



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 466**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02753872 .7**

96 Fecha de presentación : **27.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1381673**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2004**

54

Título: **Composiciones y métodos útiles para la infección por HCV.**

30

Prioridad: **27.03.2001 US 279174 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.11.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.11.2009**

73

Titular/es: **Vertex Pharmaceuticals Incorporated**  
**130 Waverly Street**  
**Cambridge, Massachusetts 02139-4242, US**

72

Inventor/es: **Kwong, Ann;**  
**Byrn, Randal y**  
**Reid, Lola, M.**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 328 466 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Composiciones y métodos útiles para la infección por HCV.

**5 Fundamento de la invención**

Aunque el virus de la hepatitis C (HCV: Hepatitis C Virus) se replica de forma intensa en las personas infectadas, no se ha perfeccionado un método sólido de desarrollo del virus en células cultivadas. Cuando se usa suero infeccioso para infectar *in vivo* células hepáticas humanas cultivadas, solamente se replican pequeñas cantidades de HCV que no son detectables más que por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction).

Se han publicado intentos de infectar con HCV células cultivadas para líneas mononucleares de sangre periférica, líneas de células B y T humanas, líneas de hepatocitos humanos, y células primarias fetales y adultas humanas. Sin embargo, los resultados publicados hasta ahora han sido decepcionantes. Con frecuencia, la replicación viral es tan baja que el HCV producido a partir de una población de células infectadas puede detectarse solamente, si es que puede hacerse, con RT-PCR, y entonces puede observarse solamente un número escaso de copias de RNA del HCV. Además, la producción viral es esporádica y no reproducible entre pocillos los mismos días o días diferentes con los mismos virus y células. También, se necesitan varios días después de la administración del virus, incluso un tiempo tan largo como es un mes, para observar el máximo de la infección, p. ej. Iacovacci *et al.*, Hepatology 26 (5): 1328-1337 (1997). Estos problemas frustran la identificación y el rápido cribado de compuestos que podrían ser útiles para tratar pacientes que padecen de HCV y/o para la investigación relacionada con la infección por HCV.

Así pues existe la necesidad de un método para infectar y replicar el HCV en cultivos de células. También existe la necesidad de métodos rápidos y eficaces para determinar compuestos que inhiban la producción de HCV en cultivo. Esta solicitud resuelve estos problemas proporcionando composiciones que comprenden células que pueden reproducir eficazmente el HCV, métodos para obtener la composición de células, medios para cultivar las células, métodos para infectar células con HCV, métodos para ensayar la infección por HCV, y métodos para evaluar la capacidad de un compuesto para afectar a la producción de un HCV usando las composiciones y métodos de esta invención.

**Sumario de la invención**

La presente invención proporciona métodos para preparar composiciones que comprenden células de cultivo altamente productoras de HCV. La presente invención proporciona composiciones que comprenden mezclas de células que comprenden células del hígado de un ser humano con una edad de tres meses, o más, después de la concepción, que pueden ser eficientemente y efectivamente infectadas con un HCV. La presente invención proporciona también composiciones que comprenden células preparadas por los métodos de esta invención. En una realización, las composiciones de esta invención comprenden mezclas de células que comprenden células expresan fetoproteína alfa, células que expresan albúmina, células que expresan glicoforina, pero son sustancialmente libres de células que expresan proteína CD34. En otra realización de esta invención, las células de la mezcla de células pueden pasar a través de un filtro de aproximadamente 40 micrómetros de tamaño. En otra realización de la presente invención la composición se usa junto con, o comprende además, una célula alimentadora. En otra realización más de esta invención, la célula alimentadora es una célula STO (Reid-99).

La presente invención proporciona composiciones para cultivar células. En una realización de esta invención, las composiciones para cultivar células comprenden: medio libre de suero que comprende calcio, ácidos grasos libres (FFA: Free Fatty Acids), lipoproteína de alta densidad (HDL: High Density Lipoprotein), nicotinamida, elementos traza, factor de crecimiento epidérmico (EGF: Epidermal Growth Factor), insulina, transferina e hidrocortisona. De acuerdo con otra realización de esta invención, las anteriores composiciones no comprenden lipoproteína de baja densidad. De acuerdo con otra realización de esta invención, la composición comprende además una combinación cualquiera de los ingredientes siguientes, o todos: glucagón, factor de crecimiento hepático, etanolamina y factor de liberación de tirotrona.

La presente invención proporciona métodos para infectar una mezcla de células administrando HCV a composiciones de la presente invención. De acuerdo con una realización de la presente invención, el HCV es RNA898. En otra realización de esta invención, el virus HCV se incuba inicialmente con la composición (inóculo) durante aproximadamente 24 horas a aproximadamente 37 grados C en un volumen de aproximadamente 0,52 ml por cm<sup>2</sup> antes de lavar las células en la composición o reemplazar el inóculo con el medio de cultivo de células.

La presente invención proporciona un método para ensayar una infección por HCV incubando una composición de esta invención con una célula alimentadora, poniendo en contacto las células de la composición con un HCV, y para medir el HCV asociado con las células y/o el medio en el que las células son cultivadas.

Además, la presente invención proporciona un método para evaluar la capacidad de un compuesto para afectar a la producción de HCV, esto es, para afectar a la capacidad de la composición de células para producir más HCV, que comprende las etapas de incubar una composición de esta invención con una célula alimentadora, poner en contacto las células de la composición con un virus HCV, y administrar el compuesto antes o después del contacto con el HCV.

En una realización, el método se usa para el cribado de una diversidad de compuestos simultáneamente en relación con su capacidad para inhibir la producción de HCV.

En otra realización, la presencia del HCV se determina midiendo la cantidad de RNA del HCV mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). En una realización, el RNA del HCV de la muestra se compara con una cantidad de RNA procedente de un segundo virus que se usa como control o testigo interno. En otra realización, el segundo virus es el virus de la diarrea vírica bovina ("BVDV": Bovine Viral Diarrhea Virus).

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa un análisis a lo largo del tiempo de la infección de células hepáticas fetales humanas después de la infección con RNA898 (-□-) o con testigo sin suero (●), medida por los niveles de RNA de HCV presentes en los sobrenadantes de los cultivos. El límite de cuantificación (---LOQ: Limit Of Quantitation) del ensayo de RT-PCR para las muestras de sobrenadantes fue 600 copias de RNA del HCV por muestra. Se presentan los valores medios de RNA de HCV/ml y su desviación estándar, a partir de cultivos por triplicado.

La Fig. 2 representa un análisis a lo largo del tiempo de la infección de células hepáticas fetales humanas después de la infección con RNA898 (-□-) o un suero testigo negativo (-X-), medido por los niveles de RNA del HCV presentes en los sobrenadantes de los cultivos. El suero testigo negativo fue obtenido de un paciente que no padece infección por el HCV. El límite de cuantificación (---LOQ) del ensayo de RT-PCR para las muestras de sobrenadantes fue 600 copias de RNA del HCV por muestra. Se presentan los valores medios de RNA de HCV/ml y su desviación estándar, a partir de cultivos por triplicado.

La Fig. 3 representa un análisis a lo largo del tiempo, de la infección de células hepáticas fetales humanas después de la infección con RNA898 (-□-) o un suero testigo negativo (-X-), medido por los niveles de RNA del HCV presentes en los sobrenadantes de los cultivos. El suero testigo negativo era de un paciente que no padece infección por el HCV. El límite de cuantificación (---LOQ) del ensayo de RT-PCR para las muestras de sobrenadantes fue 600 copias de RNA del HCV por muestra. Se presentan los valores medios de RNA de HCV/ml y su desviación estándar, a partir de cultivos por triplicado.

La Fig. 4 representa un análisis a lo largo del tiempo de la infección de células hepáticas fetales humanas después de la infección con RNA898, medida por los niveles de RNA de HCV asociado a las células. No se muestran los datos del suero testigo negativo. Después de la inoculación, las células de los cultivos se lavaron y se recolectaron los días 1, 2, 3, 6 y 8 después de la administración del virus. El límite de cuantificación (---LOQ) del ensayo de RT-PCR para las muestras de RNA asociado a las células fue 100 copias de RNA del HCV por muestra. Se presentan los valores medios de RNA del HCV por pocillo y su desviación estándar, a partir de cultivos por triplicado.

La Fig. 5 la inhibición de la infección por HCV de células hepáticas fetales humanas por el agente antiviral VRT-106866 sobre un intervalo de concentración. El RNA del HCV de la muestra se midió usando un ensayo RT-PCR cuantitativo multiplex específico de HCV. El límite de cuantificación del ensayo RT-PCR para las muestras de RNA asociado a las células fue 100 copias de RNA del HCV por muestra. Los resultados se presentan como la media y la desviación estándar del "% de RNA del HCV testigo" (valor correspondiente a la muestra/media de los valores del testigo positivo) a partir de cultivos por triplicado.

### Descripción detallada de la invención

Una composición de esta invención comprende una mezcla de células que comprende células liberadas del hígado de un ser humano de tres meses de edad o mayor, después de la concepción. De acuerdo con una realización, el ser humano tiene una edad comprendida entre los tres meses después de la concepción y 1 año después del nacimiento. En otra realización de la presente invención, el ser humano tiene una edad comprendida entre los tres meses después de la concepción y hasta un año después del nacimiento. En otra realización de la presente invención el ser humano tiene una edad entre tres y seis meses después de la concepción. En otra realización, el ser humano tiene una edad entre 18 y 22 semanas después de la concepción. En una realización de la presente invención, las células comprenden células hepáticas y hematopoiéticas fetales. De acuerdo con una realización de la presente invención, las células hepáticas y hematopoiéticas pueden expresar fetoproteína alfa, albúmina y/o glicoforina. De acuerdo con una realización preferida, si el ser humano es un adulto, el hígado humano está sano.

De acuerdo con otra realización, una composición de la presente invención comprende células que expresan fetoproteína alfa, células que expresan albúmina, y células que expresan glicoforina, pero está sustancialmente libre de células que expresan proteína CD34. Las células de la mezcla de células son susceptibles de inmunotinción con anticuerpos dirigidos específicamente contra la fetoproteína alfa, la albúmina o la glicoforina, pero la mezcla de células está sustancialmente libre de células que son susceptibles de inmunotinción con un anticuerpo dirigido específicamente contra la proteína CD34. De acuerdo con la presente invención la expresión "sustancialmente libre de células que expresan la proteína CD34" significa que las células de la mezcla de células manifiesta una inmunotinción escasa o no observable con el anticuerpo CD34 cuando se detecta la inmunounión usando un sistema de detección de fosfatasa alcalina-colorante (p. ej. Harlow *et al.*, Antibodies; A Laboratory Manual (1988) Cold Spring Harbor Laboratory, pág. 349, 106-407; *kit* LSAB2 de DAKO Corporation). De acuerdo con una realización de la composición de la presente invención, menos del 2% de la población de células de la mezcla de células podrían teñirse con un anticuerpo espe-

## ES 2 328 466 T3

cífico anti-CD34. De acuerdo con otra realización, menos del 1% de la población de células de la mezcla de células podrían teñirse con un anticuerpo específico anti-CD34.

5 La presente invención incluye una composición que comprende células que son células hospedadores significati-  
vamente mejores para la infección y la replicación del virus del HCV, RNA898 (en adelante denominado "RNA898").  
El RNA898 fue depositado el 27 de marzo de 2001 en la American Type Culture Collection ("ATCC"), 10801 Uni-  
versity Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) (n° de depósito de ATCC: PTA-3237) bajo las condiciones del tratado  
de Budapest. De acuerdo con una realización, una composición de la presente invención es capaz de producir más de  
10 aproximadamente 5.000 copias, más de aproximadamente 10.000 copias, o más de aproximadamente 50.000 copias  
de RNA viral de la hepatitis C en el medio, setenta y dos horas después de la administración del virus si hay  $4 \times 10^5$   
células en la composición. Por ejemplo, una composición preparada de acuerdo con los métodos de la presente  
invención y ensayada de acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 2 y 4, sería capaz de producir más de  
aproximadamente 5.000, más de aproximadamente 10.000 copias, o más de aproximadamente 50.000 copias de RNA  
viral de la hepatitis C en el medio, setenta y dos horas después de la administración del virus.

15 Un experto en la técnica entenderá fácilmente que si el número de células en la composición fuese mayor que  
 $4 \times 10^5$  células, el número total de copias de RNA viral que se producirían aumentaría entonces en una cantidad  
proporcional al aumento del número de células en la composición. Del mismo modo, un experto en la técnica entenderá  
fácilmente que si el número de células en la composición fuese menor que  $4 \times 10^5$  células, entonces el número total  
20 de copias de RNA viral que se producirían disminuiría en una cantidad proporcional a la disminución del número  
de células en la composición. En consecuencia, se contemplan composiciones que comprenden menos o más de  $4 \times 10^5$   
células que producirían proporcionalmente el mismo número de copias de RNA del HCV. Las composiciones de  
acuerdo con la presente invención son capaces de producir de 5.000 a 55.000 copias de RNA del HCV, de 10.000 a  
55.000 copias de RNA del HCV, y de 25.000 a 55.000 copias de RNA del HCV, setenta y dos horas después de la  
25 administración del virus a la composición.

Los ejemplos de anticuerpos que son útiles para la inmunotinción de acuerdo con la presente invención son cono-  
cidos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse los anticuerpos anti-fetoproteína alfa de DAKO Corporation, Carpinte-  
ria, CA, los anticuerpos anti-glicoforina (32591) de PharMingen, San Diego, CA, los anticuerpos anti-CD34 humana  
30 (34371A) de PharMingen, San Diego, CA, y los anticuerpos anti-albúmina (YM5024) de Accurate Chemical Corp.,  
Westbury, NY.

En otra realización de la presente invención, la mezcla de células en una composición de la invención puede pasar  
a través de un filtro de aproximadamente 40 micrómetros de tamaño.

35 En una realización de la presente invención, las composiciones de la invención se usan junto con células ali-  
mentadoras, o comprenden además tales células alimentadoras. Las células alimentadoras proporcionan una matriz  
extracelular y factores difundibles tales como factores de crecimiento. En una realización, la célula alimentadora tiene  
una capacidad escasa o nula para ser infectada con HCV. En otra realización, las células alimentadoras son células de  
40 fibroblasto. En otra realización, las células alimentadoras son células de fibroblasto mesenquimal embrionario.

Ejemplos de células alimentadoras de acuerdo con la presente invención son los fibroblastos embrionarios de ratón  
(Mouse Embryo Fibroblasts: MEF) tales como las células STO y los fibroblastos embrionarios de rata (Rat Embryo  
Fibroblasts: REF), p. ej. Hogan *et al.*, *Manipulating The Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 2ª ed. Plainview, N.  
Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994; Robertson, E. J. (1987) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells:*  
45 *A Practical Approach*, ed. Robertson, E. J. (IRS, Oxford), p. 71-112. Las células STO (Reid-99) son un tipo de células  
alimentadoras que son útiles. Las células STO (Reid-99) fueron depositadas el 27 de marzo de 2001, en la American  
Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 bajo las condiciones del tratado de  
Budapest (número de depósito de la ATCC: PTA-3236). Los métodos para cultivar y mantener células alimentadoras  
50 son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, en *Methods for Tissue Engineering*. Ed. Robert Lanza, Academic  
Press, NY (2002), p. 151-202.

Las células alimentadores pueden ponerse en fase de reposo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por  
ejemplo, pueden dejarse adherir las células STO durante 2 a 48 horas en una placa de cultivo de células. A continua-  
55 ción, el medio en el que se incuban la células STO es eliminado y reemplazado por un medio que contiene  $2 \mu\text{g/ml}$   
de mitomicina C. Después, las células STO se incuban a aproximadamente 37 grados C durante aproximadamente 2  
horas. Después de la incubación, el medio que contiene la mitomicina C se elimina. Las células se lavan dos veces y  
después los cultivos de células STO se mantienen de 0 a 48 horas antes de la adición de las mezclas de células de la  
presente invención.

60 La mezcla de células de las composiciones de acuerdo con la presente invención puede prepararse de acuerdo con  
las etapas que comprenden:

- 65 a. diseccionar (disecar) un hígado de un ser humano de tres meses de edad después de la concepción, o mayor,  
en un tampón que comprende EGTA;
- b. incubar el hígado diseccionado en un tampón que comprende colagenasa para separar células del hígado;

## ES 2 328 466 T3

- c. eliminar los objetos de aproximadamente 40 micrómetros o mayores, de las células separadas;
- d. eliminar los glóbulos rojos de las células separadas;
- 5 e. resuspender las células de la etapa (d) en un medio libre de suero, que comprende calcio de 0,1 mM a 0,6 mM, albúmina de suero bovino, ácidos grasos libres (FFA), lipoproteína de alta densidad (HDL), nicotinamida, elementos traza, factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, transferrina e hidrocortisona; y
- 10 f. cultivar las células en el medio libre de suero de la etapa (e).

El medio de la etapa (e) o de la etapa (f) puede comprender además opcionalmente uno cualquiera, una combinación, o todos los ingredientes glucagón, factor de crecimiento hepático, etanolamina y factor de liberación de tirotrópina. En una realización, el medio comprende además glucagón, factor de crecimiento hepático, etanolamina y factor de liberación de tirotrópina. En otra realización, el medio no comprende lipoproteína de baja densidad (LDL).

En una realización, el tampón de EGTA comprende bis( $\beta$ -aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraacetato de etilenglicol (EGTA) 0,01 mM a 1,0 mM. En otra realización de la presente invención, la concentración de EGTA es 0,5 mM.

20 En una realización, el tampón de colagenasa comprende de 0,1 a 5,0 mg/ml de colagenasa. En otra realización de la presente invención, la concentración de colagenasa es 2 mg/ml.

Se entiende que la etapa de exclusión de tamaños de acuerdo con la presente invención elimina objetos tales como tejido, residuos y agregados de células que no pueden pasar a través de un filtro de un tamaño de aproximadamente 40 micrómetros. Así, por ejemplo, se contempla el uso de filtros de un tamaño de aproximadamente 40 micrómetros a un tamaño de aproximadamente 100 micrómetros, y otros métodos para eliminar residuos con tamaños mayores de 40 micrómetros. En una realización, la etapa de filtración elimina los objetos que no pueden pasar a través de un filtro que es de un tamaño mayor que aproximadamente 40 micrómetros. Los ejemplos de filtros de acuerdo con la presente invención incluyen filtros de nilón (p. ej. "Cell strainer" de Falcon (números de catálogo 2034, 2350 ó 2360)).

30 Los métodos para preparar composiciones de la presente invención incluyen la etapa de eliminar los glóbulos rojos de la mezcla de células. Se ha de entender que los glóbulos rojos se pueden eliminar en cualquier etapa durante el proceso de preparación después que las células son separadas del hígado. Los métodos para eliminar los glóbulos rojos son bien conocidos en la técnica. De acuerdo con una realización de la invención, los glóbulos rojos se eliminan mediante centrifugaciones sucesivas a baja velocidad en una centrífuga. Por ejemplo, pueden centrifugarse las células separadas que pasaron a través de los filtros a 50 x g (450 rpm) durante 4 minutos, puede ser resuspendido el sedimento celular, y puede repetirse el proceso varias veces.

40 Las células primarias, líneas de células y tejidos de animales o seres humanos pueden cultivarse con un medio de la presente invención. En una realización, el medio de cultivo comprende medio libre de suero, calcio, FFA, HDL, nicotinamida, elementos traza, insulina, transferrina e hidrocortisona. De acuerdo con otra realización el medio de cultivo puede comprender además uno cualquiera, una combinación o todos los ingredientes siguientes: glucagón, etanolamina y factor de liberación de tirotrópina. En otra realización más, el medio de cultivo no comprende lipoproteína de baja densidad (LDL).

45 Después de preparar una mezcla de células de acuerdo con el procedimiento anterior, las células han de ser cultivadas en un medio adecuado para mantener las células y, si es preciso, las células alimentadoras. De acuerdo con una realización de la presente invención el medio se optimiza para una mezcla de células que se va a usar en una infección con HCV. Un medio útil para este propósito comprende medio libre de suero (p. ej. medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)) que comprende calcio, albúmina de suero bovino (BSA), ácidos grasos libres (FAA), lipoproteína de alta densidad (HDL), nicotinamida, elementos traza, factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, transferrina, hidrocortisona y opcionalmente uno cualquiera, o una combinación o todos los ingrediente siguientes: glucagón, factor de crecimiento hepático, etanolamina y factor de liberación de tirotrópina. De acuerdo con una realización de esta invención, el medio de cultivo no comprende lipoproteína de baja densidad (LDL).

55 En una realización, la concentración de calcio en el medio de cultivo está entre 0,1 mM y 0,6 mM. En otra realización la concentración de calcio es aproximadamente 0,5 mM. En una realización, la concentración de BSA es 500  $\mu$ g/ml. En otra realización la concentración de nicotinamida es 5 mM. En una realización la concentración de insulina es 10 ng/ml. En una realización de ácidos grasos libres es 7,6  $\mu$ Eq/L. En una realización la concentración de EGF es 100 ng/ml. En una realización la concentración de factor de crecimiento hepático es 20 mg/ml. En una realización la concentración de etanolamina es  $10^{-6}$  M. En una realización la concentración de factor de liberación de tirotrópina es  $10^{-6}$  M. En una realización la concentración de HDL es 5  $\mu$ g/ml. En una realización la concentración de hidrocortisona es  $10^{-6}$  M.

65 En una realización, el medio es medio IM-HDM, que comprende DMEM (de alto contenido en glucosa), 500  $\mu$ g/ml de BSA, 7,6  $\mu$ Eq/L de ácidos grasos libres (FAA), 5  $\mu$ g/ml de HDL, nicotinamida 5 mM, 1x elementos traza ([cobre  $1 \times 10^{-7}$  M, zinc  $5 \times 10^{-11}$  M, selenio  $3 \times 10^{-10}$  M], 100 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de insulina, 5  $\mu$ g/ml de transferrina, hidrocortisona  $10^{-6}$  M, 2  $\mu$ g/ml de glucagón, 20  $\mu$ g/ml de factor de crecimiento hepático, etanolamina  $10^{-6}$  M, factor

## ES 2 328 466 T3

de liberación de tirotrópina  $10^{-6}$  M]. En una realización, los  $7,6 \mu\text{Eq/L}$  de FFAs totales comprenden una mezcla de  $2,36 \mu\text{M}$  de ácido palmítico (16:0),  $0,21 \mu\text{M}$  de ácido palmitoleico (cis-16:1 n-7),  $0,88 \mu\text{M}$  de ácido esteárico (18:0),  $1,02 \mu\text{M}$  de ácido oleico (cis-18:1 n-9),  $2,71 \mu\text{M}$  de ácido linoleico (cis-18:2 n-6) y  $0,43 \mu\text{M}$  de ácido linolénico (cis 18:3 n-3). El medio puede también comprender antibióticos para impedir el desarrollo bacteriano, por ejemplo 1x penicilina/estrepomicina.

Las mezclas de células de las composiciones de la presente invención pueden ponerse en placas en sustratos de material plástico recubiertos con una matriz extracelular. Los ejemplos de componentes de la matriz extracelular incluyen, pero sin limitarse a ellos, colágeno, tal como, por ejemplo, colágeno del tipo IV, o las proteínas de adhesión, fibronectina y laminina, o Matrigel (ICN Biochemicals Inc.). El colágeno, cuando se emplea, puede ser usado solo o en combinación con laminina o fibronectina, o en combinación con proteoglicanos, o con extractos de tejidos enriquecidos en materiales de la matriz extracelular. Las matrices extracelulares pueden ser proporcionadas también por las células alimentadoras descritas anteriormente. Tales combinaciones de mezclas celulares y matriz extracelular pueden usarse en métodos de ensayo de HCV de acuerdo con la presente invención.

Las composiciones de la presente invención pueden ponerse en contacto con RNA898 o un equivalente infeccioso HCV del RNA898. Un equivalente infeccioso del RNA898 es una cepa del HCV distinta del RNA898 que es capaz de producir más de aproximadamente 5.000 copias, más de aproximadamente 10.000 copias, o más de aproximadamente 50.000 copias de RNA de HCV a las setenta y dos horas después de poner en contacto  $4 \times 10^5$  células de las composiciones preparadas de acuerdo con los métodos de la presente invención, con dicho virus HCV. De acuerdo con una realización, las células son infectadas poniendo en contacto la composición de la presente invención con RNA898 o su equivalente infeccioso durante aproximadamente 24 horas, a aproximadamente 37 grados C, en un volumen de aproximadamente  $0,52 \text{ ml por cm}^2$ . De acuerdo con una realización de la presente invención, las células que son infectadas con HCV se cultivan con una matriz extracelular. En otra realización de la presente invención, la matriz extracelular es proporcionada por células alimentadoras (p. ej. células STO (Reis-99)).

La cantidad de HCV producido a partir de las células en las composiciones de la presente invención puede ser determinada midiendo p. ej. la producción de ácido nucleico o de proteína del HCV. Por ejemplo, puede cuantificarse el número de copias de RNA del HCV que se encuentra asociado a las células (esto es, en ellas o unido a ellas) y/o en el medio en el que son cultivadas las células. Hay técnicas conocidas en este campo que pueden ser usadas para observar si se han producido moléculas de proteína o de ácido nucleico del HCV. Por ejemplo, la transferencia western de las proteínas sondadas con anticuerpos dirigidos contra proteínas del HCV o transferencias de geles sondados con moléculas de ácidos nucleicos marcados que son complementarios respecto a la secuencia de ácidos nucleicos del HCV. Los métodos para la extracción de proteínas y ácidos nucleicos de las células y el medio de cultivo de las células son bien conocidos en la técnica, y tales *kits* para este fin son disponibles comercialmente.

Para cuantificar con mayor precisión el número de copias de partículas de HCV producidas de acuerdo con esta invención, es útil la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). De acuerdo con una realización de la presente invención, el método RT-PCR se modifica de manera que el número de copias de RNA de HCV se determina comparando su valor con una segunda molécula de ácido nucleico de cantidad conocida que se añade a las muestras de células, extractos celulares y/o medio a ensayar, bien sea en forma de un segundo virus o bien de una segunda molécula de ácido nucleico. Es deseable que el segundo virus esté estrechamente relacionado con el HCV o que la segunda molécula de ácido nucleico esté estrechamente relacionada con el RNA del HCV (esto es, similar en longitud, en composición en ácidos nucleicos y en la estructura de la cápside vírica). En una realización la segunda molécula de ácido nucleico es una cápside de flavivirus. En una realización la segunda molécula de RNA es el RNA del virus de la diarrea vírica bovina ("BVDV"), p. ej. de la cepa BVDV NADL (nº de depósito ATCC: VR-534).

La presencia del segundo virus o molécula de ácido nucleico es ventajosa por cuanto sirve de testigo interno para la cuantificación de la primera molécula de ácido nucleico. Este testigo interno permite monitorizar y corregir fluctuaciones aleatorias y la variabilidad del ensayo.

Por ejemplo, la presente invención proporciona el método que comprende las etapas de:

- (a) combinar dicho HCV con una cantidad conocida de virus de la diarrea vírica bovina ("BVDV"), en donde dicho BVDV contiene una segunda molécula de ácido nucleico, con una composición de la presente invención;
- (b) extraer de las células de la composición o del medio en el que se cultivan las células una primera molécula de ácido nucleico derivada del HCV y dicha segunda molécula de ácido nucleico derivada del BVDV para formar un extracto de ácido nucleico combinado;
- (c) añadir a dicho extracto de ácido nucleico combinado una primera sonda detectable, que es específica para dicho primer ácido nucleico y una segunda sonda detectable, que es específica para dicho segundo ácido nucleico;
- (d) amplificar dicho extracto de ácido nucleico combinado por medio de una PCR;

## ES 2 328 466 T3

- (e) cuantificar en varios ciclos durante dicha amplificación una señal detectable liberada independientemente a partir de dicha primera sonda detectable y dicha segunda sonda detectable;
- (f) extrapolar los resultados de la etapa (e) para calcular la cantidad de dicha primera molécula de ácido nucleico en dicho HCV y la cantidad de dicha segunda molécula de ácido nucleico en el BVDV; y
- (g) evaluar la precisión de dicha cantidad calculada de dicha primera molécula de ácido nucleico determinada en la etapa (f) comparando dicha cantidad calculada de dicho segundo ácido nucleico en la etapa (f) con dicha cantidad conocida de dicho segundo ácido nucleico usado en la etapa (a).

De acuerdo con otra realización, el método anterior comprende la etapa adicional de ajustar dicha cantidad calculada de dicho primer ácido nucleico determinada en la etapa (f) mediante un factor determinado comparando dicha cantidad calculada de dicho segundo ácido nucleico en la etapa (f) con dicha cantidad conocida de dicho segundo ácido nucleico usado en la etapa (a).

De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona un método para determinar el efecto de un compuesto sobre la producción de un HCV, que comprende las etapas de añadir un compuesto antes o después de administrar el HCV a las composiciones de la presente invención y subsiguientemente determinar la presencia de HCV asociado con las células en las composiciones y/o medios en los que se cultivan las células infectadas. Si se desea administrar el compuesto después de que el HCV se ponga en contacto con la composición, entonces es preferible que el compuesto sea administrado dentro de los 10 días después de que el HCV es puesto en contacto con la composición. Los compuestos a ensayar de acuerdo con la presente invención pueden inhibir o activar la producción de HCV. En consecuencia, un compuesto puede inhibir cualquier etapa del ciclo de vida del HCV para conseguir su efecto. Los ejemplos de tales compuestos incluyen, pero no se limitan a ellos, moléculas de compuestos químicos sintéticos o purificados, proteínas y ácidos nucleicos. Las muestras a las que se añaden los compuestos pueden compararse con otras muestras tratadas bajo las mismas condiciones pero que no han sido expuestas al compuesto o han sido expuestas a otro compuesto del que se sabe que tiene un efecto escaso o nulo sobre la producción de HCV.

De acuerdo con una realización, el método anterior se usa para cribar simultáneamente el efecto de una diversidad de compuestos sobre la producción de HCV. Por ejemplo, cada pocillo de una placa de 96 pocillos podría contener un compuesto a cribar diferente de acuerdo con los métodos de la presente invención. En otra realización más, los métodos de la presente invención se usan para identificar compuestos que inhiben la producción de HCV.

En una realización los cebadores y la sonda usados en los métodos de la presente invención se diseñan basándose en las regiones más conservadas de las cepas de HCV. La sonda puede construirse también basándose en los siguientes criterios adicionales: a) la temperatura de fusión de la sonda es de 8°C a 10°C más alta que la de los cebadores; b) no hay G presentes en el extremo 5'; c) no hay un alargamiento de más de 4 G; y/o d) la sonda no forma estructuras internas con temperaturas de fusión elevadas ni forma un dúplex consigo misma ni con ninguno de los cebadores. En una realización la región de PCR entera era de aproximadamente 150 pares de bases de longitud.

Los cebadores y sonda útiles para la 5' UTR del BVDV pueden diseñarse basándose en el mismo conjunto de criterios. Además, se tuvo cuidado de asegurarse de que los cebadores o la sonda de HCV tiene la menor cantidad de homología respecto de la del BVDV. Los cebadores y sondas pueden obtenerse de fuentes comerciales que sintetizan y preparan moléculas de ácido nucleico modificadas (p. ej. Oligo y PE Applied Biosystems). El BVDV puede mantenerse mediante la infección de células MDBK.

En una realización de la presente invención se usan dos sondas fluorogénicas distintas marcadas dualmente, cada una de ellas específica para una pero no para otra de las moléculas de ácido nucleico del HCV. En otra realización, cada sonda fluorogénica tiene típicamente un colorante informador en el extremo 5' y un colorante apagador (o colorante inhibidor de la fluorescencia) en el extremo 3'. Las dos sondas fluorogénicas distintas se eligen de manera que den distintos picos de fluorescencia que pueden ser detectados sin interferencia cruzada entre los dos picos. Por ejemplo, como se discutió anteriormente, el extremo 5' de la primera sonda detectable puede ser marcado con un colorante informador tal como la 6-carboxi-fluoresceína ("6-FAM"), y el extremo 5' de la segunda sonda detectable puede ser marcado con un colorante informador tal como VIC. El extremo 3' de ambas sondas detectables puede ser marcado con un colorante apagador tal como la 6-carboximetil-rodamina ("6-TAMRA"). Así, cuando se une al primer ácido nucleico y al segundo ácido nucleico, la proximidad del colorante informador en el extremo 5' respecto del colorante apagador en el extremo 3' de la sonda tiene por resultado la supresión de la fluorescencia. Durante la amplificación, cuando la Tth polimerasa se mueve a lo largo de la secuencia de ácidos nucleicos, el apagador se elimina de la sonda por la acción de 5'-3' exo, degradando así la sonda fluorogénica. Esto tiene por resultado una emisión de fluorescencia, que se registra en función del ciclo de amplificación. Así, la monitorización de la emisión de fluorescencia proporciona una base para medir la cinética de amplificación en tiempo real.

Los ejemplos de cebadores y sondas útiles para el genotipo 1 de HCV son: (SEQ ID NO: 1) 5'CCATGAATCACTCCCCTGTG 3' (cebador 5' o *forward primer*), (SEQ ID NO: 2) 5' CCGGTCGTCCTGGCAATTC 3' (cebador 3' o *reverse primer*), y la sonda de HCV, (SEQ ID NO: 5) 5'-6-FAM CCTGGAGGCTGCACGACTCA-TAMRA-3'. Los cebadores y sonda para BVDV comprendían el cebador 5', (SEQ ID NO: 3) 5'- CAGGGTAGTCGT CAGTGGTTTCG-3', el cebador 3', (SEQ ID NO: 4) 5'-GGCCTCTGCAGCACCTATC-3', y la sonda, 5'VIC (SEQ ID NO: 6) CCCTCGTCCACGTGGCATCTCGA-TAMRA-3'.

## ES 2 328 466 T3

Las reacciones de RT y PCR pueden llevarse a cabo en los mismos pocillos de una bandeja óptica de placa de 96 pocillos con tapones (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). En una realización de la presente invención se usa una reacción RT-PCR multiplex (esto es, una reacción RT-PCR que amplifica y mide simultáneamente dos especies distintas de RNA, p. ej. RNA de HCV y RNA de BVDV, en el mismo tubo). Las reacciones multiplex tienen la ventaja de permitir que el técnico determine si un resultado HCV negativo fue debido al hecho de que el cultivo era realmente negativo o por algún fallo técnico en las etapas de extracción o de RT-PCR. Diez o veinte  $\mu\text{l}$  de RNA viral o RNA estándar pueden ser amplificados en un reacción de RT-PCR de 50  $\mu\text{l}$  con 1X tampón Taqman EZ (PE Applied Biosystems), acetato de manganeso 3 mM, 300 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dUTP, 5 unidades de Tth polimerasa (Epicentre), 4,0% de potenciador (Epicenter), alguna concentración de sondas y cebadores. El ensayo RT-PCR Taqman puede realizarse durante 25 min a 60°C (RT), 5 min a 95°C, y seguido por 45 ciclos de reacción PCR en dos etapas (60°C durante 1 min y 95°C durante 15 sec). Para un ensayo con HCV y otro ácido nucleico (el ensayo Taqman multiplex), la cantidad de cebadores de HCV y BVDV puede ser optimizada usando una mezcla matriz de varias concentraciones de los dos juegos de cebadores. La condición final del ensayo incluye 200 nM de sonda HCV marcada con 6-FAM y de sonda BVDV marcada con VIC, 400 nM de ambos cebadores de HCV, y 45 nM de ambos cebadores de BVDV.

A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se entenderá que la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros establecidos, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

La solicitud provisional de EE. UU. 60/279.174, presentada el 27 de marzo de 2001, y las publicaciones citadas en el presente texto se incorporan como referencia.

Aunque se han presentado varias realizaciones de la presente invención, es evidente que la construcción básica puede ser alterada para proporcionar otras realizaciones que utilizan las composiciones y métodos de esta invención. Por tanto, se apreciará que el alcance de la presente invención se ha de definir por las reivindicaciones y la memoria descriptiva y no por las realizaciones específicas que se han expuesto en el presente texto como ejemplo.

### Ejemplo 1

#### *Aislamiento y cultivo de células fetales humanas hepáticas y hematopoiéticas*

El tejido hepático de fetos humanos de 18 a 22 semanas de edad después de la concepción, fue almacenado en RPMI en hielo antes de su disección. El tejido se lavó con solución de PBS. El tejido se picó con un bisturí en 50 ml de tampón para disección [HBSS (Cellgro cat no 21-022-cv), EGTA 0,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,2 mM, HEPES 10 mM]. El tejido picado se incubó 10 minutos en un baño de agua a 37 grados C. Las células separadas y suspendidas sobre el tejido picado fueron eliminadas. El tejido picado se incubó en solución de collagenasa (2 mg/ml de collagenasa (Sigma C-5138) en tampón de collagenasa [HBSS, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 10 mM]) durante 30 minutos a 37 grados C. Las células separadas suspendidas sobre el tejido picado se recolectaron y se pasaron a través de un filtro de nilón de 40 micrómetros (Falcon números 2034, 2350 o 2360). El tejido picado se lavó con solución de lavado IM [DMEM (JRH-51444 alto en glucosa), 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de BSA (Sigma A8806), 7,6  $\mu\text{Eq}/\text{L}$  de ácidos grasos libres totales (FAA), 1 $\times$  Pen/Strep, 10 ng/ml de insulina, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de transferrina].

Las soluciones que contienen las células que se hicieron pasar a través de los filtros se agruparon y se centrifugaron a 1000 rpm durante ocho minutos. El sobrenadante fue desechado. El sedimento se resuspendió en 50 ml de solución de lavado IM y se centrifugó a 50  $\times$  g (450 rpm) durante 4 minutos. El sobrenadante fue desechado. El proceso de resuspender el sedimento en solución de lavado IM, centrifugar la resuspensión a 50  $\times$  g durante 4 minutos y desechar el sobrenadante se repitió 2-3 veces. Después se suspendió el sedimento en 20 ml de medio IM-HDM [DMEM (JRH-51444 alto en glucosa), 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de BSA (Sigma A8806), 7,6  $\mu\text{Eq}/\text{L}$  de ácidos grasos libres (FFAs) [ácido palmítico (16:0, Sigma, P0500) 2,36  $\mu\text{M}$ , ácido palmitoleico (cis-16:1 n-7, Sigma, P9417) 0,21  $\mu\text{M}$ , ácido esteárico (18:0, Sigma, S4751) 0,88  $\mu\text{M}$ , ácido oleico (cis-18:1 n-9, Sigma, 01008) 1,02  $\mu\text{M}$ , ácido linoleico (cis-18:2 n-6, Sigma, L1376) 2,71  $\mu\text{M}$ , y ácido linoléico (cis 18:3 n-3, Sigma, L2376)] 0,43  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de HDL (Sigma L2014), nicotinamida (Sigma N0636) 5 mM, 1 $\times$  Penn/Strep (Gibco 1 $\times$ ), 1 $\times$  elementos traza [cobre (C8027) 1  $\times$  10<sup>-7</sup> M, zinc (Sigma 4750) 5  $\times$  10<sup>-11</sup> M, selenio (Sigma S6663) 3  $\times$  10<sup>-10</sup> M], 100 ng/ml de EGF (Peprotech 100-15), 10 ng/ml de insulina (Sigma 15500), 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de transferrina (Sigma T0665), hidrocortisona (Sigma 15500) 10<sup>-6</sup> M, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de glucagón (Sigma G3157), 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de factor de crecimiento hepático (Sigma G1887), etanolamina (Sigma E0135) 10<sup>-6</sup> M, factor de liberación de tirotrina (Sigma T9146) 10<sup>-6</sup> M].

Las células sedimentadas se pusieron en placa en medio IM-HDM a una densidad de 3  $\times$  10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>. Las células sedimentadas crecieron bien en una matriz extracelular. Las células sedimentadas pueden crecer en placas que han sido recubiertas con colágeno. Se usó el método de Salas-Prato, *Invitro Cell. Dev. Biol* 24:230, 1988 para recubrir las placas. Generalmente, una placa se incuba con una solución madre de colágeno tipo I (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en DMEM a 37°C durante 30 minutos a 1 hora, se aclara dos veces con PBS, se cubre con PBS, y se almacena bajo PBS hasta que se necesita.

Alternativamente, las placas pueden ser recubiertas con células alimentadoras antes de añadir las células sedimentadas. Por ejemplo, se usaron células STO (Reid-99) que fueron tratadas con Mitomicina C, como células alimentadoras.

## ES 2 328 466 T3

El crecimiento con Mitomicina C detiene a las células STO pero las células siguen vivas y proporcionan una superficie para que se fijen las células hepáticas.

5 En caso de usarse, las células STO se pusieron en placa en pocillos de 1,9 cm<sup>2</sup> (1,2 × 10<sup>5</sup> por pocillo para placas de 24 pocillos, 2,2 × 10<sup>4</sup> por pocillo para placas de 96 pocillos) en medio STO normal (RPMI-1640, 10% de FCS) y se dejaron adherir durante 2 a 48 horas. El medio se eliminó y se reemplazó con medio que contiene 2 µg/ml de Mitomicina C y después se incubó a 37 grados C durante 2 horas. El medio se eliminó, las células STO se lavaron dos veces con medio STO normal, y los cultivos se mantuvieron durante 0 a 48 horas antes de la adición de las células fetales.

10 Al cabo de 24 a 48 horas, las células fetales no fijadas se retiraron usando un pipeteo suave. El medio se cambia generalmente cada 2 a 7 días. Las células se han mantenido al menos 28 días con una fijación celular sólida y una buena morfología celular.

15 La inmunotinción de la mezcla de células se realizó en pocillos de placas de 24 pocillos o placas de 96 pocillos el día 11 después de la infección con HCV. El anticuerpo alfa-1-fetoproteína y el anticuerpo testigo negativo fueron obtenidos de DAKO Corporation (DAKO), Carpinteria, CA. Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD34 humana (34371A) y anti-glicoforina (32591A) fueron obtenidos de PharMingen, San Diego CA y usados con anticuerpo testigo negativo de ratón (N1537) de DAKO. La tinción se realizó usando el *kit* LSAB2 o K0676 (fosfatasa alcalina) de DAKO de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La inmunotinción indicó que la mezcla de células tiene células que expresan alfa fetoproteína, células que expresan glicoforina y células que expresan albúmina, pero no tienen células que expresan CD34.

### Ejemplo 2

#### 25 *Infección con HCV*

Se recubrieron placas de 96 o de 24 pocillos con las células alimentadoras STO (Reid-99) del Ejemplo 1. Las células preparadas como se describió en el Ejemplo 1 se pusieron en placa sobre las células STO (Reid-99) en la placa de 24 pocillos. Las células fueron infectadas con título 9,3 × 10<sup>6</sup> Eq/ml bDNA Chiron de virus de la hepatitis C, RNA898, por pocillo, adquirido de ProMed Dx. Los inóculos se seleccionaron para hacer la concentración final en el pocillo el 20% - 30% de la del suero añadido, o 1,2 × 10<sup>6</sup> a 2,8 × 10<sup>6</sup> Eq/ml bDNA Chiron. La infección y la replicación del HCV se observó generalmente durante un periodo de 20 días. Durante la incubación antes de ensayar la producción de HCV, el medio fue reemplazado cada 2 - 3 días. La cantidad de infección y replicación del HCV fue cuantificada midiendo el número de copias del RNA del HCV en las células y el medio mediante RT-PCR.

#### 35 *Ensayo de RT-PCR*

Se extrajo el RNA del HCV de las células usando el método Rneasy-96 o a partir del sobrenadantes del cultivo de las células usando el método de extracción QIAamp 96 (reactivos de Qiagen, Valencia CA). Ambos procedimientos emplean aislamiento a pequeña escala y concentración de RNA viral usando un agente caotrópico junto con vidrio de sílice, que es capaz de unir ácidos nucleicos en presencia de una sal caotrópica. Se añade virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) a los lisados de células (aproximadamente 10<sup>6</sup> copias de BVDV por muestra) antes de añadir la solución caotrópica. Las columnas de fibra de vidrio se disponen en un formato de 96 pocillos. Las moléculas de ácido nucleico se eluyen con agua libre de RNasa a los pocillos (aproximadamente 70 - 100 µl). El BVDV se obtuvo originalmente de la ATCC (n° de depósito de ATCC: VR-534). El testigo de BVDV fue constante de un ensayo a otro usando estos protocolos.

Para estos experimentos se usaron reacciones RT-PCR multiplex, es decir, las reacciones de RT-PCR que amplifican y miden dos o más especies distintas de RNA simultáneamente, en el mismo tubo. El ensayo RT-PCR de HCV usado en los presentes experimentos fue sensible a menos de 10 copias por reacción y lineal sobre un margen de 10<sup>0</sup> a 10<sup>7</sup> copias. Se analizaron de diez a veinte µl de muestra de RNA de HCV extraído, en cada ensayo de RT-PCR.

Se realizó la RT-PCR usando los reactivos siguientes: *kit* de reactivos *core* EZ RT-PCR (Applied Biosystems); acetato de manganeso 3 mM; 300 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dUTP; cebador 5' de HCV 400 nM (SEQ ID NO: 1) 5'-ccatgaatcactcccctgtg-3'; cebador 3' de HCV 400 nM (SEQ ID NO: 2) 5'-ccggctgctcctggcaattc-3'; cebador 5' de BVDV 45 µM (SEQ ID NO: 3) 5'-cagggtagtctcagtggttcg-3'; y cebador 3' de BVDV 45 µM (SEQ ID NO: 4) 5'-ggcctctgcagcacctatc-3', y 0,1 U/µl de Tth polimerasa (Epicentre). Oligos de DNA etiquetados con un colorante y que contienen la secuencia de ácidos nucleicos derivada del RNA del HCV y el RNA del BVDV, fueron usados como sondas para los productos de ácido nucleico generados a partir de la RT-PCR (esto es, sonda FAM HCV 200 µM (SEQ ID NO: 5) 5'-FAM cctggaggctgcagcacactca-TAMRA-3' y sonda VIC BVDV 200 µM (SEQ ID NO: 6) 5'-VIC-ccctctgcacgtggcatctcga-TAMRA-3'). Las reacciones de transcriptasa inversa y en cadena de la polimerasa se llevaron a cabo en el mismo pocillo en un ciclador térmico ABI 7700 (Applied Biosystems). Se realizó un ensayo de RT-PCR sobre un conjunto de cantidades conocidas de RNA de HCV simultáneamente con las muestras que estaban siendo ensayadas por RT-PCR y a partir de estos resultados se generó una curva de calibración.

65 Para cada experimento, se determinó el límite de cuantificación. El límite de cuantificación se determina midiendo la concentración de RNA más baja que, después de la extracción y el análisis en el procedimiento RT-PCR, produce un valor de salida que está dentro de la parte lineal de la curva de calibración. Generalmente, todos los testigos negativos (es decir, que demuestran una pequeña o nula producción de HCV) han de estar por debajo del LOQ.

## ES 2 328 466 T3

La fluorescencia se midió con un detector de secuencias ABI 7700 (Applied Biosystems). La presencia del testigo de RNA, BVDV, en todas las muestras confirma que las etapas de extracción de RNA y de RT-PCR del ensayo tuvieron éxito. El resultado de BVDV fue positivo. Así pues, fue posible interpretar con confianza un resultado de HCV negativo.

### 5 Ejemplo 3

#### *Análisis a lo largo del tiempo del HCV en el medio de cultivo después de la infección*

10 Se prepararon cultivos de células fetales humanas como se describe en el Ejemplo 1 y se pusieron en placa sobre una capa alimentadora de células de STO (Reid-99) tratadas con Mitomicina C. El número de células puestas en placa fue  $2 \times 10^5$  por pocillo. El suero de un paciente humano infectado con HCV (RNA898) fue adquirido de ProMed Dx. Como testigo, no se añade suero a otra muestra de células a ensayar. Se añadió una parte alícuota de  $300 \mu\text{l}$  de suero de paciente de HCV a 0,7 ml de medio de cultivo separado. Los cultivos se incubaron con los virus durante 24 horas a 37  
15 grados C. El inóculo se eliminó, y los cultivos se lavaron con 1 ml de medio, y después se cultivaron en medio fresco. Los sobrenadantes del cultivo fueron muestreados antes de cada cambio de medio (cada 2 - 3 días) y se midió el RNA de HCV usando un ensayo RT-PCR cuantitativo multiplex específico para HCV como se describe en el Ejemplo 2. El límite de cuantificación (----LOQ) del ensayo RT-PCR para las muestras de sobrenadante fue 600 copias de RNA de HCV por muestra.

20 La Fig. 1 representa los resultados del ensayo de RT-PCR del sobrenadante del cultivo de células. La Fig. 1 indica que el RNA898 mostró evidencia de una infección elevada. El suero testigo negativo no dio producción de RNA de HCV. Todos los testigos negativos estaban por debajo del LOQ.

### 25 Ejemplo 4

#### *Análisis a lo largo del tiempo del HCV en el medio de cultivo después de la infección*

30 Se prepararon cultivos de células fetales humanas como se describe en el Ejemplo 1 y se pusieron en placa sobre una capa alimentadora de células de STO (Reid-99) tratadas con Mitomicina C. El número de células puestas en placa fue  $4 \times 10^5$  por pocillo. El suero de un paciente humano infectado con HCV (RNA898) y no infectado con HCV fue adquirido de ProMed Dx (suero testigo negativo). Se añadió una parte alícuota de  $200 \mu\text{l}$  de suero de paciente de HCV a 0,8 ml de medio de cultivo separado. Esto representa aproximadamente  $1,9 \times 10^6$  Eq de bDNA Chiron por pocillo. Los cultivos se incubaron con los virus durante 24 horas a 37 grados C. El inóculo se eliminó, y los cultivos se  
35 lavaron con 1 ml de medio, y después se cultivaron en medio fresco. Los sobrenadantes del cultivo fueron muestreados antes de cada cambio de medio (cada 2 ó 3 días) y se midió el RNA de HCV usando un ensayo RT-PCR cuantitativo multiplex específico para HCV como se describe en el Ejemplo 2. El límite de cuantificación (----LOQ) del ensayo RT-PCR para las muestras de sobrenadante fue 600 copias de RNA de HCV por muestra.

40 La Fig. 2 y la Fig. 3 representan los resultados del ensayo de RT-PCR de los sobrenadantes del cultivo de células. El RNA898 mostró evidencia de una infección elevada. El cultivo testigo negativo no dio producción de RNA de HCV. Las Figs. 2 y 3 son ejemplos del elevado nivel de reproducibilidad de este ensayo de HCV, que no puede obtenerse usando ensayos de HCV similares.

### 45 Ejemplo 5

#### *Análisis a lo largo del tiempo del RNA del HCV asociado a la célula después de la infección por HCV*

50 Se prepararon cultivos de células fetales humanas como se describe en el Ejemplo 1 y se pusieron en placa sobre una capa alimentadora de células STO (Reid-99) tratadas con Mitomicina C. El número de células puestas en placa fue  $4 \times 10^5$  por pocillo. Esto representa aproximadamente  $1,9 \times 10^6$  Eq de bDNA Chiron por pocillo. Se añadió una parte alícuota de  $200 \mu\text{l}$  de suero RNA898 (o suero testigo negativo, no mostrado) a 0,8 ml de medio de cultivo. El cultivo se incubó con el virus durante 24 horas a 37°C. El inóculo se eliminó, y los cultivos se lavaron dos veces con 1 ml de medio de lavado IM, y después los cultivos fueron o bien alimentados con medio IM-HDM fresco o bien recolectados por rotura con tapón para lisis. Los cultivos fueron lavados de un modo similar, después alimentados o recolectados el  
55 día 2, el día 3, el día 6 y el día 8 después de la infección. El RNA total se extrajo de los lisados almacenados usando el método Rneasy (Qiagen). El RNA del HCV de las muestras se midió usando un ensayo RT-PCR cuantitativo multiplex específico para HCV. El límite de cuantificación (----LOQ) del ensayo RT-PCR para las muestras de RNA asociado a las células fue 100 copias de RNA de HCV por muestra. Todos los cultivos testigo negativos no mostraron RNA del  
60 HCV (datos no mostrados).

La Fig. 4 representa los resultados del ensayo RT-PCR del RNA asociado a las células. Los niveles más altos de RNA de HCV asociado a las células fueron observados los días 2 y 3 después de la infección y todavía estaba presente una cantidad significativo de RNA del HCV el día 6 después de la infección. El aumento del RNA del HCV desde el  
65 día 1 hasta el día 3 ocurrió después de la eliminación del inóculo externo, indicando así que el HCV está replicándose en las células.

## ES 2 328 466 T3

### Ejemplo 6

#### *Inhibición de la infección por HCV de células hepáticas fetales humanas por el agente antiviral VRT-106866*

5 Se prepararon cultivos de células fetales humanas como se describe en el Ejemplo 1 y se pusieron en placa sobre una capa alimentadora de células STO (Reid-99) tratadas con mitomicina C. El número de células puestas en placa fue  $4 \times 10^5$  por pocillo. Se añadió una parte alícuota de 200  $\mu$ l de suero RNA898 (o suero testigo negativo, no mostrado) a 0,8 ml de medio de cultivo y se realizó la incubación durante 24 horas a 37°C. Al cabo de 24 horas, el medio fue eliminado, los cultivos se lavaron, y el medio de cultivo fue reemplazado por IM-HDM que contiene diferentes  
10 concentraciones del compuesto VRT-106866 (de 0 a 10  $\mu$ M). Cada concentración de inhibidor fue analizada por triplicado, y el testigo positivo (sin inhibidor) se llevó a cabo por sextuplicado. Después de la incubación durante 48 horas en presencia de inhibidor, los sobrenadantes fueron eliminados y reemplazados por medio fresco que contiene la misma concentración de inhibidor. Después de otros 3 días más, el medio de cultivo fue eliminado, los cultivos se lavaron y la monocapa de células se rompió con tampón para lisis, y el RNA total se extrajo usando en método Rneasy  
15 (Qiagen) como se describe en el Ejemplo 2. El RNA del HCV de las muestras se midió usando un ensayo RT-PCR cuantitativo multiplex específico para HCV. El límite de cuantificación del ensayo RT-PCR para las muestras de RNA asociado a las células fue 100 copias de RNA de HCV por muestra.

20 La Fig. 5 representa gráficamente los resultados que se presentan como la media y la desviación estándar del “% de RNA del HCV testigo” (valor de la muestra/media de los valores del testigo positivo) a partir de los cultivos triplicados. La Fig. 5 indica que el VRT-106866 es un inhibidor eficaz de la infección por HCV.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición que comprende una mezcla de células que comprende células hepáticas y células hematopoiéticas liberadas desde el hígado de un ser humano de tres meses de edad o más después de la concepción, y células alimentadoras no humanas, en el que la composición puede producir más de aproximadamente 5000 copias de RNA del virus de la hepatitis C (HCV) en el medio, setenta y dos horas después de administrar el RNA898 del virus HCV, ("RNA898", depositado el 27 de marzo de 2001 en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209; n° de depósito de ATCC: PTA-3237) para la mezcla de células que consiste en  $4 \times 10^5$  células.

10 2. La composición según la reivindicación 1ª, en la que la composición es capaz de producir más de aproximadamente 10.000 copias de RNA de HCV setenta y dos horas después de administrar RNA898 para la mezcla de células que consiste en  $4 \times 10^5$  células.

15 3. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª o 2ª, en la que la composición es capaz producir más de aproximadamente 50.000 copias de RNA del HCV setenta y dos horas después de administrar RNA898 para la mezcla de células que consiste en  $4 \times 10^5$  células.

20 4. Una composición que comprende una mezcla de células preparada mediante las siguientes etapas:

(a) diseccionar el hígado de un ser humano de tres meses de edad o más después de la concepción, en un tampón que comprende EGTA;

25 (b) incubar el hígado diseccionado en un tampón que comprende colagenasa, para separar las células del hígado;

(c) eliminar los objetos de 40 micrómetros o más de las células separadas;

30 (d) eliminar los glóbulos rojos de las células separadas;

35 (e) resuspender las células de la etapa (d) en un medio libre de suero, que comprende calcio, ácidos grasos libres (FFAs), lipoproteína de alta densidad (HDL), nicotinamida, elementos traza, factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, transferrina e hidrocortisona, y opcionalmente cualquiera de los ingredientes elegidos entre el grupo que consiste en glucagón, factor de crecimiento hepático, etanolamina y factor de liberación de tirotrópina; y

(f) cultivar las células en el medio libre de suero de la etapa (e);

40 en donde la composición comprende además células alimentadoras no humanas.

5 5. La composición según la reivindicación 1ª, en la que la célula alimentadora no humana es la célula STO (Reid-99) ("STO (Reid-99)", depositada el 27 de marzo de 2001, en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209; n° de depósito ATCC: PTA-3236).

45 6. La composición según la reivindicación 4ª, en la que las células alimentadoras no humanas comprenden células STO (Reid-99).

50 7. La composición según la reivindicación 1ª o la reivindicación 4ª, en la que las células de la mezcla de células puede pasar a través de un filtro de 40 micrómetros.

8. La composición según la reivindicación 1ª o la reivindicación 4ª, en la que la mezcla de células comprende células que expresan alfa fetoproteína, células que expresan albúmina, y células que expresan glicoforina, pero está sustancialmente libre de células que expresan proteína CD34.

55 9. Una composición que comprende una mezcla de células que comprende células hepáticas y células hematopoiéticas liberadas del hígado de un ser humano de tres meses de edad o más después de la concepción, y células alimentadoras no humanas, en el que la composición comprende células que expresan alfa fetoproteína, células que expresan albúmina, y células que expresan glicoforina, pero está sustancialmente libre de células que expresan proteína CD34.

60 10. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª, 4ª o 9ª, que comprende además un medio de cultivo que comprende los siguientes ingredientes: medio libre de suero, calcio, FFAs, HDL, nicotinamida, elementos traza, EGF, insulina, transferrina e hidrocortisona y, opcionalmente, uno cualquiera de los ingredientes elegidos entre el grupo consistente en glucagón, factor de crecimiento hepático, etanolamina y factor de liberación de tirotrópina.

65 11. La composición según la reivindicación 10ª, en la que el medio de cultivo no comprende lipoproteína de baja densidad (LDL).

## ES 2 328 466 T3

12. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª, 4ª o 9ª, que comprende además una matriz extracelular.

13. La composición según la reivindicación 9ª, en la que la presencia de la proteína CD34 se detecta por un procedimiento elegido entre el grupo consistente en tinción por inmunofluorescencia o con inmunoperoxidasas.

14. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª, 4ª o 9ª, que comprende además un HCV.

15. La composición según la reivindicación 14ª, en la que el HCV es RNA898.

16. Un método para aislar y cultivar una mezcla de células, que comprende las etapas de:

(a) diseccionar un hígado de un ser humano de tres meses de edad o más después de la concepción, en un tampón que comprende EGTA;

(b) incubar el hígado diseccionado en un tampón que comprende colagenasa para separar las células del hígado;

(c) eliminar de las células separadas los objetos de 40 micrómetros o más;

(d) eliminar de las células separadas los glóbulos rojos;

(e) resuspender las células de la etapa (d) en un medio libre de suero, que comprende calcio, FFAs, HDL, nicotinamida, elementos traza, EGF, insulina, transferrina, hidrocortisona, y que opcionalmente comprende además uno cualquiera de los ingredientes elegidos entre el grupo consistente en: glucagón, factor de crecimiento hepático, etanolamina y factor de liberación de tirotrpina; y

(f) cultivar las células en el medio libre de suero de la etapa (e) y en presencia de células alimentadoras no humanas.

17. El método según la reivindicación 16ª, en el que los glóbulos rojos se eliminan centrifugando las células suspendidas a baja velocidad ( $50 \times g$ ) para sedimentar las células mayores durante aproximadamente 3-4 minutos, lavar las células que sedimentan y repetir las etapas de centrifugación y lavado.

18. El método según la reivindicación 16ª, en el que el medio libre de suero no contiene lipoproteína de baja densidad (LDL).

19. Un método para infectar células con HCV, que comprende la etapa de poner en contacto la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª, 4ª o 9ª, o la mezcla de células preparada según el método de las reivindicaciones 16ª o 18ª, con el virus HCV RNA898 o su equivalente infeccioso.

20. El método según la reivindicación 19ª, en el que el virus HCV se añade a la composición y se incuba durante aproximadamente 24 horas a aproximadamente 37 grados C en un volumen de aproximadamente 0,52 ml por  $cm^2$  antes de lavar las células en la composición.

21. Un método para ensayar la infección con HCV que comprende las etapas de:

(a) incubar la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª, 4ª o 9ª, o una mezcla de células preparada según el método de las reivindicaciones 16ª o 18ª, con una célula alimentadora no humana;

(b) poner en contacto las células de la composición con RNA898 o su equivalente infeccioso; y

(c) medir la presencia del RNA del HCV asociado con las células de la composición, el medio en el que se cultivan las células, o en las células y en el medio.

22. El método según la reivindicación 21ª, en el que la célula alimentadora no humana es la célula STO (Reid-99).

23. El método según la reivindicación 23ª, en el que la cantidad de RNA del HCV se mide comparando (a) la cantidad de RNA del HCV presente asociado con las células o el medio en el que las células son cultivadas, con (b) una cantidad de RNA procedente de un segundo virus que se usa como testigo interno.

24. El método según la reivindicación 23ª, en el que el segundo RNA viral es procedente del virus de la diarrea viral bovina (BVDV).

25. Un método para evaluar la capacidad de un compuesto para afectar a la producción de un HCV, que comprende las etapas de:

(a) incubar la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª, 4ª o 9ª o una mezcla de células preparada según el método de la reivindicación 16ª o 18ª, con una célula alimentadora no humana;

## ES 2 328 466 T3

- (b) poner en contacto las células de la composición con RNA898;
- (c) administrar el compuesto a la composición antes o después de poner en contacto las células con RNA898 o su equivalente infeccioso;
- (d) medir el HCV asociado con las células, con el medio en el que las células son cultivadas, o con las células y el medio.

26. El método según la reivindicación 25<sup>a</sup>, en el que el compuesto inhibe la producción de HCV.

27. El método según la reivindicación 25<sup>a</sup>, en el que una diversidad de compuestos son cribados simultáneamente en cuanto a su capacidad para inhibir la producción de HCV.

28. El método según la reivindicación 25<sup>a</sup>, que comprende además la etapa de comparar la medida de la etapa (d) con la cantidad de HCV asociado con las células testigo, con el medio en el que se cultivan las células testigo, o con las células testigo y el medio, en el que las células testigo han sido sometidas a las etapas (a) a (d) excepto que no se ha administrado compuesto o un compuesto inactivo conocido.

29. El método según la reivindicación 25<sup>a</sup>, en el que la célula alimentadora no humana es la célula STO (Reid-99).

30. El método según la reivindicación 25<sup>a</sup>, en el que la presencia de HCV se mide determinando la cantidad de RNA del HCV asociado con las células o el medio en el que se cultivan las células.

31. El método según la reivindicación 30<sup>a</sup>, en el que la cantidad de RNA del HCV se determina mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

32. El método según la reivindicación 31<sup>a</sup>, en el que la cantidad de RNA del HCV se mide comparando (a) la cantidad de RNA del HCV asociado con la célula o el medio en el que se cultivan las células, (b) una cantidad de RNA procedente de un segundo virus que se usa como testigo interno.

33. El método según la reivindicación 32<sup>a</sup>, en el que el segundo virus es el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV).

34. El método según la reivindicación 16<sup>a</sup>, en el que las células alimentadoras no humanas comprenden STO (Reid-99).

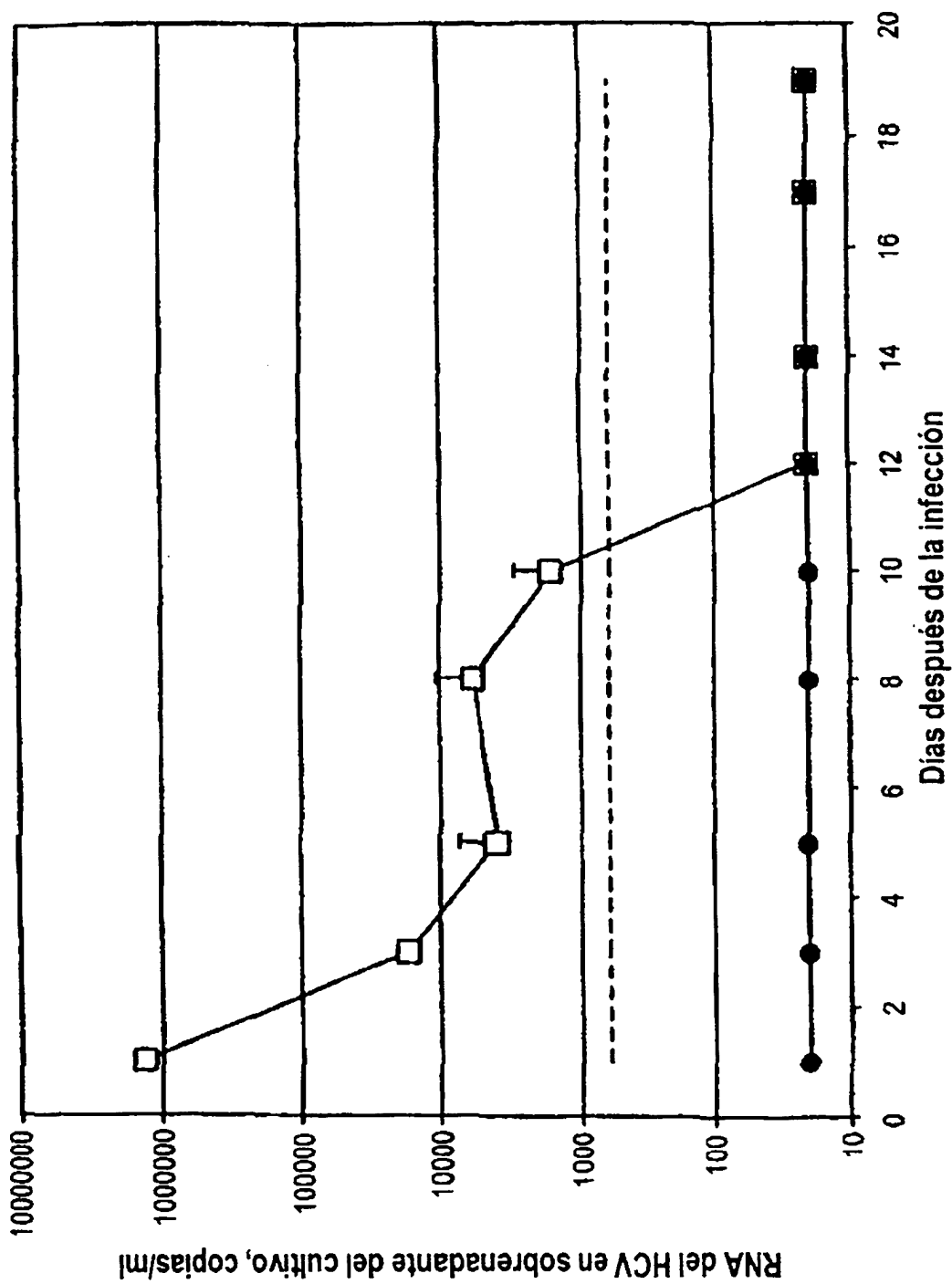


FIG. 1

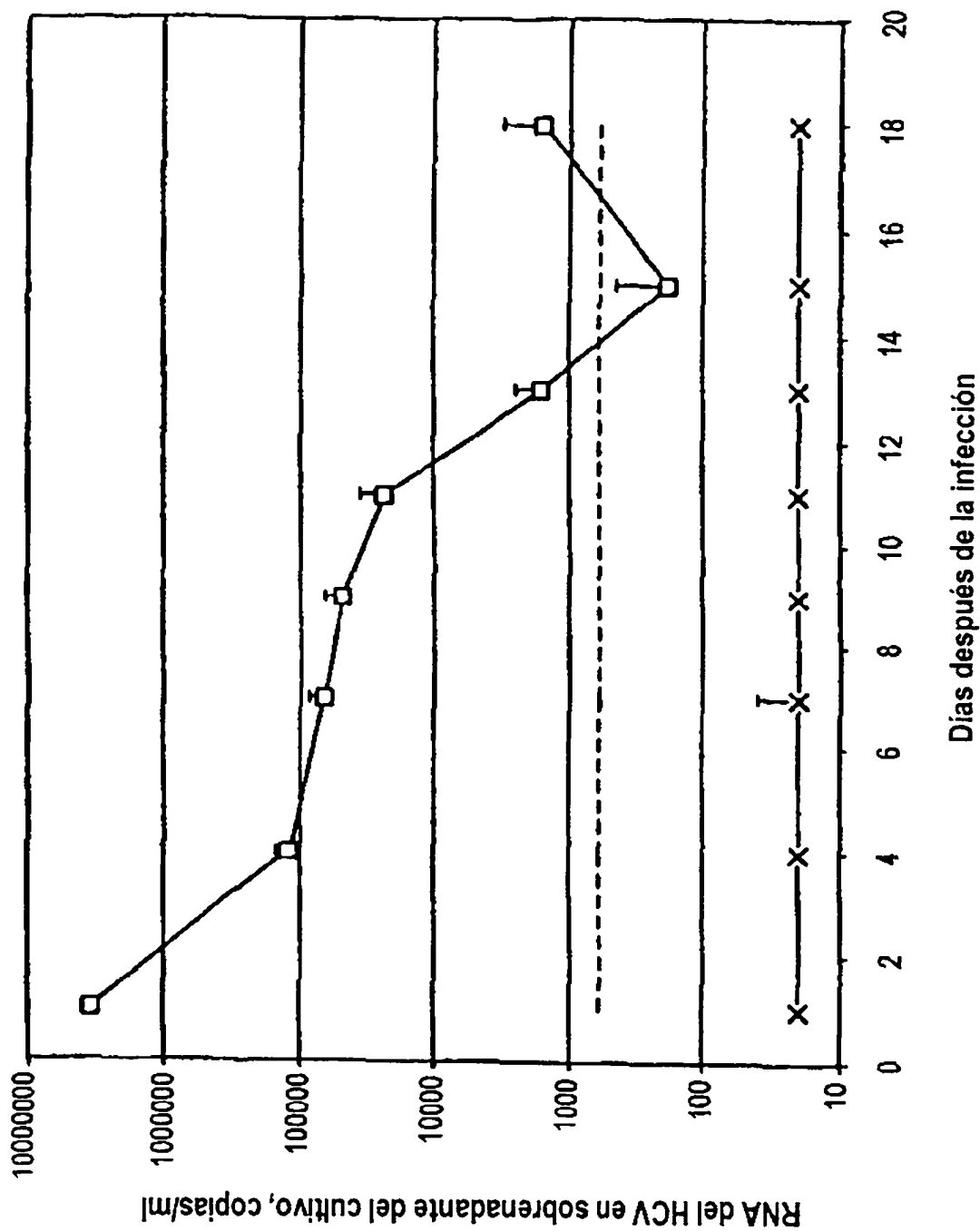


FIG. 2

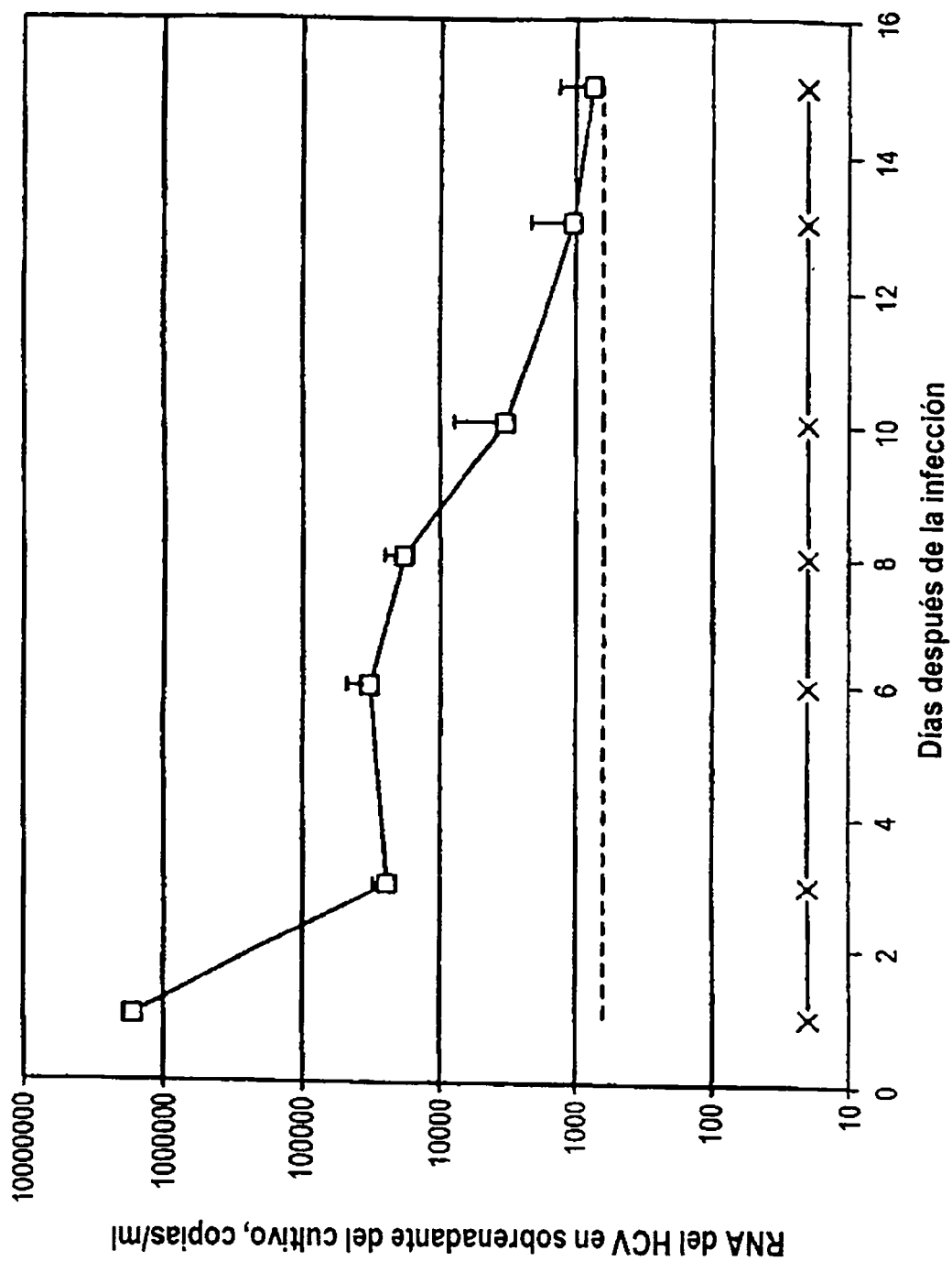
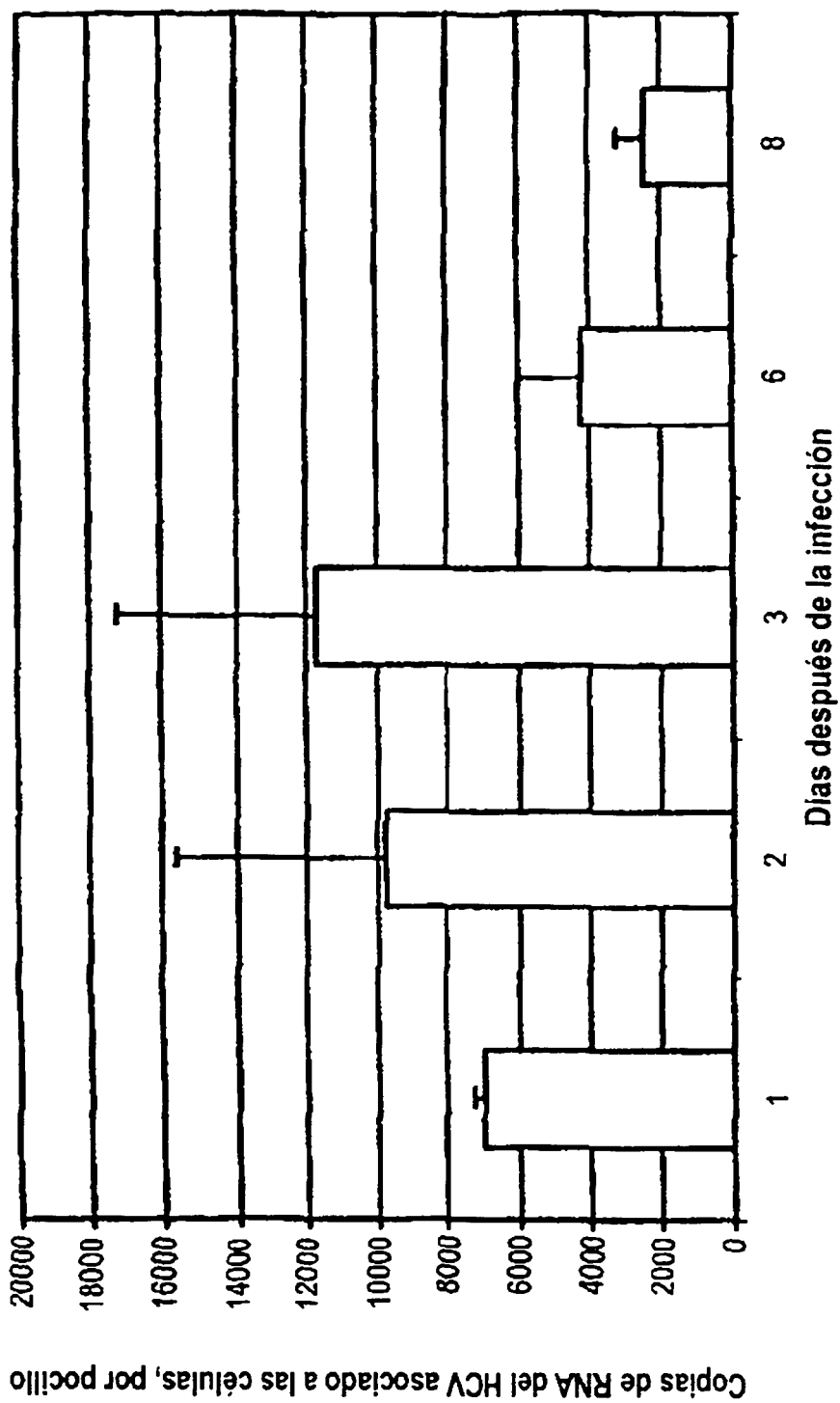
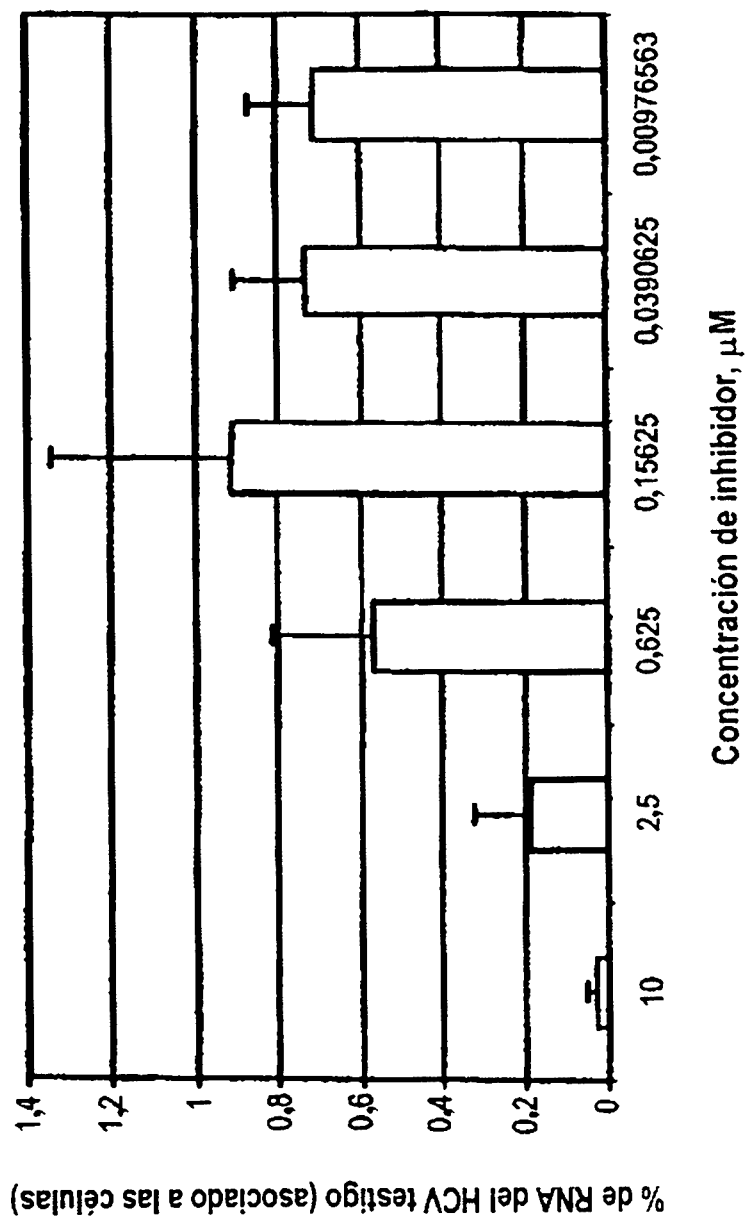


FIG. 3



**FIG. 4**



**FIG. 5**