methods. Only those with a positive response to at least one protein were included in the analysis. Medians of IFN- $\gamma$  SFCs per  $10^6$  PBMCs in the different groups were compared by Mann-Whitney's U test.

## DISCUSSION

In low-risk populations, such as volunteer blood donors, screening tests for anti-HCV have a low specificity with close to 60 percent of reactive samples representing false-positive test results.



**Fig. 4.** PBMNCs from RIBA-3-indeterminate blood donors with ELISpot response secrete IFN- $\gamma$ , IL-2 in response to HCV recombinant proteins. PBMNCs from indeterminate donors with (●) or without (□) ELISpot response were stimulated with 2  $\mu$ g per mL HCV proteins, medium alone (negative control), or PHA as a positive control. The cytokine soluble from the supernatants stimulated with recombinant protein were quantified by CBA. The results were expressed as median of cytokine concentration. Median cytokines concentrations among groups with or without response to ELISpot were compared with Mann-Whitney's U test.

Therefore, anti-HCV confirmatory testing is required for samples reactive on the screening test. Testing of reactive samples with an immunoblot assay is a widely implemented confirmatory strategy, commonly used in addition to or after HCV RNA testing. The problem with immunoblot assays is that, in low-risk populations, such tests often yield indeterminate (isolated reactivity to a single antigen) results. RIBA-3-indeterminate results may occur during early seroconversion, even in the absence of detectable HCV RNA,<sup>27</sup> and might potentially occur during chronic infection with HCV genotypes other than 1.<sup>27-30</sup> However, since most RIBA-3-indeterminate volunteer donors are consistently HCV RNA negative and do not change their antibody pattern over time, this suggests that the vast majority of cases represent resolved HCV infections<sup>31-34</sup> or false-positive antibody reactivities.<sup>35,36</sup>

Several strategies have been used to clarify the significance of anti-HCV-indeterminate results in the absence of serum HCV RNA, including the analysis of risk factors, alanine aminotransferase levels, sample-to-cutoff (S/CO) ratios on the screening test, prior donation history, and intensity of single band reactivity on the confirmatory immunoblot assay,<sup>34,37</sup> as well as the use of synthetic peptides and/or anti-E2 assays.<sup>38-40</sup> More recently, Semmo and colleagues<sup>41</sup> have shown that 50 percent of RIBA-3-indeterminate blood donors had HCV-specific T-cell responses when their PBMNCs were tested by ELISpot assay. When compared with individuals with spontaneously recovered infection, these responses were more narrowly focused (restricted mostly to core peptides) but of similar magnitude, suggesting that close to half of such donors had been exposed to the virus and that their antibody reactivity was a footprint of a prior recovered infection.

In this study, RIBA-3-indeterminate blood donors represented 0.043 percent of the 555,488 blood donors screened at the Catalanian Blood Bank over 2 years or 23 percent of the 1024 donors who tested positive for the presence of anti-HCV on the screening test over that interval. In a subset of 27 RIBA-3-indeterminate blood donors with single-band reactivity to either c22p (core) or c33c (NS3), we detected HCV-specific T-cell responses on IFN- $\gamma$  ELISpot in 48 percent thus confirming the findings reported by Semmo and colleagues.<sup>41</sup> In contrast to the above-mentioned study, however, we also found viral-specific ELISpot responses in 4 (13%) of the 30 RIBA-3-negative controls, mostly at the expense of 12 EIA-reactive/RIBA-3-negative donors. Since screening tests are more sensitive than confirmatory immunoblot assays, this finding might imply that there is a wide spectrum of individuals with past recovered subclinical HCV infection ranging from those with no detectable anti-HCV, others with a very low-level anti-HCV that cannot be detected with immunoblot tests or whose anti-HCV can

only be detected as single antigen reactivity on confirmatory testing, and finally, those with unequivocal anti-HCV positivity readily confirmed by immunoblot testing. The lower proportion of IFN- $\gamma$  responses and risk factors for HCV infection among the RIBA-3–indeterminate donors compared to those of clear-cut spontaneous resolvers (RIBA-3 positive, HCV RNA-negative) might be explained by a combination of timing and inocula size. Older exposures might explain a weaker antibody response and a waning T-cell response, as well as failure to recall a potential risk factor. Seemingly, lower inocula size or less frequent exposure might also contribute to faster antibody clearance or a blunted humoral response. Our results also differ from those previously reported,<sup>41</sup> in that 8 of the 13 (62%) RIBA-3–indeterminate donors with HCV-specific T-cell reactivity had ELISpot responses to NS3 antigens, compared to 90 percent of spontaneous resolvers, suggesting that memory T cells had developed in response to actual viral infection rather than to exposure to non-infectious viral particles or a variant protective immune response to prior infection. This finding, supported by the production of significant levels of IFN- $\gamma$  after short-term culture in the presence of both core and NS3 antigens, rules out the possibility that the observed T-cell responses were due to cross-reactivity with other viruses or nonviral antigens, since cross-reactivity has been found to target certain core-derived peptides and to involve CD8 rather than CD4 T-cell responses, as previously reported.<sup>42</sup>

Interestingly, we did not find a correlation between antibody specificity on RIBA and T-cell reactivity on ELISpot, with c22p single-band reactive donors showing T-cell responses only to NS3 antigens and c33c (NS3)-indeterminate donors with positive ELISpot results restricted to core antigen, suggesting that the dynamics of B- and T-cell responses after spontaneous HCV clearance may be different in a substantial proportion of cases. Although the limited number of patients precludes statistical differences from being uncovered, spontaneous resolvers (RIBA-3 positive/HCV RNA negative) tended to show a stronger and broader IFN- $\gamma$  response toward non-structural antigens than both chronic carriers (RIBA-3 positive/HCV RNA positive) and RIBA-3–indeterminate donors. Remarkably, the latter tended to have a T-cell response toward NS3 of higher magnitude than that of chronic carriers, again suggesting that although lower in scope and magnitude the T-cell response pattern observed among RIBA-3–indeterminate donors more closely mirrors that of spontaneous resolvers.<sup>5,11</sup> This observation is also supported by the cytokine production after short-term culture, which was similar in RIBA-3–indeterminate donors with a positive ELISpot response and spontaneous resolvers (data not shown).

Whether some indeterminate blood donors without an HCV-specific ELISpot response had also been exposed to HCV remains to be determined. Had we used additional

HCV antigens or overlapping peptides spanning the entire HCV polyprotein, additional donors with specific T-cell responses might have been found. In addition, the ELISpot and CBA analyses might have been limited by the use of genotype 1a–based HCV antigens, which might not detect responses elicited by other genotypes. Finally, although ELISpot is a very sensitive technique, even more sensitive techniques, such as Class II tetrameric complexes,<sup>43</sup> and CD154-based capture and enrichment assays,<sup>44</sup> might have revealed additional specificities in some donors. In any event, our results strongly suggest that spontaneous recovery rates after HCV infection might be much higher than the 15 to 25 percent figures generally quoted (mostly derived from prospectively followed transfusion-associated infections) and could even reach 50 percent of exposed individuals especially when considering that up to 50 percent of seronegative sexual partners of chronic carriers show specific T-cell reactivity toward HCV.<sup>22-25</sup>

Our results support, as previously suggested<sup>41</sup> that IFN- $\gamma$  ELISpot might be useful in the diagnostic armament for resolved HCV infection and that RIBA-3–indeterminate blood donors should be appropriately counseled with regard to potential prior HCV exposure.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rosa Maria Maymó, Núria Martínez, and Joan Cid for their collaboration.


#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### REFERENCES

1. Lauer GM, Walker BD Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41-52.
2. Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune response in acute and chronic HCV infection. *Nature* 2005;436:946-51.
3. Neumann-Haefelin C, Blum HE, Chisari FV, Thimme R. T cell response in hepatitis C virus infection. *J Clin Virol* 2005;32:75-85.
4. Bigger CB, Brasky KM, Landford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C. *J Virol* 2001;120:955-66.
5. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pمبرتون J, Steiger C, Gavindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15661-8.
6. Major ME, Mihalik K, Puig M, Rehermann B, Nascimbeni M, Rice CM, Feinstone SM. Previously infected and recovered chimpanzees exhibit rapid responses that control

- hepatitis C virus replication upon rechallenge. *J Virol* 2002; 76:6586-95.
7. Major ME, Dahari H, Mihalik K, Puig M, Rice CM, Neumann AU, Feinstone SM. Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees. *Hepatology* 2004;39:1709-20.
  8. Gerlach JT, Ulsenheimer A, Gruner NH, Jung MC, Schraut W, Schirren CA, Heeq M, Scholz S, Witter K, Zahn R, Vogler A, Zachoval R, Pape GR, Diepolder HM. Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4+ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J Virol* 2005;79:12425-33.
  9. Schulze zur Wiesch J, Lauer GM, Day CL, Kim AY, Ouchi K, Duncan JE, Wurcel AG, Timm J, Jones AM, Mothe B, Allen TM, McGovern B, Lewis-Ximenez L, Sidney J, Sette A, Chung RT, Walker BD. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol* 2005;175:3603-13.
  10. Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995;346:1006-7.
  11. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruner NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4+ T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999;117:933-41.
  12. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A, Schraut WW, Schirren CA, Waechter M, Backmund M, Pape GR. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 2003;125:80-8.
  13. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001;194:1395-406.
  14. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with HCV. *J Exp Med* 2000;191:1499-512.
  15. 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. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent HCV infection. *Gastroenterology* 2004;127: 924-36.
  16. Aberle JH, Formann E, Steindl-Munda P, Weseslntner L, Gurguta C, Perstinger G, Grilnberger E, Laferl H, Dienes HP, Popow-Kraupp T, Ferenci P, Holzmann H. Prospective study of viral clearance and CD4 (+) T-cell response in acute hepatitis C primary infection and reinfection. *J Clin Virol* 2006;36:24-31.
  17. Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997;25:449-58.
  18. Semmo N, Day CL, Ward SM, Lucas M, Harcourt G, Loughry A, Klenerman P. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology* 2005;41:1019-28.
  19. Semmo N, Krashias G, Willberg C, Klenerman P. Analysis of the relationship between cytokine secretion and proliferative capacity in hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2007;14:492-502.
  20. Semmo N, Klenerman P. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2007;13:4831-8.
  21. Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 2000;6:578-82.
  22. Koziel MJ, Wong DK, Dudley D, Houghton M, Walker BD. Hepatitis C virus—specific cytolytic T lymphocytes and T helper cell responses in seronegative persons. *J Infect Dis* 1997;176:859-66.
  23. Bronowicki JP, Vetter D, Uhl G, Hudziak H, Uhrmacher A, Vetter JM. Lymphocyte reactivity to hepatitis C virus infection (HCV) antigens shows evidence for exposure to HCV in HCV-seronegative spouses of HCV-infected patients. *J Infect Dis* 1997;176:518-22.
  24. Kamal SM, Amin A, Madwar M, Graham CS, He Q, Al Tawil A, Rasenack J, Nakano T, Robertson B, Ismail A, Koziel MJ. Cellular immune responses in seronegative sexual contacts of acute hepatitis C patients. *J Virol* 2004;78: 12252-8.
  25. Busch M, Glynn S, Stramer S, Orland J, Murphy EL, Wright DJ, Kleinman S. Correlates of hepatitis C virus (HCV) RNA negativity among HCV-seropositive blood donors. *Transfusion* 2006;46:469-75.
  26. Kubitschke A, Bahr MJ, Aslan N, Bader C, Tillmann HL, Sarrazin C, Greten T, Wiegand J, Manns MP, Wedemeyer H. Induction of hepatitis C virus (HCV)-specific T cells by needle stick injury in the absence of HCV-viraemia. *Eur J Clin Invest* 2007;37:54-64.
  27. Fang CT, Tobler LH, Haesche C, Busch MP, Phelps B, Lepar G. Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donor. *Transfusion* 2003; 43:541-4.
  28. Dow BC, Munro H, Buchanan I, Follett EA, Davidson F, Yap PL, Simmonds P. Third-generation recombinant immunoblot assay: comparison of reactivities according to hepatitis C virus genotype. *Transfusion* 1996;36:547-51.
  29. Kanistanon D, Neelamek M, Dharakul T, Songsivilai S. The immunoreactivity profile of different HCV genotypes on immunoblot assay and its implications in the development of diagnostic assays. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1997;15: 133-40.
  30. Halfon P, Bourliere M, Khiri H, Halimi G, Gerolami V,

- Feryn JM, Feryn JM, Ouzan D. Serological response to infection with different isolates of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 2002;9:438-42.
31. Allain JP, Kitchen A, Aloysius S, Reeves I, Petrik J, Barbara JM, Williamson LM. Safety and efficacy of hepatitis C virus antibody screening of blood donors with two sequential screening assays. *Transfusion* 1996;36:401-5.
  32. Dow BC, Buchanan I, Munro H, Follett EA, Davidson F, Prescott LE, Yap PL, Simmonds P. Relevance of RIBA-3 supplementary test to HCV PCR positivity and genotypes for HCV confirmation of blood donors. *J Med Virol* 1996; 49:132-6.
  33. Lemaire JM, Courouche AM, Defer C, Bouchardeau F, Coste J, Agulles O, Cantaloube JF, Barlet V, Barin F. HCV RNA in blood donors with isolated reactivities by third-generation RIBA. *Transfusion* 2000;40:867-70.
  34. Kiely P, Kay D, Parker S, Piscitelli L. The significance of third-generation HCV RIBA-indeterminate, HCV RNA-negative results in voluntary blood donors screened with sequential third-generation immunoassays. *Transfusion* 2004;44:349-58.
  35. Kitchen AD, Tucker NV. The specificity of anti-HCV supplementary assays. *Vox Sang* 1995;69:100-3.
  36. Howell DR, Webster MH, Barbara JA. Retrospective follow up of recipients and donors of blood donations reactive for anti-HBc or for single HCV antibodies. *Transfus Med* 2000; 10:265-9.
  37. Pawlotsky JM, Bastie A, Pellet C, Remire J, Darthuy F, Wolfe L, Sayada C, Duval J, Dhumeaux D. Significance of third generation hepatitis C virus recombinant immunoblot assay. *J Clin Microbiol* 1996;34:80-3.
  38. Tobler LH, Busch MP, Wilber J, Dinello R, Quan S, Polito A, Kochesky R, Bahl C, Nelles M, Lee SR. Evaluation of indeterminate c22-3 reactivity in volunteer blood donors. *Transfusion* 1994;34:130-4.
  39. Leon P, Lopez JA, Elola C, Domingo CJ, Echevarria JM. Detection of antibody to hepatitis C virus E2 recombinant antigen among samples indeterminate for anti-HCV after wide serological testing and correlation with viremia. The Spanish Study Group for Blood Donors at Risk of Transmission of HCV. *Vox Sang* 1996;70:213-6.
  40. Leon P, Lopez JA, Elola C, Lee SR, Calmann M, Echevarria JM. Use of overlapping synthetic peptides to characterize samples from blood donors with indeterminate results to hepatitis C virus core antigen. *Vox Sang* 1998;75:32-6.
  41. Semmo N, Barnes E, Taylor C, Kurtz J, Harcourt G, Smith N, Klenerman P. T-cell responses and previous exposure to hepatitis C virus in indeterminate blood donors. *Lancet* 2005;365:327-9.
  42. Wedemeyer H, Mizukoshi E, Davis AR, Bennink JR, Rehermann B. Cross-reactivity between hepatitis C virus and influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells. *J Virol* 2001;75:11392-400.
  43. Cl D, Seth NP, Lucas M, Appel H, Gauthier L, Lauer GM, Robbins GK, Szczepiorkowski ZM, Casson DR, Chung RT, Bell S, Harcourt G, Walker BD, Klenerman P, Wucherpfennig KW. Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *J Clin Invest* 2003;112:831-42.
  44. Frentsch M, Olga A, Kirchoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, Scheffold A, Thiel A. Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med* 2005;11:1118-24. 

## 3. ESTUDI 2

REVERSIÓ DE L'ESTAT DISFUNCIONAL DE LES  
CÈL·LULES T CD4<sup>+</sup> ESPECÍFIQUES DE NS3 EN  
PACIENTS AMB INFECCIÓ PERSISTENT PEL VHC

### 3. ESTUDI 2: REVERSIÓ DE L'ESTAT DISFUNCIONAL DE LES CÈL·LULES T CD4<sup>+</sup> ESPECÍFIQUES DE NS3 EN PACIENTS AMB INFECCIÓ PERSISTENT PEL VHC

#### 3.1. Hipòtesi, objectius i disseny de l'estudi

##### Introducció

El VHC utilitza diferents mecanismes d'evasió del sistema immune generant que el 80% dels pacients amb exposició al virus evolucionin cap a persistència viral. Tot i l'eficàcia del tractament antiviral actual (Peg-IFN- $\alpha$  + RBV) en individus amb infecció persistent<sup>155-158</sup>, existeixen grups especials de pacients en els quals la teràpia actualment disponible està contraindicada o és francament insuficient per eliminar el virus, pel que la millor comprensió dels mecanismes de persistència viral o resolució espontània de la infecció poden ser clínicament rellevants.

Com hem explicat anteriorment, el VHC utilitza diferents mecanismes d'evasió del sistema immune tals com interferències en les vies de senyalització, modulació de l'activitat efectora del sistema immune, mutacions virals contínues i inducció d'un estat tolerogènic<sup>72-104</sup>. Tot i que el mecanisme d'inducció de la persistència viral no es coneix amb claredat, està ben establert que la resposta immune de les cèl·lules T és determinant en l'evolució de la infecció. Com ja s'havia demostrat i hem pogut corroborar en l'estudi anterior, les respostes immunes tipus Th1 de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> enfront a proteïnes no estructurals del virus són essencial per a la resolució de la infecció mentre que la infecció persistent està associada a una resposta inadequada i dèbil de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i l'alteració funcional de la resposta CD8 (disminució en la producció de citocines, incapacitat d'induir respostes citotòxiques i de proliferar i sobreexpressió de Tim-3 i PD1).

Estudis experimentals en ximpanzés han demostrat que l'absència de col·laboració per part dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> específics condiciona la persistència viral, per la qual cosa és possible que la infecció crònica en l'ésser humà sigui deguda a una disminució de la resposta CD4<sup>+</sup>. Les causes d'aquesta disfunció poden ser vàries incloent la inducció d'anèrgia a través de lligands peptídics alterats tal com s'ha postulat en el cas de la tolerància a cèl·lules tumorals.

## Hipòtesi

L'estat disfuncional de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques d'antigen dels individus amb infecció persistent és reversible *in vitro* en absència d'estimulació antigènica.

## Objectius

1. Identificar les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques del VHC de sang perifèrica de pacients amb infecció persistent i resolta espontàniament.
2. Dissenyar un protocol de selecció i expansió *ex vivo* de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques del VHC amb les condicions òptimes per restaurar la funcionalitat cel·lular en individus amb infecció persistent.
3. Caracteritzar fenotípicament i funcionalment les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques de VHC expandides per determinar el grau de restauració funcional.
4. Intentar comprendre els mecanismes de persistència viral en individus amb infecció persistent.

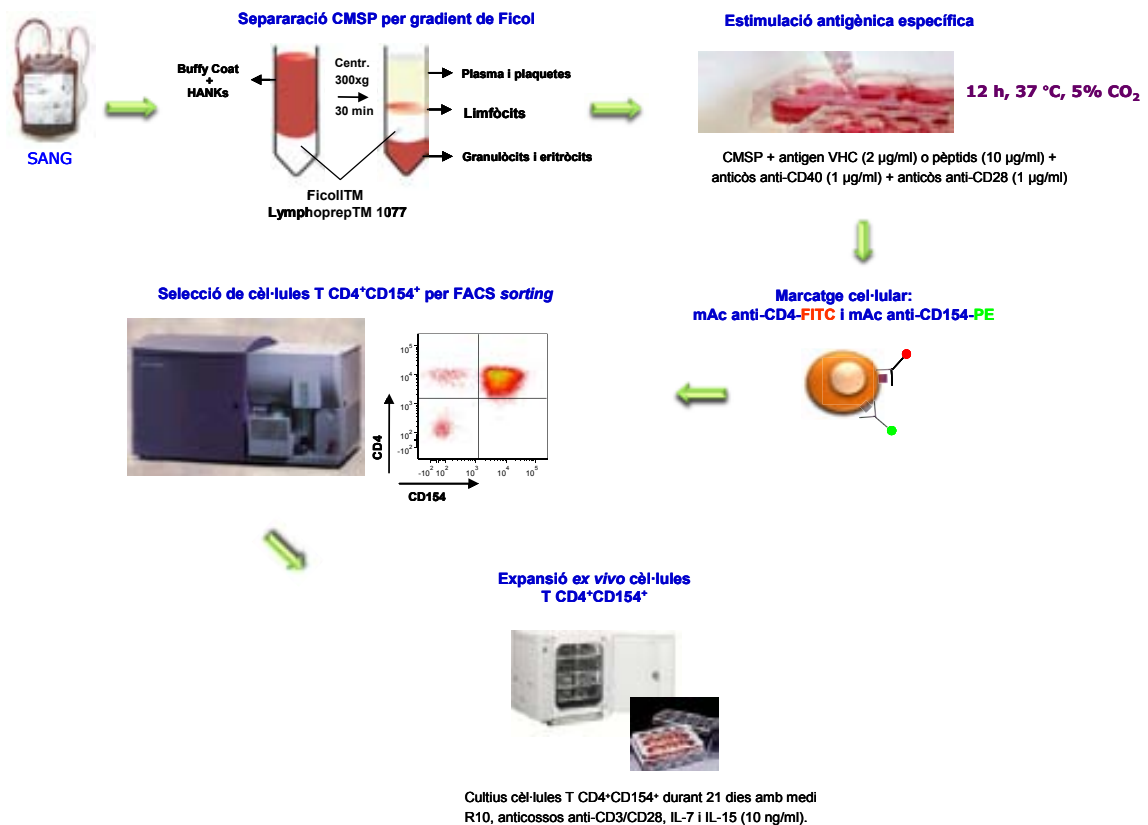
## Disseny de l'estudi

L'estudi de reversió de l'estat disfuncional de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques d'antigen es va realitzar sobre una cohort de 8 pacients amb infecció persistent pel VHC, 8 pacients amb curació espontània de la infecció i 9 controls sans, el procés del qual està esquematitzat en la figura 17.

- Identificació de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques del VHC de sang perifèrica mitjançant l'activació específica d'antigen i transitòria de la molècula CD154<sup>255, 256</sup> (segona senyal en la via d'activació limfocitària).
- Selecció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques d'antigen per *sorting* (citometria de flux) i expansió *in vitro* durant 21 dies en absència d'antigen viral i en presència de citocines homeostàtiques (IL-7/IL-15)<sup>257</sup>.



Tot el procés de selecció i expansió està parcialment explicat en l'article i completament detallat en l'apartat de material i mètodes d'aquesta tesi degut a la seva rellevància dins de l'estudi.



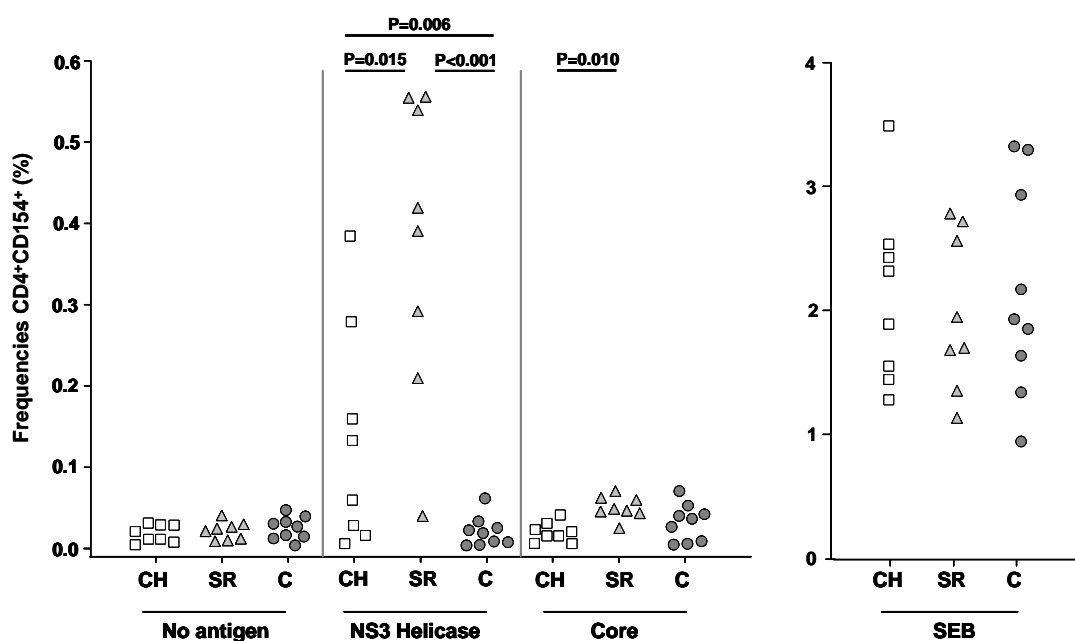
**Figura 17. Esquema del procés d'identificació, selecció i expansió de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques del VHC**

- Caracterització fenotípica (T<sub>CM</sub>, T<sub>EM</sub>) de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques expandides determinant l'expressió de CD45RO, CCR7 i CD62L en superfície per citometria de flux.
- Caracterització funcional mitjançant l'anàlisi de la producció de citocines Th1 / Th2 (ELISpot IFN-γ, CBA, secreció de citocines intracel·lulars), la capacitat proliferativa (assajos de CFSE<sup>258</sup>) i la capacitat de reexpressió de CD154.

Els estudis de caracterització fenotípica i funcional es van realitzar simultàniament en cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques de VHC expandides i en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> *ex vivo* autòlogues de cadascun dels pacients per poder realitzar les comparacions oportunes.

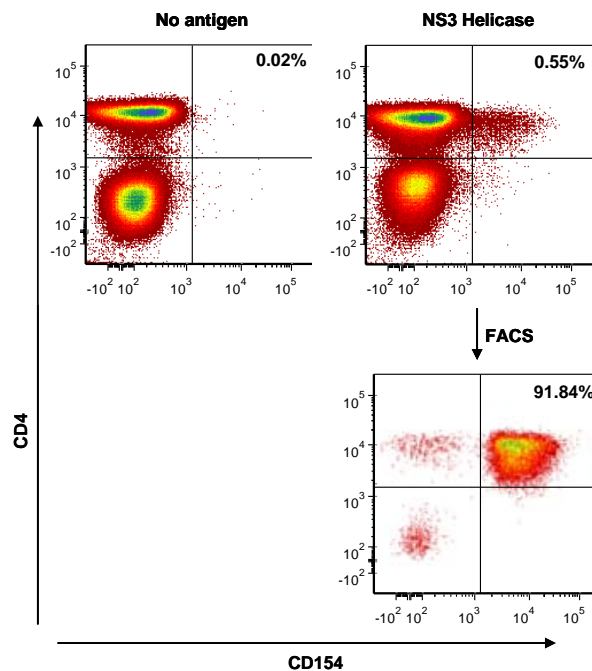
### 3.2. Resum dels resultats

1. Els pacients amb infecció persistent presentaven cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques de NS3 helicasa capaces d'activar-se (expressar CD154 en superfície) tot i la seva incapacitat d'induir respostes immunes efectives [mitjana de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>: 0,107% (0,019-0,386%) vs. 0,409% (0,030-0,546%), individus amb infecció persistent i curats espontanis respectivament,  $p=0,015$ ] (Fig. 18). L'expressió de CD154 sota l'estimulació amb l'antigen del core en individus amb infecció persistent va ser pràcticament nul·la (mitjana: 0,023% vs. 0,020%, core i absència antigènica;  $p=0,312$ ) (Fig. 18).



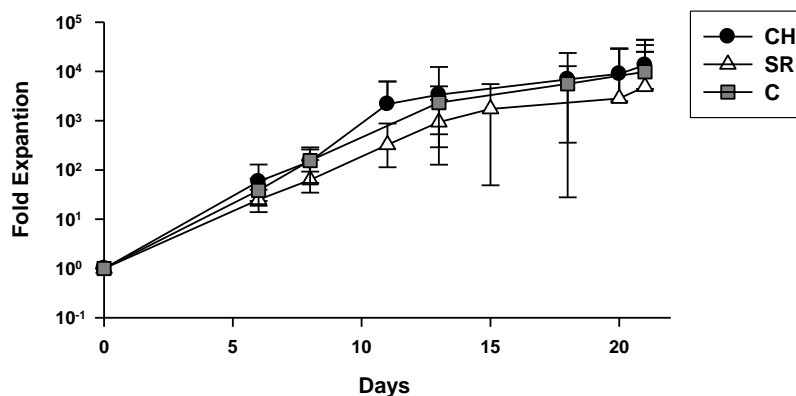
**Figura 18.** Freqüències d'expressió del CD154 en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> ex vivo enfront a les diferents proteïnes virals. Les freqüències de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> estan calculades sobre la població de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> totals (eix y). Els valors de P estan calculats amb el test de U-Mann Whitney. CH: infecció persistent per VHC; SR: resolució espontània del VHC; C: controls sans.

2. La selecció de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques es va realitzar mitjançant *sorting*, previ marcatge cel·lular amb anticossos anti-CD4-FITC i anti-CD154-PE, aconseguint separar de 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (en funció dels percentatges d'expressió de CD154) amb una puresa superior al 90%. (Fig. 19).



**Figura 19. Model d'anàlisi de la puresa de les cèl·lules CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> seleccionades per FACS**

3. Les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> es van expandir 3 logaritmes en 21 dies de cultiu policlonal amb medi R10 en presència d'anticòs anti-CD3/CD28, citocines homeostàtiques IL-7 i IL-15 (garantir la supervivència cel·lular), i en absència de NS3 helicasa, és a dir, l'antigen inductor de l'anèrgia (Fig. 20).



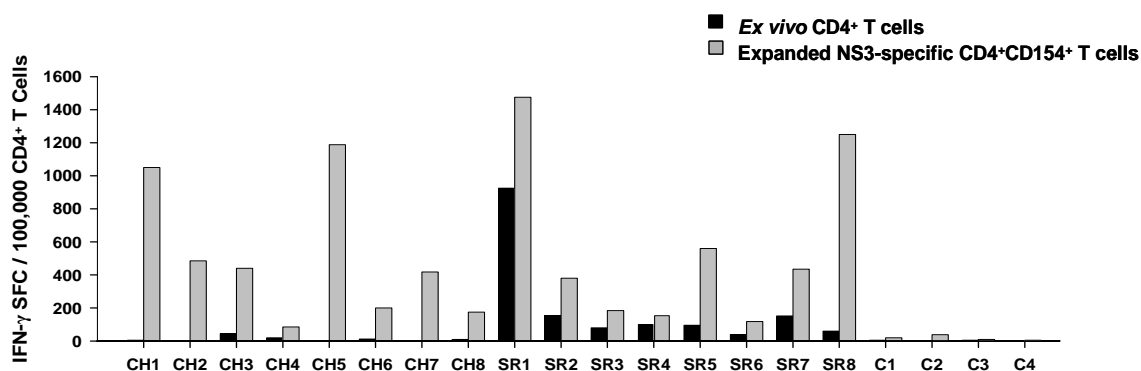
**Figura 20. Cultius d'expansió in vitro de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques de NS3 helicasa seleccionades per FACS.**

4. El 97% de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> expandides van presentar un fenotip de memòria efectora (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>baix</sup>), tant en pacients amb curació espontània com individus amb infecció persistent.

5. Les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques de NS3 helicasa dels individus amb infecció persistent havien restaurat la capacitat funcional (capacitat d'inducció citocines tipus Th1, de proliferar i de reexpressar CD154 i induir noves respostes efectores) després del procés d'expansió *in vitro* en absència antigènica.

### Citocines Th1 i Th2 (ELISpot IFN- $\gamma$ i CBA)

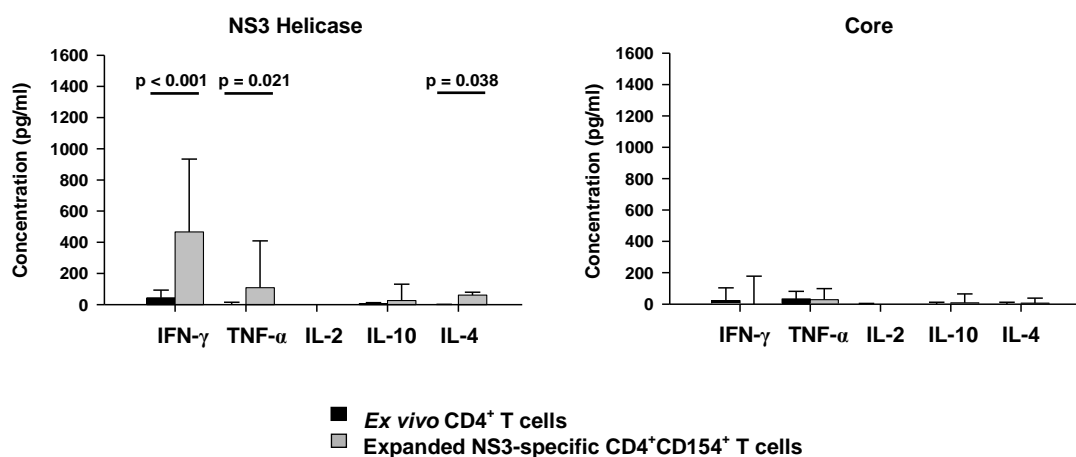
Les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> expandides dels individus amb infecció persistent van restaurar la capacitat de produir IFN- $\gamma$  aconseguint nivells similars als obtinguts en individus amb resolució espontània de la infecció (mitjana: 429 CFS-IFN $\gamma$ /10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> expandides vs. 408 CFS-IFN- $\gamma$ /10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>, respectivament), i 50 vegades superior als produïts per les cèl·lules les CD4<sup>+</sup> *ex vivo* (429 CFS/10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> expandides vs. 8 CFS/10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> *ex vivo*; p<0,001). Els resultats d'ELISpot es van confirmar amb la quantificació de citocines solubles per citometria de flux (mitjana: 465,9 pg/ml IFN- $\gamma$  vs. 43,5 pg/ml, cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> expandides vs. CD4<sup>+</sup> *ex vivo* respectivament; p<0,001, Fig. 21).



**Figura 21. Resultats de l'assaig d'ELISpot IFN- $\gamma$  de les cèl·lules CD4<sup>+</sup> *ex vivo* i expandides dels pacients i dels controls.**

La producció de TNF- $\alpha$  i d'IL-4 per part de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> dels individus amb infecció persistent s'incrementava significativament després del procés d'expansió (108 pg/ml vs. 0,52 per al TNF- $\alpha$  p=0,021 i 61 pg/ml vs. 0,19 pg/ml per la IL-4, p=0,038), mentre que la producció d'IL-10 es va mantenir constant (26 vs. 6,8 pg/ml, respectivament; p=0,382) (Fig. 22).

En individus amb infecció curada espontàniament, la producció d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$ , d'IL-4 i d'IL-10 va ser pràcticament la mateixa abans i després del procés d'expansió.



**Figura 22. Producció de citocines específiques del VHC per part de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> ex vivo i expandides dels individus amb infecció persistent.**

### **Capacitat de proliferació (CFSE)**

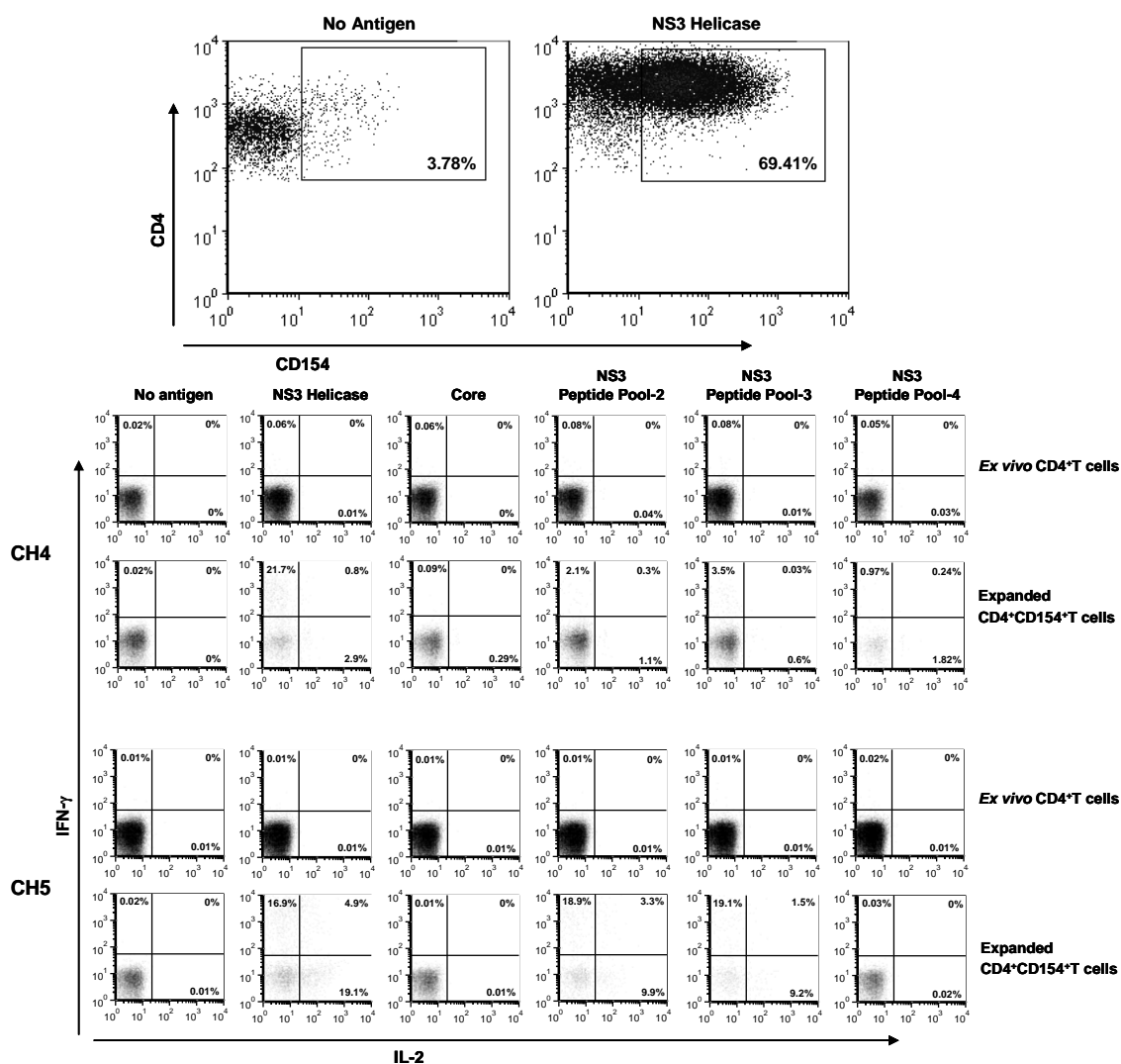
Les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques de NS3 helicasa dels individus amb infecció persistent van recuperar la capacitat de proliferació després del procés d'expansió *in vitro* en absència antigènica. La freqüència mitjana de proliferació de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> expandides en individus amb infecció persistent va ser de 11,3% (rang: 0-21,4%), 10 vegades superior a la proliferació de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> *ex vivo* (1,08%), i similars als obtinguts en individus amb infecció resolta espontàniament (7% CD4<sup>+</sup> *ex vivo* i 10,5% cèl·lules CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> expandides). No obstant, els pacients amb infecció persistent presenten un menor nombre de divisions cel·lulars que els individus curats espontàniament amb el mateix temps d'estimulació.

### **Reexpressió de CD154 i citocines intracel·lulars (ICS)**

Les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> seleccionades i expandides dels individus amb infecció persistent eren capaces d'induir la reexpressió del CD154 i de generar noves respostes immunes efectores Th1 (Fig. 23).

En ambdós grups, crònics i curats espontanis, més del 50% de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> expandides reexpressaven CD154 de manera antigen específica després de 12h d'estimulació amb la NS3 helicasa. Addicionalment es va correlacionar l'expressió de

CD154 amb perfils funcionals productors de múltiples citocines. Fins un 21,7% de les cèl·lules T CD154<sup>+</sup> expandides dels individus amb infecció persistent expressaven IFN- $\gamma$  intracel·lular, 19,1% IL-2 i fins al 4,9% expressaven simultàniament les dos citocines sota l'estimulació amb la NS3 helicasa o els pools de pèptids virals corresponents a la regió de la NS3, mentre que la producció de citocines intracel·lulars en cèl·lules CD4<sup>+</sup> *ex vivo* va ser pràcticament nul·la.



**Figura 23. Reexpressió de CD154 i producció de citocines específiques del VHC per part de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> *ex vivo* i expandides dels individus amb infecció persistent.**

6. El procés de selecció i expansió va ser específic. Les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques de NS3 helicasa expandides eren incapaces d'induir la producció de citocines (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4 i TNF- $\alpha$ ) i de proliferar sota l'estimulació amb l'antigen del core (Fig. 22 i 23).

7. No va haver correlació entre l'haplotip MHC de classe II i l'expressió de CD154 ni el grau de restauració funcional de les cèl·lules expandides.

En resum, en aquest segon estudi de la tesi es va demostrar que els pacients amb infecció persistent presenten cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques de VHC i en segon lloc, es va dissenyar un protocol de selecció i expansió *in vitro* de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques de NS3 helicasa en absència de l'estímul antigènic inductor de l'anèrgia i en presència de citocines homeostàtiques per tal de revertir l'estat disfuncional.

# Reversal of nonstructural protein 3-specific CD4<sup>+</sup> T cell dysfunction in patients with persistent hepatitis C virus infection

M. Bes,<sup>1,2,3</sup> S. Sauleda,<sup>1,3</sup> N. Casamitjana,<sup>1</sup> M. Piron,<sup>1,3</sup> I. Campos-Varela,<sup>2,3,4</sup> J. Quer,<sup>2,3,4</sup> M. Cubero,<sup>2,3,4</sup> L. Puig,<sup>1,3</sup> J. Guardia<sup>2,3,4</sup> and J. I. Esteban<sup>2,3,4</sup> <sup>1</sup>Transfusion Safety Laboratory, Banc de Sang i Teixits, Servei Català de la Salut, Barcelona; <sup>2</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra; <sup>3</sup>Centro de investigación biomédica en red de enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD) del Instituto de Salud Carlos III, Madrid; and <sup>4</sup>Liver Unit, Department of Medicine, and Liver Diseases Laboratory, Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Received July 2011; accepted for publication September 2011

**SUMMARY.** Hepatitis C virus (HCV)-specific T cell responses are essential for HCV control, and chronic infection is characterized by functionally altered antigen-specific T cells. It has been proposed that the early inactivation of specific CD4<sup>+</sup> T cell responses may be involved in establishment of HCV persistence. We have investigated whether HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cells dysfunction can be reversed *in vitro*. Non-structural protein 3 (NS3) and core-specific CD4<sup>+</sup> T cells from eight chronically infected and eight spontaneously resolved HCV individuals were selected through transient CD154 (CD40 ligand) expression, and their functional profile (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-4 production by enzyme-linked immunospot assay, cytometric bead array and intracellular cytokine staining, and proliferation by carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester dilution assay) was determined both *ex vivo* and after *in vitro* expansion of sorted CD154-expressing cells in the absence of specific antigen in

IL-7/IL-15-supplemented medium. *Ex vivo* bulk CD4<sup>+</sup> T cells from chronic patients expressed CD154 in most cases, albeit at lower frequencies than those of resolved patients (0.11% vs 0.41%;  $P = 0.01$ ), when stimulated with NS3, but not core, although they had a markedly impaired capacity to produce IL-2 and IFN- $\gamma$ . Antigen-free *in vitro* expansion of NS3-specific CD154<sup>+</sup> cells from chronic patients restored IFN- $\gamma$  and IL-2 production and proliferation to levels similar to those of patients with spontaneously resolved infection. Hence, NS3-specific CD4<sup>+</sup> T cell response can be rescued in most chronic HCV patients by *in vitro* expansion in the absence of HCV-specific antigen. These results might provide a rationale for adoptive immunotherapy.

**Keywords:** CD154, CD4 T cells, hepatitis C virus, interferon- $\gamma$ , T cell response.

## INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) persistence occurs in 60–85% of HCV-infected individuals, and although the precise mecha-

Abbreviations: APC, antigen presenting cells; CBA, cytometric bead array; CFSE, carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester; CMV, cytomegalovirus; ELISpot, enzyme-linked immunospot assay; FACS, fluorescence-activated cell sorting; HCV, hepatitis C virus; HLA, human leucocyte antigen; ICS, intracellular cytokine staining; IFN, interferon; IL-15, interleukin 15; IL-7, interleukin 7; NS3, non-structural protein 3; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PHA, phytohemagglutinin; SEB, *Staphylococcus aureus* enterotoxin B; SFC(s), spot-forming cell(s); TCR, T cell receptor; Treg, regulatory T cells.

Correspondence: Juan I. Esteban, MD, PhD, CIBEREHD, Liver Unit, Department of Medicine, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: jignacio.esteban@ciberehd.org

nism(s) of viral persistence remain unclear, it is well known that T cell responses play a critical role in the outcome of infection. Several observations in humans and experimentally inoculated chimpanzees have shown that HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cells are essential for spontaneous HCV clearance [1–4]. Individuals with self-limiting infection demonstrate polyfunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, mostly targeting dominant epitopes within nonstructural proteins [1–3], which appear critical for protective immunity. In contrast, persistent infection is associated with failure to mount or sustain an adequate CD4<sup>+</sup> T cell response, followed by deficient maturation and generation of HCV-specific memory CD8<sup>+</sup> T cells [5–10].

Recently Mueller *et al.* [11], based on the antigen-specific upregulation of CD154, have demonstrated that polyclonal HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cells, although dysfunctional, are present in peripheral blood and liver of most patients with persistent HCV infection, confirming previous reports



showing that exhausted virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells are not completely deleted during chronic infection [7,8]. Accordingly, it is possible that the CD8<sup>+</sup> T cell exhausted phenotype found in persistent HCV infection (decreased cytokine production, proliferation and cytotoxicity and overexpression of inhibitory receptor molecules such as PD-1 and Tim-3) [4–6] might be a consequence of insufficient help from functionally impaired CD4<sup>+</sup> T cells, as previously suggested [5–11].

We hypothesized that if the exhaustion of the HCV-specific CD4<sup>+</sup> response is associated with persistent high-level viral replication during chronic infection, it could be restored by *in vitro* culture of HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the absence of the cognate antigens. Our results show that NS3-specific CD4<sup>+</sup> T cells can be readily selected from peripheral blood in most chronic patients and their impaired capacity to produce IFN- $\gamma$ , IL-2 and proliferate can be reversed after expansion with anti-CD3/CD28-coated beads, in IL-7 and IL-15-supplemented medium [12,13].

## PATIENTS AND METHODS

### Subjects

As shown in Table 1, blood was obtained from eight-first-time blood donors with persistent HCV infection (CH1–CH8), HCV RNA+ (Ampliprep-Cobas Taqman HCV test<sup>®</sup>; Roche Molecular Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland), eight confirmed (RIBA3 HCVSIA<sup>®</sup>; Chiron, Emeryville, CA, USA) anti-HCV-positive blood donors with persistently undetectable HCV RNA (SR1–SR8) and nine healthy seronegative donors included as controls. All HCV individuals had been exposed to HCV genotype 1 as confirmed by serological (Murex HCV 1-6 serotyping assay<sup>®</sup>; Abbot, Abbot Park, IL, USA) or molecular (Inno-LiPA HCV<sup>®</sup>; Innogenetics, Ghent, Belgium) tests, in HCV RNA negative and positive individuals, respectively. No selection criteria other than genotype were used, and all donors were included during 2008. Class I and II MHC typing was performed by polymerase chain reaction

**Table 1** Baseline characteristics of patients with chronic HCV infection (CH1–CH8), spontaneously resolved infection (SR1–SR8) and healthy controls (C1–C9)

Patient	Sex	Age	HCV RNA (log <sub>10</sub> IU/mL)	ALT (U/L)	MHC I		MHC II	
					HLA-A	HLA-B	HLA-DR B1	HLA-DQ B1
CH1	M	43	5.6	45				
CH2	F	53	6.9	33	A*24, A*30	B*18, B*35	B1*03, B1*11	B1*02, B1*03
CH3	M	37	6.5	29	A*02, A*30	B*13, B*13	B1*07, B1*07	B1*02, B1*02
CH4	F	51	5.9	44	A*02, A*11	B*15, B*44	B1*11, B1*13	B1*03, B1*06
CH5	F	37	5.7	48	A*02, A*02	B*40, B*41	B1*13, B1*13	B1*03, B1*06
CH6	M	35	6.6	35	A*02, A*03	B*18, B*49	B1*11, B1*11	B1*03, B1*03
CH7	M	44	6.4	27	A*02, A*02	B*18, B*44	B1*03, B1*07	B1*02, B1*02
CH8	F	40	6.2	104	A*02, A*68	B*14, B*18	B1*01, B1*04	B1*03, B1*05
SR1	F	41	Und	7	A*66, A*69	B*41, B*55	B1*04, B1*11	B1*03, B1*03
SR2	F	45	Und	14	A*02, A*33	B*08, B*49	B1*01, B1*03	B1*02, B1*05
SR3	M	48	Und	23	A*29, A*74	B*35, B*44	B1*15, B1*16	B1*05, B1*06
SR4	M	50	Und	12	A*01, A*26	B*15, B*51	B1*04, B1*15	B1*03, B1*06
SR5	F	34	Und	11	A*24, A*24	B*14, B*35	B1*11, B1*15	B1*03, B1*06
SR6	M	56	Und	21	A*02, A*32	B*14, B*49	B1*04, B1*15	B1*03, B1*06
SR7	M	40	Und	33	A*02, A*02	B*44, B*44	B1*07, B1*16	B1*02, B1*05
SR8	F	33	Und	7	A*68, A*68	B*08, B*44	B1*03, B1*07	B1*02, B1*02
C1	M	53			A*01, A*02	B*15, B*35	B1*03, B1*08	B1*02, B1*04
C2	F	23			A*01, A*30	B*37, B*51	B1*11, B1*11	B1*03, B1*06
C3	M	31			A*11, A*24	B*13, B*35	B1*01, B1*15	B1*05, B1*06
C4	F	47			A*24, A*29	B*35, B*51	B1*13, B1*14	B1*05, B1*06
C5	F	28			A*03, A*33	B*07, B*35	B1*01, B1*04	B1*04, B1*05
C6	F	36						
C7	M	41						
C8	M	29						
C9	F	52						

CH, chronic hepatitis C; HCV, hepatitis C virus; SR, spontaneously resolved HCV infection; C, healthy control; M, male; F, female; ALT, alanine aminotransferase; MHC, major histocompatibility complex; HLA, human leucocyte antigen; Und, undetectable, <50 IU/mL.

sequence-specific oligonucleotide testing on Luminex microbead arrays (Tepnel Lifecodes, Stamford, CT, USA). All subjects gave written informed consent, and the study protocol was performed according to the 1975 Declaration of Helsinki guidelines after approval by the Institutional Review Board on Clinical Research.

#### *Separation of lymphocytes*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from whole blood by density gradient centrifugation and cryopreserved in 90% foetal calf serum and 10% DMSO. All assays were performed with cryopreserved PBMCs. Whole PBMCs were used for *ex vivo* antigen-specific expression of CD154. For functional studies, CD4<sup>+</sup> T cells were isolated using Dynal CD4 isolation kit (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) and autologous CD4-depleted PBMCs were irradiated (30 Gy) and used as feeder and antigen presenting cells (APC).

#### *Synthetic peptides and recombinant proteins*

The 28 and 98 peptides (15–19-mers with 11–12 amino acid overlaps) spanning the core and NS3 proteins of HCV genotype 1a were obtained through the NIH Biodefense and Emerging Infectious Research Resources Repository, NIAID, NIH (peptide arrays, HCV, H77, core and NS3 proteins, NR-3747 and NR-3752) and used at a final concentration of 10 µg/mL. Purified recombinant HCV core (aa: 1–115) and NS3-helicase (aa: 1207–1488) proteins, derived from a genotype 1a sequence, were purchased from Mikrogen (Neuried, Germany) and used at a final concentration of 2 µg/mL. An additional recombinant NS3 helicase protein, derived from a genotype 1b sequence expressed in the yeast *Pichia pastoris*, was also used in some experiments. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) and phytohemagglutinin (PHA) were used as positive controls. A cytomegalovirus (CMV) peptide pool (Peptivator-CMV pp65; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) at the final concentration of 1 µg/mL was also used as an additional positive control in CMV-antibody positive individuals.

#### *Ex vivo antigen-specific induction of CD154 expression on CD4<sup>+</sup> T cells*

After thawing, 10<sup>8</sup> PBMCs from each patient were rested at 1 × 10<sup>6</sup> cells/mL in R10 (RPMI 1640; Gibco BRL, NY, USA), supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum, 2 mmol/mL L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 8 h. After washed with PBS, they were stimulated (in 20 mL at 1 × 10<sup>6</sup> cells/mL) with recombinant NS3 and core antigens and NS3 and core peptide pools, CMV peptides, SEB or medium alone (containing dimethyl sulfoxide, at the same

final concentration as that of HCV peptides, when applicable), for 12 h, in R10 containing 1 µg/mL anti-CD28 (clone 28.2; BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) and 1 µg/mL anti-CD40 (clone 5C3; e-Bioscience, San Diego, CA, USA) antibodies [11,14,15]. After stimulation, cells were stained with anti-CD4-FITC, anti-CD154-PE and 7-amino-actinomycin D (all from BD Pharmingen) to exclude dead cells.

#### *Sorting and expansion of CD154-expressing CD4<sup>+</sup> T cells*

After induction of CD154 expression, the CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup> cell fractions were sorted with a FACSARIA cell sorter (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) into 96-well plates and cultured with anti-CD3/CD28-coated beads (Invitrogen Dynal AS), at a 3:1 ratio, in R10 medium supplemented with 10 ng/mL each of IL-7 and IL-15 (both from e-Bioscience) for 21 days [12,13]. Cells were given fresh IL-7/IL-15-supplemented R10 medium every day and split and transferred to culture flasks (Cellstar, Monroe, NC, USA) to maintain the cell concentration at 0.5–1 × 10<sup>6</sup> cells/mL throughout the expansion period. No interleukin was added during the last week of culture to avoid the over-stimulation of T cells immediately before re-testing.

#### *Phenotypic analysis*

The phenotype of *ex vivo* Dynabead-sorted and *in vitro*-expanded CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells was determined by multi-colour flow cytometry after staining 2 × 10<sup>6</sup> cells with CD4-FITC, CD45RO-PE, CCR7-PE-Cy7 and CD62L-APC antibodies and the corresponding isotype controls (all from BD Pharmingen).

#### *Functional analyses*

##### *Antigen-induced cytokine production*

Cytokine production was quantified on supernatants of 1 × 10<sup>4</sup> Dynabead-sorted unexpanded *ex vivo* CD4<sup>+</sup> or culture-expanded CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells, cultured at a 1:4 ratio with autologous feeder cells (CD4-depleted PBMCs) prepulsed with recombinant HCV proteins and peptide pools, PHA, SEB or medium alone (with DMSO when applicable) for 20 h. After 48 h of culture, cell-free supernatants were stored at –80 °C until testing. Cytokine (IL-2, IFN-γ, TNF-α, IL-10 and IL-4) concentrations were measured simultaneously in culture supernatants using a cytometric bead array (CBA; Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Data were acquired by flow cytometry (FACSCalibur; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed with CBA software. Standard curves for each cytokine were generated to calculate their concentration in the tested samples. Low-end detection limits of CBA were: 3 pg/mL for IL-2, IL-10, IL-4 and TNF-α and 8 pg/mL for IFN-γ.

*Interferon- $\gamma$  enzyme-linked immunospot assay*

Duplicates of Dynabead-sorted unexpanded *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells and cell-culture-expanded CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup> T cells were tested by interferon- $\gamma$  enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay (MABTECH, Stockholm, Sweden) as previously described [16]. Briefly,  $1 \times 10^5$  cells/well were plated at a 1:4 ratio with irradiated autologous feeder cells in 96-well ELISpot plates precoated with anti-IFN- $\gamma$  and incubated for 48 h. Recombinant core and NS3 proteins and peptide pools were used as antigens, while CMV pp65, SEB and PHA or medium alone were used as positive and negative controls, respectively. For each sample, the number of antigen-specific spot-forming cells (SFCs) was calculated after subtracting the number of SFCs in the absence of antigen from that in the presence of antigen and results expressed as the number of IFN- $\gamma$  SFCs per  $10^5$  CD4<sup>+</sup> T cells. Assays with high background (average 20 SFCs/well in buffer control wells) or with no PHA/SEB response were excluded.

*Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester-based cell proliferation assay*

Antigen-specific T cell proliferation was determined in four chronic patients, four spontaneous resolvers and two controls by carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) dilution assay as previously described [11,17]. Briefly,  $1 \times 10^7$  Dynabead-sorted unexpanded *ex vivo* CD4<sup>+</sup> or *in vitro*-expanded CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> in 1 mL PBS were incubated with 0.5  $\mu$ M CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) at 37 °C for 7 min and then washed with PBS-10% human AB serum and PBS alone. Subsequently, CFSE-labelled T cells were cultured with autologous APC prepulsed with medium alone (negative control) recombinants HCV proteins or HCV peptide pools, or CMV peptide pool. After 5 days, cells were washed and stained with anti-CD4-PE and 7-amino-actinomycin D and analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur using CellQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The number of cells that had proliferated was determined by gating on the CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>low</sup> and CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>high</sup> subsets after adjusting for the positive CD4-PE, CFSE and isotype controls for each patient. As CFSE<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup> T cell populations were not constant among patients, stimulation indexes (SI) were calculated by dividing CD4<sup>+</sup> proliferative frequency (%) in the presence of specific antigen by that in the absence of antigen, as previously reported [17]. SI > 2 were considered positive responses.

*NS3-specific CD154 re-expression and intracellular cytokine staining in expanded NS3-specific CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells*

To further confirm reversal of CD4<sup>+</sup> T cell dysfunction, expanded CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells from four chronic patients, four spontaneous resolvers and two control patients were re-stimulated with NS3 helicase antigen, NS3 peptides

pools, core antigen or medium alone for 12 h with irradiated autologous feeder cells at a 1:4 ratio in R10 supplemented with 1  $\mu$ g/mL CD28-specific antibody, 2  $\mu$ M monensin and 1  $\mu$ g/mL anti-CD40 (all BD Pharmingen) [14,15]. After culture, cells were stained with surface anti-CD4-FITC and anti-CD154-PE, fixed, permeabilized (CytoPerm Kit; BD Pharmingen) and stained with anti-IL-2-PerCp-Cy5 and anti-IFN- $\gamma$ -APC (both BD Pharmingen). The same procedure was performed in parallel with Dynabead-sorted unexpanded *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells from the same patients.

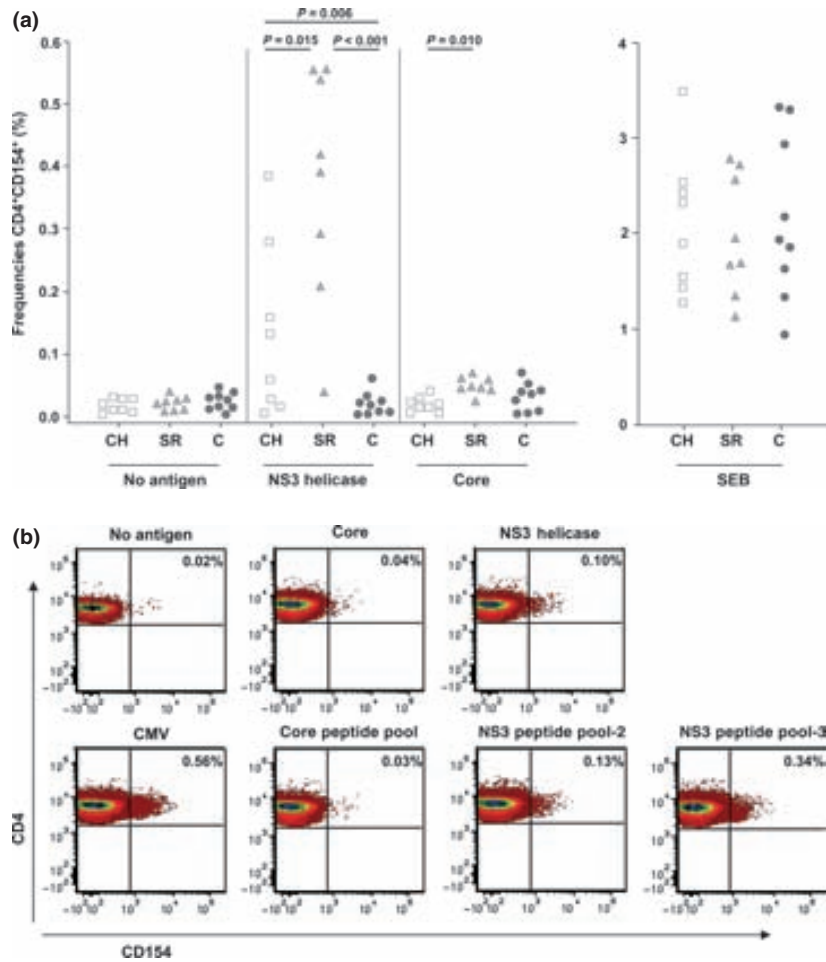
*Statistical analysis*

Qualitative variables were compared with the Fisher's or Chi-Square tests. Quantitative data were compared by Mann-Whitney test. *P*-values < 0.05 were considered significant. All calculations were performed with SPSS software 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

## RESULTS

*Frequency of hepatitis C virus antigen-specific CD154 expression*

Peripheral blood mononuclear cells from patients and controls were stimulated with recombinant NS3 and core proteins or core and NS3 peptide pools in the presence of CD28 co-stimulation and anti-CD40 monoclonal antibody to prevent the internalization of surface CD154. After 12 h of stimulation with NS3 helicase, the median frequency of CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells in the eight chronic patients was 0.107% (range: 0.019–0.386%), as compared with a median frequency of 0.409% (range: 0.03–0.546%) in the eight subjects with spontaneously resolved infection (*P* = 0.015) (see Fig. 1a). As expected, in both patients and controls, the proportion of CD4<sup>+</sup> T cells expressing CD154 to SEB was always higher than 1% (median: 1.9%; range: 1–3.5%) and frequencies of CD154 expressing cells in the absence of antigen were always below 0.02%. None of the control subjects up-regulated CD154 when stimulated with HCV antigens. Remarkably, core antigen induced low-level CD154 expression in all but one spontaneous resolver (0.040% vs 0.016% for core and no antigen, respectively, *P* < 0.001), while no significant response was obtained in chronic patients (0.023% vs 0.020%, respectively, *P* = 0.312). Albeit low, CD154 expression in response to core was significantly higher *ex vivo* among spontaneous resolvers than among chronic patients (median 0.040% vs 0.023%, respectively, *P* = 0.01). Identical results were seen when core peptide pools were used. Of note, NS3 peptide pools induced CD154 upregulation in a higher proportion of CD4<sup>+</sup> cells than recombinant NS3 as exemplified in one representative chronic patient in Fig. 1b.



**Fig. 1** Analysis of hepatitis C virus (HCV)-specific CD154 expression by CD4<sup>+</sup> T cells *ex vivo*. (a) Frequency of NS3 and core-specific CD154 expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from eight chronic HCV patients (CH), eight with resolved infection (SR) and nine healthy controls (left panel). As positive control, *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB)-induced expression of CD154 in the same groups is shown in the right panel. No significant CD154 expression was detected in the absence of antigen, and response to SEB was similar in all groups. Frequencies of CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells are given as percentage of the CD4<sup>+</sup> T cell population (*y*-axis). *P*-values were calculated using Mann–Whitney test. (b) FACS plots of *ex vivo* analysis of antigen-induced CD154 expression in one representative individual with chronic infection (CH5). Upper plots: PBMCs cultured with no antigen, core or NS3 helicase; lower plots: PBMCs were cultured with cytomegalovirus (CMV) peptide pool (positive control), a single core peptide pool and NS3-peptide pools 2 and 3 (both corresponding to the NS3 helicase domain). In the plots shown, gated on CD4<sup>+</sup> cells, CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells are represented in the upper right quadrant of each plot, and CD4<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup> T cells in the upper left quadrant.

#### *Expansion of NS3-specific CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells generates CD4<sup>+</sup> T cells with effector memory phenotype*

Antigen-specific CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells as well as CD4<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup> T cells were sorted by flow cytometry to >90% purity and subsequently expanded *in vitro* with anti-CD3/CD28-coated beads, in medium supplemented with IL-7 and IL-15 but with no specific antigen. After 21 days, CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells could be expanded >3 logs (from ~10<sup>3</sup> to ≥3 × 10<sup>6</sup> cells) in all cases, including the chronic patient (CH1) with the lowest frequency of NS3-specific CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells at baseline (0.019% or 10<sup>3</sup> cells). At

the end of the expansion procedure, 97% of CD4<sup>+</sup> T cells displayed an effector memory phenotype (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>low</sup>) in all cases.

#### *Reversal of NS3-specific CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells dysfunction in patients with persistent hepatitis C virus infection*

We next investigated the functional profile of expanded CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells as compared with that of bulk Dyna-bead-sorted *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells with regard to cytokine production, proliferative capacity and ability to re-express CD154 in response to HCV antigens.

### Interferon- $\gamma$ enzyme-linked immunospot assay

As expected, the number of NS3-specific IFN- $\gamma$  producing cells in bulk *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells was significantly higher in spontaneous resolvers than in chronically infected patients (median: 98 SFC/10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> cells; range: 40–925, vs 8 SFC/10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> cells; range: 0–40, respectively;  $P < 0.001$ ). As shown in Fig. 2, IFN- $\gamma$ -producing antigen-free expansion of NS3-specific CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> cells restored IFN- $\gamma$  production, in all persistently infected patients to levels similar to those seen in recovered patients (median: 429 SFC/10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> cells; range: 85–1188, vs 408 IFN- $\gamma$  SFU/10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup>; range: 118–1475, respectively), a 50-fold increase in the median number of NS3-specific IFN- $\gamma$  producing cells among chronic patients (429 vs 8 SFC/10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup>;  $P < 0.001$ ). No NS3-specific IFN- $\gamma$  production was detected in any control subject *ex vivo* or after expansion of CD4<sup>+</sup> cells. Similar results were obtained when *ex vivo* or expanded cells were stimulated with the recombinant genotype 1b NS3 helicase and with the NS3 peptide pools (data not shown). As expected, expanded CD154-negative T cells did not produce IFN- $\gamma$  when stimulated with NS3.

### Short-term culture cytokine production

As shown in Fig. 3a, IFN- $\gamma$  production by *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells in response to NS3 antigen was significantly higher among spontaneous resolvers than in persistently infected patients (median: 278 pg/mL; range: 20–741 vs 43.5 pg/mL, range: 0–108, respectively;  $P = 0.035$ ). The CBA of culture supernatants of expanded CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells produced a 10-fold higher amount of IFN- $\gamma$  than Dynabead-sorted *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells among chronic patients (median: 465.9 pg/mL; range: 252–911, vs 43.5 pg/mL, range: 0–108, respectively;  $P < 0.001$ ). Similarly, production of TNF- $\alpha$  and IL-4 increased significantly after expansion (median: 108 pg/mL of TNF- $\alpha$  and 61 pg/mL of IL-4 vs 0.52 and 0.19 pg/mL, respectively), while no significant difference in IL-10 production was found after expansion (26 vs 6.8 pg/mL, respectively;  $P = 0.382$ ). No IL-2 could be measured in culture supernatants probably due to the self-consumption of the cytokine. In contrast, IFN- $\gamma$  production by expanded cells was not significantly different from that of

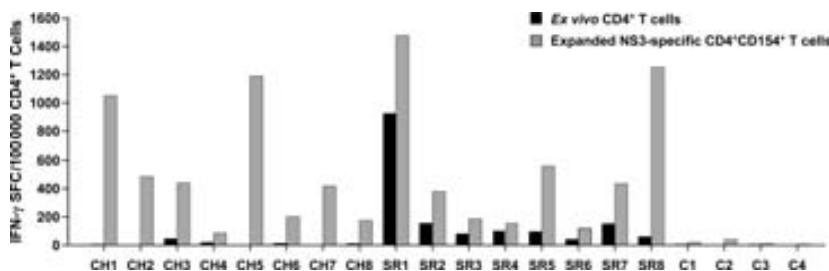
*ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells among patients with resolved infection (median: 609 pg/mL; range: 30–1414 vs 278 pg/mL; range: 20–741;  $P = 0.234$ ) (see Fig. 3b). Similarly, no differences in TNF- $\alpha$  and IL-4 production were seen among spontaneous resolvers before and after expansion (24.32 vs 12.41 pg/mL, respectively,  $P = 0.279$ , for TNF- $\alpha$  and 11.14 vs 12.56 pg/mL, respectively,  $P = 0.878$ , for IL-4). As expected, no cytokine production was induced by core antigen stimulation, (nor to NS3 stimulation of expanded CD4<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup> T cells), confirming the NS3 specificity of the selection and sorting procedures in both chronic and resolved HCV groups.

### Proliferative capacity of expanded NS3-specific CD4<sup>+</sup> T cells

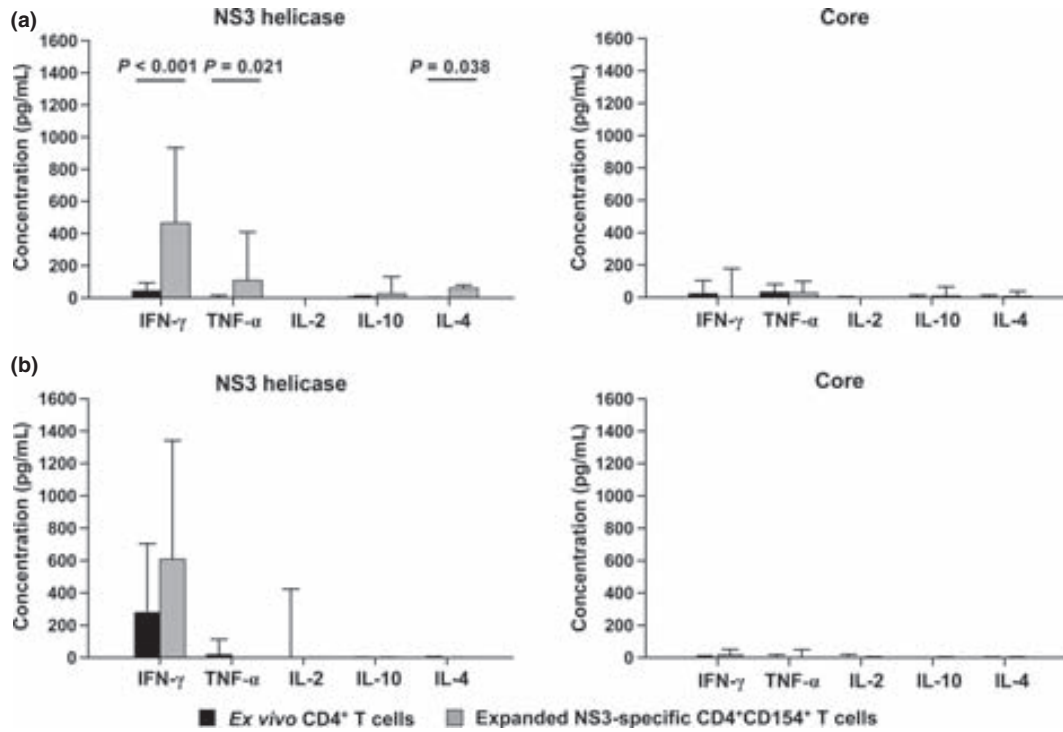
Proliferative capacity of expanded CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells was analyzed by CFSE dilution assay in four chronic (CH4, CH5, CH6 and CH8) and four resolved patients (SR4, SR5, SR6 and SR8), which were chosen based on the number of available baseline cells, after 5-day stimulation with NS3. The median frequency of proliferating CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells was 11.3% (range: 0–21.4%) among chronically infected patients, a 10-fold increase over *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cell proliferation (1.08%). In contrast, among patients with resolved infection, proliferative frequency of expanded cells was similar to that of *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells (7%; range: 0–15% vs 10.5%; range: 0.95–29%, respectively). Mean fluorescence level of proliferating cells from chronic patients was, however, higher than that of spontaneous resolvers, suggesting a lower number of cell divisions among the former. No NS3-specific proliferative responses were detected among controls. Figure 4 shows a representative example of NS3-specific proliferative responses by *ex vivo* CD4<sup>+</sup> and expanded CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells in one HCV RNA+ patient (CH4) and one spontaneous resolver (SR6). No apparent correlation was observed between T cell proliferation and cytokine production among the studied patients.

### Specific re-expression of CD154 and intracellular cytokine production in expanded NS3-specific CD4<sup>+</sup> T cells

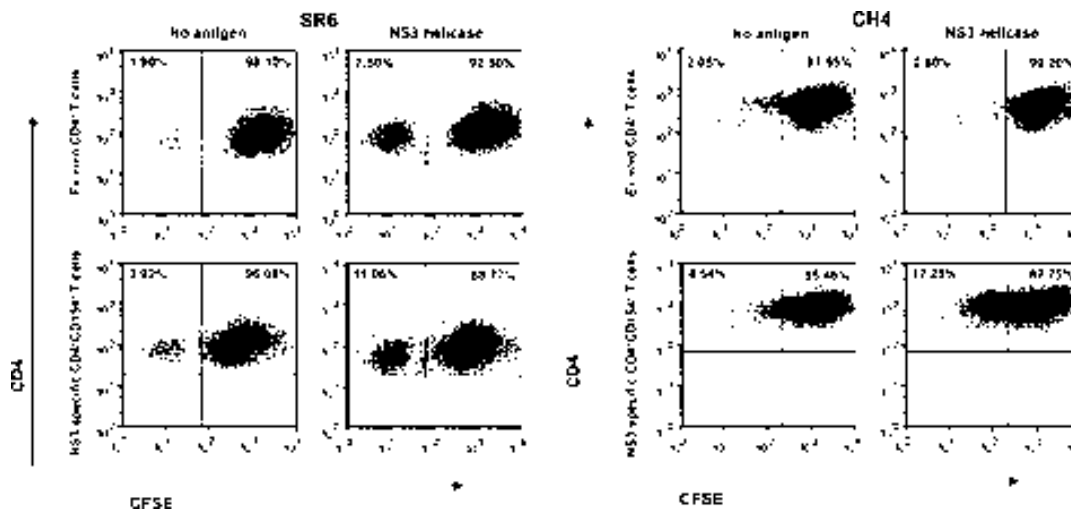
Because expression of CD154 by CD4<sup>+</sup> T cells has been shown to allow effector memory cells (T<sub>EM</sub>) to migrate into



**Fig. 2** IFN- $\gamma$  enzyme-linked immunospot assay results in *ex vivo* and expanded CD4<sup>+</sup> T cells in patients and controls. Average number of IFN- $\gamma$  spot-forming cells per 10<sup>5</sup> Dynabead-sorted unexpanded *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells (black bars) and expanded CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells (grey bars) in chronic (CH1–CH8), resolved patients (SR1–SR8) and controls (C1–C4), after stimulation with subtype 1a recombinant NS3 helicase antigen.



**Fig. 3** Hepatitis C virus (HCV)-specific cytokine production by *ex vivo* and expanded CD4<sup>+</sup> T cells. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-10 and IL-4 concentrations as assessed by cytometric bead array in culture supernatants of Dynabead-sorted unexpanded *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells (black bars) and expanded NS3-specific CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells (grey bars) after stimulation with recombinant core and NS3 helicase are shown as error bars. Median cytokine concentrations after stimulation with NS3 helicase (left) and core antigen (right) in HCV RNA-positive individuals (a) and patients with spontaneously resolved infection (b). Medians were compared by Mann-Whitney *U*-test.



**Fig. 4** Hepatitis C virus (HCV)-specific CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> proliferative responses. HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cell proliferative response from one spontaneously resolver individual (SR6) (left panel) and one chronic patient (CH4) (right panel) is shown. Flow cytometry plots from Dynabead-sorted unexpanded *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells (upper plots) and expanded CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells (lower plots) stained with carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) and cultured for 5 days with autologous antigen presenting cells pulsed with NS3 (right plots) or medium alone (left plots) are depicted. Numbers in the upper left quadrants of each plot represent the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells that have proliferated during the 5-day culture. Cells were gated on CD4<sup>+</sup> and 7-AAD negative cells.

lymph nodes (licensing dendritic cells for T cell priming) [18] and to correlate with multiple-cytokine producing functional profiles [19], we examined the proportion and intensity of CD154 re-expression in NS3-specific expanded cells after 12 h of stimulation with NS3 or no antigen. In both chronic and resolved patients, more than 50% of expanded cells re-expressed CD154 in an antigen-specific manner. ICS was performed in Dynabead-sorted unexpanded *ex vivo* CD4<sup>+</sup> and expanded CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells in four chronic, four resolved patients and two healthy controls. Both IFN- $\gamma$  and IL-2 expression were increased in expanded cells as compared with *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells in chronic patients from undetectable to up to 21.7% for IFN- $\gamma$  19.1% for IL-2, and up to 4.9% of cells producing both cytokines. Most specific cytokine production was elicited by recombinant NS3 and NS3 peptide pools 2 and 3, known to contain strong immunodominant T helper epitopes [20], but not core. Similar results were observed in the spontaneous resolvers, although the frequency of *ex vivo* IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> cells was higher than among chronic patients (median 2.89% vs 0.32% among spontaneous resolvers and chronic patients, respectively;  $P = 0.002$ ). Figure 5a,b show IL-2 and IFN- $\gamma$  production in *ex vivo* and CD154<sup>+</sup> expanded CD4<sup>+</sup> T cells from two representative chronic patients (CH4 and CH5), one spontaneous resolver (SR7) and one control (C4).

#### *Selection and reversal of NS3-specific CD4<sup>+</sup> T cells dysfunction is independent of class II MHC haplotype*

We investigated whether MHC class II haplotype, which has been associated with HCV infection outcome [21], influenced antigen-specific CD154 expression. No correlation was found between MHC haplotype and *ex vivo* NS3-specific CD154 expression or subsequent functional restoration of expanded cells.

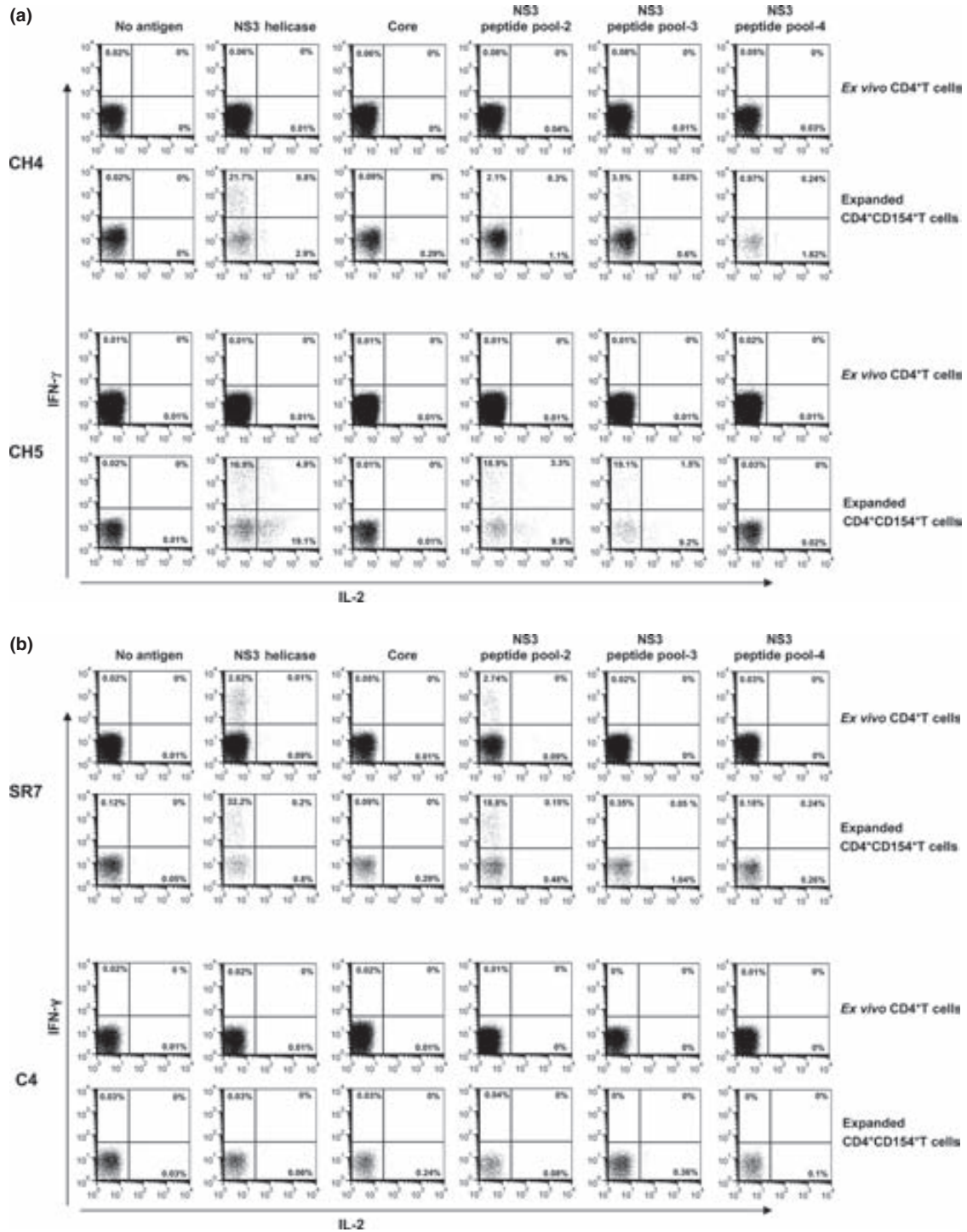
## DISCUSSION

Despite the limited number of patients included, this study confirms previous findings [11] that HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cells, although dysfunctional, are present in the peripheral blood in most patients with chronic HCV infection and can be easily detected, irrespective of their functional profile, by the transient antigen-specific upregulation of CD154. Remarkably, CD154 upregulation on virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells could be elicited by different NS3 peptide pools in chronic and recovered patients, supporting previous findings [11] and suggesting that CD4<sup>+</sup> T cells with broad specificities may readily be found in the peripheral blood after bulk expansion in IL-2-containing medium. Our study also shows that NS3-specific CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> cells can be sorted and expanded (in the absence of the cognate antigen) by more than three logs while restoring their capacity to produce IFN- $\gamma$  and IL-2, proliferate and re-express CD154 upon stimulation with NS3. Although our study cannot exclude the expansion of small

numbers of functional HCV-specific T cells rather than reversal of previously dysfunctional CD4<sup>+</sup> T cells, the multi-specific nature and strength of the response after expansion and its similarity to that of *ex vivo* CD4<sup>+</sup> cells from individuals with spontaneously resolved infection would support reversal of dysfunction rather than expansion of a small number of fully functional T cells. These selection and expansion was possible even from the chronic patient whose *ex vivo* NS3-specific CD154-expression was lowest (0.019% of bulk CD4<sup>+</sup> T cells), and no difference was found in functional restoration according to the proportion of CD154-expressing T cells. Unfortunately, given the low proportion of HCV-specific CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells, these cells could not be used as controls to compare phenotype and functional profile of IL-7/IL-15-expanded cells. Hence, we can only infer functional restoration through antigen-free expansion of HCV-specific T cells by comparing the profile of expanded cells from chronic patients with that of *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells from spontaneously recovered patients. As in the latter, T cell function was not increased after expansion, and this comparison further supports that expansion of specific T cells from chronic patients reversed their dysfunctional state and was not a nonspecific activated effector state associated with the *in vitro* expansion process. The reason why the expansion process did not increase IFN- $\gamma$  production over *ex vivo* cells among spontaneous resolvers is unclear, although a potential explanation would be that specific CD4<sup>+</sup> T cells are already fully functional memory cells that cannot be over-expanded in the absence of their cognate antigen.

The finding that core antigen, contrary to NS3, failed to induce CD154 expression in CD4<sup>+</sup> T cells, or only low-level expression in recovered patients might be related to the reported property of core to induce FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells capable of inhibiting Th1 responses through IL-10 production [22,23]. However, further phenotypic characterization of core-specific CD4<sup>+</sup> T cells, including Treg-specific markers, as well as functional studies using smaller core peptide pools should be conducted to address this issue. In any event, it has been suggested that NS3-specific responses, rather than those to core or other antigens, are characteristic of spontaneous recovery [16,24].

Several studies [6,23,25] have identified characteristic features of the dysfunctional T cell immune response during chronic infection, including high-level expression of programmed death receptor 1 (PD-1), low-levels of CD127 in CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> HCV-specific T cells, along with expansion of virus-specific FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> regulatory T cells (capable of decreasing effector functions in a dose dependent manner) [23,26]. Although these findings suggest the potential for the immunotherapeutic restoration of T cell function [27,28], their causative role in viral persistence is a matter of debate as they could rather reflect adaptive mechanisms to limit liver cell damage during acute and chronic infection [29–31].



**Fig. 5** Analysis of intracellular IFN- $\gamma$  and IL-2 in *ex vivo* and expanded CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells by intracellular cytokine staining method. Dynabead-sorted unexpanded *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells and expanded NS3-specific CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells were re-stimulated for 12 h with autologous feeder cells prepulsed with recombinant antigens, NS3 peptide pools or medium alone, in the presence of monensin, anti-CD28 and anti-CD40. FACS plots of intracellular IFN- $\gamma$ , IL-2 or both, by *ex vivo* CD4<sup>+</sup> T cells (upper plots) and expanded-CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> T cells (lower plots) are shown from two representative chronic patients (CH4 and CH5) in (a), and from one patient with spontaneously resolved infection (SR7) and one healthy control (b). Proportion of IFN- $\gamma$  expressing CD4<sup>+</sup> T cells are shown in upper left quadrants, IL-2-expressing cells in lower right quadrants and those expressing both cytokines in right upper quadrants.



As previously suggested [1,2,8,9,32], the current study would rather support that an early functional inactivation of the HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cell response may play a major role in establishing viral persistence. The triggering of such inactivation remains unknown because, in contrast to continuous CD8 epitope escape during acute and chronic infection, selection-driven immune escape does not appear to have a relevant role in CD4<sup>+</sup> T cell failure during chronic infection [33]. Nonetheless, during acute infection, few CD4 epitope variants within well-conserved nonstructural proteins, such as NS3 (likely to be co-presented with other dominant epitopes by dendritic cells), might induce widespread CD4<sup>+</sup> T cell anergy and impair effective CD8<sup>+</sup> T cell memory generation and maturation thus preventing viral clearance [32,34]. Specific variants of NS3 epitopes have been proposed to cause CD4<sup>+</sup> T cell anergy or induce CD4<sup>+</sup> Treg phenotypes [35,36].

Studies in mice shown that CD4<sup>+</sup> T cell functional inactivation occurs (at the cellular level and independently of regulatory T cells or APC) early during the transition into viral persistence leading to subsequent inability to sustain cytotoxic T cell function and facilitating persistence, although a small reservoir of CD4<sup>+</sup> T cells resist inactivation and persist during chronicity [37]. Furthermore, such dysfunctional T cells can be functionally reactivated during persistent infection even after an initial programme of inactivation has been instituted [38]. The possibility of expanding and functionally restoring virus-specific memory CD4<sup>+</sup> T cells suggests their potential use in adaptive immunotherapy. Adoptive immunotherapy after bone marrow transplantation has been shown to induce recovery from chronic hepatitis B virus infection [39]. In the current study, the features of the expanded CD4<sup>+</sup> T cells appear to fulfil the requirements to provide efficient help to restore *in vivo* exhausted HCV-specific CD8<sup>+</sup> T cells [40,41], a rescue that has been proven in animal models [42]. In addition,

memory CD4<sup>+</sup> T cells can also induce innate immune responses [43], which might indirectly provide additional help to CD8<sup>+</sup> T cells. However, a major potential draw-back for the use of autologous CD4<sup>+</sup> T cells in adaptive immunotherapy might be that the same mechanisms leading to CD4<sup>+</sup> T cell failure and viral persistence might again inactivate restored CD4<sup>+</sup> T cells. Hence, such an approach, which is being explored in cancer immunotherapy [44], might only be feasible as an adjuvant to current and future antiviral treatments [45], capable of suppressing viral replication enough to prevent the inactivation of functionally restored cells, or to prevent HCV reinfection of the graft during the first hours after liver transplantation, when viral load dramatically decreases [46].

In summary, our results strongly suggest that NS3-specific CD4<sup>+</sup> T cells can be selected, expanded and functionally restored *in vitro* in most patients with chronic hepatitis C, providing a promising new tool to further understand the mechanisms of viral persistence and to investigate potential immune-therapeutic interventions.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to BEI Resources (American Type Culture Collection 10801 University Blvs. Manassas, VA 20110-2209, USA) for kindly providing HCV peptides. The authors want to thank Alex Bote for his technical support in flow cytometry techniques and Anna Oliveira and Angie Rico for their technical support. This work has been supported by grants: SAF2006-03681 from the Spanish Ministry of Science and Education, PI061244 from the Spanish Ministry of Health, TV3 052310 from the Fundació Marató TV3, 36623/06 from FIPSE, PI10/01505 from the Spanish Ministry of Health and a research grant from the Fundació Privada Catalana de l'Hemofilia. CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III (Madrid, Spain).

#### REFERENCES

- Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM *et al.* Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995; 346: 1006–1007.
- Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC *et al.* Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 117: 933–941.
- Wertheimer AM, Miner C, Lewinsohn DM, Sasaki AW, Kaufman E, Rosen HR. Novel CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology* 2003; 37: 577–589.
- Lauer GM, Barnes E, Lucas M *et al.* High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent HCV infection. *Gastroenterology* 2004; 127: 924–936.
- Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M *et al.* Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002; 169: 3447–3458.
- Radziewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML *et al.* Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol* 2007; 81: 2545–2553.
- Semmo N, Day CL, Ward SM *et al.* Preferential loss of IL-2-secreting CD4<sup>+</sup> T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology* 2005; 41: 1019–1028.
- Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH *et al.* Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 37: 1189–1198.
- Urbani S, Amadei B, Fiscaro P *et al.* Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function

- and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology* 2006; 44: 126–139.
- 10 Smyk-Pearson S, Tester IA, Klarquist J *et al.* Spontaneous recovery in acute human hepatitis C virus infection: functional T-cell thresholds and relative importance of CD4 help. *J Virol* 2008; 82: 1827–1837.
  - 11 Mueller M, Spangenberg HC, Kersting N *et al.* Virus-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in chronic HCV infection in blood and liver identified by antigen-specific upregulation of CD154. *J Hepatol* 2010; 52: 800–811.
  - 12 Skov S, Bonyhadi M, Odum N, Ledbetter JA. IL-2 and IL-15 regulate CD154 expression on activated CD4 T cells. *J Immunol* 2000; 164: 3500–3505.
  - 13 Chen HW, Lio CH, Ying C, Chang CJ, Lin CM. Ex vivo expansion of dendritic-cell-activated antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells with anti-CD3/CD28, interleukin-7, and interleukin-15: potential for adoptive T cell immunotherapy. *Clin Immunol* 2006; 119: 21–31.
  - 14 Frensch M, Arbach O, Kirchoff D *et al.* Direct access to CD4<sup>+</sup> T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med* 2005; 11: 1118–1124.
  - 15 Chattopadhyay PK, Yu J, Roederer M. A live-cell assay to detect antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells with diverse cytokine profiles. *Nat Med* 2005; 11: 1113–1117.
  - 16 Bes M, Esteban JI, Casamitjana N *et al.* Hepatitis C virus (HCV)-specific T cell responses among recombinant immunoblot assay 3-indeterminate blood donors: a confirmatory evidence of HCV exposure. *Transfusion* 2009; 49: 1296–1305.
  - 17 Semmo N, Krashias G, Willberg C, Klenerman P. Analysis of the relationship between cytokine secretion and proliferative capacity in hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2007; 14: 492–502.
  - 18 Martin-Fontecha A, Baumjohann D, Guarda G *et al.* CD40L<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> memory T cells migrate in a CD62P-dependent fashion into reactive lymph nodes and license dendritic cells for T cell priming. *J Exp Med* 2008; 205: 2561–2574.
  - 19 Kannanganat S, Ibegbu C, Chen-nareddi L, Robinson HL, Amara RR. Multiple-cytokine-producing antiviral CD4 T cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells. *J Virol* 2007; 81: 8468–8476.
  - 20 Semmo N, Klenerman P. CD4<sup>+</sup> T cell responses in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4831–4838.
  - 21 Kuniholm MH, Kovacs A, Gao X *et al.* Specific human leukocyte antigen class I and II alleles associated with hepatitis C virus viremia. *Hepatology* 2010; 51: 1514–1522.
  - 22 Krishnadas DK, Li W, Kumar R, Tyrrell DL, Agrawal B. HCV-core and NS3 antigens play disparate role in inducing regulatory or effector T cells in vivo: implications for viral persistence or clearance. *Vaccine* 2010; 28: 2104–2114.
  - 23 Langhans B, Braunschweiger I, Arndt S *et al.* Core-specific adaptive regulatory T-cells in different outcomes of hepatitis C. *Clin Sci (Lond)* 2010; 119: 97–109.
  - 24 Smyk-Pearson S, Tester IA, Lezotte D, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Rosen HR. Differential antigenic hierarchy associated with spontaneous recovery from hepatitis C virus infection: implications for vaccine design. *J Infect Dis* 2006; 194: 454–463.
  - 25 Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N *et al.* Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J Virol* 2009; 83: 9122–9130.
  - 26 Ebinuma H, Nakamoto N, Li Y *et al.* Identification and in-vitro expansion of functional antigen-specific CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T-cells in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2008; 82: 5043–5053.
  - 27 Urbani S, Amadei B, Tola D *et al.* Restoration of HCV-specific T cell functions by PD-1/PD-L1 blockade in HCV infection: effect of viremia levels and antiviral treatment. *J Hepatol* 2008; 48: 548–558.
  - 28 Nakamoto N, Cho H, Shaked A *et al.* Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000313.
  - 29 Bowen DG, Shoukry NH, Grakoui A *et al.* Variable patterns of programmed death-1 expression on fully functional memory T cells after spontaneous resolution of hepatitis C virus infection. *J Virol* 2008; 82: 5109–5114.
  - 30 Heeg MH, Ulsenheimer A, Grüner NH *et al.* FOXP3 expression in hepatitis C virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells during acute hepatitis C. *Gastroenterology* 2009; 137: 1280–1288.
  - 31 Claassen MA, de Knecht RJ, Tilanus HW, Janssen HL, Boonstra A. Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis. *J Hepatol* 2010; 52: 315–321.
  - 32 Puig M, Mihalik K, Tilton JC *et al.* CD4<sup>+</sup> immune escape and subsequent T cell failure following chimpanzee immunization against hepatitis C virus. *Hepatology* 2006; 44: 736–745.
  - 33 Fuller MJ, Shoukry NH, Gushima T *et al.* Selection-driven immune escape is not a significant factor in the failure of CD4 T cell responses in persistent hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2010; 51: 378–387.
  - 34 Sadegh-Nasseri S, Dalai SK, Korb Ferris LC, Mirshahidi S. Suboptimal engagement of the T-cell receptor by a variety of peptide-MHC ligands triggers T-cell anergy. *Immunology* 2010; 129: 1–7.
  - 35 Cusick MF, Yang M, Gill JC, Eckels DD. Naturally occurring CD4<sup>(+)</sup> T-cell epitope variants act as altered peptide ligands leading to impaired helper T-cell responses in hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* 2011; 72: 379–385.
  - 36 Cusick MF, Schiller JJ, Gill JC, Eckels DD. Hepatitis C virus induces regulatory T cells by naturally occurring viral variants to suppress T cell responses. *Clin Dev Immunol* 2011; 806061. Epub 2010 Dec 6.
  - 37 Brooks DG, Teyton L, Oldstone MB, McGavern DB. Intrinsic functional dysregulation of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection. *J Virol* 2005; 79: 10514–10527.
  - 38 Brooks DG, McGavern DB, Oldstone MB. Reprogramming of antiviral T cells prevents inactivation and

- restores T cell activity during persistent viral infection. *J Clin Invest* 2006; 116: 1675–1685.
- 39 Lau GK, Suri D, Liang R *et al*. Resolution of chronic hepatitis B and anti-HBs seroconversion in humans by adoptive transfer of immunity to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 2002; 122: 614–624.
- 40 Pantaleo G, Harari A. Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 417–423.
- 41 Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A. CD8 (+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4 (+) T-cell help. *Nature* 2009; 462: 510–513.
- 42 Kumaraguru U, Banerjee K, Rouse BT. In vivo rescue of defective memory CD8+ T cells by cognate helper T cells. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 879–887.
- 43 Strutt TM, McKinstry KK, Dibble JP *et al*. Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nat Med* 2010; 16: 558–564.
- 44 Porter DL, Levine BL, Bunin N *et al*. A phase 1 trial of donor lymphocyte infusions expanded and activated ex vivo via CD3/CD28 co-stimulation. *Blood* 2006; 107: 1325–1331.
- 45 Thompson A, Patel K, Tillman H, McHutchison JG. Directly acting antivirals for the treatment of patients with hepatitis C infection: a clinical development update addressing key future challenges. *J Hepatol* 2009; 50: 184–194.
- 46 Garcia-Retortillo M, Forns X, Feliu A *et al*. Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35: 680–687.

## 4. DISCUSSIÓ

#### 4.1. Problemàtica dels donants de sang amb patró d'immunoblot pel VHC indeterminat

Actualment els Bancs de Sang estan utilitzant tests d'ELISA de 3<sup>a</sup> generació com a mètode de cribatge d'anticossos anti-VHC i tècniques moleculars (PCR o TMA) per a la detecció de l'ARN viral, fet que ha permès pràcticament eliminar el risc de transmissió del VHC associat a la transfusió. En poblacions de baix risc d'infecció pel VHC, tal com són els donants de sang voluntaris, les proves d'ELISA presenten una elevada sensibilitat però poca especificitat, generant que aproximadament el 60% de les mostres inicialment reactives representin falsos positius de la tècnica de cribatge. Per la qual cosa, la realització de proves confirmatòries és essencial tant pel diagnòstic com per la correcta informació del donant. Actualment, la tècnica confirmatòria més utilitzada, conjuntament amb les proves moleculars de detecció de l'ARN viral, són els assajos d'immunoblot. El problema dels assajos d'immunoblot és que freqüentment generen resultats indeterminats, és a dir, reactivitat enfront a un únic antigen, dificultant la seva interpretació. En alguns casos aquests resultats indeterminats es poden associar a seroconversions precoces, inclús en absència d'ARN detectable<sup>259</sup>, o bé a pacients o donants de sang que presenten una infecció crònica i que s'han infectat amb genotips virals diferents del genotip 1.<sup>259-262</sup> No obstant, en la majoria dels casos són donants voluntaris que presenten consistentment ARN VHC negatiu i el seu patró d'anticossos no varia en funció del temps, suggerint que la majoria dels casos poden ser curacions espontànies de la infecció pel VHC amb pèrdua d'anticossos<sup>263-266</sup> o bé reaccions serològiques inespecífiques i, per tant, falsos positius de la tècnica de cribatge.<sup>267,268</sup>

Al Banc de Sang i Teixits de Catalunya la prevalença de donants de sang amb RIBA-3 indeterminat és del 0,043% o el que és el mateix, el 23% dels donants amb anti-VHC positiu en el test de cribatge. Això suposa que anualment aproximadament 120 donants són rebutjats permanentment com a donants de sang, sent informats per defecte com a falsos positius de la tècnica de cribatge.

Durant anys s'han estudiat diferents estratègies per poder classificar els donants i els pacients amb patró de RIBA indeterminat en absència virèmia, incloent anàlisi dels factors de risc d'exposició viral, nivells d'ALT, analitzant les densitats òptiques de les mostres (S/CO) del test de cribatge, l'historial previ de donacions de sang, la intensitat de la banda reactiva així com l'ús de pèptids sintètics i/o assajos d'anti-E2<sup>263, 268-272</sup>. D'aquests estudis s'ha pogut deduir que

els patrons RIBA-3 indeterminat c100 i NS5 (els menys freqüents en la nostra població de donants) són falsos positius de les tècniques de cribatge, mentre que els RIBA-3 indeterminats c22/c33 poden representar veritables exposicions virals. No obstant, en el nostre estudi aquests factors no ens serveixen per categoritzar els donants amb RIBA-3 indeterminat, ja que aquests no reporten factors de risc associats a exposició viral i els nivells de transaminases són normals, per la qual cosa, s'ha de buscar una nova estratègia per classificar-los.

#### **4.2. ELISpot IFN- $\gamma$ : prova confirmatòria d'exposició viral**

La determinació de la capacitat de les cèl·lules T d'induir respostes immunes específiques del VHC es va plantejar com una estratègia per diferenciar prèvies exposicions virals de falsos positius en individus RIBA-3 indeterminats c22/c33. Aquesta hipòtesi es va plantejar basant-nos en l'evidència de que la resposta immune cel·lular específica del VHC en individus amb infecció resolta espontàniament es manté indefinidament mentre que els anticossos disminueixen progressivament fins a desaparèixer al cap de varies dècades de l'exposició viral <sup>46</sup>. A més, es va decidir utilitzar la tècnica d'ELISpot IFN- $\gamma$  per mesurar la resposta immune cel·lular degut a l'elevada sensibilitat que presenta (es pot detectar de l'ordre d'una cèl·lula productora d'antigen per cada 100.000 cèl·lules totals), la facilitat d'execució i la possible automatització.

En l'estudi realitzat sobre 27 donants amb patró indeterminat amb una única banda enfront a c22 (core) o enfront c33 (NS3), es va observar que el 48% d'aquest donants presenten respostes de cèl·lules T específiques de VHC (producció d'IFN- $\gamma$ ) tant enfront a les proteïnes del core com enfront a la NS3, demostrant que com a mínim la meitat d'aquests individus representen curacions espontànies passades de la infecció i no falsos positius de la tècnica de cribatge d'anticossos, confirmant resultats publicats anteriorment per grup de Semmo i col·laboradors, tot i que ells van observar respostes immunes principalment enfront a l'antigen del core. <sup>273</sup> Simultàniament al mateix volum de publicació de l'article un grup de viròlegs alemanys van publicar una article molt semblant, realitzat igualment en donants amb RIBA-3 indeterminat, obtenint resultats pràcticament idèntics i, per tant, verificant encara més els resultats obtinguts <sup>274</sup>. Tal i com hem esmentat anteriorment, estudis anteriors havien reportat que els individus amb RIBA-3 indeterminat presenten immunitat cel·lular enfront a l'antigen del core, <sup>273</sup> mentre que nosaltres observem que 8 dels 13 (62%) donants amb RIBA-3

indeterminat presenten cèl·lules T específiques de NS3 amb comparació al 90% dels curats espontanis, suggerint que les cèl·lules T de memòria es van desenvolupar en resposta a una infecció viral actual i no pas a una exposició amb partícules virals no-infeccioses o a una resposta immune protectora d'una infecció anterior. Addicionalment, la producció d'IFN- $\gamma$  després de cultius a curt termini en presència tant d'antígens del core com d'antígens no estructurals (NS3) descarta la possibilitat de què la resposta de cèl·lules T es degui a reactivitat creuada amb altres virus o antígens no-virals donat que les reactivitats creuades només s'han descrit enfront a core i en respostes CTL<sup>275</sup>.

Curiosament, en aquest estudi no hem trobat una correlació entre l'especificitat dels anticossos en el RIBA i la reactivitat de les cèl·lules T en l'ELISpot, podent identificar donants reactius amb una única banda c22p del RIBA amb presència de cèl·lules T específiques de NS3 i, per altra banda, donants indeterminats c33c (NS3) amb resultats positius d'ELISpot restringits a l'antigen del core, suggerint que la dinàmica de resposta de les cèl·lules B i T després de l'eliminació espontània del VHC és diferent en la majoria dels casos. El que sí que està clar és que, tot i el baix nombre d'individus participants en l'estudi, els donants amb patró de RIBA-3 indeterminat tendeixen a presentar una resposta específica enfront a la NS3 de major magnitud que els donants amb infecció crònica C, suggerint de nou que el patró de resposta de les cèl·lules T en RIBA indeterminats és més semblant al de resolució espontània que la obtinguda en pacients amb infecció persistent.<sup>44,50</sup> Per últim, cal destacar que els individus amb resolució espontània (RIBA-3 positiu / ARN VHC negatiu) presenten una major producció d'IFN- $\gamma$  enfront als antígens no estructurals que els portadors crònics (RIBA-3 positiu / ARN VHC negatiu), sent per tant la resposta cel·lular enfront a la NS3 i especialment al domini de l'helicasa el factor discriminant entre resolució i persistència viral.

Aquest estudi està limitat pel fet de què no podem concloure si els donants de sang amb patró RIBA-3 indeterminat sense resposta a ELISpot han estat o no exposats al virus. Possiblement la utilització d'altres antígens virals o *pools* de pèptids solapats corresponents a tota la poliproteïna viral ens hagués ajudat a trobar més respostes específiques del virus i, per tant, augmentar els percentatges de resposta dins d'aquesta població. A més a més, les proteïnes utilitzades corresponen al genotip 1a del VHC limitant la detecció de respostes induïdes per altres genotips virals. Per últim, tot i que la tècnica d'ELISpot és molt sensible, algunes

tècniques més sensibles encara tals com són els complexos tetramèrics de classe II<sup>276</sup> i assajos de captura i expansió de cèl·lules CD154<sup>+</sup><sup>255,256</sup> podrien ser d'utilitat per detectar especificitats addicionals en aquests donants. No obstant, la tècnica d'ELISpot IFN- $\gamma$  pot identificar que la meitat dels donants de sang amb patró RIBA-3 indeterminat (ARN VHC negatiu) representen resolucions passades de la infecció pel VHC, sent una eina útil pel diagnòstic de la infecció. Proves funcionals addicionals tals com l'ELISpot IFN- $\gamma$  s'haurien de realitzar als Bancs de Sang per poder informar degudament als donants i donant una raó més versemblant del perquè són rebutjats definitivament com a donants de sang.

#### **4.3. Rellevància de la curació espontània de la infecció detectada per memòria immune cel·lular**

La fase aguda de la infecció pel VHC és asimptomàtica en el 80% dels casos d'exposició viral fet que dificulta el diagnòstic i, normalment, la infecció es detecta ja en la fase crònica mitjançant anàlisi clínics rutinaris o bé en el moment de fer una donació de sang. Estudis prospectius d'infeccions postransfusionals mostren que després de l'exposició viral, la curació espontània de la infecció es produeix únicament en el 15-25% dels casos. Tenint en compte que el volum del inòcul, el nombre d'exposicions virals i l'estat del sistema immune són factors importants en l'evolució de la infecció, segurament les taxes de resolució espontània de la infecció estan infravalorades. En el nostre estudi hem observat que inclús 4 (13%) donants amb RIBA-3 negatiu (tres d'ells amb resultats d'ELISA VHC positius dèbils) presenten resposta a ELISpot, mostrant que en la població de donants de baix risc, els tests de cribatge són possiblement més sensibles que els tests confirmatoris i segurament el percentatge de persones exposades al VHC amb un evolució cap a curació espontània és superior a les taxes reportades fins ara i havent-hi un espectre més ampli de persones amb resolució subclínica de la infecció. En l'estudi podem trobar individus amb resolucions espontànies del VHC amb absència d'anti-VHC detectable, d'altres amb baixos nivells d'anti-VHC (detectats amb ELISA) els quals no es poden detectar amb les proves d'immunoblot, individus amb anti-VHC en els quals únicament se'ls detecta reactivitat enfront a un únic antigen en els tests confirmatoris de RIBA i, finalment, individus amb anti-VHC positiu i RIBA-3 positiu (ARN VHC negatiu). Aquest resultat evidencien que les taxes de curació espontània després de la infecció pel VHC poden



ser superiors al 15-25% tradicionalment descrit i inclús poden arribar al 50% de les persones exposades, especialment considerant que el 50% de les parelles sexuals seronegatives dels portadors crònics mostren reactivitat específica de les cèl·lules T enfront al VHC.<sup>60-62</sup>

Per altra banda cal tenir amb compte que la magnitud de la resposta d'IFN- $\gamma$  i els factors de risc d'exposició viral són menys freqüents en donants amb RIBA-3 indeterminat que en donants amb resolució espontània confirmada, fet que es podria explicar pel temps transcorregut des de l'exposició viral i/o el volum del inòcul en el moment de la infecció. Així doncs, un major temps des de l'exposició viral podria explicar la resposta més dèbil dels anticossos i la disminució en la resposta de les cèl·lules T, així com la dificultat per part del donant de recordar un factor de risc potencial. Similarment, un volum menor d'inòcul o menys exposicions al virus pot contribuir també a la ràpida desaparició d'anticossos o inclús debilitar la inducció de la resposta humoral. Així doncs, l'assaig d'ELISpot pot ajudar a identificar individus amb resolució subclínica de la infecció pel VHC i ajudar a comprendre els mecanismes que intervenen en la resolució de la infecció.

#### **4.4. Mecanismes immunològics de persistència viral i reversió de l'anèrgia de les cèl·lules T**

Tal i com hem explicat anteriorment, la relació entre el VHC i l'hoste és dinàmica, el virus intenta silenciar la seva presència per poder coexistir, mentre que el sistema immune de l'hoste intenta eliminar el virus sense autolesionar-se. El balanç entre aquestes dues forces biològiques depèn de la cinètica de replicació viral i la quantitat i la qualitat de la resposta immune. En el primer estudi presentat en aquesta tesi hem demostrat que la resposta vigorosa i multiespecífica dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, especialment enfront a proteïnes no estructurals del virus, s'associa a reduccions de la càrrega viral i curació de la infecció. En canvi, l'absència de resposta específica per part dels limfòcits T o la incapacitat de mantenir-la durant el temps suficient es relaciona amb la infecció persistent. S'han postulat diferents mecanismes que sembla que poden contribuir a l'absència d'una resposta adaptativa eficaç, sent probablement les mutacions d'escapament i l'anèrgia funcional els mecanismes més importants, els quals impediria la correcta activació de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> específiques del VHC<sup>72-74, 101-104,</sup>

Sempre hi ha hagut molta controvèrsia de si l'absència de resposta immune eficaç en pacients amb infecció persistent es deu a una delecció de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> o més bé a l'alteració funcional de la resposta CD4<sup>+</sup>. Durant aquests últims anys, diversos estudis han demostrat que es deu més bé a l'alteració funcional de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> ja que la disminució de la càrrega viral durant el tractament antiviral o durant les primeres setmanes del transplantament hepàtic és suficient per a la ràpida reaparició de la resposta CD4<sup>+</sup> Th1 efectora <sup>107-110, 277</sup>. En el segon estudi ens vàrem proposar el disseny d'un protocol *in vitro* per identificar i seleccionar cèl·lules específiques del VHC disfuncionals en pacients amb infecció crònica C i poder revertir el seu fenotip disfuncional mitjançant cultius *in vitro* en absència de l'estímul inductor d'anèrgia.

Primerament vàrem demostrar que els pacients amb infecció persistent presenten cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques del VHC en sang perifèrica i que aquestes cèl·lules es poden detectar fàcilment, independentment del seu perfil funcional, mitjançant l'expressió en superfície de l'antigen CD154, molècula d'expressió antígen-específica i transitòria. Es va escollir la molècula CD154 ja que, tal i com hem explicat anteriorment, s'expressa específicament a la superfície del limfòcit T CD4<sup>+</sup> després de la interacció del TCR amb el complex MHC-antigen present a les CPA, i per tant, ens assegurem de seleccionar cèl·lules específiques de l'antigen viral amb un únic pas de citometria. Cal remarcar que l'expressió del CD154 es dona principalment sota l'estimulació amb l'antigen o *pools* de pèptids de la NS3, tant en pacients crònics com en pacients amb resolució espontània de la infecció, confirmant els resultats obtinguts en l'estudi 1 i verificant que la resposta immune de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques de NS3 helicasa i Th1 són essencials per a la resolució espontània de la infecció. En segon lloc, aquest estudi també demostra que les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques de NS3 es poden seleccionar i expandir més de 3 logaritmes en 21 dies de cultiu en absència antigènica amb pèptids alterats tot restaurant la capacitat de produir IFN-γ i IL-2, proliferar i de reexpressar CD154, demostrant que la contínua estimulació antigènica en individus amb infecció persistent pot ser un dels mecanismes de disfuncionalitat de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques i de la inducció de l'estat tolerogènic.

Un altre aspecte a tenir en compte en aquest segon estudi és que l'antigen del core, contràriament al de la NS3, no és capaç d'induir l'expressió de CD154, i si ho fa, és en individus amb infecció curada espontàniament i a freqüències baixes. Aquest fet pot estar relacionat amb

que l'antigen del core indueix les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>FoxPE<sup>+</sup> reguladores les quals inhibeixen les respostes immunes Th1 a través de la producció d'IL-10.<sup>278, 279</sup> No obstant, per tal de confirmar aquests resultats s'haurien de caracteritzar funcionalment les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques del core incloent marcadors específics de Treg.

Un dels dubtes que van sorgir al principi de l'estudi va ser creure realment que durant el procés d'expansió es produís la reversió de l'estat funcional de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> preexistents i disfuncionals en individus amb infecció persistent, i no pas que representés l'expansió d'un nombre petit de cèl·lules T específiques de VHC ja funcionals. Tot i que no es pot excloure amb la seva totalitat aquesta última reflexió, la naturalesa multiespecífica i la intensitat de la resposta després de l'expansió i la semblança en quant al tipus de resposta immune amb les cèl·lules CD4<sup>+</sup> *ex vivo* observada en els individus amb resolució espontània, dona suport a què el procés d'expansió genera la reversió de l'estat disfuncional de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i no pas l'expansió d'un petit nombre de cèl·lules T totalment funcional. Addicionalment, la selecció i expansió cel·lular va ser possible inclús en el pacient amb infecció persistent que presentava menor expressió de CD154 sota l'estimulació amb NS3 (0,019% de les CD4<sup>+</sup> totals), i tampoc hi va haver diferències entre el grau de restauració funcional i les freqüències d'expressió de CD154. A l'hora de determinar la funcionalitat d'aquestes cèl·lules la situació ideal hagués sigut poder comparar el fenotip i la funcionalitat de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> expandides amb la població de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> autòlogues no expandides. Desafortunadament, degut al baix nombre de limfòcits CD154<sup>+</sup> específics de VHC en sang perifèrica aquestes cèl·lules no es poden utilitzar com a control i, per tant, únicament es va poder determinar el grau de reversió funcional per comparació del perfil de producció de citocines en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> *ex vivo* autòlogues. En individus amb infecció curada espontàniament, la funcionalitat de les cèl·lules T no es va veure incrementada significativament després del procés d'expansió, donant suport a la teoria de què l'expansió de les cèl·lules T específiques dels pacients amb infecció persistent permet revertir l'estat disfuncional i no es deu a un estat d'activació inespecífica associat al procés d'expansió *in vitro*. A més, les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> *ex vivo* específiques de NS3 presents als individus amb infecció curada espontàniament sembla que presentin un fenotip complet de memòria efectora i, en part, no poden ser sobreexpandides en absència de l'antigen afí.

---

Per altra banda, i tal com s'havia suggerit prèviament <sup>41, 44, 253, 280</sup>, el nostre estudi dona suport a la teoria de què la inactivació funcional precoç de la resposta immune de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques del VHC juga un paper essencial en l'establiment de la persistència viral. El desencadenant de la inactivació cel·lular encara es desconeix, però a diferència de les cèl·lules CD8<sup>+</sup>, la selecció de mutants d'escapament sembla que no té un paper rellevant amb la pèrdua de funcionalitat de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> durant la infecció crònica <sup>69</sup>. No obstant, tot i que s'han proposat algunes variants dels epítops de la NS3 com a responsables de causar l'anèrgia de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> o d'induir el fenotip Treg, durant la fase aguda de la infecció, sembla que pocs d'ells són capaços d'induir l'anèrgia de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i perjudicar la generació i la maduració de les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> de memòria i per tant, impeding l'eliminació del virus. <sup>281, 282</sup>

Estudis en ratolins han demostrat que la inactivació funcional de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> es produeix precoçment durant la transició cap a la persistència viral, és independent de la presència de cèl·lules Treg, i aquestes cèl·lules T CD4<sup>+</sup> disfuncionals generades actuen dificultant el manteniment de la funcionalitat de les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> citotòxiques i facilitant la persistència viral. No obstant, s'ha observat que resta un petit reservori de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> resistents a la inactivació les quals es mantenen durant la cronicitat <sup>102</sup>.

#### 4.5. Potencial ús de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques de NS3 en immunoteràpia adaptativa

Diversos estudis han identificat patrons característics de cèl·lules T disfuncionals en individus amb infecció persistent tals com la sobreexpressió de PD-1, els nivells baixos de CD127 en superfície, així com l'expansió de cèl·lules Treg CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> capaces de disminuir la funció efectora), sent dianes perfectes per immunoteràpia.<sup>279, 283-285</sup> Actualment s'estan estudiant diferents immunomoduladors bloquejants d'aquestes molècules inhibidores que podrien restaurar l'estat funcional de les cèl·lules T<sup>208-210</sup>, tot i que el seu paper en la persistència viral és motiu de debat ja que aquestes cèl·lules podrien actuar també com un mecanisme d'adaptació per evitar o limitar el dany de les cèl·lules hepàtiques durant la infecció aguda i crònica<sup>286-288</sup>.

En el segon estudi presentat en aquesta tesi hem demostrat que les cèl·lules T disfuncionals es poden reactivar funcionalment durant la infecció persistent<sup>289</sup>. Per tant, la possibilitat de seleccionar, expandir i restaurar la capacitat funcional de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> de memòria específiques del VHC en individus amb infecció persistent suggereix l'ús potencial de les cèl·lules T CD154<sup>+</sup> específiques expandides autòlogues per a immunoteràpia adaptativa. Durant els últims anys s'estan investigant estratègies d'immunoteràpia adaptativa tant per a l'eliminació del virus com per a evitar la reinfecció de l'empelt després del trasplantament hepàtic. Recentment s'ha descrit un estudi d'immunoteràpia cel·lular per tal d'evitar la recurrència agressiva de la infecció pel VHC després del trasplantament hepàtic i que consisteix en la infusió de limfòcits del donant demostrant que el tractament immunosupressor gairebé no afecta la capacitat dels limfòcits T per controlar la replicació viral.<sup>248</sup> En el nostre estudi, les característiques que presenten les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> expandides sembla que compleixen els requisits necessaris per proporcionar l'ajuda suficient i eficaç per restaurar *in vivo* les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> específiques del VHC esgotades<sup>152, 290</sup>, un rescat que ja s'ha demostrat en models animals<sup>291</sup>. Addicionalment, les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> de memòria també poden activar la resposta immune innata<sup>292</sup>, la qual indirectament també proporciona ajuda addicional a les cèl·lules T CD8<sup>+</sup> per tal de controlar la infecció viral. No obstant, el gran dubte que podria presentar l'ús de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> autòlogues expandides en la immunoteràpia adaptativa seria que els mateixos mecanismes que condueixen la disfuncionalitat de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i la persistència viral podrien tornar a desactivar les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>

restaurades funcionalment. En aquest cas, aquests tipus d'immunoteràpia únicament seria factible com adjuvant dels tractaments antivirals convencionals i futurs, els quals disminuirien la càrrega viral i s'evitaria la inactivació de les cèl·lules funcionalment restaurades, o bé per prevenir la *novo* infecció de l'empelt durant les primeres hores posteriors al trasplantament hepàtic, quan la càrrega viral disminueix dràsticament.

#### 4.6. Projectes en desenvolupament i futurs

Els dos estudis presentats en aquesta tesi han donat lloc a nous projectes respectivament.

Per una banda, s'ha intentat aprofundir en els mecanismes implicats en la curació espontània de la infecció pel VHC correlacionant l'evolució de la infecció, el polimorfisme *rs12979860* del gen de la IL-28B i la resposta immune cel·lular. Efectivament, hem trobat una correlació directa entre l'haplotip favorable del polimorfisme *rs12979860* de la IL28B (CC) i curació espontània de la infecció en la nostra població de donants, tot i que les respostes immunes de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> enfront a l'antigen NS3 és un factor més potent de predicció de resolució en individus amb genotips desfavorables per a la IL28B (CT/TT). Els resultats i les conclusions d'aquest estudi estan en revisió al Journal of Viral Hepatitis (veure l'article original a l'annex).

Per altra banda, la possibilitat de seleccionar i expandir *in vitro* cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques de NS3 i restaurar la capacitat funcional en la majoria d'individus amb infecció persistent, ha donat lloc a un segon estudi, el qual està en vies de desenvolupament, per tal d'identificar el(s) pèptid(s) responsables de la inducció d'anèrgia així com determinar la capacitat dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> específics de NS3 restaurats funcionalment *ex vivo* per reprogramar la resposta CD8<sup>+</sup> citotòxica autòloga, i en segon lloc, adaptar el procés d'expansió i restauració funcional segons normativa GMP i la legislació espanyola vigent sobre teràpies cel·lulars avançades per la seva aplicació en investigació humana. Si aquests objectius es compleixen, l'ús de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques autòlogues restaurades funcionalment podria ser una bona estratègia d'immunoteràpia adaptativa en el tractament de la recurrència de la infecció pel VHC posttrasplantament, ja que en la fase precoç es produeix una dràstica disminució de la càrrega viral, seguida de replicació viral a un títol elevat d'una població viral molt homogènia durant varies setmanes, factors que facilitarien la restauració de la resposta CD8<sup>+</sup> disfuncional mitjançant la transferència precoç de limfòcits CD4<sup>+</sup> Th1 funcionals, que podrien generar

l'eradicació de la infecció o modificar el curs clínic de la mateixa i la resposta als tractaments antivirals convencionals. A més, l'ús de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques de NS3 autòlogues i restaurades funcionalment podria ser una bona estratègia ja que s'evitarien els potencials efectes col·laterals associats a d'altres estratègies d'immunoteràpia tals com són la inhibició de l'activitat de les cèl·lules Treg amb anticossos anti-IL10R, el bloqueig de la interacció PD1-PD-L1 amb anticossos anti-PD-1L i/o anti-CTL4, ja que presenten seriosos inconvenients per a la seva aplicació *in vivo* degut al seu caràcter indiscriminats per a suprimir els mecanismes moduladors dels fenòmens autoimmunes o les reaccions immuno-citotòxiques exagerades, en comparació a la simple reinoculació de CD4<sup>+</sup> autòlogues específiques i restaurades funcionalment.

## 5. CONCLUSIONS



1. La meitat dels donants amb patró de RIBA-3 indeterminat (ARN VHC negatiu) presenten cèl·lules T específiques del VHC capaces de produir citocines Th1 sota estimulació antigènica i, per tant, representen curacions espontànies de la infecció.
2. La tecnologia d'ELISpot ajuda a identificar individus amb infecció subclínica evidenciant que les taxes de resolució espontània de la infecció per VHC poden ser superiors al 15-25% descrit fins ara.
3. La tècnica d'ELISpot IFN- $\gamma$  pot ser una eina útil pel diagnòstic de la infecció viral ja que permet discriminar els donants amb patró de RIBA-3 indeterminat entre resolucions espontànies de la infecció i falsos positius de la tècnica de criatge, permetent que els donants siguin degudament informats i donant una raó més versemblant del perquè són rebutjats definitivament com a donants de sang.
4. La resposta immune enfront a la proteïna no estructural NS3 i, especialment al domini de l'helicasa, és el factor discriminant entre resolució de la infecció i persistència viral.
5. Els pacients amb infecció persistent presenten cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques del VHC en sang perifèrica i aquestes cèl·lules es poden identificar fàcilment, independentment del seu perfil funcional, mitjançant l'expressió en superfície de l'antigen CD154, molècula d'expressió específica d'antigen i transitòria. La manca o la debilitat de la resposta immune en individus amb infecció persistent es deu a l'alteració funcional de la resposta de les cèl·lules T i no pas a la delecció de la resposta CD4<sup>+</sup>.
6. Es poden seleccionar i expandir les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques de NS3 i restaurar la capacitat funcional en la majoria d'individus amb infecció persistent pel VHC, proporcionant un nou instrument per ajudar a entendre els mecanismes implicats en la persistència viral i investigar l'ús d'aquestes cèl·lules per a estratègies d'immunoteràpia adaptativa.

## 6. MATERIALS I MÈTODES

### 6.1. Tests serològics

Els anticossos enfront al VHC es van determinar mitjançant immunoassajos de tercera generació (PRISM HCV ChLIA, Abbott Diagnostics, Alemanya). El PRISM HCV ChLIA és un immunoassaig quimioluminiscent *in vitro*, una variació de la tècnica d'EIA, el qual presenta una fase sòlida amb micropartícules recobertes amb antígens recombinants del VHC, que reconeixen els anticossos presents a les mostres de sèrum o plasma humà. La detecció es realitza amb la immunoglobulina anti-humana biotinitada i l'anticòs anti-biotina conjugat amb acridini. El senyal quimioluminiscent és generat per l'addició del peròxid d'hidrogen que genera l'oxidació de l'acridini tot alliberant fotons que són detectats pel tub fotomultiplicador (Fig. 24). La quantitat de fotons alliberada és proporcional a la quantitat d'anticòs anti-VHC present a la mostra. La presència o absència d'anti-VHC es determina per comparació amb els fotons alliberats pels calibradors (*cutoff*). Si el nombre de fotons recol·lectats per la mostra és inferior al *cutoff*, aquesta mostra no és reactiva, mentre que si és igual o superior la mostra es reactiva.

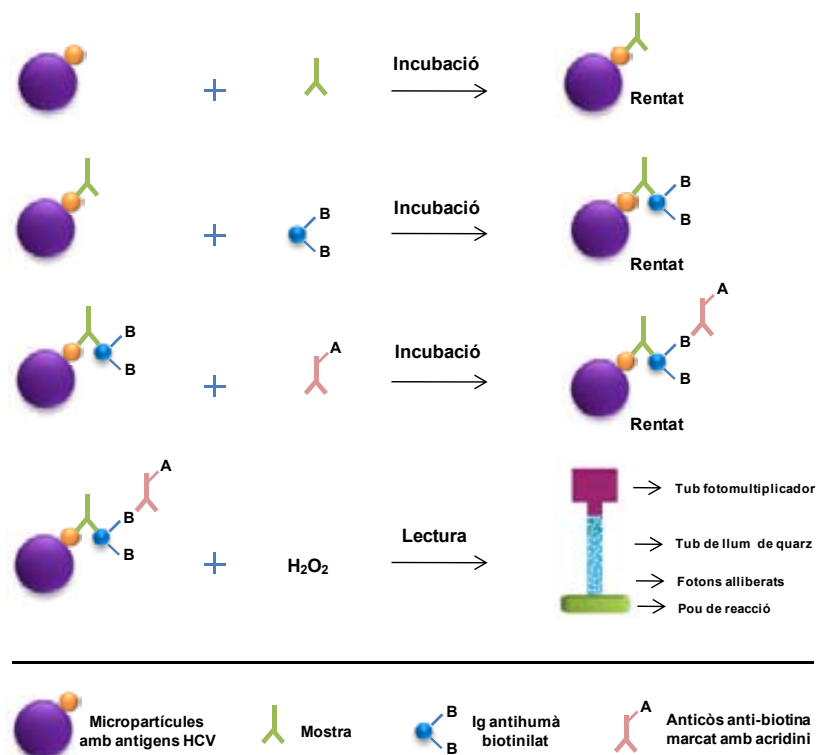
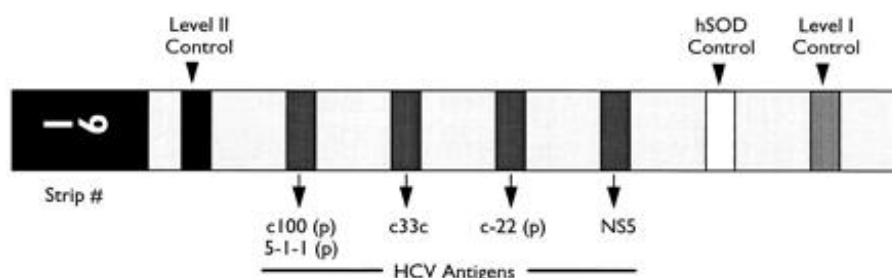


Figura 24. Esquema de l'assaig de ChLIA (quimioluminiscència)

La tècnica de ChLIA utilitza tres antígens recombinants del VHC (HCr43, c100-3 i el NS5). La HCr43 està formada per una regió del core (aminoàcids 1 al 150) i una regió de la NS3 (aas 1192-1497). La proteïna c100-3, és una proteïna de fusió amb la superòxid dismutasa (SOD), i inclou una part de la poliproteïna que codifica per a la NS3 i la NS4 del VHC (aminoàcids 1569-1931). Per últim, la NS5 també està sintetitzada unida a la SOD i inclou els aminoàcids 2054-2995 de la seqüència de la poliproteïna del VHC. La sensibilitat i la especificitat d'aquesta tècnica és molt elevada (>99%).

Les mostres reactives per ChLIA es van confirmar per assajos d'immunoblot (RIBA HCV 3.0 SIA, Chiron Corp, USA). El RIBA (*Recombinant immunoblot assay*) es basa en la detecció d'anticossos que reaccionen amb antigen recombinant i pèptids sintètics que estan adherits a una membrana de nitrocel·lulosa. Els antígens utilitzats són el c33c (regió NS3 del virus), el NS5, els pèptids sintètics, c100p i 5.-1-1, (regió NS4), i el c22p (regió del core). A més, conté una banda amb SOD com a control negatiu (evitar reaccions inespecífiques), així com dos bandes (una més concentrada que l'altra) amb IgG com a control positiu. Seran aquestes últimes bandes les que, per comparació d'intensitats, permetran realitzar una semiquantificació dels anticossos específics del VHC presents a la mostra.

Primerament s'incuba la tira de nitrocel·lulosa amb la mostra de sèrum o plasma per tal de què es produeixi el reconeixement específic antigen-anticòs. El revelat es realitza amb una immunoglobulina anti-humana conjugada amb l'enzim peroxidasa i l'addició del substrat, el peròxid d'hidrogen i 4-cloro-1-naftol, el qual dóna lloc a un producte insoluble de color blau fosc podent-se visualitzar les bandes sobre la tira de nitrocel·lulosa (Fig. 25).



**Figura 25. Tira immunoreactiva de l'assaig de RIBA-3 del VHC**

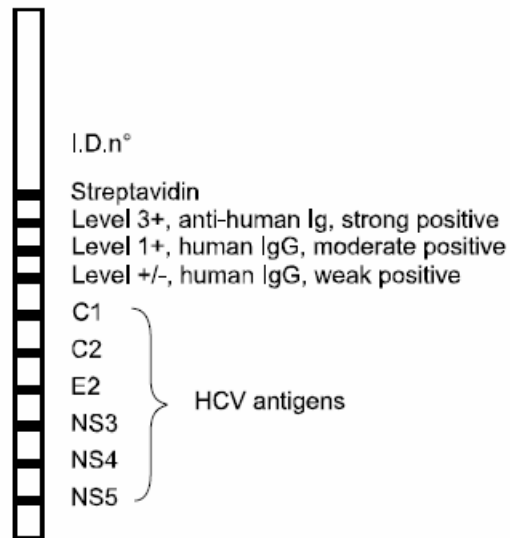
La intensitat de la reacció de les bandes control en cada tira s'utilitza per assignar els índex de reactivitat a cada antigen present a la tira seguint la interpretació descrita a la Taula 4.

**Taula 4.** Interpretació dels resultats del RIBA-3 del VHC

Intensitat de la reacció de les bandes de l'antigen (R)	Interpretació
Absència	<b>neg</b>
Menor que control IgG nivell I	<b>+/-</b>
Igual que control IgG nivell I	<b>1+</b>
>IgG nivell II i <IgG nivell II	<b>2+</b>
Igual que control IgG nivell II	<b>3+</b>
Major que control IgG nivell II	<b>4+</b>

Un RIBA positiu queda definit per la reactivitat enfront a dos o més antigens del VHC amb absència de reactivitat enfront a la SOD. La reactivitat enfront a un únic antigen es considera un resultat indeterminat, mentre que l'absència de reactivitat enfront als antigens virals o reactivitat únicament enfront a la SOD es considera un resultat negatiu. El test de RIBA té menor especificitat però major sensibilitat que el mètode d'EIA.

Les mostres amb un resultat de RIBA-3 indeterminat es van retestar amb un kit addicional d'immunoblot (INNO-LIA HCV Score, Innogenetics, Ghent, Bèlgica), el qual incorpora antigens del VHC derivats de la proteïna estructural del core (C1 i C2 i E2), i de les regions no estructurals del virus (NS3 helicasa, NS4A i NS5A) a una membrana de niló (Fig. 26). A cada tira hi ha quatre bandes control: una banda de control de l'estreptavidina, control positiu 3+ (anti-Ig humà), que també s'utilitza com a banda de control d'addició de mostra i control positiu 1+ (IgG humà). L'INNO-LIA HCV Score utilitza la mateixa tecnologia que el RIBA de Chiron, però en aquest cas l'enzim utilitzat per a la detecció és la fosfatasa alcalina i el substrat enzimàtic és el 5-bromo-4cloro-3-indoïlfosfat/nitroblau de tetrazol en dimetilformamida (BCIP/NBT), i la reacció es para amb l'àcid sulfúric.



**Figura 26.** Tira immunoreactiva de l'assaig de INNO-LIA HCV Score

La intensitat de la reacció de les bandes control en cada tira s'utilitza per assignar els índex de reactivitat a cada antigen present a la tira seguint la interpretació descrita a la Taula 5.

**Taula 5.** Interpretació dels resultats del INNO-LIA HCV Score

Intensitat de la reacció de les bandes de l'antigen (R)	Interpretació
Absència	<b>neg</b>
Igual que el control IgG +/-	<b>+/-</b>
>IgG nivell +/- i/o igual a IgG nivell 1+	<b>1+</b>
>IgG nivell 1+ però < IgG nivell 3+	<b>2+</b>
Igual IgG nivell 3+	<b>3+</b>
Major que IgG nivell 3+	<b>4+</b>

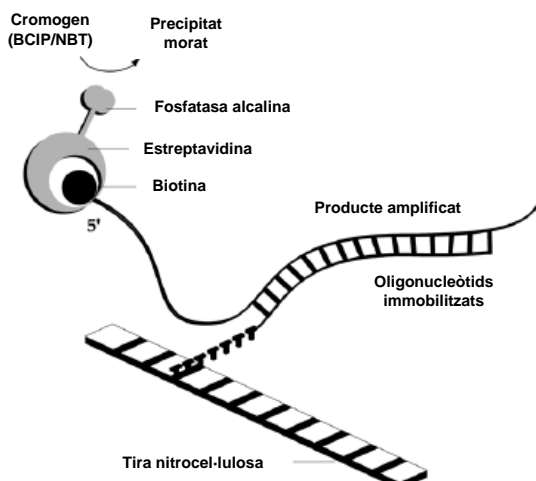
L'INNO-LIA HCV Score presenta una sensibilitat del 100% i una especificitat del 94,5%.

## 6.2. Determinació de l'ARN viral

Del Gener de 2006 al Març de 2007, el cribatge de l'ARN del VHC de totes les donacions de sang del Banc de Sang i Teixits de Catalunya es va realitzar en *pools* de 48 mostres mitjançant RT-PCR "in house" (límit de detecció de 816 UI/ml). A partir de l'Abril de 2007 es va implementar la tècnica de TMA en mostra individual (TMA; Procleix Ultrio assay, Novartis, Emeryville, CA) (límit de detecció 3,6 UI/ml). El principi del TMA es basa en l'amplificació a temperatura constant (37 °C) de l'ARN viral fins a obtenir-ne milions de còpies. En la reacció intervenen diversos enzims (RNasa H, retrotranscriptasa, ARN polimerasa) i la detecció del producte amplificat es realitza per hidròlisi química d'una sonda específica i detecció per quimioluminiscència. Les mostres inicialment reactives en el test de cribatge es van confirmar en mostra individual mitjançant RT-PCR *in house* (límit de detecció de 17 UI/ml).

## 6.3. Determinació del genotip i del serotip viral

Els genotips del VHC dels donants amb RIBA-3 positiu i virèmia detectable es van determinar mitjançant assajos moleculars (VERSANT HCV Genotype 2.0 LIPA; Innogenetics, Ghent, Bèlgica). Aquest assaig permet identificar els genotips 1-6 del VHC i els subtipus 1a i 1b basant-se en la tècnica d'hibridació inversa (Fig. 27). Després de l'extracció de l'ARN viral a partir de 200 µl de plasma (Kit Qiagen), es genera un producte de PCR biotinitat de les regions 5'UTR i core. Després de comprovar la correcta amplificació en gels d'agarosa al 1%, s'hibrida el producte de PCR amb les tires de nitrocel·lulosa les quals porten immobilitzades sondes específiques de la regió 5'UTR i del core. El revelat es realitza amb el conjugat format per l'estreptavidina i la fosfatasa alcalina i el substrat enzimàtic (cromògen BCIP/NBT).



**Figura 27. Esquema del principi d'hibridació inversa del LIPA**

La interpretació dels resultats es realitza amb la taula de patró de bandes característica de cada genotip proporcionada per la casa comercial.

En les mostres que presentaven anticossos en absència de virèmia (RIBA-3 Positiu / ARN VHC negatiu) es va determinar el serotip a través d'un assaig que es basa en la resposta diferenciada dels antisèrums enfront a les regions de la NS4 (Murex HCV 1-6 serotyping assay, Abbott, Abbott Park, IL, USA).

La mostra diluïda s'incuba, en presència de pèptids competitiu, als micropous recoberts de pèptids específics pels serotips del VHC. Durant aquesta primera incubació, els anticossos específics enfront als serotips s'uneixen als antígens immobilitzats. Després del rentat per eliminar el material no unit, els anticossos anti-VHC s'incuben amb anticossos monoclonals anti-IgG humans conjugats amb peroxidasa. Durant la segona incubació, es forma un complex antigen-anticòs humà-anticòs anti-IgG humà/enzim als pous que contenen mostres amb anticossos enfront a un serotip específic del VHC. El revelat es realitza amb el substrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) i peròxid d'hidrogen. Als pous que contenen mostres reactives per anti-VHC es desenvolupa un color violeta i la reacció enzimàtica es para amb àcid sulfúric, que canvia el color a taronja, i es mesura espectofotomètricament. La intensitat de color és directament proporcional a la concentració d'anticossos específics en la mostra.

#### **6.4. Genotipatge HLA de classe I i II**

La tipificació del HLA de classe I i II es va realitzar al Laboratori d'Immunologia per a la Recerca i les Aplicacions Diagnòstiques (LIRAD) del Banc de Sang i Teixits de Catalunya. El tipatge es va realitzar mitjançant PCR amb oligonucleòtids específics de cada regió utilitzant la tecnologia Luminex (Tepnel Lifecodes, Stamford, CT, USA).



## 6.5. Pèptids sintètics i proteïnes recombinants del VHC

Els antigens virals emprats en l'estimulació antigènica van ser la proteïna estructural del core (aas 1 – 115) i les proteïnes no estructurals NS3 total (aas 1007 – 1534) i NS3 Helicasa (aas 1207 – 1488), totes elles de Mikrogen (Neuried, Alemanya). Les proteïnes es van obtenir a partir de la seqüència del genotip viral 1a, expressades en *Escherichia coli* i dissoltes en Tris/glicina i es van utilitzar a una concentració final de 2 µg/ml. En el segon estudi es va utilitzar addicionalment *pools* de 14-30 pèptids sintètics amb 11-12 aas solapats que codifiquen per a la regió del core i NS3 del VHC genotip 1a (Taula 6). Aquests pèptids van ser proporcionats pel *National Institute of Health* (Biodefense and Emerging Infectious Research Resources Repository, NIAID, NIH) i es van utilitzar a una concentració final de 10 µg/ml. En alguns experiments es va emprar una NS3 helicasa derivada del genotip 1b del VHC i expressada en *Pichia pastoris*.

Com a controls positius es va utilitzar la fitohematoglutina (PHA, Gibco) i la endotoxina B del *Staphylococcus aureus* (SEB), ambdós a una concentració final de 1µg/ml. En individus seropositius per citomegalovirus (CMV) es va utilitzar un *pool* de pèptids (Peptivator-CMV pp65; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanya) com a control addicional a una concentració final de 1µg/ml. Com a control negatiu, es va utilitzar medi RPMI 1640 complet sense estimulació antigènica o amb DMSO quant fou convenient.

**Taula 6.** Pools de pèptids amb 11-12 amino àcids solapats que codifiquen per a la regió del core i la proteïna no estructural NS3 del VHC

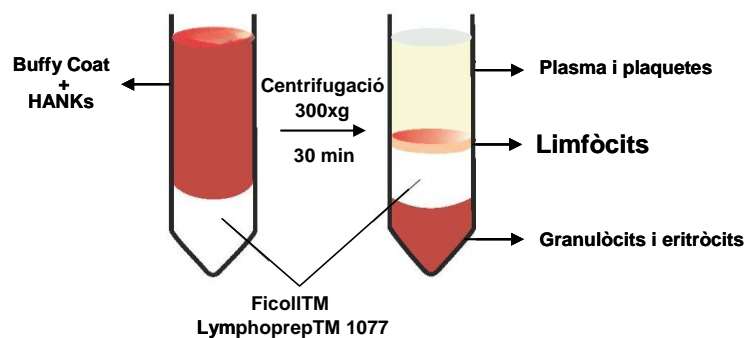
Pool Pèptid	Pèptids	Nombre de pèptids	Posició dels amino àcids	Proteïna viral codificant
Core-1	1 – 28	28	1 – 191	Core
NS3-1	1 – 30	30	1027 – 1214	NS3
NS3-2	31 – 44	14	1215 – 1301	NS3
NS3-3	45 – 61	17	1302 – 1415	NS3
NS3-4	62 – 82	21	1416 – 1546	NS3
NS3-5	83 – 98	16	1547 – 1647	NS3

## 6.6. Cèl·lules emprades

La totalitat del treball es va realitzar utilitzant cultius primaris de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica humana (CMSPs) purificades a partir de concentrats leucocitaris (“*buffy coats*”). Els *buffy coats* utilitzats són concentrats de cèl·lules sanguínies, leucòcits i plaquetes, resultant del fraccionament de donacions de sang amb VHC positiu o controls seronegatius cedides generosament pel Banc de Sang i Teixits de Catalunya, després de l’obtenció dels permisos pertinents i d’obtenir l’aprovació del comitè ètic de l’empresa.

### 6.6.1. Purificació de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica

La separació de CMSP es va realitzar mitjançant gradient de densitat aprofitant característiques cel·lulars tals com la densitat i el tamany per fer efectiva la separació. En aquest treball es va utilitzar el gradient de Ficoll Lymphoprep™ 1077 (Axis-Shield PacAS, Oslo, Norway), el qual és un medi de separació isosmòtic de densitat igual a 1,077 g/ml, el que permet la separació de limfòcits i monòcits (cèl·lules mononuclears) de la resta de cèl·lules sanguínies en funció de la seva densitat.



**Figura 28. Esquema del gradient de Ficoll**

Degut a l’elevada concentració cel·lular present al *buffy coat*, primerament es va realitzar la dilució 1:2 del *buffy coat* amb solució salina HANKs (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). A continuació, es va dipositar al fons dels tubs Falcon estèrils, de 50 ml, un volum de 15 ml de Ficoll Lymphoprep™ a temperatura ambient. És important que la temperatura sigui el més propera possible a 20° per mantenir la densitat adequada. Sobre el Ficoll es van dipositar 30 ml

de sang diluïda, mantenint un flux lent i constant per tal d'evitar que les dos fases es mesclin (fet que impediria la correcta separació dels components cel·lulars). El gradient es centrifuga a 300xg durant 30 min a 20 °C i sense fre. Després de la centrifugació, podem observar al fons del tub un dipòsit vermell, en la qual es troben els eritròcits i les cèl·lules polimorfonuclears, una banda transparent corresponent al Ficoll Lymphoprep™, una banda amb tonalitat blanca que correspon als limfòcits, i una gran capa superior, o sobrenedant, que bàsicament està formada per plasma sanguini, plaquetes i medi HANKs (Fig. 28). La banda dels limfòcits es va recollir amb una pipeta pasteur i es va dipositar a un nou tub Falcon estèril. Posteriorment, es van rentar 3 vegades amb medi HANKs a 750xg, durant 10 min per tal d'eliminar les restes de Ficoll que poden haver sigut arrastrades al recollir la banda. Després de rentar-les es va realitzar el recompte cel·lular amb el comptador hematològic Coulter ACT Diff (IZASA) i el càlcul viabilitat cel·lular mitjançant la dilució d'una alíquota de volum conegut de les cèl·lules amb Blau de Tripà (0.1% pes/volum en PBS: 137mM NaCl, 10 mM tampó fosfat sòdic pH 7,4 i 2,7 mM KCl). Aquest mètode permet conèixer les cèl·lules danyades ja que el colorant penetrarà a dins d'aquelles que presentin la membrana permeabilitzada i es reconeixeran pel seu interior de color blau. Les cèl·lules mononuclears es van resuspendre en sèrum fetal boví (FCS, Gibco, Invitrogen) i 10% de DMSO (Sigma) i es van congelar a -80°C o -196°C en N<sub>2</sub> (l) a una concentració de 10-20x10<sup>6</sup> cèl/ml<sup>250</sup>.

#### 6.6.2. Purificació de cèl·lules CD4<sup>+</sup> i cèl·lules presentadores d'antigen

Les cèl·lules CD4<sup>+</sup> es van obtenir a partir de les CMSPs amb un kit comercial, el Dynal CD4 isolation kit (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Noruega). El principi d'aquesta separació consisteix amb el marcatge cel·lular amb microesferes magnètiques conjugades amb anticossos específics i la retenció de les mateixes a les parets del tub a l'aplicar el camp magnètic. Primer s'obté la fracció no marcada i, una vegada separat el tub del camp magnètic, s'obtenen les cèl·lules marcades. Les Dynabeads CD4 són unes boletes de poliestirè recobertes de material superparamagnètic ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) de 4,5  $\mu\text{m}$  de diàmetre les quals porten fixades un anticòs monoclonal primari específic per a l'antigen de membrana CD4<sup>+</sup> de cèl·lules humanes. Per al procés de separació, es van diluir 4x10<sup>7</sup> CMSP en 1 ml de PBS amb 1 % de sèrum AB humà inactivat i s'hi va afegir 400  $\mu\text{l}$  de CD4-Dynabeads, per tal de formar els complexos entre les

partícules magnètiques i les cèl·lules CD4<sup>+</sup>. Després de la incubació, els complexos formats (cèl·lula CD4 – boleta) es van separar amb l'iman 15-MPC de Dynal Biotech, obtenint així dos fraccions cel·lulars: el sobrenedant que contenia les cèl·lules mononuclears amb delecció de CD4<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>, monòcits, macròfags, limfòcits B...) i les cèl·lules CD4<sup>+</sup> unides a les boletes.

Per tal de mantenir la viabilitat i el fenotip es van alliberar les boletes paramagnètiques de les cèl·lules CD4<sup>+</sup> seleccionades amb Detachabeads® (Dynal Biotech, Oslo, Noruega), que són anticossos policlonals anti-Fab específics dels anticossos CD4 de les Dynabeads. Anàlisi per citometria de flux indicaven que la població de cèl·lules CD4<sup>+</sup> seleccionada presentava una puresa >95%.

La fracció cel·lular que conté les cèl·lules mononuclears amb delecció de les CD4<sup>+</sup> es van irradiar a 30 Gy i es van utilitzar com a *feeders* i cèl·lules presentadores d'antigen (CPA).

## 6.7. Cultius cel·lulars

Pels diferents experiments va ser necessari la realització de cultius cel·lulars. En tots ells, es va utilitzar medi complet R10 (RPMI 1640 complementat 10 % Sèrum AB humà inactivat, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicil·lina, 100 µg/ml estreptomina, 25 mM Hepes). Tots els experiments es van realitzar en cèl·lules criopreservades descongelades al bany maria (37 °C) i rentades amb medi HANKs (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). El recompte limfocitari es va realitzar mitjançant el comptador cel·lular Coulter ACT Diff (Becman Coulter) i la viabilitat mitjançant marcatge amb blau de Tripà.

### 6.7.1. Cultius limfocitaris

L'activació dels limfòcits específics del VHC es va realitzar cultivant CMSPs descongelades amb medi complet R10 sota estimulació antigènica de les proteïnes recombinants del VHC (Core, NS3 i NS3 Helicasa), *pools* de pèptids virals, o controls positius CMV, SEB o PHA. Com a control negatiu es va utilitzar medi sol o amb DMSO a una concentració final igual a la dels *pools* de pèptids.

Pels cultius d'estimulació de la molècula d'activació CD154, es va afegir anticossos monoclonals anti-CD40L i anti-CD28 (BD Biosciences) i en el cultiu d'expansió de cèl·lules T

CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques del VHC també es va addicionar interleuquines homeostàtiques IL-7 i IL-15 (ambdós de PeproTech) i boletes amb anticòs anti-CD3 (Dynal). Aquest procediment el descriurem més detalladament posteriorment degut a la seva importància dins del protocol dissenyat.

### 6.7.2. Cultius de cèl·lules presentadores d'antigen

Pels experiments de caracterització funcional de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i les cèl·lules CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> seleccionades i expandides, es va realitzar cocultius d'aquestes amb CPA autòlogues. Aquestes últimes es van pulsar durant 20h amb 2 µg/ml de les proteïnes del VHC (core, NS3 i NS3 Helicasa), amb 10 µg/ml de *pools* de pèptids, amb 1 µg/ml de SEB o amb absència d'estimulació antigènica (control negatiu). Els cultius es van realitzar amb medi R10 i 1 µg/ml d'anticòs específic anti-CD40. Després de la incubació i abans de realitzar els cocultius, es van irradiar les CPA pulsades a 30 Gy.

Les condicions ambientals de cultiu es van fixar en un incubador a 37°C que mantenia una atmosfera humida amb 5% de CO<sub>2</sub>. La duració dels cultius va variar en funció de les condicions requerides de cada experiment.

## 6.8. Identificació, selecció i expansió de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques del VHC

### 6.8.1. Expressió de la molècula CD154 en superfície dels limfòcits CD4<sup>+</sup>

Per tal de determinar l'expressió de CD154 en superfície dels limfòcits CD4<sup>+</sup>, primerament es van cultivar 10<sup>8</sup> CMSPs durant 8h a 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> amb medi R10 per tal d'eliminar les restes cèl·lulars i les cèl·lules apoptòtiques. Després de rentar-les, es van estimular a una concentració de 2x10<sup>6</sup> cèl/ml amb els antígens del core i NS3, amb els *pools* de pèptids virals, amb els pèptids del CMV, amb l'antigen SEB o amb medi sol (amb presència de DMSO a la mateixa concentració final que els pèptids de VHC quan fou necessari) durant 12h a 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>. Els cultius es van realitzar en medi R10 en presència de 1 µg/ml d'anticòs anti-CD28 (cló 28.2, BD Pharmingen) com a molècula coestimuladora i 1 µg/ml d'anticòs anti-CD40 (cló 5C3, eBioscience) per a bloquejar la ràpida internalització del CD154. Estudis previs havien

demostrat que el pic màxim d'expressió del CD154 corresponia a les 6h de l'estimulació tot i que es mantenia estable fins a les 12h, ja que temps superior suposava la internalització de la molècula.<sup>255,256</sup>

### 6.8.2. Selecció de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques del VHC per FACS

Es va utilitzar el mètode d'immunofluorescència directa (citometria de flux) per detectar cèl·lules que expressaven els antigens de membrana CD4 i CD154 i poder així seleccionar les cèl·lules específiques d'antigen. El marcatge cel·lular es va realitzar sobre 1 ml de CMSP estimulades a una concentració de  $1 \times 10^7$  cel/ml. Els anticossos anti-CD4 conjugat amb fluoresceïna isotiocianat (FITC) (cló RPA-TA, BD Pharmingen) i anti-CD154 conjugat amb ficoeritrina (PE) (cló TRAP1, BD Pharmingen) es van utilitzar a una titulació de  $0,5 \mu\text{g}/10^6$  cèl. Les cèl·lules es van incubar a 4°C i a la foscor durant 20 minuts i posteriorment es van rentar i resuspendre amb PBS i 0,5% de sèrum AB humà a una concentració final de  $1 \times 10^7$  cèl/ml.

La població de cèl·lules CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques de NS3 helicasa i les cèl·lules control (CD4<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup>) es van seleccionar amb el separador cel·lular FACSAria (BD Immunocytometry Systems, San José). Les dos fraccions cel·lulars es van recollir en plaques de 96 pous amb medi R10. Per fixar els voltatges i les compensacions es va utilitzar un kit comercial, anti-Mouse Ig,κ/Negative control (FBS) Compensation Particles Set (Becton Dickinson) i es van marcar amb els anticossos d'interès. La velocitat del flux laminar es va fixar en 2000 cèl·lules/seg.

De tots els pacients es va aconseguir seleccionar de 3000 a 10000 cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> (en funció dels percentatges d'expressió de CD154) i  $1 \times 10^6$  cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup> amb una puresa >90%.

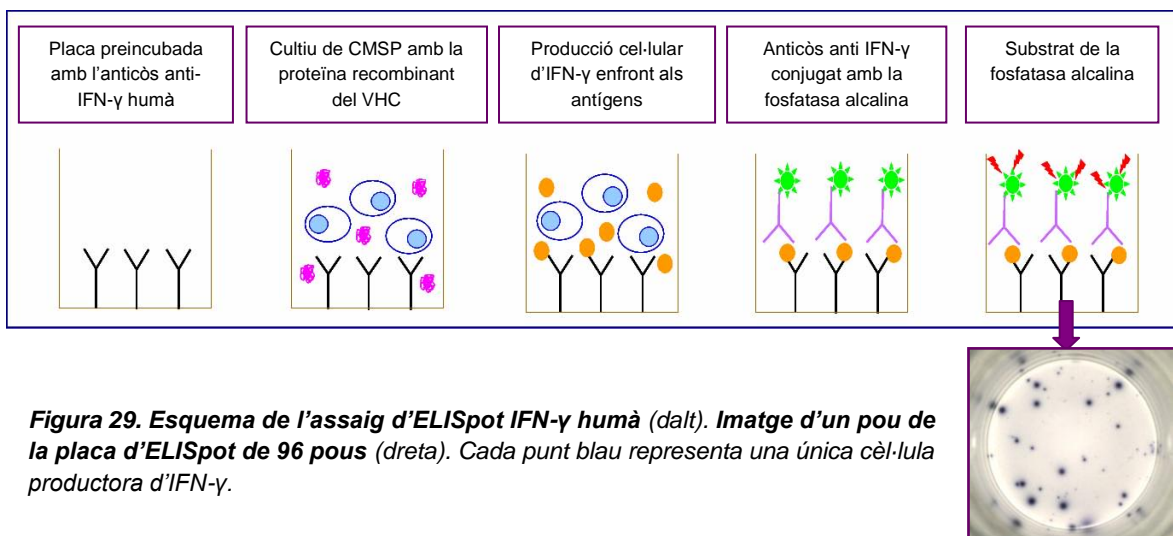
### 6.8.3. Expansió de cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques del VHC

Les cèl·lules CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques de NS3 Helicasa i les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup> separades per *sorting* es van expandir *in vitro* durant 21 dies a 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> en plaques de cultiu de 96 pous amb fons rodó (Cultek), amb medi R10 complementat amb 10 ng/ml d'IL-7 i IL-15 (R&D Systems) i microesferes anti-CD3/CD28 (Dynabeads®CD3 / CD28 T Cell Expander, Dynal Biotech, Oslo, Noruega), a una relació de 3:1 (microesfera:cèl·lula)<sup>255-257</sup>. El

medi es va canviar diàriament i es van fer les dilucions pertinents al llarg del cultiu per tal de mantenir les cèl·lules a una concentració de  $0,5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^6$  cel/ml. Durant la tercera setmana d'expansió no es van afegir interleuquines per tal d'evitar la sobreestimulació i mantenir les cèl·lules en repòs just abans de la realització dels assajos funcionals.

### 6.9. Assaig d'ELISpot IFN- $\gamma$

El nombre de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> productores d'IFN- $\gamma$  es va determinar mitjançant la tècnica d'ELISpot (Mabtech, Suècia), tècnica àmpliament utilitzada per a monitoritzar la resposta immune ja que permet observar cadascuna de les cèl·lules secretores o activades en base a la visualització del producte secretat, proporcionant tant informació quantitativa (nombre de cèl·lules secretores) com qualitativa (tipus de proteïna secretada). La tècnica és una versió modificada de l'ELISA convencional en que utilitza una placa amb 96 pouets recoberts amb una membrana amb anticossos immobilitzats (monoclonals o policlonals) específics de la citocina d'estudi. Després del cultiu les cèl·lules d'interès amb l'antigen estimulador, la citocina és reconeguda per l'anticòs i immobilitzada a la membrana. El revelat es realitza amb l'addició d'un segon anticòs específic conjugat amb l'enzim d'interès, el qual forma un producte colorejat que precipita i permet veure on estava localitzada la cèl·lula productora de la citocina (Fig. 29).



En aquesta tesi, la tècnica d'ELISpot IFN- $\gamma$  es va utilitzar tant per a la detecció de respostes immunes en donants amb RIBA-3 indeterminat (Estudi 1), com per a detectar la magnitud de la resposta immune i el grau de restauració funcional de la resposta CD4<sup>+</sup> específica de VHC (Estudi 2).

En l'estudi 1, es van incubar  $1 \times 10^5$  CMSP estimulades amb 2  $\mu\text{g/ml}$  d'antígens virals, 1  $\mu\text{g/ml}$  PHA (com a control de viabilitat cel·lular) o medi sol (background) en plaques de 96 pous preincubades amb l'anticòs monoclonal anti-IFN- $\gamma$  humà (mAb 1-D1K) i bloquejades amb medi complet, durant 48 hores a 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>. Després de la incubació i el posterior rentat, es van incubar les plaques amb l'anticòs de detecció anti-IFN- $\gamma$  conjugat amb fosfatasa alcalina (mAb 7-B6-1-ALP). Després de 2 hores d'incubació a temperatura ambient, les cèl·lules productores d'IFN- $\gamma$  es van revelar amb el substrat de la fosfatasa alcalina (BCIP/NBT-plus). La reacció es va parar als 15 minuts amb aigua destil·lada i es va deixar assecar la placa a 4 °C abans de procedir al recompte.

El nombre de cèl·lules productores d'IFN- $\gamma$  es va comptar automàticament amb l'ELISpot Reader (AID Diagnostika, Alemanya) i els resultats es van expressar com a nombre de cèl·lules productores d'IFN- $\gamma$  per 10<sup>6</sup> CMSP (IFN- $\gamma$  CFS/10<sup>6</sup> CMSP). Es van excloure els assajos en els quals la producció d'IFN- $\gamma$  en medi sol (control negatiu) era superior a 10 CFS/10<sup>6</sup> CMSP. Un resultat negatiu de PHA també era motiu d'exclusió. El punt de tall de resposta positiva es va calcular amb els controls seronegatius (mitja de la resposta per a cada proteïna més 2 desviacions estàndards).

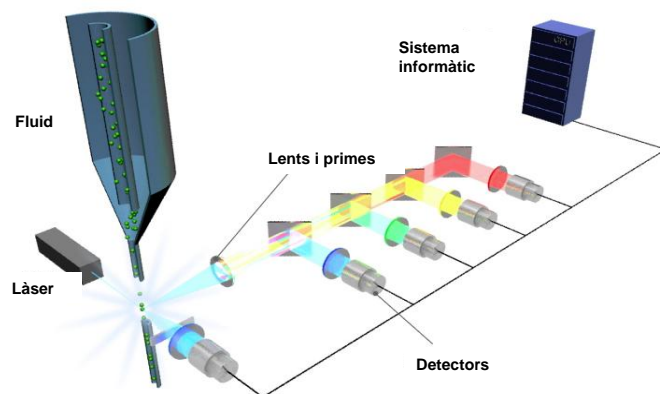
En l'estudi 2 es van realitzar els cultius de les cèl·lules CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques expandides o els limfòcits CD4<sup>+</sup> *ex vivo* seleccionats per Dynabeads amb les cèl·lules presentadores d'antigen autòlogues prepulsades amb les diferents proteïnes/pool pèptids del VHC (o dels controls, SEB i CMV) a una concentració final de  $1 \times 10^6$  cèl·lules/ml i una relació de 1:4. Es van incubar  $1 \times 10^5$  cèl·lules per cada pou (100  $\mu\text{l}$ ) i per duplicat en la placa d'ELISpot IFN- $\gamma$ . El nombre de cèl·lules CD4<sup>+</sup> específiques d'antigen formadores d'IFN- $\gamma$  es va obtenir restant el nombre de cèl·lules productores d'IFN- $\gamma$  obtingudes en absència de les obtingudes en presència antigènica. Els resultats es van donar com a nombre de cèl·lules CD4<sup>+</sup> productores d'IFN- $\gamma$  per cada 100.000 CD4<sup>+</sup> totals.



## 6.10. Citometria de flux

La citometria de flux és una tècnica d'estudi i de detecció ràpida i senzilla de paràmetres (o molècules) quan passen a través d'un punt on es creuen amb un làser. Aquesta característica permet que la detecció i la mesura d'aquests paràmetres es realitzi individualment per a cadascuna de les cèl·lules implicades conferint gran solides a la tècnica degut al gran nombre de cèl·lules analitzades simultàniament. La citometria també permet la separació física de subpoblacions cel·lulars en funció de les característiques antigèniques.

La utilització de fluorocroms es basa en la particularitat de certes molècules per emetre llum a una longitud d'ona determinada al ser excitades per un feix de llum amb menys longitud d'ona (i per tant, amb major capacitat energètica). Aquestes propietats es poden trobar en molècules com la fluoresceïna (FITC) o la ficoeritrina (PE), o altres compostos de nova generació com poden ser el PE-Cy7. Habitualment aquestes molècules s'utilitzen unides covalentment a anticossos que reconeixen específicament la molècula d'interès. A més, la combinació adequada dels fluorocroms i la detecció de molècules a les cèl·lules permeten l'anàlisi de varies molècules simultàniament.



**Figura 30. Esquema del procés de citometria de flux.**

Quan les cèl·lules passen a través del punt de detecció, la llum del làser es dispersada per la pròpia cèl·lula podent detectar tant la dispersió frontal (*Forward Scatter* o FSC), que ens informa del volum, com la dispersió lateral (*Side Scatter* o SSC), donant informació de la complexitat cel·lular. La representació gràfica d'aquests dos paràmetres permet diferenciar les poblacions a analitzar i, en tot cas, permet descartar la informació procedent de restes

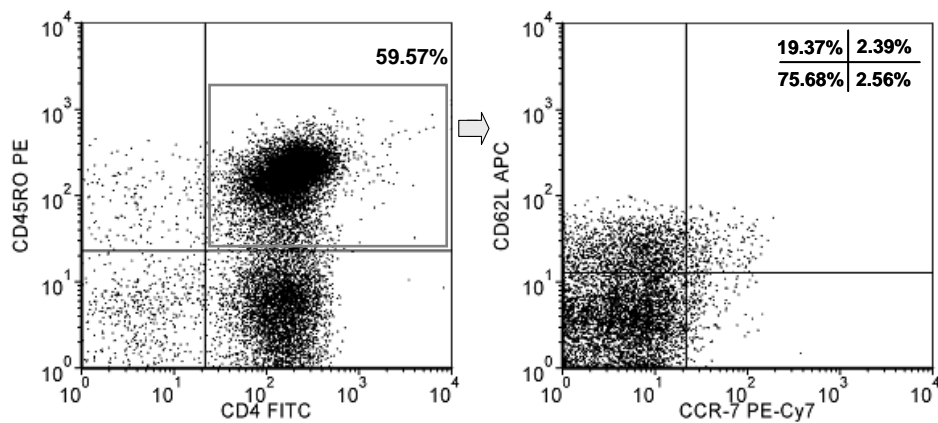
cel·lulars, agregats del medi extracel·lular o cèl·lules apoptòtiques que poden alterar l'anàlisi. Si volem detectar una molècula determinada, solament necessitem un anticòs marcat amb un fluorocrom. El citòmetre detecta emissió de llum del fluorocrom, quan és activat per la llum del làser. Aquesta senyal és filtrada, amplificada i detectada a diferents longituds d'ona, i tota aquesta informació és processada per un sistema informàtic (Fig. 30).

En aquesta tesi la citometria de flux ha sigut de gran utilitat ja que ens ha permès separar poblacions limfocitàries, detectar antígens de superfície, quantificar citocines solubles, determinar el grau de la resposta proliferativa així com detectar citocines intracel·lulars.

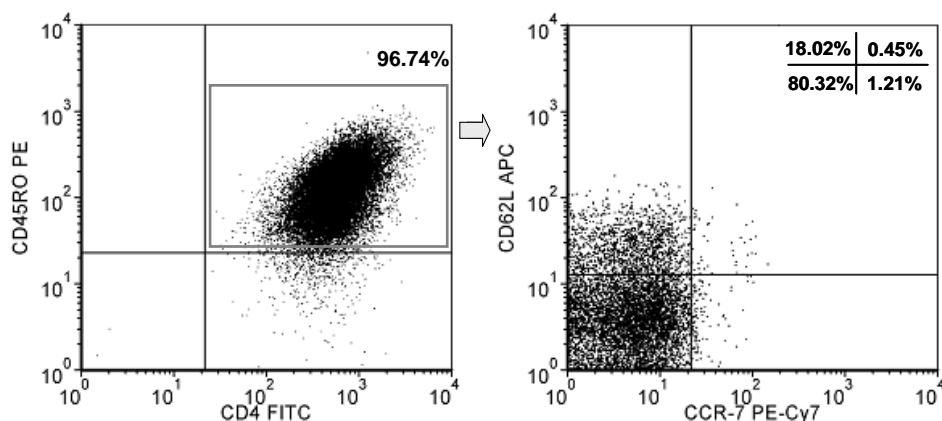
### 6.10.1. Marcatge de superfície

Per a la caracterització fenotípica, es van marcar  $0,5 \times 10^6$  cèl·lules  $CD4^+CD154^+$  expandides 21 dies i  $CD4^+$  separades per Dynabeads amb els anticossos monoclonals anti- $CD4$ -FITC (cló RPA-TA), anti- $CD45RO$ -PE (cló UCHL1), anti- $CCR7$ -PE Cy7 (cló 3D12) i anti- $CD62L$ -APC (cló DREG-56) (conc.  $5 \mu\text{g/ml}$ ) durant 20 min, temperatura ambient. Com a controls isotípics es van utilitzar els anticossos monoclonals  $IgG_{1,\kappa}$ -FITC (cló MOPC-21),  $IgG_{2a,\kappa}$ -PE (cló G155-178),  $IgG_{1,\kappa}$ -APC (cló MOPC-21) (BD Pharmingen, San José, CA). Els anàlisi de citometria es van realitzar amb el FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems; San José, CA) i es van adquirir 30000 limfòcits per a cada anàlisi. Els resultats es van analitzar amb el software CellQuest Pro (Becton Dickinson, San José, CA) tal com es mostra a la figura 31.

#### Cèl·lules $CD4^+$ ex vivo



#### Cèl·lules $CD4^+CD154^+$ específiques NS3 expandides



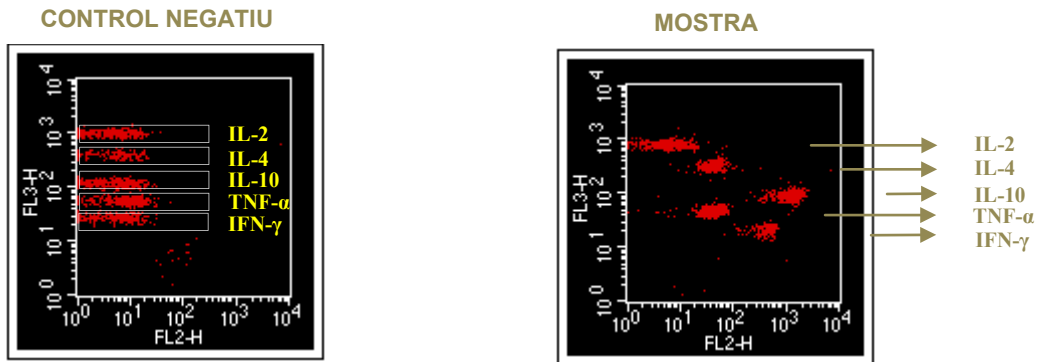
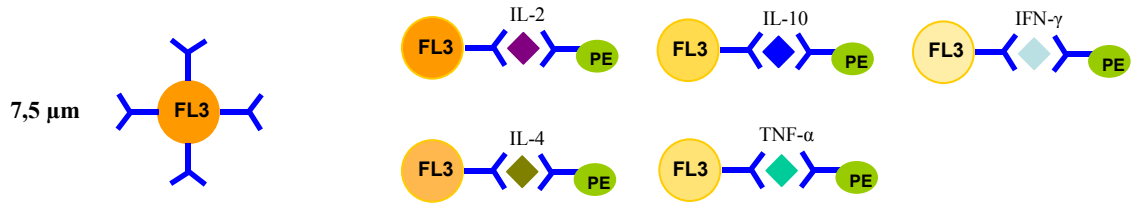
**Figura 31: Model d'anàlisi de la caracterització immunofenotípica de les cèl·lules T  $CD4^+$  ex vivo i de les cèl·lules  $CD4^+CD154^+$  específiques de NS3 Helicosa expandides.** L'anàlisi està realitzat sobre la població de cèl·lules de memòria ( $CD4^+CD45RO^+$ ) (plots esquerra). Percentatges de cèl·lules de memòria central ( $T_{CM}$ ,  $CCR7^+CD62L^+$ ) i memòria efectora ( $T_{EM}$ ,  $CCR7^+CD62L^-$ ) (plots dreta).

### 6.10.2. Quantificació de citocines solubles mitjançant CBA

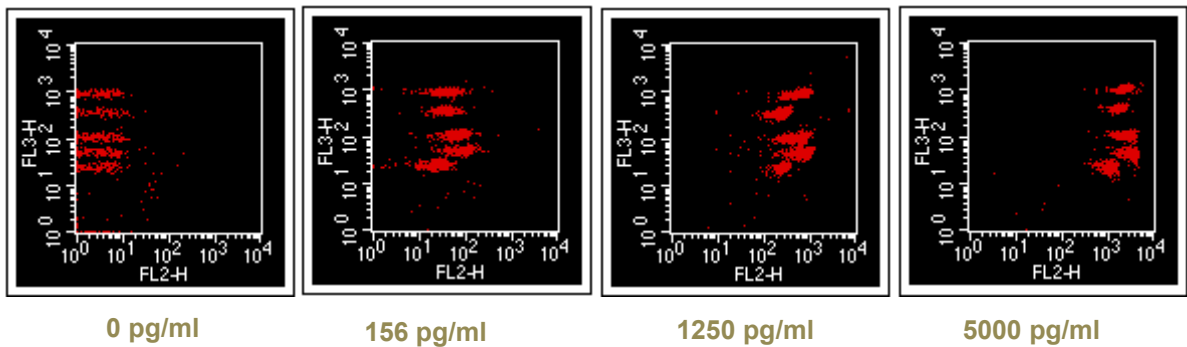
Les citocines solubles dels sobrenedant dels cultius estimulats es van quantificar per citometria de flux (CBA; Cytometric Bead Assay, BD Biosciences). La tècnica de CBA es basa en l'ús de microesferes de la mateixa mida amb diferents intensitats de fluorescència i on cada micropartícula, amb una intensitat de fluorescència concreta, porta fixat un anticòs de captura anti-citocina (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 o IL-10). Les citocines són directament detectades en immunoassajos utilitzant 5 anticossos diferents (anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-2, anti-IL-4 i anti-IL-10) marcats amb ficoeritrina (PE), el qual emet a una longitud d'ona de 585 nm (FL2). Aquest *pool* d'anticossos detectors s'utilitzen per completar el sandwich sent la mitja d'intensitat en FL2 proporcional a la concentració de citocines de la mostra. La quantificació es realitza a partir de les corbes estàndards (amb un rang de 20 a 5000 pg/ml) sent una tècnica molt sensible. A la figura 32 es mostra un esquema del procés.

En l'estudi 1, es van cultivar  $8 \times 10^5$  CMSP (a una concentració de  $1 \times 10^6$  CMSP/ml) amb 2  $\mu\text{g/ml}$  de proteïnes virals o control. Després de 72 hores d'estimulació a 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> es va realitzar la quantificació afegint 50  $\mu\text{l}$  dels sobrenedant dels cultius estimulats o dels estàndards a una barreja formada per 50  $\mu\text{l}$  de la barreja de les boletes conjugades amb els diferents anticossos de captura i 50  $\mu\text{l}$  de l'anticòs detector (conté una mescla d'anti-citocines) conjugat amb PE. La barreja (150  $\mu\text{l}$ ) es va incubar durant 3 hores a la foscor, es va eliminar l'excés d'anticòs, es van adquirir 500 microesferes de cada citocina amb el FACSCalibur i es van analitzar amb el *software* FACSArray (Becton Dickinson). El *dot plot forward vs. side scatter* es va utilitzar per diferenciar les partícules i detectar les boletes amb les citocines, mentre que la quantificació es va realitzar amb el *dot plot* de fluorescències FL2 vs. FL3 i les corbes dels estàndards (Fig. 32).

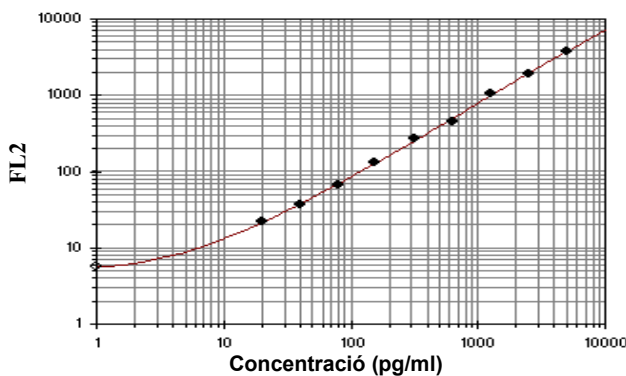
En l'estudi 2 també es va utilitzar aquesta tècnica per a quantificar les citocines solubles de les cèl·lules CD4<sup>+</sup> totals com de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> seleccionades i expandides en cultiu. En aquest cas es van cultivar 40.000 CD4<sup>+</sup> (separades per Dynabeads o CD154<sup>+</sup> expandides) amb 160.000 CPA prepulsades i irradiades 30 Gy a concentració final de  $1 \times 10^6/\text{ml}$ .



Lectura dels estàndards



Corba estàndard de detecció de la IL-10



Model de corba: 4-Parameter Logistic  

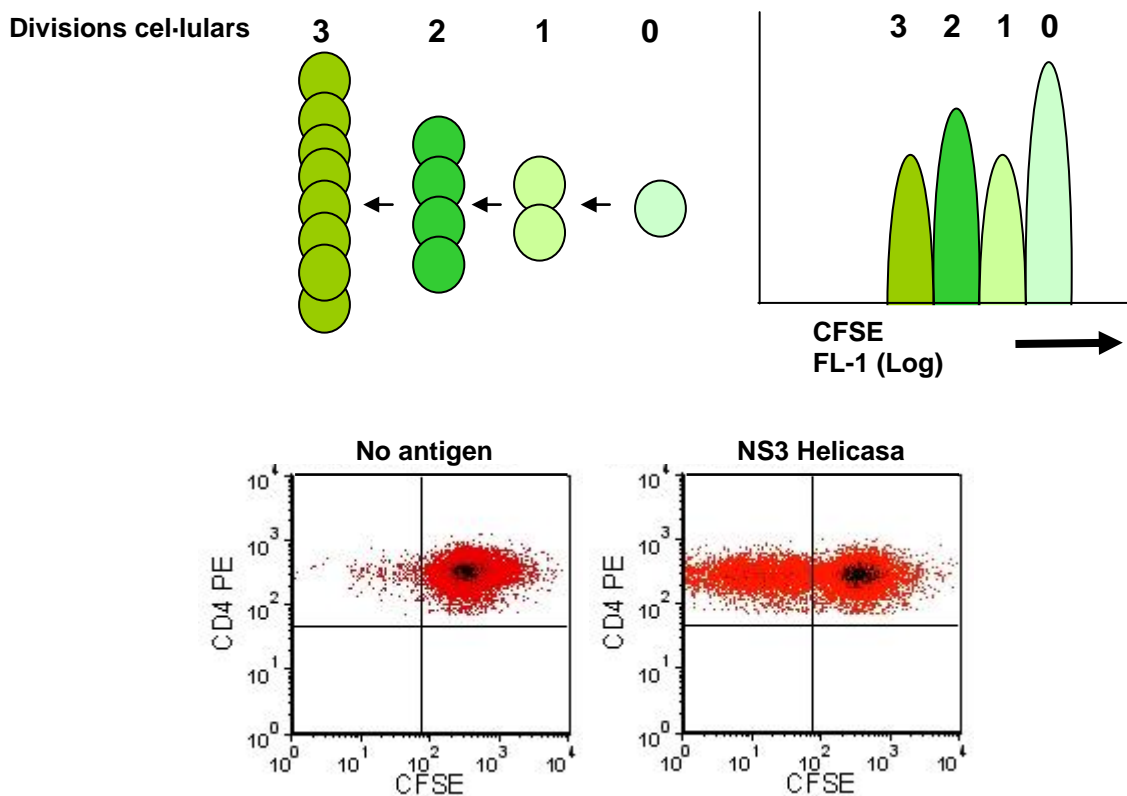
$$y = [(A - D) / (1 + (x/C)^B)] + D$$

Citocina	A	B	C	D	R <sup>2</sup>
IFN-γ	0,81	2,44	4,56	7,49	0,9993
TNF-α	0,73	1,58	7,76	12,87	0,9988
IL-10	0,75	1,8	5,73	9,82	0,9993
IL-4	0,6	2,19	7,47	15,22	0,9997
IL-2	0,52	1,69	5,57	10,19	0,9997

**Figura 32: Quantificació de citocines solubles per citometria de flux (CBA).** De dalt a baix de la figura, esquema de les microesferes conjugades amb els diferents anticossos i amb diferents intensitats de fluorescència; dot plots amb FL2 vs. FL3 per posicionar les citocines; en el control negatiu, la fluorescència en el canal FL2 és nul·la, mentre que a la mostra s'observa fluorescència en el canal FL2 i és proporcional a la concentració de citocina; dot plots per a l'obtenció de les corbes estàndard, la corba estàndard de la IL-10 i el model de corba utilitzat.

### 6.10.3. Assajos de proliferació cel·lular per dilució del CFSE

La capacitat de proliferació de les cèl·lules  $CD4^+$  i les cèl·lules  $CD4^+CD154^+$  seleccionades i expandides es va determinar mitjançant assajos de dilució del CFSE, reactiu que es difon lliurement a l'interior de la cèl·lula, i no és fluorescent fins que els seus grups acetats són processats per esterases intracel·lulars per a formar un fluorofor d'alta intensitat. El CFSE (ja fluorescent) s'uneix de forma espontània i irreversible tant a proteïnes intracel·lulars com de superfície, a través d'una reacció amb les cadenes laterals de la lisina i altres grups amino disponibles. Quan les cèl·lules es divideixen, aquest marcatge es distribueix de forma equitativa entre les cèl·lules filles, de manera que la intensitat de fluorescència disminueix a la meitat respecte les seves "progenitores". Com a resultat, cada generació queda marcada amb una fluorescència concreta dins d'una població de cèl·lules en constant proliferació que, a més, pot ser monitoritzada per citometria de flux (Fig. 33). El nombre de divisions només està limitat pel nivell d'auto-fluorescència de les cèl·lules no marcades i per la uniformitat en el tamany de la població marcada.



**Figura 33: Esquema de l'assaig de proliferació per dilució del CFSE.** Gràfic de la base de la metodologia (a dalt). Exemple de cèl·lules marcades amb CFSE i CD4 sense estimulació antigènica i amb NS3 helicasa (sota).

Per aconseguir el nostre objectiu, abans de realitzar els cocultius vam marcar amb CFSE  $1 \times 10^7$  cèl·lules  $CD4^+$  separades per Dynabeads i  $1 \times 10^7$  cèl·lules  $CD4^+CD154^+$  seleccionades i expandides a una concentració final de  $0,5 \mu M$  a  $37^\circ C$  durant 7 min i a la foscor. Per parar la reacció es va afegir un volum igual però de PBS amb 10% sèrum AB humà inactivat, es van centrifugar a  $600 \times g$  durant 5 min i es van rentar 2 vegades amb PBS. Al finalitzar els rentats, les cèl·lules T  $CD4^+$  marcades es van cultivar amb les CPA prepulsades amb proteïnes recombinants del VHC, *pools* de pèptids virals, *pools* de CMV o medi sol a una relació 1:4 i a una concentració final de  $1 \times 10^6$  cèl/ml. Després de 5 dies de cultiu, les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van marcar amb anticòs anti- $CD4$ -PE a una concentració de  $5 \mu g/ml$ . Just abans de passar les cèl·lules pel citòmetre es va afegir el marcador de viabilitat 7-AAD a una concentració de  $4 \mu g/ml$ . El 7-AAD s'uneix a l'ADN i té la particularitat de ser una molècula fluorescent. Tenint en compte que aquest reactiu sol pot travessar la membrana i arribar al nucli si la membrana està danyada, les cèl·lules que presenten aquest tipus de marcatge són cèl·lules que estan en situació apoptòtica o preapoptòtica. Les cèl·lules es van analitzar amb el FACSCalibur i les dades obtingudes es van analitzar amb el software FACSEXPRESS (BD Biosciences).

Per a l'anàlisi es van excloure les cèl·lules positives per 7-AAD, és a dir, únicament es van analitzar les cèl·lules viables. El nombre de cèl·lules que havien proliferat es va determinar seleccionant les subpoblacions cel·lulars  $CD4^+CFSE^{baix}$  i  $CD4^+CFSE^{alt}$  després d'ajustar les finestres d'anàlisi amb els controls positius de  $CD4$ -PE i de CFSE. Com que la població de cèl·lules  $CD4^+CFSE^{alt}$  no era constant en tots els pacients es va normalitzar la capacitat de proliferació i l'índex de proliferació de cada tipus cel·lular sota l'estimulació de cada proteïna i en cadascun dels pacients seguint les següents fórmules <sup>258</sup>:

$$\text{Freqüència proliferació (\%)} = \frac{\text{Nombre cèl·lules } CD4^+ CFSE^{baix}}{\text{Nombre cèl·lules } CD4^+ CFSE^{baix} + \text{Nombre cèl } CD4^+ CFSE^{alt}}$$

$$\text{Índex de proliferació} = \frac{\text{Freqüència proliferació } CD4^+ \text{ amb estimulació antigènica}}{\text{Freqüència proliferació } CD4^+ \text{ sense antigen}}$$

#### 6.10.4. Reexpressió de CD154 i detecció de citocines intracel·lulars

Pel marcatge de citocines intracel·lular i reexpressió de CD154 es van cultivar les cèl·lules CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> específiques del VHC expandides o CD4<sup>+</sup> separades per Dynabeads amb CPA autòlogues prepulsades amb NS3 helicasa, *pools* de pèptids, antígens del core, SEB o medi sol a una relació de 1:4 (conc. final  $1 \times 10^6$  cèl/ml). Els cultius es van realitzar amb medi R10 complementat amb 1 µg/ml d'anticòs anti-CD28, 1 µg/ml d'anti-CD40 i 2µM de monesina. Finalitzada la incubació durant 12 hores a 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>, es va procedir al marcatge de superfície de  $0,5 \times 10^6$  cèl·lules amb els anticossos anti-CD4-FITC i anti-CD154-PE (conc. 5µg/ml) durant 30 min a 4 °C. Després dels rentats es van fixar i permeabilitzar les cèl·lules amb el kit Cytoperm (BD Pharmingen) i es va procedir al marcatge amb els anticossos anti-IL-2-PerCp-Cy5 i anti-IFN-γ-APC (ambdós a 5 µg/ml), durant 30 min a 4°C. Es van adquirir el nombre màxim d'events amb el FACSCalibur i es va analitzar amb el software FACSEXPRESS.

#### 6.11. Anàlisi estadística

L'anàlisi estadística de les dades incloses en aquesta tesi es va realitzar amb el programa SPSS (versió 15.0 per a Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) per a l'estadística descriptiva i l'anàlisi de les variables quantitatives, i amb el SigmaStat (3.0 per a Windows) per a l'anàlisi de les variables qualitatives.

Les variables quantitatives es van comparar mitjançant el test no paramètric de U de Mann-Whitney. Per a les variables qualitatives es va aplicar el test Chi-quadrat i el de Fisher.

La significació estadística es va marcar al 95% amb una  $p < 0.05$ .

#### 6.12. Aspectes ètics

Els donants de sang van donar el seu consentiment de donació de mostres al moment de la donació de sang. Els estudis posteriors es van realitzar de forma anònima i sense traçabilitat seguint la llei de protecció de dades. En qualsevol cas, aquest estudi va ser aprovat pel comitè ètic de l'hospital Universitari Vall d'Hebron.



## 7. BIBLIOGRAFIA

- 1 Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244; 359-362.
- 2 Lindenbach D, Rice M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005; 436: 933-938.
- 3 Martell M, Esteban, JI, Quer J, et al. Hepatitis C virus (VHC) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992; 66: 3225-3229.
- 4 Pérez M, Álvarez A, Fuertes A. Treatment of chronic hepatitis C virus infection in human immunodeficiency virus (HIV) infected patients. *Ann Med Internal (Madrid)* 2005; 22: 288-292.
- 5 García-Retortillo, Forn X. Variabilidad genómica e historia natural de la infección por el virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 2002; 25: 514-520.
- 6 Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trépo C, Inchauspé G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2001; 120: 512-524.
- 7 Sung VM, Shimodaira S, Doughty AL, Picchio GR, Can H, Yen TS, Lindsay KL, Levine AM, Lai MM. Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus infection in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J Virol* 2003; 77: 2136-2146.
- 8 Esteban JI, Sauleda S and Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol.* 2008; 48: 148-162.
- 9 Prati D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and others medical procedures: a global review. *J Hepatol* 2006; 45: 607-616.
- 10 Alvarez BM, González DR, Hernández Sánchez JM, Oyonarte GS. Residual risk of transfusión-transmitted viral infections in Spain, 1997-2002, and impact of nucleic acid testing. *Euro Surveill* 2005; 10: 20-22.
- 11 Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Lyles CM, Chon S, Thomas DL. Incidence and risk factors for hepatitis C among injection drug users in Baltimore, Maryland. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3274-3277.
- 12 Mathei C, Buntinx F, van Damme P. Seroprevalence of hepatitis C markers among intravenous drug users in western European countries: a systematic review. *J Viral Hepat* 2002; 9: 157-173.
- 13 Barril G, Traver JA. Decrease in the hepatitis C virus (HCV) prevalence in haemodialysis patients in Spain: effect of time, initiating HCV prevalence studies and adoption of isolation measures. *Antiviral Res* 2003; 60: 129-134.

- 14 Martínez-Bauer E, Forns X, Armelles M, Planas R, Solà R, Vergara M, Fàbregas S, Vega R, Salmerón J, Diago M, Sánchez-Tapias JM, Bruguera M. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. *J Hepatol* 2008; 48: 20-27.
- 15 Lim J K. Natural history of hepatitis C infection: a concise review. *Yale J Biol Med.* 2001; 74: 229-237.
- 16 El-Serag HB and Mason A. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N England J Med* 2009; 34: 745-750.
- 17 Deuffic S, Poynard T and Valleron AJ. Modelling the hepatitis C virus epidemic in France. *Hepatology* 2009; 29: 1596-1601.
- 18 Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349: 825-832.
- 19 Feld JJ, Liang TJ. Hepatitis C –identifying patients with progressive liver injury. *Hepatology* 2006; 43:S194-206.
- 20 Samuel D, Forns X, Berenguer M, Trautwein C, Burroughs A, Rizzetto M, Trepo C. Report of the monothematic EASL conference on liver transplantation for viral hepatitis. *J Hepatol* 2006; 45: 127-143.
- 21 García- Retortillo M, Forns X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M, Rimola A, Rodes J. Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002; 35: 680-687.
- 22 Berenguer M, Prieto M, Rayón JM, Mora J, Pastor M, Ortiz V, Carrasco D, San Juan F, Burgueño MD, Mir J, Berenguer J. Natural history of clinically compensated HCV-related graft cirrhosis following liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32: 852-858.
- 23 Berenguer M. Natural history of recurrent hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8: S14-18.
- 24 Berenguer M. What determinates the natural history of recurrent hepatitis C after liver transplantation? *J Hepatol* 2005; 42: 448-456.
- 25 Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002; 122: 1554-1568.
- 26 Chevaliez S, Pawlotsky JM. Use of virologic assays in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 371-382.
- 27 Hendricks DA, Friesenhahn M, Tanimoto L, Goergen B, Dodge D, Comanor L. Multicenter evaluation of the VERSANT HCV RNA qualitative assay for detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 651-656.
- 28 Pawlotsky JM, Hezode C, Darthuy F, Darthuy F, Remire J, Dhumeaux D. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. *Hepatology* 2000; 32: 654-659.

- 29 Esteban JI and Sauleda S. Diagnóstico de laboratorio de la infección por el virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29(Supl 2): 107-112.
- 30 Martinot-Peignoux M, Khiri H, Leclere L, Maylin S, Marcellin P, Halfon P. Clinical performances of two real-time PCR assays and bDNA/TMA to early monitor treatment outcome in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Virol* 2005; 32: 92-101.
- 31 Alberti A, Noventa F, Benvegnù L, Boccato S, Gatta A. Prevalence of liver disease in a population of asymptomatic persons with hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 2002; 137: 961-964.
- 32 Bedossa P, Dargère D and Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 1449-1457.
- 33 Poynard T, Ratziu V and Bedossa P. Appropriateness of liver biopsy. *Can J Gastroenterol* 2000; 14: 543-548.
- 34 Tatsumi C, Kudo M, Ueshima K, Kitai S, Ishikawa E, Yada N, Hagiwara S, Inoue T, Minami Y, Chung H, Maekawa K, Fujimoto K, Kato M, Tonomura A, Mitake T, Shiina T. Non-invasive evaluation of hepatic fibrosis for type C chronic hepatitis. *Intervirology* 2010; 53: 76-81.
- 35 Grigorescu M. Non-invasive biochemical markers of liver fibrosis. Review. *J Gastrointestin Liver Dis* 2006; 15: 149-159.
- 36 Castéra L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, De Ledinghen V. Prospective comparison of transient elastography, fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2005; 128: 343-350.
- 37 Reherrmann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest* 2009; 119: 1745-1754.
- 38 Reherrmann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Immunology Reviews* 2005; 5: 215-229.
- 39 Gale M, Foy E.M. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 436: 939-945.
- 40 Thimme R, Lohmann V, Weber F. A target on the move: Innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Research* 2006; 69: 129-141.
- 41 Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann R, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995; 346: 1006-1007.

- 42 Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C. Different clinical behaviours of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigour of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98: 706-714.
- 43 Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999; 10: 439-449.
- 44 Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4 (+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 117: 933-941.
- 45 Lechner F, Wong DKH, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with HCV. *J Exp Med* 2000; 191: 1499-1512.
- 46 Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 2000; 6: 578-582.
- 47 Bigger CB, Brasky KM, Landford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C. *J Virol* 2001; 120: 955-966.
- 48 Day CL, Lauer GM, Robbins GK, McGovern B, Wurcel AG, Gandhi RT, Chung RT, Walker BD. Broad specificity of virus-specific CD4+ T helper-cell responses in resolved HCV infection. *J Virol* 2002; 76: 12584-12595.
- 49 Mehta SH, Cox A, Hoover DR, Wang XH, Mao Q, Ray S, Strathdee SA, Vlahov D, Thomas DL. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* 2002; 359: 1478-1483.
- 50 Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence and disease. *PNAS* 2002; 99: 15661-15668.
- 51 Su AL, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, Wieland S, Bukh J, Purcell RH, Schultz PG, Chisari FV. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *PNAS* 2002; 99: 15669-15674.
- 52 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. High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent HCV infection. *Gastroenterology* 2004; 125: 924-936.

- 53 Schulze zur Wiesch J, Lauer GM, Day CL, Kim AY, Ouchi K, Duncan JE, Wurcel AG, Timm J, Jones AM, Mothe B, Allen TM, McGovern B, Lewis-Ximenez L, Sidney J, Sette A, Chung RT, Walker BD. Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol* 2005; 175: 3603-3613.
- 54 Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune response in acute and chronic HCV infection. *Nature* 2005; 436: 946-951.
- 55 Gerlach JT, Ulsenheimer A, Grüner NH, Jung MC, Schraut W, Schirren CA, Heeg M, Scholz S, Witter K, Zahn R, Vogler A, Zachoval R, Pape GR, Diepolder HM. Minimal T-cell stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4 T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J Virology* 2005; 79: 12425-12433.
- 56 Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: Immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999; 30: 595-601.
- 57 Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002; 169: 3447-3458.
- 58 Spangenberg HC, Viazou S, Kersting N, Neumann-Haefelin C, McKinney D, Roggendorf M, von Weizsäcker F, Blum HE, Thimme R. Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic Cvirus infection. *Hepatology* 2005; 42: 828-837.
- 59 Semmo N, Day CL, Ward SM, Lucas M, Harcourt G, Loughry A, Klenerman P. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ Th cells in chronic HCV infection. *Hepatology* 2005; 41: 1019-1028.
- 60 Koziel MJ, Wong DK, Dudley D, Houghton M, Walker BD. Hepatitis C virus-specific cytolytic T lymphocyte and T helper cell responses in seronegative persons. *J Infect. Dis* 1997; 176: 859-866.
- 61 Bronowicki JP, Vetter D, Uhl G, Hudziak H, Uhrmacher A, Vetter JM, Doffoel M. Lymphocyte reactivity to hepatitis C virus (HCV) antigens shows evidence for exposure to HCV in HCV-seronegative spouses of HCV-infected patients. *J Infect Dis* 1997; 176: 518-522.
- 62 Quer J, Esteban JI, Cos J, Sauleda S, Ocaña L, Martell M, Otero T, Cubero M, Palou E, Murillo P, Esteban R, Guàrdia J. Effect of bottlenecking on evolution of the non structural protein 3 gene of hepatitis C virus during sexually transmitted acute resolving infection. *J Virol* 2005; 79: 15131-15141.
- 63 Grebely J, Conway B, Raffa JD, Lai C, Krajdén M, Tyndall MW. Hepatitis C virus reinfection in injection drug users. *Hepatology* 2006; 44(5): 1139-1145.

- 64 Kurokohchi K, Masaki T, Arima K, Miyauchi Y, Funaki T, Yoneyama H, Yoshida S, Deguchi A, Nakai S, Watanabe S, Kuriyama S. CD28-negative CD8-positive cytotoxic T lymphocytes mediate hepatocellular damage in hepatitis C virus infection. *J Clin Immunol* 2003; 23: 518-527.
- 65 Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, Abrignani S, Mondelli MU, Barnaba V. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8 (+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 2004;113: 963-972.
- 66 Penna A, Missale G, Lamonaca V, Pilli M, Mori C, Zanelli P, Cavalli A, Elia G, Ferrari C. Intrahepatic and circulating HLA class II-restricted, hepatitis C virus-specific T cells: functional characterization in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 35: 1225-1236.
- 67 Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin, Panther E, Urbani S, Ferrari C, Blum HE, von Weizsäcker F, Thimme R. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 79: 7860-7867.
- 68 Shimizu YY, Hijikata M, Iwamoto A, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergent of neutralization escape mutant virus. *J Virol* 1994; 68: 1494-1500.
- 69 Fuller MJ, Shoukry NH, Gushima T, Bowen DG, Callendret B, Campbell KJ, Hasselschwert DL, Hughes AL, Walker CM. Selection-driven immune escape is not a significant factor in the failure of CD4 T cell responses in persistent hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2010; 51: 378-387.
- 70 Mondelli MU, Cerino A, Meola A, Nicosia A. Variability or conservation of hepatitis C virus hypervariable region 1? Implications for immune responses. *J Biosci* 2003; 28: 305-310.
- 71 Tsai SL, Chen YM, Chen MH, Huang CY, Sheen IS, Yeh CT, Huang JH, Kuo GC, Liaw YF. Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* 1998; 115: 954-965.
- 72 Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S, Eichelberger J, Houghton M, Sidney J, McKinney D, Sette A, Hughes AL, Walker CM. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 2001; 15: 883-895.
- 73 Guglietta S, Garbuglia AR, Pacciani V, Scottà C, Perrone MP, Laurenti L, Spada E, Mele A, Capobianchi MR, Taliani G, Folgori A, Vitelli A, Ruggeri L, Nicosia A, Piccolella E, Del Porto P. Positive selection of CTL escapes variants during acute HCV infection. *Eur J Immunol* 2005; 35: 2627-2637.

- 74 Urbani S, Amadei B, Cariani E, Fiscaro P, Orlandini A, Missale G, Ferrari C. The impairment of CD8 responses limits the selection of escape mutations in acute hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2005; 175: 7519-7529.
- 75 Lee CH, Choi YH, Yang SH, Lee CW, Ha SJ, Sung YC. Hepatitis C virus core protein inhibits 12 and nitric oxide production from activated macrophages. *Virology* 2001; 279: 271-279.
- 76 Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, López-Díaz de Cerio A, Baixeras E, Labarga P, García N, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Abnormal priming of CD4+ T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol* 2002; 76: 5062-5070.
- 77 Lanzavecchia A and Sallusto F. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 291-298.
- 78 Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent Th1 polarization. *Nat Immunol* 2000; 1: 305-310.
- 79 Cousens LP, Peterson R, Hsu S, Dorner A, Altman JD, Ahmed R, Biron CA. Two roads diverged: interferon  $\alpha/\beta$ - and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon  $\gamma$  responses during viral infection. *J Exp Med* 1999; 189: 1315
- 80 Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nature Immunol* 2000; 1: 311-316.
- 81 Auffermann-Gretzinger S, Keeffe EB and Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 2001; 97: 3171-3176.
- 82 Anthony DD, Yonkers NL, Post AB, Asaad R, Heinzl FP, Lederman MM, Lehmann PV, Valdez H. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguishes hepatitis C virus and HIV infection. *J Immunol* 2004; 172: 4907-4916.
- 83 Yao ZQ, Eisen-Vandervelde A, Waggoner SN, Cale EM, Hahn YS. Direct binding of hepatitis C virus core to gC1qR on CD4+ and CD8+ T cells leads to impaired activation of Lck and Akt. *J Virol* 2004; 78: 6409-6419.
- 84 Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol JA, Castelblanco N, Rosen HR. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol* 2007; 81: 9249-9258.



- 85 Radziejewicz H, Ibegbu CC, Hon H, Osborn MK, Obideen K, Wehbi M, Freeman GJ, Lennox JL, Workowski KA, Hanson HL, Grakoui A. Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8<sup>+</sup> T cells undergo massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection. *J Virol* 2008; 82: 9808-9822.
- 86 Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 1993; 362: 758-761.
- 87 Nuti S, Rosa Da, Valiante NM, Saletti G, Caratozzolo M, Dellabona P, Barnaba V, Abrignani S. Dynamics of intra-hepatic lymphocytes in chronic hepatitis C: enrichment for Valpha24<sup>+</sup> T cells and rapid elimination of effector cells by apoptosis. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3448-3455.
- 88 Gruener NH, Lechner F, J MC, Diepolder H, Gerlach T, Lauer G, Walker B, Sullivan J, Phillips R, Pape GR, Klenerman P. Sustained dysfunction of viral CD8<sup>+</sup> T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol* 2001; 75: 5550-5558.
- 89 Lechner F, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR, Cerny A, Phillips R, Ferrari C, Pape GR, Klenerman P. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes responses are induced during hepatitis C virus infection but not sustained. *Eur J Immunol* 2000; 30: 2479-2487.
- 90 Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001; 194: 1395-1406.
- 91 Wedemayer H, He XS, Nascimbeni, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002; 169: 3447-3458.
- 92 Urbani S, Boni C, Missale G, Elia G, Cavallo C, Massari M, Raimondo G, Ferrari C. Virus-specific CD8<sup>+</sup> lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Virol* 2002; 76: 12423-12434.
- 93 Appay V, Callan M, Klenerman P, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Memory CD8<sup>+</sup> T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infection. *Nat Med* 2002; 8: 379-385.
- 94 Claasen MA, de Knecht RJ, Tilanus HW, Janssen HL, Boonstra A. Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limits the extent of fibrosis. *J Hepatol* 2010; 52: 315-321.

- 95 Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 1994; 68: 8056.
- 96 Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effectors function. *J Exp med* 1998; 188: 2205-2213.
- 97 Kalams SA, Walker BD. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 1998; 188: 2199-2204.
- 98 Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 2003; 421: 852-856.
- 99 Shedlock DJ and Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T memory. *Science* 2003; 300: 337-339.
- 100 Harari A, Vallelian F, Meylan PR, Pantaleo G. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol* 2005; 174: 1037-1045.
- 101 Rollier C, Depla E, Drexhage JA, Verschoor EJ, Verstrepen BE, Fatmi A, Brinster C, Fournillier A, Whelan JA, Whelan M, Jacobs D, Maertens G, Inchauspé G, Heeney JL. Control of heterologous hepatitis C virus infection in chimpanzees is associated with the quality of vaccine-induced peripheral T-helper immune response. *J Virol* 2004; 74: 187-196.
- 102 Brooks DG, Teyton L, Oldstone MB, McGavern DB. Intrinsic functional dysregulation of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection. *J Virol* 2005; 79: 10514-10527.
- 103 Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghayeb J, Reimann KA, Walker CM. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent HCV infection. *J Exp Med* 2003; 197: 1645-1655.
- 104 Grakoui A, Shoukry NH, Woolard DL, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, Murthy KK, Rice CM, Walker CM. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003; 302: 659-662.
- 105 Kamal SM, Fehr J, Roesler B, Peters T, Rasenack JW. Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 123: 1070-1083.
- 106 Sreenarasimhaiah J, Jaramillo A, Crippin J, Lisker-Melman M, Chapman WC, Mohanakumar T. Concomitant augmentation of type 1 CD4+ and CD8+ T cell responses during successful interferon- $\alpha$  and ribavirin treatment for chronic hepatitis C virus infection. *Human Immunol* 2003; 64: 497-504.

- 107 Tang KH, Herrmann E, Cooksley H, Tatman N, Chokshi S, Williams R, Zeuzem S, Naoumov NV. Relationship between early HCV kinetics and T cell reactivity in chronic hepatitis C genotype 1 during Peginterferon and ribavirin therapy. *J Hepatol* 2005; 43: 776-782.
- 108 Barnes E, Gelderblom HC, Humphreys I, Semmo N, Reesink HW, Beld MG, van Lier RA, Klenerman P. Cellular immune responses during high-dose interferon-alpha induction therapy for hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2009; 199(6): 819-828.
- 109 Schirren CA, Zachoal R, Gerlach JT, Ulsenheimer A, Gruener NH, Diepolder HM, Baretton G, Schraut W, Rau HG, Nitschko H, Pape GR, Jung MC. Antiviral treatment of recurrent hepatitis C virus (HCV) infection after liver transplantation: association of a strong, multiespecific, and long-lasting CD4+ T cell response with HCV elimination. *J Hepatol* 2003; 39: 397-404.
- 110 Weston SJ, Leistikow RL, Reddy KR, Torres M, Wertheimer AM, Lewinsohn DM, Chou S, Davey MP, Corless C, O'Farrelly C, Nelson DR, Rosen HR. Reconstitution of hepatitis C virus-specific T-cell-mediated immunity after liver transplantation. *Hepatology* 2005; 41: 72-81.
- 111 Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 305-334.
- 112 Singh NJ, Schwartz RH. The strength of persistent antigenic stimulation modulates adaptive tolerance in peripheral CD4+ T cells. *J Exp Med* 2003; 190: 1107-1117.
- 113 Vigouroux S, Yvon E, Biagi E, Brenner MK. Antigen-induced regulatory T cells. *Blood* 2004; 104: 26-33.
- 114 Vignali DAA, Collison LW and Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 523-532.
- 115 Chiodetti L, Choi S, Barber DL, Schwartz RH. Adaptive tolerance and clonal anergy are distinct biochemical states. *J Immunol* 2006; 176: 2279-2291.
- 116 Sloan-Lancaster J, Allen PM. Altered peptide ligand-induced partial activation: molecular mechanism and role in T cell biology. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 1-27.
- 117 Blish CA, Dillon SR, Farr AG, Fink PJ. Anergic CD8+ T cells can persist and function in vivo. *J Immunol* 1999; 163: 155-164.
- 118 Frasca L, Scotta C, Lombardi G, Piccolella E. Human anergic CD4+ T cells can act as suppressor cells by affecting autologous dendritic cell conditioning and survival. *J Immunol* 2002; 168: 1060-1068.
- 119 Frasca L, Carmichael P, Lechler R, Lombardi G. Anergic T cells effect linked suppression. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3191-3197.

- 120 Della Bella S, Riva A, Tanzi E, Nicola S, Amendola A, Vecchi L, Nebbia G, Longhi R, Zanetti AR, Villa ML. Hepatitis C virus-specific reactivity of CD4+ lymphocytes in children born from HCV-infected women. *J Hepatol* 2005; 43: 394-402.
- 121 Freeman AJ, French RA, Post JJ, Harvey CE, Gilmour SJ, White PA, Marinos G, van Beek I, Rawlinson WD, Lloyd AR. Prevalence of production of virus-specific interferon-gamma among seronegative hepatitis C-resistant subjects reporting injection drug use. *J Infect Dis* 2004; 190: 1093-1097.
- 122 Frasca L, del Porto P, Tuosto L, Marinari B, Scottà C, Carbonari M, Nicosia A, Piccolella E. Hypervariable region 1 variants act as TCR antagonists for hepatitis C virus-specific CD4+ T cells. *J Immunol* 1999; 163: 650-658.
- 123 Tabatabai N, Bian TH, Rice CM, Yoshizawa, Gill J, Eckels DD. Functionally distinct T cell epitopes within the hepatitis C virus non-structural 3 protein. *Hum Immunol* 1999; 60: 105-115.
- 124 Wang JH, Layden TJ, Eckels DD. Modulation of the peripheral T-cell response by CD4 mutants of hepatitis C virus: transition from a Th1 to a Th2 response. *Hum Immunol* 2003; 64: 662-73.
- 125 Nakanishi K. Innate and acquired activation pathways in T cells. *Nat Immunol* 2001; 2: 140-142.
- 126 Nemeč M. Web alert. Lymphocyte activation and effector function. *Curr Opin Immunol* 2001; 13:265.
- 127 Samelson, LE. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: The Role of Adapter Proteins. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 371-394.
- 128 Hollenbaugh D, Grosmaire LS, Kullas CD, Chalupny NJ, Braesch-Andersen S, Noelle RJ, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. The human cell antigen gp39, a member of the TNF family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *EMBO J* 1992; 11: 4313-4321.
- 129 Grewal IS, Flavell RA. CD40-CD40L interactions in T cell activation. *Immunol Rev* 1996; 153: 85-106.
- 130 Grewal IS, Flavell RA. CD40-CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 111-1135.
- 131 Kooten CV and Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leuk Biol* 2000; 67: 2-17.
- 132 Vermeiren J, Ceuppens JL, Haegel-kronenberger H, De Boer M, Boon L, Van Gool SW. Blocking B7 and CD40 co-stimulatory molecules decreases antiviral T cell activity. *Clin Exp Immunol* 2004; 135: 253-258.
- 133 Grewal IS and Flavell RA. The role of CD40 ligand in costimulatory and T-cell activation. *Immunol Rev* 1996; 153: 85-106.

- 134 Gregal IS, Xu J, Flavell RA. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* 1995; 378: 617-620.
- 135 Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heuffler C, Kämpgen E, Romani N, Schuler G. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-10. *J Exp Med* 1996; 184: 741-746.
- 136 Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4 producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997; 185: 461-469.
- 137 Blotta MH, Marshall JD, Dkruffy RH, Umetsu DT. Cross-linking of the CD40 ligand on human CD4+ T lymphocytes generates a costimulatory signal that upregulates IL-4 synthesis. *J Immunol* 1996; 156: 3133-3140.
- 138 Bergamini A, Cepparulo M, Bolacchi F, Araco A, Tisone G, Ombres D, Rocchi G, Angelico M. Ribavirin increases mitogen- and antigen-induced expression of CD40L on CD4+ T cells in vivo. *Clin Exp Immunol* 2002; 130: 293-299.
- 139 Maleau AM and Sarvetnick. T cell homeostasis in tolerance and immunity. *J Leuk Biol* 2005; 78: 575-584.
- 140 Surh CD and Sprent J. Homeostasis of naïve and memory T cells. *Immunity Rev* 2008; 29: 848-862.
- 141 Lenz DC, Kurk SK, Lemmens E, Schoenberger SP, Sprent J, Oldstone MB, Homann D. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+ T cell memory. *PNAS* 2004; 101: 9357-9362.
- 142 Bradley LM, Haynes L and Swain S. IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. *TRENDS Immunol* 26: 172-176.
- 143 Ma A, Koka R and Burkett P. Diverse function of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 657-679.
- 144 Buentke E, Mathiot A, Tolaini M, Di Santo J, Zamoyska R, Seddon B. Do CD8 effector cells need IL-7R expression to become resting memory cells? *Blood* 2006; 108: 1949-1956.
- 145 Carrio R, Rolle CE and Malek TR. Non-redundant role for IL-7R signalling for the survival of CD8+ memory T cells. *Eur J Immunol* 2007; 37: 3078-3088.
- 146 Osborne LC, Dhanji S, Snow JK, Priatel JJ, Ma MC, Miners MJ, Teh HS, Goldsmith MA, Abraham N. Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R alpha mutant mice. *J Exp Med* 204; 619-631.
- 147 Purton JF, Tan JT, Rubinstein MP, Kim DM, Sprent J, Surh CD. Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent. *J Exp Med* 2007; 204: 951-961.
- 148 Williams MA, Ravkov EV and Evan MJ. Rapid culling of the CD4+ T cell repertoire in the transition from effector to memory. *Immunity* 2008; 28: 533-545.

- 149 Sallusto F, Geginat J I Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 745-763.
- 150 Lanzavecchia A I Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 326-332.
- 151 Lefrançois L and Mazo A. The descent of memory T-cell subsets. *Nature* 2006; 6: 618-623.
- 152 Pantaleo G and Harari A. Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev* 2006; 6: 417-423.
- 153 Verhoeven D, Teijaro JR and Farber DL. Heterogeneous memory T cells in antiviral immunity and immunopathology. *Viral Immunol* 2008; 21: 99-113.
- 154 Riou C, Yassine-Diab B, Van grevenynghe J, Somogyi R, Greller LD, Gagnon D, Gimmig S, Wilkinson P, Shi Y, Cameron MJ, Campos-Gonzalez R, Balderas RS, Kelvin D, Sekaly RP, Haddad EK. Convergence of TCR and cytokine signalling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4+ central memory T cells. *J Exp Med* 2007; 204: 79-91.
- 155 Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. 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: 958-965.
- 156 Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon- $\alpha$ 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975-982.
- 157 Esteban JI. Factores pronósticos de respuesta al tratamiento de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30(Supl 1): 33-41.
- 158 Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461: 798-801.
- 159 Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399-401.
- 160 Lee WM, Dienstag JL, Lindsay KL, Lok AS, Bonkovsky HL, Shiffman ML, Everson GT, Di Bisceglie AM, Morgan TR, Ghany MG, Morishima C, Wright EC, Everhart JE. Evolution of the HALT-C Trial: pegylated interferon as maintenance therapy for chronic hepatitis C in previous interferon nonresponders. *Control Clin Trials* 2004; 25: 472-492.

- 161 Jensen DM and Marcellin P. Rationale and design of the REPEAT study: a phase III, randomized, clinical trial of peginterferon alfa 2a (40 kDa) plus ribavirin in non-responders to peginterferon alfa-2b (12 KDa) plus ribavirin. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005; 17: 899-904.
- 162 Marrache FR, Consigny Y, Cazalshaten D. Safety and efficacy of peginterferon alpha2b plus ribavirin in precirrhotic and cirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003; 124: 123.
- 163 Jensen DM, Marcellin P, Freilich B, Andreone P, Di Bisceglie A, Brandão-Mello CE, Reddy KR, Craxi A, Martin AO, Teuber G, Messinger D, Thommes JA, Tietz A. Re-treatment of patients with chronic hepatitis C who do not respond to peginterferon-alpha2b: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2009; 150: 528-540.
- 164 Shergill AK, Khalili M, Straley S, Bollinger K, Roberts JP, Ascher NA, Terrault NA. Applicability, tolerability and efficacy of preventive antiviral therapy in hepatitis C-infected patients undergoing liver transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 118-124.
- 165 Campos-Varela I, Castells L, Esteban JI, Bes M, Rodríguez-Frias F, Sapisochin G, Allende H, Charco R, Esteban R. Twelve-week posttreatment follow-up to predict sustained virologic response for recurrent hepatitis C infection in liver recipients. *Transplantation* 2012 Jan 18. PMID: 22262129.
- 166 Berenguer M. Management of hepatitis C virus in the transplant patient. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 355-376.
- 167 Ryu KJ, Lee W. Identification of the most accessible sites to ribosome on the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36: 538-544.
- 168 McHutchison JG, Patel K, Pockros P, Nyberg L, Pianko S, Yu RZ, Dorr FA, Kwoh TJ. A phase I trial of antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2006; 44: 88-96.
- 169 Zekri AR, Bahnassy AA, El-Din AH, Salama HM. Consensus siRNA for inhibition of HCV genotype-4 replication. *Viol J*. 2009; 6: 21-27.
- 170 Khañiq S, Jahan S, Pervaiz A, Ali Ashfaq U, Hassan S. Down regulation of IRES containing 5'UTR of HCV genotype 3a using siRNAs. *Virology* 2011; 8: 221-230.
- 171 Reesink HM, Zeuzem S, Weegink CJ, Forestier N, van Vliet A, van de Wetering de Rooij J, McNair L, Purdy S, Kauffman R, Alam J, Jansen PL. Rapid decline of viral RNA in hepatitis C patients treated with VX-950: a phase Ib, placebo-controlled, randomized study. *Gastroenterology* 2006; 131: 997-1002.
- 172 McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC, Jacobson IM, Sulkowski M, Kauffman R, McNair L, Alam J, Muir AJ. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2009; 360: 1827-1838.

- 173 Hézode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, Goeser T, Bronowicki JP, Bourlière M, Gharakhanian S, Bengtsson L, McNair L, George S, Kieffer T, Kwong A, Kauffman RS, Alam J, Pawlotsky JM, Zeuzem S. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2009; 360: 1839-1850.
- 174 Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, Focaccia R, Younossi Z, Foster GR, Horban A, Ferenci P, Nevens F, Müllhaupt B, Pockros P, Terg R, Shouval D, van Hoek B, Weiland O, Van Heeswijk R, De Meyer S, Luo D, Boogaerts G, Polo R, Picchio G, Beumont M. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med* 2011; 364: 2417-2428.
- 175 Muir AJ, Poordad FF, McHutchison JG, Shiffman ML, Berg T, Ferenci P, Heathcote EJ, Pawlotsky JM, Zeuzem S, Reesink HW, Dusheiko G, Martin EC, George S, Kauffman RS, Adda N. Retreatment with telaprevir combination therapy in hepatitis C patients with well-characterized prior treatment response. *Hepatology* 2011; 54: 1538-1546.
- 176 Foster GR, Hézode C, Bronowicki JP, Carosi G, Weiland O, Verlinden L, van Heeswijk R, van Baelen B, Picchio G, Beumont M. Telaprevir alone or with peginterferon and ribavirin reduce HCV RNA in patients with chronic genotype 2 but not genotype 3 infection. *Gastroenterology* 2011; 141: 881-889.
- 177 Kwo PY, Lawitz E, McCone J, Schiff ER, Vierling JM, Pound D, Davis MN, Galati JS, Gordon SC, Ravendhran N, Rossaro L, Anderson FH, Jacobson IM, Rubin R, Koury K, Pedicone LD, Brass CA, Chaudhri E, Albrecht JK. HCV SPRINT-1 Final results: SVR 24 from phase 2 study of boceprevir plus peginterferon alfa-2b/ribavirin in treatment-naïve subjects with genotype-1 chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2009; 50: S4.
- 178 Kwo PY, Lawitz E, McCone J. High sustained virologic response (SVR) in genotype 1 (G1) null responders to peginterferon alfa-2b (P) plus ribavirin (R) when treated with boceprevir (BOC) combination therapy. *Hepatology* 2009; 50: 331A.
- 179 Poordad F, McCoe J, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, Jacobson IM, Reddy KR, Goodman ZD, Boparai N, DiNubile MJ, Sniukiene V, Brass CA, Albrecht JK, Bronowicki JP. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 patients. *N Engl J Med* 2011; 364: 1195-1206.
- 180 Bacon BR, Gordon SC, Lawitz EL, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, Poordad F, Goodman ZD, Sings HL, Boparai N, Burroughs M, Brass CA, Albrecht JK, Esteban R. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011; 364: 1207-1217.
- 181 Susser S, Welsch C, Wang Y, Zettler M, Domingues FS, Karey U, Hughes E, Ralston R, Tong X, Herrmann E, Zeuzem S, Sarrazin C. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* 2009; 50: 1709-1718.



- 182 Manns M, Reesink H, Berg T, Dusheiko G, Flisiak R, Marcellin P, Moreno C, Lenz O, Meyvisch P, Peeters M, Sekar V, Simmen K, Verloes R. Rapid viral response of once-daily TMC435 plus pegylated interferon/ribavirin in hepatitis C genotype-1 patients: a randomized trial. *Antivir Ther* 2011; 16: 1021-1033.
- 183 Liverton NJ, Carroll SS, Dimuzio J, Fandozzi C, Graham DJ, Hazuda D, Holloway MK, Ludmerer SW, McCauley JA, McIntyre CJ, Olsen DB, Rudd MT, Stahlhut M, Vacca JP. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 305-311.
- 184 Forestier N, Larrey D, Marcellin P, Guyader D, Patat A, Rouzier R, Smith PF, Qin X, Lim S, Bradford W, Porter S, Seiwert SD, Zeuzem S. Antiviral activity of danoprevir (ITMN-191/RG7227) in combination with pegylated interferon  $\alpha$ -2a and ribavirin in patients with hepatitis C. *J Infect Dis* 2011; 204: 601-608.
- 185 Manns MP, Pourière M, Benhamou Y, Pol S, Bonacini M, Trepo C, Wright D, Berg T, Calleja JL, White PW, Stern JO, Steinmann G, Yong CL, Kukulj G, Scherer J, Boecher WO. Potency, safety, and pharmacokinetics of the NS3/4A protease inhibitor BI201335 in patients with chronic HCV genotype-1 infection. *J Hepatol* 2011; 54: 1114-1122.
- 186 De Bruijne J, Bergmann JF, Reesink HW, Weegink CJ, Molenkamp R, Schinkel J, Tong X, Li J, Treitel MA, Hughes EA, van Lier JJ, van Vliet AA, Janssen HL, de Knegt RJ. Antiviral activity of narlaprevir combined with ritonavir and pegylated interferon in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 2010; 52: 1590-1599.
- 187 Nettles RE, Gao M, Bifano M, Chung E, Persson A, Marbury TC, Goldwater R, DeMicco MP, Rodriguez-Torres M, Vutikullird A, Fuentes E, Lawitz E, Lopez-Talavera JC, Grasela DM. Multiple ascending dose study of BMS-790052, a nonstructural protein 5A replication complex inhibitor, in patients infected with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatology* 2011; 54: 1956-1965.
- 188 Lalezari J, Gane E, Rodriguez-Torres M. Potent antiviral activity of the HCV nucleoside polymerase inhibitor R7128 with PEG-IFN and ribavirin: interim results of R7128 500 mg BID for 28 days [abstract]. *J Hepatol* 2008; 48 Suppl. 2; S29.
- 189 Zhou XJ, Pietropaolo K, Chen J, Khan S, Sullivan-Bólyai J, Mayers D. Safety and pharmacokinetics of IDX184, a liver-targeted nucleotide polymerase inhibitor of hepatitis C virus, in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 76-81.
- 190 Pockros P, Rodriguez-Torres M, Villano S. A phase 2, randomized study of HCV-796 in combination with pegylated-interferon (PEG) plus ribavirin (RBV) versus PEG plus RBV in hepatitis C virus genotype-1 infection. *J Hepatol* 2009; 50: S7-S8.
- 191 Wagner F, Thompson R, Kantaridis C, Simpson P, Troke PJ, Jagannatha S, Neelakantan S, Purohit VS, Hammond JL. Antiviral activity of the hepatitis C virus polymerase inhibitor filibuvir in genotype 1-infected patients. *Hepatology* 2011; 54: 50-59.

- 192 Shih IH, Vliegen I, Peng B, Yang H, Hebner C, Paeshuyse J, Pürstinger G, Fenaux M, Tian Y, Mabery E, Qi X, Bahador G, Paulson M, Lehman LS, Bondy S, Tse W, Reiser H, Lee WA, Schmitz U, Neyts J, Zhong W. Mechanistic characterization of GS-9190 (Tegobuvir), a novel nonnucleoside inhibitor of hepatitis C virus NS5B polymerase. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 4196-4203.
- 193 Larrey DG, Benhamou Y, Lohse AW. BI 207127 is a potent HCV RNA polymerase inhibitor during 5 days monotherapy in patients with chronic hepatitis C. Abstract 1599. 60th AASLD, Boston, MA, 2009.
- 194 Gallay PA. Cyclophilin Inhibitors. *Clin Liver Dis* 2009; 13: 403-417.
- 195 Flisiak R, Horban A, Gallay P, Bobardt M, Selvarajah S, Wiercinska-Drapalo A, Siwak E, Cielniak I, Higersberger J, Kierkus J, Aeschlimann C, Groscurin P, Nicolas-Métral V, Dumont JM, Porchet H, Crabbé R, Scalfaro P. The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus. *Hepatology* 2008; 47: 817-826.
- 196 Hopkins S, Scoreneaux B, Huang Z, Murray MG, Wring S, Smitley C, Harris R, Erdmann F, Fischer G, Ribeill Y. SCY-635: a novel non-immunosuppressive analog of cyclosporine A that exhibits potent inhibition of hepatitis C virus RNA replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 660-672.
- 197 Schlaphoff V, Klade CS, Jilma B, Jelovcan SB, Cornberg M, Tauber E, Manns MP, Wedemeyer H. Functional and phenotypic characterization of peptide-vaccine-induced HCV-specific CD8+ T cells in healthy individuals and chronic hepatitis C patients. *Vaccine* 2007; 25: 6793-6806.
- 198 Klade CS, Wedemeyer H, Berg T, Hinrichsen H, Cholewinska G, Zeuzem S, Blum H, Buschle M, Jelovcan S, Buerger V, Tauber E, Frisch J, Manns MP. Therapeutic vaccination of chronic hepatitis C nonresponder patients with the peptide vaccine IC41. *Gastroenterology* 2008; 134: 1385-1395.
- 199 Firbas C, Boehm T, Buerger V, Schuller E, Sabarth N, Jilma B, Klade CS. Immunogenicity and safety of different injection routes and schedules of IC41, a hepatitis C virus (HCV) peptide vaccine. *Vaccine* 2010; 28: 2397-2407.
- 200 Haller AA, Lauer GM, King TH, Kemmler C, Fiolkoski V, Lu Y, Bellgrau D, Rodell TC, Apelian D, Franzusoff A, Duke RC. Whole recombinant yeast-based immunotherapy induces potent targeting HCV NS3 and Core proteins. *Vaccine* 2007; 25: 1452-1463.
- 201 McHutchison JG, Jacobson IM, Boyer TD, et al. GI-5005 therapeutic vaccine plus Peg-IFN/Ribavirin improves end of treatment response at 48 weeks versus Peg-IFN/Ribavirin in naïve genotype 1 chronic HCV patients. *Hepatology* 2009; 50:LB15.

- 202 Habersetzer F, Honnet G, Bain C, Maynard-Muet M, Leroy V, Zarski JP, Feray C, Baumert TF, Bronowicki JP, Doffoël M, Trépo C, Agathon D, Toh ML, Baudin M, Bonnefoy JY, Limacher JM, Inchauspé G. A poxvirus vaccine is safe, induces T-cell responses, and decreases viral load in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 141: 890-899.
- 203 Drane D, Maraskovsky E, Gibson R, Mitchell S, Barnden M, Moskwa A, Shaw D, Gervase B, Coates S, Houghton M, Bassler R. Priming of CD4+ and CD8+ T cell responses using a HCV core ISCOMATRIX™ vaccine. *Human Vaccines* 2009; 5: 151-157.
- 204 Castellanos M, Cinza Z, Dorta Z, Veliz G, Vega H, Lorenzo I, Ojeda S, Dueñas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Martínez G, Ferrer E, Limonta M, Linares M, Ruiz O, Acevedo B, Torres D, Márquez G, Herrera L, Arús E. Immunization with a DNA vaccine candidate in chronic hepatitis C patients is safe, well tolerated and does not impair immune response induction after anti-hepatitis B vaccination. *J Gene Med* 2010; 12: 107-116.
- 205 Raziorrouh B, Ulsenheimer A, Schraut W, Heeg M, Kurktschiev P, Zachoval R, Jung MC, Thimme R, Neumann-Haefelin C, Horster S, Wächtler M, Spannagl M, Haas J, Diepolder HM, Grüner NH. Inhibitory molecules that regulate expansion and restoration of HCV-specific CD4+ T cells in patients with chronic infection. *Gastroenterology* 2011; 141: 1422-1431.
- 206 Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, Ferrari C. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* 2006; 80: 11398-11403.
- 207 Rutebemberwa A, Ray SC, Astemborski J, Levine J, Liu L, Dowd KA, Clute S, Wang C, Korman A, Sette A, Sidney J, Pardoll DM, Cox AL. High-programmed death-1 levels on hepatitis C virus-specific T cells during acute infection are associated with viral persistence and require preservation of cognate antigen during chronic infection. *J Immunol* 2008; 181: 8215-8225.
- 208 Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 682-687.
- 209 Ferrari C. Therapeutic vaccination for hepatitis C: can protective T-cell responses be restored after prolonged antigen exposure? *Gastroenterology* 2008; 134: 1601-1604.
- 210 Nakamoto N, Cho H, Shaked A, Olthoff K, Valiga ME, Kaminski M, Gostick E, Price DA, Freeman GJ, Wherry EJ, Chang KM. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *Plos Patho* 2009; 5: 5(2):e1000313.

- 211 Sakthivel P, Gereke M and Bruder D. Therapeutic intervention in cancer and chronic viral infections: antibody mediated manipulation of PD-1/PD-L1 interaction. *Rev Recent Clin Trials*. 2011 Oct 21. PMID: 22023178.
- 212 Ha SL, Mueller SN, Wherry EJ, Barber DL, Aubert RD, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection. *J Exp Med* 2008 205: 543-555.
- 213 Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH. Interleukin-10 determinates viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 2006; 12: 1301-1309.
- 214 Ejrnaes M, Filippi CM, Martinic MM, Ling EM, Togher LM, Crotty S, von Herrath MG. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J Exp Med* 2006; 203: 2461-2472.
- 215 Brooks DG, Lee AM, Elsaesser H, McGavern DB, Oldstone MB. IL-10 blockade facilitates DNA vaccine-induced T cell responses and enhances clearance of persistent virus infection. *J Exp Med* 2008; 205: 533-541.
- 216 McMahan RH, Golden-Mason L, Nishimura MI, McMahon BJ, Kemper M, Allen TM, Gretch DR, Rosen HR. Tim-3 expression on PD-1+ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *J Clin Invest* 2010; 120: 4546-4557.
- 217 Borgia G. HepeX-C (XTL Biopharmaceuticals). *Curr Opin Investig Drugs* 2004; 5(8): 892-897.
- 218 Soares MM, King SW, and Thorpe PE. Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral disease. *Nat Med* 2008; 14: 1357-1362.
- 219 Lawitz E, Godofsky E, Shan J. Multiple dose safety and pharmacokinetics study of bavituximab, a chimeric anti-phosphatidylserine monoclonal antibody, in subjects with chronic hepatitis C virus (HCV) infection. *Hepatology* 2007; 46: 257A.
- 220 Bacon BR, Shiffman ML, Mendes F, Ghalib R, Hassanein T, Morelli G, Joshi S, Rothstein K, Kwo P, Gitlin N. Retreating chronic hepatitis C with daily interferon alfacon-1/ribavirin after nonresponse to pegylated inteferon/ribavirin: DIRECT results. *Hepatology* 2009; 49: 1838-1846.
- 221 Yee HS, Currie SL, Tortorice K, Cozen M, Shen H, Chapman S, Cunningham F, Monto A. Retreatment of hepatitis C with consensus interferon and ribavirin after nonresponse or relapse to pegylated interferon and ribavirin: a national VA clinical practice study. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 2439-2448.
- 222 Rustge VK. Albinterferon alfa-2b, a novel fusion protein of human albumin and human interferon alfa-2b, for chronic hepatitis C. *Curr Med Res and Opinion* 2009; 25: 991-1002.

- 223 Sulkowski MS, Zeuzem S, Lawitz E. Efficacy and safety of albinterferon alfa-2b in combination with ribavirin in treatment naïve patients with chronic hepatitis C genotype 1. Abstract 64. *Hepatology* 2009; 50: 333A.
- 224 Leede LG, Humphries JE, Bechet AC, Van Hoogdalem EJ, Verrijck R, Spencer DG. Novel controlled-release Lemma-derived IFN-alpha2b (Locteron): pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability in a phase I clinical trial. *J Interferon Cytokine Res* 2008; 28: 113-122.
- 225 Robek MD, Boyd BS, and Chisari FV. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J Virol* 2005; 79: 3851-3854.
- 226 Muir AJ, Sylvestre PB and Rockey DC. Interferon gamma-1b for the treatment of chronic hepatitis C infection. [Abstract]. *Gastroenterology* 2003; 124 Suppl. 1; A718.
- 227 McHutchison JG, Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Shiffman M, Afdhal NH, Jacobson IM, Muir A, Al-Adhami M, Morris ML, Lekstrom-Himes JA, Efler SM, Davis HL. Phase 1B, randomized, double-blind, dose-escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus. *Hepatology* 2007; 46: 1341-1349.
- 228 Horsmans Y. Isatoridibine, a toll like receptor 7 agonist, significantly reduced plasma viral load in a clinical proof-of-concept study in patients with chronic hepatitis C virus. *Hepatology* 2004; 40. Suppl. 1: 282A.
- 229 Pockros PJ, Guyader D, Patton H, Tong MJ, Wright T, McHutchison JG, Meng TC. Oral resiquimod in chronic HCV infection: safety and efficacy in 2 placebo-controlled, double-blind phase IIa studies. *J Hepatol* 2007; 47: 174-182.
- 230 Bergmann JF, de Bruijne J, Hotho DM, de Knecht RJ, Boonstra A, Weegink CJ, van Vliet AA, van de Wetering J, Fletcher SP, Bauman LA, Rahimy M, Appleman JR, Freddo JL, Janssen HL, Reesink HW. Randomised clinical trial: anti-viral activity of ANA773, an oral inducer of endogenous interferons acting via TLR7, in chronic HCV. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 443-453.
- 231 Agrawal S, Kandimalla ER. Synthetic agonists of Toll-like receptors 7, 8 and 9. *Biochem Soc Trans.* 35: 1461-1467.
- 232 Poo JL, Sánchez Avila F, Kershenovich D, García Samper X, Torres-Ibarra R, Góngora J, Cano C, Parada M, Uribe M. Efficacy of triple therapy with thymalfasin, peginterferon alpha-2a, and ribavirin for the treatment of Hispanic chronic HCV nonresponders. *Ann Hepatol* 2008; 7: 369-375.
- 233 Korba BE, Montero AB, Farras K, Gaye K, Mukerjee S, Ayers MS, Rossignol JF. Nitazoxanide, tizoxanide and other thiazolides are potent inhibitors of hepatitis B virus and hepatitis C virus replication. *Antivir Res* 2008; 77:56-63.

- 234 Rossignol JF, Elfert A, El-Gohary Y, Keeffe EB. Improved virologic response in chronic hepatitis C genotype 4 treated with nitazoxanide, peginterferon, and ribavirin. *Gastroenterology* 2009; 136: 856-862.
- 235 Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo. *H Hepatol* 2011; 55: 11-18.
- 236 Bar-Yehuda S, Stemmer SM, Madi L, Castel D, Ochaion A, Cohen S, Barer F, Zabutti A, Perez-Liz G, Del Valle L, Fishman P. The A3 adenosine receptor agonist CF102 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via de-regulation of the Wnt and NF- $\kappa$ B signal transduction pathways. *Internat J of onco* 2008; 33: 287-295.
- 237 Louis CU, Straathof K, Bollard CM, Ennamuri S, Gerken C, Lopez TT, Huls MH, Sheehan A, Wu MF, Liu H, Gee A, Brenner MK, Rooney CM, Heslop HE, Gottschalk S. Adoptive transfer of EBV-specific T cells results in sustained clinical responses in patients with locoregional nasopharyngeal carcinoma. *J Immunother* 2010; 33: 983-990.
- 238 Wang Q, Liu H, Zhang X, Liu Q, Xing Y, Zhou X, Tong C, Zhu P. High doses of mother's lymphocyte infusion to treat EBV-positive T-cell lymphoproliferative disorders in childhood. *Blood* 2010; 116: 5941-5947.
- 239 Laport GG, Levine BL, Stadtmauer EA, Schuster SJ, Luger SM, Grupp S, Bunin N, Strobl FJ, Cotte J, Zheng Z, Gregson B, Rivers P, Vonderheide RH, Liebowitz DN, Porter DL, June CH. Adoptive transfer of costimulated T cells induces lymphocytosis in patients with relapsed/refractory non-Hodgkins lymphoma following CD34+-selected hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2003; 2004-2013.
- 240 Hardy NM, Mossoba ME, Steinberg SM, Fellowes V, Yan XY, Hakim FT, Babb RR, Avila D, Gea-Banacloche J, Sportès C, Levine BL, June CH, Khuu HM, Carpenter AE, Krumlauf MC, Dwyer AJ, Gress RE, Fowler DH, Bishop MR. Phase I trial of adoptive cell transfer with mixed-profile type-I/Type-II allogenic T cells for metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6878-6887.
- 241 Basso S, Zecca M, Merli P, Gurrado A, Secondino S, Quartuccio G, Guido I, Guerini P, Ottonello G, Zavras N, Maccario R, Pedrazzoli P, Comoli P. T cell therapy for nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer* 2011; 2:341-346.
- 242 Encke J, Findeklee J, Geib J, et al. Prophylactic and therapeutic vaccination with dendritic cells against hepatitis C virus infection. *Clin and Exp Immunol* 2005; 142: 362-369.
- 243 Yu H, Huang H, Xiang J, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. Dendritic cells pulsed with hepatitis C virus NS3 protein induce immune responses and protection from infection with recombinant vaccinia virus expressing NS3. *J Gen Virol* 2006; 87: 1-10.

- 244 Zabaleta A, Llopiz D, Arribillaga L, Silva L, Riezu-Boj JI, Lasarte JJ, Borrás-Cuesta F, Prieto J, Sarobe P. Vaccination against hepatitis C virus with dendritic cells transduced with an adenovirus encoding NS3 protein. *Mol Therapy* 2008; 16: 210-217.
- 245 Gowans EJ, Stuart R, Katheryn J, Dinatale I, Latour PA, Chua B, Eriksson EM, Chin R, Li S, Wall DM, Sparrow RL, Moloney J, Loudovaris M, Ffrench R, Prince HM, Hart D, Zeng W, Torresi J, Brown LE, Jackson DC. A phase I clinical trial of dendritic cell immunotherapy in HCV-infected individuals. *J Hepatol* 2010; 53: 599-607.
- 246 Ye L, Wang X, Wang S, Wang Y, Song L, Hou W, Zhou L, Li H, Ho W. CD56+ T cells inhibit hepatitis C virus replication in human hepatocytes. *Hepatology* 2009; 49: 753-762.
- 247 Duskali M, Tanaka Y, Ohira M, Ishiyama K, Tashiro H, Chayama K, Ohdan H. Possibility of adoptive immunotherapy with peripheral blood-derived CD3-CD56+ and CD3+CD56+ cells for inducing antihepatocellular carcinoma and antihepatitis C virus reactivity. *J Immunother* 2011; 34: 129-138.
- 248 Ohira M, Ishiyama K, Tanaka Y, Duskali M, Igarashi Y, Tashiro H, Hiraga N, Imamura M, Sakamoto N, Asahara T, Chayama K, Ohdan H. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 3226-3235.
- 249 Zhang Yi, Liu Y, Moxley KM, Golden-Mason L, Hughes MG, Liu T, Heemskerk MH, Rosen HR, Nishimura MI. Transduction of human T cells with a novel T-cell receptor confers anti-HCV reactivity. *Plos Patho* 2010; 6: 1-13.
- 250 Rehmann B, Naoumov NV. Immunological techniques in viral hepatitis. *J Hepatol* 2007; 46: 508-520.
- 251 Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH et al. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 37: 1189-1198.
- 252 Urbani S, Amadei B, Fiscaro P, Jung MC, Schirren CA, Schraut W, Zachoval R, Pape GR, Diepolder HM. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology* 2006; 44: 126-139.
- 253 Smyk-Pearson S, Tester IA, Klarquist, Palmer BE, Pawlotsky JM, Golden-Mason L, Rosen HR. Spontaneous recovery in acute human hepatitis C virus infection: functional T-cell thresholds and relative importance of CD4 help. *J Virol* 2008; 82: 1827-1837.
- 254 Mueller M, Spangenberg HC, Kersting N, Altay T, Blum HE, Klenerman P, Thimme R, Semmo N. Virus-specific CD4+ T cell responses in chronic HCV infection in blood and liver identified by antigen-specific upregulation of CD154. *J Hepatol* 2010; 52: 800-811.

- 255 Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, Scheffold A, Thiel A. Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med* 2005; 11: 1118-1124.
- 256 Chattopadhyay PK, Yu J, Roederer M. A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles. *Nat Med* 2005; 11: 1113-1117.
- 257 Chen HW, Lio CH, Ying C, Chang CJ, Lin CM. Ex vivo expansion of dendritic-cell-activated antigen-specific CD4+ T cells with anti-CD3/CD28, interleukin-7, and interleukin-15: Potential for adoptive T cell immunotherapy. *Clin Immunol* 2006; 119: 21-31.
- 258 Semmo N, Krashias G, Willberg C, Klenerman P. Analysis of the relationship between cytokine secretion and proliferative capacity in hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2007; 14: 492-502.
- 259 Fang CT, Tobler LH, Haesche C, Busch MP, Phelps B, Leparac G. Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donors. *Transfusion* 2003; 43: 541-544.
- 260 Dow BC, Munro H, Buchanan I, Follett EA, Davidson F, Yap PL, Simmonds P. Third-generation recombinant immunoblot assay: comparison of reactivity's according to hepatitis C virus genotype. *Transfusion* 1996; 36: 547-551.
- 261 Kanistanon D, Neelamek M, Dharakul T, Songsivilai S. The immunoreactivity profile of different HCV genotypes on immunoblot assay and its implications in the development of diagnostic assays. *Asian Pacific J Allergy Immunol* 1997; 15: 133-140.
- 262 Halfon P, Bourliere M, Khiri H, Halimi G, Gerolami V, Feryn JM, Feryn JM, Ouzan D. Serological response to infection with different isolates of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 2002; 9: 438-442.
- 263 Allain JP, Kitchen A, Aloysius S, Reeves I, Petrik J, Barbara JM, Williamson LM. Safety and efficacy of hepatitis C virus antibody screening of blood donors with two sequential screening assays. *Transfusion* 1996; 36: 401-405.
- 264 Dow BC, Buchanan I, Munro H, Follett EA, Davidson F, Prescott LE, Yap PL, Simmonds P. Relevance of RIBA-3 supplementary test to HCV PCR positivity and genotypes for HCV confirmation of blood donors. *J Med Virol* 1996; 49: 132-136.
- 265 Lemaire JM, Courouce AM, Defer C, Bouchardeau F, Coste J, Agulles O, Cantaloube JF, Barlet V, Barin F. HCV RNA in blood donors with isolated reactivities by third-generation RIBA. *Transfusion* 2000; 40: 867-870.
- 266 Kiely P, Kay D, Parker S, Piscitelli L. The significance of third-generation HCV RIBA-indeterminate, HCV RNA-negative results in voluntary blood donors screened with sequential third-generation immunoassays. *Transfusion* 2004; 44: 349-358.



- 267 Kitchen AD, Tucker NV. The specificity of anti-HCV supplementary assays. *Vox Sang* 1995; 69: 100-103.
- 268 Howell DR, Webster MH, Barbara JA. Retrospective follow up of recipients and donors of blood donations reactive for anti-HBc or for single HCV antibodies. *Transfus Med* 2000; 10: 265-269.
- 269 Pawlotsky JM, Bastie A, Pellet C, Remire J, Darthuy F, Wolfe L, Sayada C, Duval J, Dhumeaux D. Significance of third generation hepatitis C virus recombinant immunoblot assay. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 80-83.
- 270 Tobler LH, Busch MP, Wilber J, Dinello R, Quan S, Polito A, Kochesky R, Bahl C, Nelles M, Lee SR. Evaluation of indeterminate c22-3 reactivity in volunteer blood donors. *Transfusion* 1994; 34: 130-134.
- 271 Leon P, Lopez JA, Elola C, Domingo CJ, Echevarria JM. Detection of antibody to hepatitis C virus E2 recombinant antigen among samples indeterminate for anti-HCV after wide serological testing and correlation with viremia. The Spanish Study Group for Blood Donors at Risk of Transmission of HCV. *Vox Sang* 1996; 70: 213-216.
- 272 Leon P, Lopez JA, Elola C, Lee SR, Calmann M, Echevarria JM. Use of overlapping synthetic peptides to characterize samples from blood donors with indeterminate results to hepatitis C virus core antigen. *Vox Sang* 1998; 75: 32-36.
- 273 Semmo N, Barnes E, Taylor C, Kurtz J, Harcourt G, Smith N, Klenerman P. T-cell responses and previous exposure to hepatitis C virus in indeterminate blood donors. *Lancet* 2005; 365: 327-329.
- 274 Hitziger T, Schmidt M, Schottstedt V, Henning H, Schumann A, Ross S, Lu M, Seifried E, Roggendorf M. Cellular immune response to hepatitis C virus (HCV) in non viremic blood donors with indeterminate anti-HCV reactivity. *Transfusion* 2009; 49: 1306-1313.
- 275 Wedemeyer H, Mizukoshi E, Davis AR, Bennink JR, Rehmann B. Cross-reactivity between hepatitis C virus and influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells. *J Virol* 2001; 75: 11392-11400.
- 276 Day CI, Seth NP, Lucas M, Appel H, Gauthier L, Lauer GM, Robbins GK, Szczepiorkowski ZM, Casson DR, Chung RT, Bell S, Harcourt G, Walker BD, Klenerman P, Wucherpfennig KW. Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *J Clin Invest* 2003; 112: 831-842.
- 277 Rohrbach J, Robinson N, Harcourt G, Hammond E, Gaudieri S, Gorgievski M, et al. Cellular immune responses to HCV core increase and HCV RNA levels decrease during successful antiretroviral therapy. *Gut* 2010; 59: 1252-1258.

- 278 Krishnadas DK, Li W, Kumar R, Tyrrell DL, Agrawal B. HCV-core and NS3 antigens play disparate role in inducing regulatory or effector T cells in vivo: Implications for viral persistence or clearance. *Vaccine* 2010; 28: 2104-2114.
- 279 Langhans B, Braunschweiger I, Arndt S, Schulte W, Satoguina J, Layland LE, Vidovic N, Hoerauf A, Oldenburg J, Sauerbruch T, Spengler U. Core-specific adaptive regulatory T-cells in different outcomes of hepatitis C. *Clin Sci (Lond)* 2010; 119: 97-109.
- 280 Puig M, Mihalik K, Tilton JC, Williams O, Merchinsky M, Connors M, Feinstone SM, Major ME. CD4+ immune escape and subsequent T cell failure following chimpanzee immunization against hepatitis C virus. *Hepatology* 2006; 44: 736-745.
- 281 Sadegh-Nasseri S, Dalai SK, Korb Ferris LC, Mirshahidi S. Suboptimal engagement of the T-cell receptor by a variety of peptide-MHC ligands triggers T-cell anergy. *Immunology* 2010; 129: 1-7.
- 282 Cusick MF, Yang M, Gill JC, Eckels DD. Naturally occurring CD4(+) T-cell epitope variants act as altered peptide ligands leading to impaired helper T-cell responses in hepatitis C virus infection. *Hum Immunol.* 2011; 72: 379-385.
- 283 Radziewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, Workowski KA, Obideen K, Wehbi M, Hanson HL, Steinberg JP, Masopust D, Wherry EJ, Altman JD, Rouse BT, Freeman GJ, Ahmed R, Grakoui A. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol* 2007; 81: 2545-2553.
- 284 Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam, Townshend-Bulson L, Livingston S, McMahon BJ, Castelblanco N, Kuchroo V, Gretch DR, Rosen HR. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol* 2009; 83: 9122-9130.
- 285 Ebinuma H, Nakamoto N, Li Y, Price DA, Gostick E, Levine BL, Tobias J, Kwok WW, Chang KM. Identification and in-vitro expansion of functional antigen-specific CD25+FoxP3+ regulatory T-cells in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2008; 82: 5043-5053.
- 286 Bowen DG, Shoukry NH, Grakoui A, Fuller MJ, Cawthon AG, Dong C, Hasselschwert DL, Brasky KM, Freeman GJ, Seth NP, Wucherpfennig KW, Houghton M, Walker CM. Variable patterns of programmed death-1 expression on fully functional memory T cells after spontaneous resolution of hepatitis C virus infection. *J Virol* 2008; 82: 5109-5114.
- 287 Heeg MH, Ulsenheimer A, Grüner NH, Zchoval R, Jung MC, Gerlach JT, Raziorrouh B, Schraut W, Horster S, Kauke T, Spannagl M, Diepolder HM. FOXP3 expression in hepatitis C virus-specific CD4+ T cells during acute hepatitis C. *Gastroenterology* 2009; 137: 1280-1288.

- 288 Claassen MA, de Knecht RJ, Tilanus HW, Janssen HL, Boonstra A. Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis. *J Hepatol* 2010; 52: 315-321.
- 289 Brooks DG, McGavern DB, Oldstone MB. Reprogramming of antiviral T cells prevents inactivation and restores T cell activity during persistent viral infection. *J Clin Invest* 2006; 116: 1675-1685.
- 290 Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A. CD8 (+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4 (+) T-cell help. *Nature* 2009; 462: 510-513.
- 291 Kumaraguru U, Banerjee K, Rouse BT. In vivo rescue of defective memory CD8+ T cells by cognate helper T cells. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 879-887.
- 292 Strutt TM, McKinstry KK, Dibble JP, Winchell C, Kuang Y, Curtis JD, Huston G, Dutton RW, Swain SL. Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nat Med* 2010; 16: 558-564.

## 8. ANNEX

## 8.1 ESTUDI 3: IL28B GENETIC VARIATION AND HEPATITIS C VIRUS SPECIFIC CD4<sup>+</sup> T CELL RESPONSES IN ANTI-HCV POSITIVE BLOOD DONORS

**Title:** IL28B genetic variation and hepatitis C virus specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in anti-HCV positive blood donors

**Short running page heading:** IL28B and HCV-specific T-cell responses

**Authors:**

Marta Bes<sup>1,2,3</sup>, Silvia Sauleda<sup>1,3</sup>, Isabel Campos-Varela<sup>2,3,4</sup>, Francisco Rodriguez-Frias<sup>3,5</sup>, Natalia Casamitjana<sup>1</sup>, Maria Homs<sup>2,3,5</sup>, Maria Piron<sup>1,3</sup>, Josep Quer<sup>2,3,4</sup>, David Tabernero<sup>2,3,5</sup>, Jaime Guardia<sup>2,3,4</sup>, Lluís Puig<sup>1,3</sup>, Juan Ignacio Esteban<sup>2,3,4\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup> Transfusion Safety Laboratory, Banc de Sang i Teixits, Servei Català de la Salut, Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> Universitat Autònoma de Barcelona. UAB. Bellaterra, Spain.

<sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD) del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

<sup>4</sup> Liver Unit, Department of Medicine, and Liver Diseases Laboratory, Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

<sup>5</sup> Department of Biochemistry, Hospital Universitari Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain.

**\* Corresponding author:** Juan I Esteban, MD, PhD  
CIBEREHD  
Liver Unit, Department of Medicine  
Hospital Universitari Vall d'Hebron  
Passeig Vall d'Hebron 119-129  
08035 Barcelona, Spain  
Tel: +34 93 2746140  
Fax: +34 93 2746068  
e-mail: [jignacio.esteban@ciberehd.org](mailto:jignacio.esteban@ciberehd.org)

---

## **ABSTRACT**

**Background and Aims:** Epidemiological, viral and host factors are associated with the outcome of HCV infection, and strong host immune responses against HCV favours viral clearance. Recently genome-wide associated studies have shown a strong correlation between single-nucleotide polymorphisms (SNPs) near the Interleukin-28B (IL28B) gene and spontaneous or treatment-induced HCV clearance. We have investigated whether protective IL28B genetic variants are associated with HCV specific T-cell responses among Spanish blood donors.

**Patients and Methods:** The *rs12979860* IL28B haplotype was determined in 69 anti-HCV positive blood donors (21 HCV RNA negative and 48 HCV RNA positive) and 30 seronegative donors. In all cases, HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses to HCV recombinant proteins (core, NS3 and NS3 helicase) were assessed by ex vivo interferon- $\gamma$  ELISpot assay.

**Results:** The *rs12979860*-CC genotype was highly overrepresented in donors with spontaneous HCV clearance when compared to those with chronic infection (76.2% versus 29.2%,  $p < 0.001$ ; odds ratio, 7.77; 95% confidence interval, 2.4 to 25.3,  $p < 0.001$ ). HCV specific CD4<sup>+</sup> T cell responses were detected in 16 (76.2%) spontaneous resolvers especially towards non-structural proteins, but with no correlation with IL28B genotype. Chronic individuals had a significantly lower overall T cell response again irrespective of IL28B genotype. When spontaneous resolvers and chronic individuals were stratified according to their IL28B genotype significantly stronger T cell responses were only observed among those with non-CC haplotypes.

**Conclusions:** Although the protective *rs12979860* IL28B CC genotype is associated with spontaneous HCV clearance, stronger CD4<sup>+</sup> T cell responses towards NS3 are only evident among those with non-CC haplotypes.

**Keywords:** Hepatitis C virus, IL28B haplotypes, Interferon- $\gamma$ , Interferon- $\lambda$ , T cell immune response.

---

## **INTRODUCTION**

The hepatitis C virus (HCV) is one of the leading causes of chronic liver disease with an estimated 170 million people infected worldwide. Only a minority of those infected spontaneously clear acute infection, whereas 70-80% of patients become chronic carriers and are at risk to progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (1).

The factors associated with spontaneous and treatment-induced hepatitis C virus (HCV) clearance are not well defined, but likely involve a combination of host and viral factors. Some studies have reported correlations between rate of resolution and host HLA polymorphisms (2, 3), host demographics (including age at infection, race-ethnicity and sex), coexisting viral infections and other cofactors (3, 4). There has also been extensive research that has led to compelling evidence that HCV clearance is also influenced by viral factors, including genotype, inocula size and quasispecies diversity (3, 4). Several studies have demonstrated that a strong host immune response against HCV favours viral clearance and both HCV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells are considered essential for spontaneous HCV clearance (5, 6). Gene activation profiles of acute infected chimpanzee's liver have shown a direct correlation between up regulation of IFN- $\gamma$  induced genes and inhibition of viral replication, confirming the essential role of this cytokine in viral clearance (7, 8). Sustained persistence of multispecific CD4<sup>+</sup> Th1 response, targeting dominant epitopes within non-structural proteins, leads to viral eradication and resolution of infection (9-14). After spontaneous resolution of infection, specific T cell responses are maintained indefinitely, while antibodies progressively decline and eventually wane, decades after exposure (15-17).

Recent genome-wide association studies have highlighted that single nucleotide polymorphisms within or outside the IL28B (*rs12979860*) coding gene (interferon IFN- $\lambda$ 3) are strongly associated with both spontaneous and treatment induced resolution of HCV infection (18-21). Although it is unclear how the IL28B haplotypes affect HCV clearance, IFN- $\lambda$ 3 seems to inhibit viral replication and some studies have shown that IFN- $\lambda$ 3 could be implicated in both innate and adoptive immune responses (22-25).

The aims of this study were to determine whether variation at the SNP *rs12979860* correlates with spontaneous clearance in a cohort of Spanish blood donors and the extent to which the *rs12979860* variants correlate with the magnitude of the HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses.

## **PATIENTS AND METHODS**

### ***Serological tests***

Blood donations are routinely screened for anti-HCV antibodies using a commercial chemiluminescent immunoassay (PRISM HCV ChLIA™ Abbott Diagnostics, Wiesbaden-Delkenheim, Germany). Specimens repeatedly reactive on the screening test are confirmed with a third generation immunoblot assay (RIBA HCV 3.0 SIA™; Chiron Corp., Emeryville, CA) (16).

### ***HCV RNA detection and HCV genotyping and serotyping***

Blood donations are screened using a commercial HCV transcription-mediated amplification (TMA) system (Procleix Ultrio Assay, Novartis, Emeryville, CA, USA) (low-end detection limit of 3.6 IU mL<sup>-1</sup>). Specimens initially reactive on screening were re-tested individually with the in-house real-time (RT)-PCR (low-end detection limit ~17 IU mL<sup>-1</sup>). HCV genotype was determined using a commercial line-probe assay (INNO-LIPA HCV Kit™; Innogenetics, Ghent, Belgium) while in those with undetectable RNA the HCV serotype was tested using the Murex HCV Serotyping 1-6 assay™ (Abbott, Abbott Park, IL, USA) according to the manufacturer's instructions.

### ***Subjects***

A subset of 48 blood donors with chronic HCV infection (anti-HCV positive / HCV RNA positive) and 21 blood donors with spontaneous HCV resolution (anti-HCV positive / HCV RNA negative) were included. As control subjects we enrolled 30 blood donors with all serological HCV markers negative. None of the donors was co-infected with HIV or HBV. All subjects gave their written informed consent and the study was approved by the Institutional Review Board on Clinical Research. Table 1 shows the demographic characteristics.



### ***IL28B genotyping***

Genomic DNA from donors was extracted from  $5\text{-}10 \times 10^6$  PBMCs using a QIAamp DNA Blood Minikit (Qiagen, Hilden, Germany). The *rs12979860* IL28B C/T genotype was analyzed by LigthMix IL28B Kit (TIB MolBio, Berlin, Germany) based on real-time PCR with fluorescently labelled probes followed by melting curve analysis (26). Briefly, 5  $\mu\text{L}$  (30-100 ng) of extracted DNA was amplified in a single step real-time (RT)-PCR, which contained 2  $\mu\text{L}$  of reagent mix (primers and probes), 2  $\mu\text{L}$  of Roche Master 10x, 1.6  $\mu\text{L}$   $\text{Mg}^{2+}$  (40  $\mu\text{M}$  final concentration) and water up to a final volume of 20  $\mu\text{L}$ . The assay was performed on a LightCycler<sup>®</sup> 2.0 (Roche Applied Science) under following conditions: pre-incubation at 95 °C for 10 min followed by 45 cycles of 95 °C for 5 sec (denaturising) and 60 °C for 10 sec (annealing), and extension step of 72 °C 15 sec. Amplification was followed by melting curves analysis of the real-time PCR products, consisting of a denaturising step at 95 °C for 20 sec, a cooling step at 40 °C for 20 sec and a continuous acquisition step from 40 °C to 85 °C. In the IL28B *rs12979860* genotyping the melting peaks were 59 °C for C allele and 51 °C for T allele.

### ***HCV antigens***

Purified recombinant HCV proteins, derived from genotype 1a sequence and expressed in *E.coli*, (core, amino acids: 1-115; NS3: amino acids 1007-1534 and NS3-helicase: amino acids 1207-1488) were purchased from Mikrogen (Neuried, Germany) and used at 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  as previously described (16).

### ***Enzyme-Linked Immunospot (ELISpot) Assay***

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated on Ficoll density gradients (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), washed twice in PBS, and cryopreserved in media containing 90% fetal calf serum and 10% DMSO. All functional assays were performed with cryopreserved PBMCs. After thawing, cells were cultured at  $10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  in R10 (RPMI 1640; Gibco BRL, NY, USA, supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum, 2  $\text{mmol L}^{-1}$  L-glutamine, 100  $\text{U mL}^{-1}$  penicillin, and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin]. After overnight rest at 37 °C and

5% CO<sub>2</sub>, HCV antigens were added. Control cultures included phytohemagglutinin (PHA) or medium alone.

Duplicates of  $1 \times 10^5$  PBMCs per well were cultured in 96-well plates pre-coated with anti-IFN- $\gamma$  monoclonal antibody (MoAb; 1-D1K, Mabtech, Sockholm, Sweden) in R10 and with  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  HCV antigen,  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  PHA, or buffer control, as previously reported (16). Results were expressed as number of IFN- $\gamma$  spot-forming cells (SFCs) per  $10^6$  PBMCs. Assays with high background (mean 10 SFCs/well in buffer control wells) or no PHA responses were excluded. An ELISpot response was considered positive when the number of IFN- $\gamma$  SFCs was higher than the mean number in controls plus 2 standard deviations (SDs) for each protein and more than three-fold above the background response (buffer control). The threshold for a positive IFN- $\gamma$  ELISpot response was calculated with the seronegative controls (mean response plus 2 SD) and differed slightly for the different HCV proteins (16).

### **Statistical analysis**

Results are presented as means and standard deviations or medians and ranges. Fisher's exact test or the Chi-square and Student's t-test were used for statistical comparison of rates and of means of normally distributed quantitative measures, respectively. Results are expressed as odds ratios with 95% confidence interval (CIs) (27). Medians of IFN- $\gamma$  spot-forming cells (SFCs) among groups were compared with nonparametric test (Mann-Whitney's U test). P values of less than 0.05 were considered significant. All calculations were performed with SPSS software 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

## **RESULTS**

### ***Genetic variation in IL28B among blood donors exposed to hepatitis C virus***

Consistent with previous works (18, 28), the frequency of the protective CC genotype at the SNP *rs12979860* among spontaneous resolvers was significantly higher than those with chronic infection [(76.2% versus 29.2%, respectively,  $p < 0.001$ ); odds ratios (OR), 7.77; 95% CI, 2.38-25.33];  $p < 0.001$ ] as shown in Fig. 1.

---

**Correlation between HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses and genetic variation in IL28B**

We next investigated the potential correlation of the IL28B genotype and HCV-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses according to the infection outcome.

The threshold for a positive IFN- $\gamma$  ELISpot response was set at 96 SFC/10<sup>6</sup> PBMCs for the core protein, 129 for the NS3 and 164 for NS3 helicase, according to the criteria described in methods section. Using the thresholds, positive ELISpot responses were detected in 16 of the 21 spontaneous resolvers (76.2%) and in 22 of the 48 chronic donors (45.8%;  $p=0.034$ ). As expected, the median number of SFC/10<sup>6</sup> PBMCs to non structural proteins was significantly greater among spontaneous resolvers than in chronically infected patients (median IFN- $\gamma$  SFC/10<sup>6</sup> PBMCs: 235 versus 80 and 210 versus 65, for NS3 and NS3 helicase, respectively;  $p=0.042$  and  $p=0.005$ ). In contrast, as previously reported (16), no significant differences in IFN- $\gamma$  production towards core antigen were seen among spontaneous resolvers and chronic individuals (median: 90 versus 120, respectively;  $p=0.312$ ).

In order to determine whether IL28B genetic variation influences the capacity to induce HCV-specific immune responses in blood donors with different HCV status, we stratified each group according to the *rs12979860* genotype (CC versus non-CC (CT/TT)). As shown in Fig. 2, within each donor category (spontaneous resolvers and chronic individuals) the presence of the protective IL28B allele (CC homozygous) did not significantly correlate with the quality (structural versus non-structural HCV antigens) and magnitude of T-cell responses (number of spot forming cells). In blood donors with spontaneous HCV clearance, the median number of IFN- $\gamma$  SFC/10<sup>6</sup> PBMCs in those with IL28B-CC genotype was similar to that observed in those with non-CC genotype for structural and non structural HCV proteins (120 versus 70 for core protein, 130 versus 260 for NS3 and 170 versus 230 for NS3 helicase, IL28B-CC and IL28B-non-CC genotype respectively;  $p=NS$ ). Similarly, among HCV RNA positive donors the breadth and magnitude of the ELISpot response did not differ between those with IL28B-CC and those with IL28B-non-CC (median, 100 versus 120 for core, 110 versus 80 for NS3 and 70 versus 60 for NS3 helicase, IL28B-CC and IL28B-non-CC respectively;  $p=NS$  for all antigens). Whereas among donors with *rs12979860* CC genotype there was no difference in T cell responses to the different antigens irrespectively of the infection outcome (median IFN- $\gamma$  SFC/10<sup>6</sup> PBMCs: 120 versus 100

for core, 130 versus 110 for NS3 and 170 versus 70 for NS3 helicase, spontaneous resolver and chronic individuals respectively,  $p=NS$ ), *rs12979860* non-CC HCV spontaneous resolvers donors had a stronger T-cell immune response to NS3 antigens than chronic donors with non-CC genotype (median IFN- $\gamma$  SFC/ $10^6$  PBMCs: 260 versus 80 for NS3, respectively  $p=0.026$  and 230 versus 60 for NS3 helicase, respectively,  $p=0.020$ ). For core antigen non-CC donors had a significantly stronger T cell response (median IFN- $\gamma$  SFC/ $10^6$  PBMCs: 70 versus 120 for core, spontaneous resolvers and chronic individuals respectively,  $p=0.031$ ).

## **DISCUSSION**

Genome-wide association studies have identified several single nucleotide polymorphisms (SNP) (*rs12979860*) close or within the interleukin 28 (IL28B) gene (codifying for Interferon lambda 3), strongly associated with both spontaneous and treatment-induced HCV clearance.<sup>18,19</sup> Thomas *et al.* genotyped the *rs12979860* SNP in more than 1000 people from six cohorts and found that the CC genotype is a strong predictor of spontaneous resolution of HCV infection among individuals of both European and African ancestry (18). As expected, in our study among a Spanish blood donors' cohort, IL28B-CC genotype was also strongly associated with spontaneous HCV clearance (76.2% IL28B-CC; OR=7.77) as previously reported in another Spanish patients and blood donors cohort (72.5%) (28).

There are many evidences that IL28B can determine the outcome of HCV infection, but the mechanisms that mediate the association between the different SNPs and HCV control are unclear, and innate and adoptive immune response could be implicated (20-22, 29-31). IL28B belongs to the newly described interferon lambda family of cytokines, which also includes IFN- $\lambda 1$  (IL29) and IFN- $\lambda 2$  (IL28A) (32). IFN- $\lambda$ s have potent antiviral activity observed in different cell culture model for HCV (29, 34) and trials of IFN- $\lambda 1$  in patients with chronic HCV infection (34). Several studies suggest a direct role for IFN- $\lambda$  in the control of HCV replication through the induction of interferon-stimulated genes (ISGs) transcription (33). *In vivo* studies have shown that favourable IL28B variants correlate with lower intrahepatic ISG expression and better treatment response (24, 30, 31). In contrast, IL28B has not yet been associated for its potential ability to influence adoptive immune responses in HCV infection. Morrow *et al.* have demonstrated that

---

IL28B (IFN- $\lambda$ 3) increases the T-helper cell 1 response to HIV DNA vaccine and simultaneously inhibits regulatory T-cell responses (34) and IL28B significantly increases CTL killing activity in macaques (35). In this regard, the findings of the present study that stronger CD4<sup>+</sup> T cell responses towards NS3 were only evident among spontaneous resolvers with non-CC *rs12979860* genotypes are intriguing. This might suggest that while innate immune response may largely determine infection outcome in individuals with favourable IL28B genotype (CC), the adoptive immune response towards non-structural antigens may become more relevant in individuals with heterozygous or unfavourable homozygous genotypes (CT or TT). Although these findings have to be interpreted with caution due to the limited number of individuals investigated they warrant further investigation. Additional studies with larger numbers of subjects, along with the use of additional techniques (i.e: intracellular cytokine staining, HLA class II tetramer staining, etc) and HCV-peptides pools covering the entire HCV polyprotein, are currently in progress to better establish the role of adoptive immune response in infection outcome.

In summary, our results suggest that although the protective *rs12979860* IL28B CC genotype is strongly associated with spontaneous HCV clearance in our Spanish blood donors' cohort, stronger CD4<sup>+</sup> T cell responses towards NS3 are only evident among those with non-CC haplotypes. This suggest that while innate immune response may determine infection outcome in individuals with favourable IL28B genotype, the adoptive immune response towards NS3 antigens may become more relevant in individuals with CT or TT genotypes.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Anna Oliveira and Angie Rico for their technical support.

This work has been supported by grants: PI10/01505 from the Spanish Ministry of Health, CDTI 2010.623 from the Spanish Centre for the Development of Industrial Technology, SAF 2009-10403 from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and a research grant from the Fundació Privada Catalana de l'Hemofília. CIBEREHD is funded by the Instituto de Salud Carlos III (Madrid, Spain).

---

**REFERENCES**

1. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S21-S29.
2. Harris RA, Sugimoto K, Kaplan DE, Ikeda F, Kamoun M, Chang KM. Human leukocyte antigen class II associations with hepatitis C virus clearance and virus-specific CD4 T cell response among Caucasians and Africans. *Hepatology* 2008; 48: 70-79.
3. Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, *et al.* The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA*. 2000; 284: 450-456.
4. Selvarajah S, Tobler LH, Simmons G, Bush MP. Hostgenetic basis for HCV clearance: a role for blood collection centers. *Curr Opin Hematol* 2010; 17: 550-557.
5. Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune response in acute and chronic HCV infection. *Nature* 2005;436:946-951.
6. Neumann-Haefelin C, Blum HE, Chisari FV, Thimme R. T cell response in hepatitis C virus infection. *J Clin Virol* 2005; 32: 75-85.
7. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, *et al.* Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15661-15668.
8. Major ME, Mihalik K, Puig M, *et al.* Previously infected and recovered chimpanzees exhibit rapid responses that control hepatitis C virus replication upon rechallenge. *J Virol* 2002; 76: 6586-6595.
9. Schulze zur Wiesch J, Lauer GM, Day CL, *et al.* Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol* 2005; 175: 3603-3613.
10. Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, *et al.* Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995; 346: 1006-1007.
11. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, *et al.* Acute Hepatitis C: High rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 2003; 125: 80-88.
12. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001; 194: 1395-1406.
13. Semmo N, Day CL, Ward SM, *et al.* Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology* 2005; 41: 1019-1028.
14. Semmo N, Klenerman P. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2007; 13: 4831-4838.
15. Takaki A, Wiese M, Maertens G, *et al.* Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 2000; 6: 578-582.

16. Bes M, Esteban JI, Casamitjana N, *et al.* Hepatitis C virus (HCV)-specific T-cell responses among recombinant immunoblot assay-3-indeterminate blood donors: a confirmatory evidence of HCV exposure. *Transfusion* 2009; 49: 1296-1305.
17. Hitziger T, Schmidt M, Schottstedt V, *et al.* Cellular immune response to hepatitis C virus (HCV) in nonviremic blood donors with indeterminate anti-HCV reactivity. *Transfusion* 2009; 49: 1306-1313.
18. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, *et al.* Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461: 798-802.
19. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, *et al.* Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399-401.
20. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, *et al.* Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 2010; 138: 1338-1345.
21. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, *et al.* IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009; 41: 1100-1104.
22. Balagopal A, Thomas DL, Thio Chloe L. IL28B and the control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010; 139: 1865-1876.
23. Robek MD, Boyd BS, Chisari F. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J Virol* 2005; 79: 3851-3854.
24. Honda M, Sakai A, Yamashita T, *et al.* Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2010; 139: 499-509.
25. Li M, Liu X, Zhou Y, Bo Su Shao. Interferon- $\alpha$ s: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *J Leuk Biol* 2009; 86: 23-32.
26. Kovanda A, Poljak M. Real-Time polymerase chain reaction assay based on high-resolution melting analysis for the determination of the rs12979860 polymorphism involved in hepatitis C treatment response. *J Virol Methods* 2011; 175: 125-128.
27. Domenech JM, Granero R. Macro !CI2IP for SPSS Statistics. Confidences Intervals for Measures of Association: 2x2 table (Independence samples) [computer program]. V2008.02.29. Bellaterra: Universitat Autònoma de Barcelona; 2008. Available from: <http://www.metodo.uab.cat/macros.htm>.
28. Montes-Cano MA, Garcia-Lozano JR, Abad-Molina C, *et al.* Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology* 2010; 52: 33-37.
29. Zhang L, Jilg N, Shao RX, *et al.* IL28B inhibits hepatitis C virus replication through the JAK-STAT pathway. *J Hepatol* 2011; 55: 289-298.

30. Urban TJ, Thompson AJ, Bradrick SS, *et al.* IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010; 52: 1888-1896.
31. Dill MT, Duong FH, Vogt JE, *et al.* Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 140: 1021-1031.
32. Dellgren C, Gad HH, Hamming OJ, Melchjorsen J, Hartmann R. Human interferon-lambda3 is a potent member of the type III interferon family. *Gene Immun* 2009; 10: 125-131.
33. Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, *et al.* Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* 2006; 131: 1887-1898.
34. Morrow MP, Pankhong P, Laddy DJ, *et al.* Comparative ability of IL-12 and IL28 to regulate Treg populations and enhance adaptive cellular immunity. *Blood* 2009; 113: 5868-5877.
35. Morrow MP, Yan J, Pankhong P, *et al.* IL-28B/IFN-lambda 3 drives granzyme B loading and significantly increases CTL killing activity in macaques. *Mol Ther* 2010; 18: 1714-1723.

**Abbreviations:**

HCV, hepatitis C virus; IL, interleukin; SNP, single-nucleotide polymorphism; IFN, interferon; ELISpot assay, enzyme-linked immunospot assay; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; SFC(s), spot-forming cell(s).



**Table 1.** Baseline characteristics of study subjects at time of blood donation.

	<b>Spontaneous resolvers</b>	<b>Chronic</b>	<b>Controls</b>
Number	21	48	30
Mean age (range)	46 (27-61)	43 (23-63)	44 (19-63)
European ancestry (%)	21 (100)	48 (100)	30 (100)
Gender males (%)	14 (67)	29 (60)	18 (60)
HCV RNA	negative	positive	negative
Anti-HCV (mean S/CO, SD) †	5.09 ± 1.8	6.80 ± 1.5	
Risk factor (%) ‡	7 (33)	26 (54)	2 (7)
HCV genotype (%)			
1	9 (43)	29 (60)	
2		4 (8)	
3	3 (14)	6 (13)	
4		7 (15)	
6		2 (4)	
ND	9 (43)		

† Sample to assay cut-off of the chemiluminescent anti-HCV screening test

‡ Intravenous drug use, transfusion of blood or blood products before 1991, major surgical or invasive diagnostic or therapeutic procedure during hospitalization, sexual intercourse with known HCV-infected partner and tattoo or piercing.

## FIGURES AND LEGENDS

Figure 1

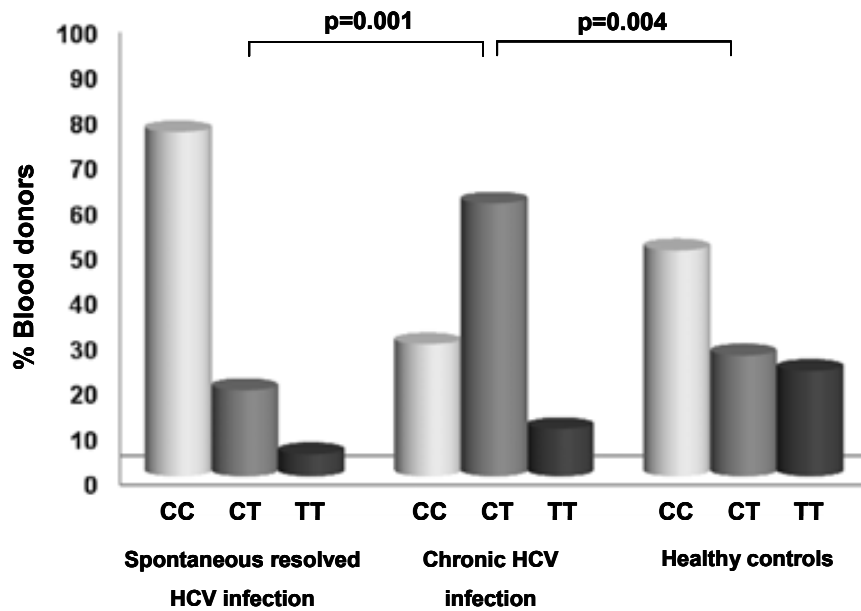
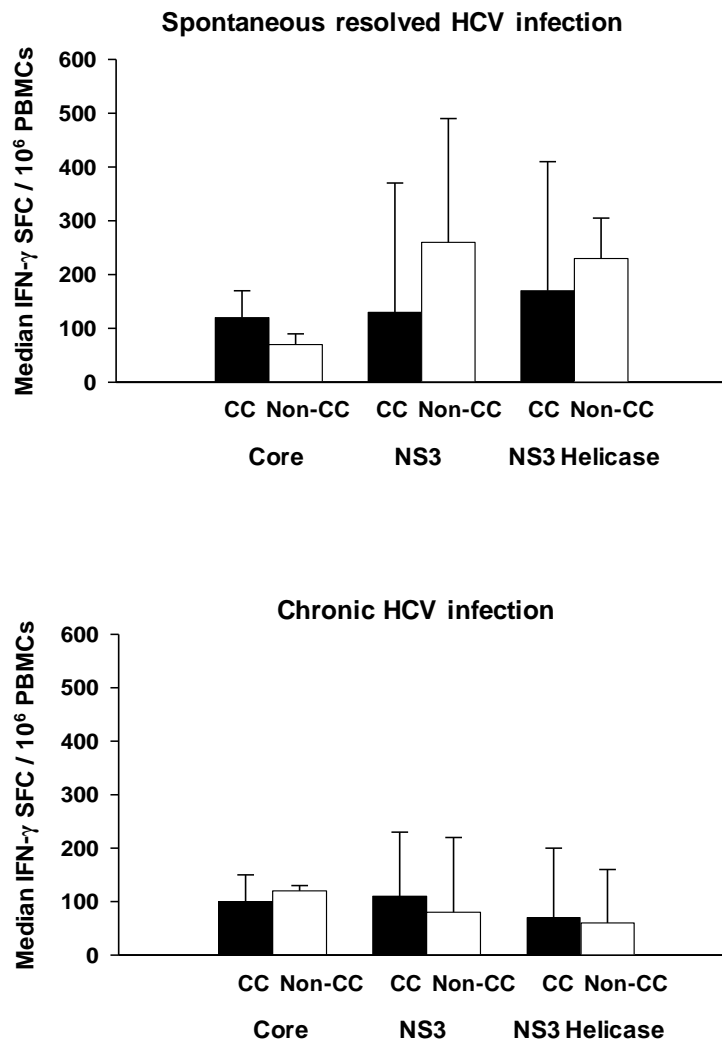


Fig. 1: Percentages of blood donors with different variants of IL28B (*rs12979860*) polymorphism according HCV status. P values were calculated with Pearson Chi-square and only p values for statistically significant differences are depicted.

Figure 2



**Fig. 2: Ex vivo IFN- $\gamma$  ELISpot responses to HCV antigens in each study group in function of IL28B genetic variants. Only those with a positive response to at least one protein were included in the analysis.** Spontaneous resolvers donors; IL28B-CC, n=11; IL28B-non-CC, n=5; chronic individuals; IL28B-CC, n=7; IL28B-non-CC, n=15. The results are expressed as medians of IFN- $\gamma$  SFCs/10<sup>6</sup> PBMCs. Medians among IL28B genetic variants (IL28B-CC and IL28B-non-CC genotype) were compared with Mann-Whitney's U test.