



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 636**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01914893 .1**

96 Fecha de presentación : **16.03.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1265480**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.12.2002**

54 Título: **Modelo animal quimérico susceptible a la infección por virus de la hepatitis C humano.**

30 Prioridad: **17.03.2000 US 528120**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2010

73 Titular/es: **KMT Hepatech, Inc.**
Research Transition Facility
Room 2079, 8308-114 Street
Edmonton, Alberta T6G 2E1, CA

72 Inventor/es: **Kneteman, Norman M.;**
Tyrrell, Lorne D. y
Mercer, David F.

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 346 636 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

Modelo animal quimérico susceptible a la infección por virus de la hepatitis C humano.

5 La presente invención está relacionada, en general, con el campo de las enfermedades infecciosas, particularmente con modelos de patógenos virales.

La enfermedad hepática humana producida por el virus de la hepatitis C (VHC) se ha presentado a lo largo de la última década como uno de los retos más difíciles con los que se enfrenta la comunidad médica mundial. El esclarecimiento de la secuencia viral en 1989 (Choo, *et al.* Science 244, 359-361 (1989)) inició la era del estudio coordinado del VHC; actualmente se estima que están infectadas hasta 175.000.000 personas (Sarbah *et al.* Cell 62, 447-456 (1990)). VHC es el tipo más común de hepatitis viral crónica con una prevalencia estimada del 1-2% en países desarrollados. La hepatitis crónica por el VHC deriva en cirrosis hepática en, por lo menos, un 25% de los pacientes afectados y, tras el desarrollo de la cirrosis, se estima que cada año el 1-4% de los pacientes desarrollan carcinoma hepatocelular. En 15 Norteamérica el VHC es actualmente la indicación más común para trasplante hepático.

Actualmente, la terapia antiviral con una combinación de interferón y ribavirina es eficaz en pacientes seleccionados, pero muchos fallan en la respuesta o tienen baja tolerancia a la terapia, subrayando la necesidad de una mejora. Las tasas de respuesta prolongadas para la monoterapia con interferón oscilan entre un 20-25%, mientras que la terapia de combinación con interferón y ribavirina ha mostrado tasas de respuesta prolongada de hasta el 40%. A pesar de que están en desarrollo nuevos fármacos antivirales que se dirigen a distintas partes del genoma viral, el progreso se ha visto entorpecido severamente por la falta de un modelo animal sólido y eficaz en cuanto al coste de VHC. Los únicos hospedadores naturales del VHC son los seres humanos y los chimpancés, sin que ninguno de los dos sea válido para ensayos antivirales a gran escala.

25 La falta de un modelo animal pequeño reproducible para la infección por VHC ha limitado mucho la investigación de distintos factores inmunes que contribuyen a la enfermedad, así como de candidatos de vacuna para la inmunoterapia de la infección crónica por VHC. En el caso de la infección por VHC, varios informes han demostrado la presencia de un cambio de Th1 a Th2 y de células T CD4+ y CD8+ con especificidad de antígeno de VHC en estudios *in vitro* realizados en células T aisladas a partir de los individuos infectados con VHC. Por otra parte, se ha visto que en pacientes infectados por VHC no virémico se estimula una fuerte respuesta Th1 contra múltiples antígenos de VHC incluso muchos años después de las infecciones, lo cual sugiere que el control de la replicación de VHC puede depender de la activación eficaz de Th1 (Cramp *et al.* Gut 44:424-429 (1999)). La resolución de estas preguntas para proporcionar un mejor entendimiento de la respuesta inmune a VHC, y por lo tanto una nueva percepción en relación con el desarrollo de vacunas y terapias eficaces, no se puede conseguir fácilmente sin un modelo animal adecuado.

35 Durante los últimos años, se han hecho avances significativos en el desarrollo de modelos animales para el virus de la hepatitis B. No obstante, a pesar de su similitud en la fonética del nombre, el virus de la hepatitis B (VHB) humano y el virus de la hepatitis C (VHC) humano son virus completamente distintos, y por eso las investigaciones relacionadas con la infección por VHB no pueden extrapolarse fácilmente a la infección por VHC. Ambos virus se denominan virus de la "hepatitis" principalmente porque VHB y VHC infectan y se replican en el hígado. Aparte de esto, VHB y VHC no se parecen más que VIH y VEB, que afectan, cada uno, al sistema inmune. De hecho, VHB y VHC son tan diferentes que ni siquiera pertenecen a la misma familia filogenética. VHB pertenece a la familia de *hepadnavirus* con un genoma de ADN bicatenario, mientras que VHC es miembro de la familia de *flavivirus*, que se basa en un genoma de una sola cadena positiva de ARN.

40 VHB y VHC también difieren en su infectividad. VHC es menos infeccioso que una dosis equivalente de VHB, como se evidencia por las diferencias en su porcentaje de adquisición por el personal hospitalario tras las lesiones por pinchazo con agujas. Las infecciones por VHB se producen en un 2-40% de los sucesos de pinchazo con agujas contaminadas por VHB, mientras que las infecciones por VHC se producen sólo en el 3-10% de los sucesos de pinchazo con agujas contaminadas por VHC. Estas observaciones sugieren que VHC es aproximadamente de tres a cuatro veces menos infeccioso que VHB (Shapiro Surgical Clin North Amer. 75(6):1047-56 (1995)).

55 VHB y VHC difieren mucho en sus requisitos para la replicación así como en la carga viral durante la infección. VHB es capaz de replicarse en sistemas menos diferenciados (por ejemplo, células HepG2, Sells *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1005 (1987)). Por el contrario, la replicación de VHC puede depender de la presencia de hepatocitos no transformados (véase, por ejemplo, Ito *et al.* J. Gen. Virol. 77:1043 (1995)). Los títulos virales de pacientes infectados con VHC son generalmente menores que los de pacientes infectados con VHB. Los pacientes infectados con VHB tienen niveles que varían entre 10^5 y 10^9 partículas por ml, comparado con los niveles de 10^2 a 10^7 partículas por ml de las infecciones por VHC. Estas diferencias en el título viral pueden deberse, al menos en parte, al porcentaje relativo de eliminación de partículas virales. Además, el número de copias virales por célula también es muy bajo en la infección por VHC (por ejemplo, generalmente menos de 20 copias por célula (Dhillon *et al.* Histopathology 26:297-309 (1995)). Esta combinación de títulos virales bajos y bajos números de copias virales por célula quiere decir que un número significativo de hepatocitos humanos debe estar infectado y produciendo virus para que pueda detectarse la infección dentro del suero.

65 La gama limitada de hospedadores de VHB humano y de VHC humano ha supuesto un problema en el desarrollo de modelos de infección *in vitro* e *in vivo*. Los seres humanos y los chimpancés son los únicos animales suscepti-

bles a la infección por el VHB humano; los seres humanos, los chimpancés y tres musarañas son susceptibles a la infección por el VHC humano (Xie *et al.* Virology 244:513-20 (1998), que informa sobre la infección transitoria de tres musarañas con el VHC). El VHB humano infectará a células hepáticas humanas aisladas en cultivo (véase, por ejemplo, Sureau Arch. Virol. 8:3-14 (1993); Lampertico *et al.* Hepatology 13; 422-6 (1991)). Se ha notificado que el VHC infecta a cultivos primarios de hepatocitos humanos; sin embargo, las células no soportan la producción de viriones (Fournier *et al.* J Gen Virol 79(Pt 10):2367-74 (1998)). Se necesita el desarrollo de un modelo satisfactorio *in vivo* para proporcionar un medio clínicamente más relevante para ensayar agentes terapéuticos candidatos. La gama extremadamente estrecha de hospedadores de VHB y VHC ha dificultado mucho el desarrollo de modelos animales. Los modelos animales actuales de VHB y VHC no implican el curso normal de la infección, requieren el uso de células hepáticas humanas previamente infectadas o ambas cosas (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.709.843; 5.652.373; 5.804.160; 5.849.288; 5.858.328; y 5.866.757; que describen un modelo de ratón quimérico para la infección por VHB mediante el trasplante de células hepáticas humanas infectadas con VHB debajo de la cápsula renal de ratón; el documento WO 99/16307 and Galun *et al.* J. Infect. Dis. 172:25-30 (1995), que describe el trasplante de hepatocitos humanos infectados con VHC en hígado de ratones inmunodeficientes; Bronowicki *et al.* Hepatology 28:211-8 (1998), que describe la inyección intraperitoneal de células hematopoyéticas infectadas con VHC en ratones SCID; y Lerta *et al.* Hepatology 28(4Pt2):498A (1998), que describe ratones transgénicos para el genoma de VHC). La infección por el VHB humano se imita bastante bien por la infección de marmotas con el virus de la hepatitis de la marmota (VHM) y por la infección de patos pequineses con el virus de la hepatitis del pato (VHP). Marmotas infectadas con VHM y patos infectados con VHP se han utilizado con éxito para identificar fármacos eficaces contra la infección por el VHB humano de seres humanos. Sin embargo, no se ha identificado ningún modelo animal de infección análogo para el VHC humano.

En la ausencia de un hospedador no humano práctico, el modelo animal más deseable sería un modelo animal quimérico que permitiese la infección de células hepáticas humanas por medio de la vía normal de infección, preferiblemente un modelo de ratón susceptible a la infección viral por medio de inoculación intravenosa y que pudiera soportar la infección crónica. Desafortunadamente, el desarrollo de ratones que tengan hígados quiméricos con hepatocitos humanos susceptibles a la infección por VHB y VHC, y que mantengan la replicación viral y la producción de viriones a niveles sostenibles clínicamente relevantes, no ha resultado ser un asunto sencillo. El campo del trasplante hepático xenogénico se ha movido muy lentamente y se ha encontrado con muchos obstáculos.

Para estudiar trastornos hemorrágicos e hipofibrinogenemia en recién nacidos, se desarrolló un ratón transgénico para una construcción de un activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (Alb-uPA) (Heckel *et al.* Cell 62:447-56 (1990); Sandgren *et al.* Cell 66:245-56 (1991)). El transgén Alb-uPA incluye un gen de uroquinasa murina bajo el control del promotor de albúmina, lo que tiene como resultado la focalización de la producción de uroquinasa en el hígado y la producción de un estado profundamente hipofibrinogénico. También se descubrió que este transgén estaba asociado con la aceleración de la muerte de los hepatocitos. Un trabajo posterior con este animal transgénico demostró que hepatocitos individuales que espontáneamente eliminaban el transgén adquirían una ventaja significativa en la supervivencia y replicación, dando como resultado una repoblación del hígado con estas células no transgénicas (Sandgren *et al.* (1991), *supra*). El ratón transgénico Alb-uPA ha resultado ser susceptible al trasplante de células hepáticas de ratones no transgénicos (Rhim *et al.* Science 263:1149-52 (1994)). El ratón transgénico Alb-uPA se usó también con éxito para generar ratones que tuvieran hígados quiméricos con hepatocitos de rata (Rhim *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4942-6 (1995)) o hepatocitos de marmota (Petersen *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:310-5 (1998)). Sin embargo, estos avances siguen estando un paso por detrás del desarrollo de un modelo animal susceptible a la infección por el VHC. La producción de un ratón con un trasplante xenogénico de otro miembro de la familia *Rodentia* no es ni mucho menos tan difícil o inesperado como la producción de un ratón con un trasplante xenogénico de un animal de una familia diferente, por ejemplo, un ser humano, y se esperaría mucho menos que pudiera conseguirse un alto grado de quimerismo o que esos animales quiméricos pudieran soportar una infección por el VHC. Por ejemplo, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es el estímulo más potente de la regeneración de hepatocitos *in vivo*; comparando los datos de secuencia, se demostró que el HGF de ratón tenía un 98,5% de homología de secuencia de aminoácidos con el HGF de rata, y sólo el 90,9% con el HGF humano (Liu *et al.* Biochim et Biophys Acta 1216; 299-303 (1993)). No hubo garantías de éxito.

Existe la necesidad en el campo de una quimera de hígado humano-de ratón susceptible a la infección crónica con VHC y que tenga una producción viral a niveles clínicamente relevantes. La presente invención se centra en este problema.

Descripción resumida de la invención

La presente invención presenta un ratón hospedador transgénico quimérico como se expone en la reivindicación 1. La invención también presenta métodos para identificar agentes terapéuticos candidatos, por ejemplo, agentes que tienen una actividad antiviral contra la infección por VHC.

Un objetivo primario de la invención es proporcionar un modelo de ratón que esté infectado con el VHC humano mediante la vía normal de infección.

Una ventaja de la invención es que el modelo de ratón proporciona el primer caso de un animal que está infectado por VHC mediante la vía normal de infección y además que puede infectarse de manera crónica, consistente y estable a títulos virales que pueden igualar los títulos virales en los seres humanos infectados con VHC.

Otra ventaja más de la invención es que la producción del modelo de ratón no necesita obtener o manipular células infectadas con VHC. Por tanto, la invención evita la necesidad de obtener hepatocitos de donadores humanos infectados con VHC o de cultivar e infectar hepatocitos humanos *in vitro*.

- 5 Estos y otros objetivos, ventajas y características de la invención se pondrán de manifiesto para los expertos en la materia tras la lectura de los detalles del modelo animal y los métodos para su uso como se describe más completamente a continuación.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La Fig. 1 es una transferencia de Western de la producción de albúmina humana (AH) en muestras de suero receptoras a lo largo del tiempo en animales que portan o no el transgén Alb-uPA.

- 15 Las Figs. 2A-2F son fotografías del análisis histoquímico del quimerismo humano en hígados de ratón. La Fig. 2A es una sección H y E de baja intensidad de un hígado de ratón control que se toma de un hígado no trasplantado homocigoto Alb-uPA, que muestra arquitectura celular uniforme. La Fig. 2B es una sección H y E de baja intensidad de un ratón homocigoto trasplantado, que muestra un gran nódulo de tejido que comprime el parénquima hepático circundante derivado del hospedador. Las Figs. 2C y 2D muestran las secciones de control de hígado de ratón y humano respectivamente, ambas inmunoteñidas con un anticuerpo anti-hepatocito humano, demostrando que el procedimiento
20 inmunohistoquímico claramente tiñe células humanas, pero no células murinas. La Fig. 2E es una sección teñida H y E de alta intensidad de hígado homocigoto trasplantado, que muestra un nódulo de hepatocitos sanos que comprime el tejido circundante. La Fig. 2F es una sección consecutiva inmunoteñida para el antígeno de hepatocito humano, que muestra que el nódulo más oscuro está comprendido por células humanas, siendo el parénquima circundante de origen murino.

- 25 La Fig. 3 es un gráfico que ilustra la producción de albúmina de injertos de hepatocitos humanos (1×10^6 células) en cuatro receptores que portan el transgén Alb-uPA.

- 30 La Fig. 4 es una transferencia de Western de la producción de AH en un receptor positivo para Alb-uPA después del trasplante que muestra una intensidad de señal prolongada. AH-patrón de albúmina humana (50 ng); Con - control de suero de ratón no trasplantado.

- 35 La Fig. 5 es una fotografía de una transferencia de Western que muestra la detección de la albúmina humana (AH) que se produce a partir de hepatocitos humanos en hígados quiméricos (las muestras representan ratones individuales). Tipo silvestre (-); receptores transgénicos (+). AH-patrón de albúmina humana; MS-suero de ratón no trasplantado (control negativo).

- 40 La Fig. 6 es una fotografía de una transferencia de Southern para la determinación de la cigosidad Alb-uPA del ADN genómico; una relación T/E de ~ 2 es característica de ratones hemicigotos, mientras que los homocigotos tienen una relación de ~ 4 .

- 45 La Fig. 7 es una fotografía de una transferencia de Western que muestra la producción a largo plazo de AH en receptores de trasplante hemicigotos (+/-) u homocigotos (+/+) para el transgén Alb-uPA. AH-patrón de albúmina humana; MS-suero de ratón no trasplantado (control negativo).

- La Fig. 8 es una figura que muestra una nube de puntos vertical de la producción de AH cuantificada a partir de muestras de suero de ratones receptores homocigotas (círculos cerrados) o hemicigotas (círculos abiertos). Las líneas de tendencia media se muestran para ambos grupos.

- 50 La Fig. 9 es una figura que muestra aumento de los títulos de ARN de VHC durante las primeras 4-7 semanas después de la inoculación en receptores de injertos transgénicos homocigotos después de la inoculación con suero humano infectado con VHC. Cada línea representa títulos en serie de un receptor de injerto individual.

- 55 La Fig. 10A es una fotografía de un gel que muestra la detección de la cadena (+) de ARN (panel superior) o la cadena (-) de ARN (panel inferior) mediante un protocolo de PCR para ARN con una transcriptasa inversa termoestable rTth con cebadores específicos de cadena. Las denominaciones de letras (A a J) son muestras de control y las denominaciones numéricas (1 a 10) representan muestras individuales de ARN aisladas de los hígados de diez ratones homocigotos a los que se realizó el trasplante y después se inoculó con suero humano infectado con VHC. A, ratón de control de tipo silvestre, no trasplantado, no infectado; B, ratón trasplantado heterocigoto inoculado con VHC; C, ratón trasplantado homocigoto, no inoculado con VHC; D, suero tomado de un ser humano infectado; E, escalera de ADN patrón; F, unión de la sonda marcada a secuencias de ADN diana generadas a partir de cadenas (+) (panel superior) o cadenas (-) (panel inferior) de ARN viral; G, ARN hepático de ratón ($10 \mu\text{g}$) al que se le ha añadido ARN sérico de un ser humano positivo para VHC; H, ARN hepático de ratón ($10 \mu\text{g}$) al que se le han añadido 10^6 copias de ribosonda radioinerte antisentido (superior) o sentido (inferior); I, ARN hepático de ratón ($10 \mu\text{g}$) al que se le ha añadido 10^6 copias de ribosonda radioinerte sentido (panel superior) o antisentido (panel inferior); J, las ribosondas que hibridan con $10 \mu\text{g}$ de ARN hepático del ratón, todas las etapas posteriores son idénticas excepto la adición de RNasa. La Fig. 10B es un análisis de series de dilución.
- 65

La Fig. 10B es una fotografía de un gel de un análisis de series de dilución de animales seleccionados usando el protocolo de PCR para ARN con una transcriptasa inversa termoestable rTth. Las denominaciones de letras y números son las mismas que en la Fig. 10A.

5 La Fig. 10C es una fotografía de un gel que muestra la detección de la cadena (+) ARN de VHC (panel superior), la cadena (-) ARN de VHC (panel medio) o ARN de β -actina (panel inferior) mediante un ensayo de protección de RNasa. Los carriles de control son como se ha indicado anteriormente; el ratón 10 se analizó sólo mediante el método RPA. Las denominaciones de letras y números son las mismas que en la Fig. 10A.

10 Las Figs. 11A y 11B son fotografías que muestran el análisis inmunohistoquímico de secciones hepáticas de control (Fig. 11A) e infectadas con VHC (Fig. 11B), usando anticuerpo de hormiga anti-VHC.

15 La Fig. 12 es una fotografía de una transferencia de Western para detectar Apo B 100 en suero de un animal quimérico transplantado Alb/uPA (carril 2). El suero humano (carril 1) y el suero de Alb/uPA un animal no trasplantado (carril 3) sirvieron como controles positivos y negativos, respectivamente.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

20 Antes de que la presente invención se describa, debe entenderse que esta invención no se limita a metodologías, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales, construcciones y reactivos particulares descritos, ya que estos pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología que se usa en la presente memoria tiene como fin la descripción de realizaciones particulares solamente y no se pretende que sea limitante, puesto que el alcance de la presente invención sólo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.

25 Cuando se da un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a no ser que el contexto claramente indique lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo también se describe específicamente. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor declarado o valor intermedio en un intervalo declarado y cualquier otro valor declarado o intermedio en un intervalo declarado lo abarca la invención. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse
30 independientemente en el intervalo y cada intervalo en el que cualquier, ningún o ambos límites se incluyen en los intervalos más pequeños también los abarca la invención, sometido a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo declarado. Cuando el intervalo declarado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de estos límites incluidos también se incluyen en la invención.

35 A no ser que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente memoria tienen el mismo significado que el que entiende de manera común un experto habitual en la materia a la cual pertenece la invención. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente memoria se puede usar en la práctica o en el ensayo de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación.

40 Debe observarse que como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un/una”, “y” y “el/la” incluyen referencias plurales a no ser que el contexto claramente indique lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una célula hepática” incluye una pluralidad de dichas células hepáticas y la referencia al “animal no humano” incluye la referencia a uno o más animales no humanos y equivalentes de los mismos conocidos
45 por los expertos en la materia y así sucesivamente.

Las publicaciones que se analizan en la presente memoria se proporcionan únicamente para su descripción previa a la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo que aparece en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder dicha publicación en virtud de la
50 invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser distintas de las fechas de publicación actuales que pueden necesitar una confirmación de manera independiente.

Definiciones

55 “Quimérico” como se usa en la presente memoria (por ejemplo, “animal quimérico” o “hígado quimérico”) pretende describir un órgano o animal que comprende tejidos o células xenogénicos. Es de interés particular un animal quimérico, en el que el animal es quimérico debido a la presencia de hepatocitos humanos injertados en el hígado del animal.

60 Mediante “inmunocomprometido” se entiende que el animal no puede crear una respuesta inmune completa o significativa contra el tejido o las células xenogénicas, por ejemplo, cualquier respuesta inmune del animal hospedador es tal que es ineficaz en el rechazo de las células trasplantadas.

El término “transgén” se usa en la presente memoria para describir material genético que ha sido o va a ser insertado artificialmente dentro del genoma de un mamífero, particularmente una célula de mamífero de un animal vivo.
65

Mediante “animal transgénico” se entiende un animal distinto del ser humano, normalmente un mamífero, que tiene una secuencia de ácido nucleico no endógena (por ejemplo, heteróloga) presente como un elemento extracromosomal

en una parte de sus células o establemente integrado en su ADN de línea germinal (es decir, en la secuencia genómica de la mayoría o de todas sus células). El ácido nucleico heterólogo se introduce en la línea germinal de estos animales transgénicos mediante la manipulación genética de, por ejemplo, embriones o células madre embrionarias del animal hospedador de acuerdo con métodos que se conocen bien en la técnica. Un “transgén” pretende referirse a tal ácido nucleico heterólogo, por ejemplo, un ácido nucleico heterólogo en la forma de una construcción de expresión (por ejemplo, para la producción de un animal transgénico “knock in”) o un ácido nucleico heterólogo que tras la inserción en o adyacente a un gen diana da como resultado una disminución en la expresión génica diana (por ejemplo, para la producción de un animal transgénico “knock out”).

Un “knock out” de un gen significa una alteración en la secuencia del gen que da como resultado una disminución de la función del gen diana, preferiblemente tal que la expresión del gen diana no sea detectable o sea insignificante. Los animales transgénicos knock out pueden comprender un knock out heterocigoto de un gen diana o un knock out homocigoto de un gen diana. Los “knock outs” como se usan en la presente memoria también incluyen knock outs condicionales, en los que la alteración del gen diana puede aparecer tras, por ejemplo, la exposición del animal a una sustancia que promueva la alteración del gen diana, la introducción de una enzima que promueva la recombinación en el sitio del gen diana (por ejemplo, Cre en el sistema Cre-lox) u otros métodos para dirigir la alteración del gen diana después del nacimiento.

Un “knock in” de un gen diana significa una alteración en el genoma de una célula hospedadora que da como resultado la expresión alterada (por ejemplo, expresión aumentada (incluyendo ectópica) o disminuida) de un gen diana, por ejemplo, mediante la introducción de una copia adicional del gen diana o insertando operativamente una secuencia reguladora que proporciona la potenciación de la expresión de una copia endógena del gen diana. Los transgénicos “knock in” pueden comprender un knock in heterocigoto del gen diana o un knock in homocigoto de un gen diana. Los “knock ins” también abarcan knock ins condicionales.

Mediante “unido operativamente” se entiende que una secuencia de ADN y una/s secuencia/s reguladora/s está/s conectada/s de una manera que permite la expresión génica cuando las moléculas adecuadas (por ejemplo, proteínas activadoras de la transcripción) están unidas a la/s secuencia/s reguladora/s.

Mediante “insertado operativamente” se entiende que una secuencia de nucleótidos de interés se posiciona adyacente a una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción y la traducción de la secuencia de nucleótidos introducida de interés.

La expresión “agente terapéutico” como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier molécula, por ejemplo, proteínas o pequeñas moléculas, compuestos farmacéuticos, anticuerpos, moléculas antisentido, ribozimas y similares, útil en el tratamiento de una enfermedad o afección, por ejemplo, una afección hepática, incluyendo, pero no necesariamente limitada a la infección por VHC. Por ejemplo, los agentes terapéuticos de la invención incluyen moléculas que inhiben, mejoran o alivian los síntomas que se asocian con una infección viral, y en particular con VHC.

La expresión “forma farmacéutica unitaria” como se usa en la presente memoria se refiere a unidades discretas físicamente adecuadas como dosis unitarias para sujetos (por ejemplo, animales, normalmente seres humanos), conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de agente/s en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las memorias para las formas farmacéuticas unitarias nuevas de la presente invención dependerán de una variedad de factores que incluyen, pero no necesariamente limitados a, el agente particular que se emplea y el efecto a conseguir y la farmacodinámica asociada con cada compuesto en el hospedador.

Los términos “tratamiento”, “tratando” y similares como se usan en la presente memoria para significar generalmente la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completamente o parcialmente una enfermedad o síntomas de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. “Tratamiento” como se usa en la presente memoria cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) el prevenir que la enfermedad ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que todavía no se le ha diagnosticado como que la tenga; (b) la inhibición de la enfermedad, es decir, la detención de su desarrollo o (c) el alivio de la enfermedad, es decir, produciendo la regresión de la enfermedad.

Visión General

La presente invención se basa en el desarrollo de un modelo animal murino para el virus de la hepatitis C (VHC). El modelo animal murino normalmente implica el trasplante de hepatocitos humanos en el hígado de un ratón transgénico en una fase adecuada del desarrollo del hospedador, preferiblemente poco después del nacimiento del hospedador. Sin quedar ligado a la teoría, el éxito en el desarrollo del modelo se debe al menos en parte a lo siguiente: 1) el uso de un hospedador que tiene antecedentes de inmunodeficiencia, de este modo se evita la destrucción inmune de células xenogénicas introducidas (humanas); 2) el uso de un animal transgénico que contiene un transgén para uroquinasa ligado a un promotor de albúmina, que está presente en el estado homocigoto, por lo tanto, proporcionando un estímulo potente en curso para el crecimiento de hepatocitos y la división celular; y, 3) la introducción de hepatocitos humanos viables en el animal hospedador en el tiempo adecuado en el ciclo de vida del hepatocito y en una etapa temprana

del desarrollo del animal hospedador para proporcionar supervivencia a largo plazo de un gran número y/o un alto porcentaje de células humanas en el hospedador.

Hasta donde alcanza el conocimiento de los inventores, la presente invención proporciona por primera vez un hospedador distinto de un primate para su uso como un modelo de la infección por VHC que puede infectarse a través de la vía normal de infección (por ejemplo, mediante inoculación intravenosa o intraperitoneal). Este aspecto de la invención es particularmente importante para su uso en el desarrollo de agentes antivirales. Además, el modelo animal de la invención no necesita el uso de hepatocitos humanos preinfectados, evitando así la manipulación de tejido infectado aislado de donadores humanos o la infección de los hepatocitos humanos *in vitro* antes de la implantación.

Por consiguiente la invención presenta un ratón quimérico como se ha descrito anteriormente, al igual que un método para producir un ratón quimérico mediante el trasplante de hepatocitos humanos en el hígado de un ratón inmunocomprometido, que porta un transgén de uroquinasa ligado a albúmina. Además la invención presenta métodos de uso del modelo de ratón quimérico que se describe en la presente memoria, incluyendo métodos de identificación de agentes para el tratamiento de infecciones mediante patógenos microbianos hepatotrofos.

Ahora se describirá la invención con más detalle.

Animales Hospedadores

El animal hospedador generalmente es un ratón inmucomprometido que tiene una producción hepática aumentada del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) y en el que los hepatocitos humanos se pueden injertar y mantener (por ejemplo, un transgén Alb-uPA, véase, por ejemplo, Heckel *et al* Cell 62:447 (1990)). Los ratones adecuados para su uso en la presente invención se pueden producir a partir de cualquiera de una variedad de cepas ancestrales incluyendo, pero no necesariamente limitado a, las cepas C.B-17, C3H, BALB/c, C57131/6, AKR, BA, B10, 129, *etc.* El animal hospedador puede ser macho o hembra.

Antecedentes Inmunocomprometidos

Están disponibles hospedadores mamíferos inmunocomprometidos adecuados para la implantación y que tienen la incapacidad inmune deseada. Como alternativa, aunque menos preferida, los animales inmunocomprometidos se pueden generar a partir de animales inmunocompetentes mediante, por ejemplo, la administración de uno o más compuestos (por ejemplo, ciclosporina) y otros métodos bien conocidos en la técnica. En general, el hospedador inmunocomprometido no puede crear una respuesta inmune completa contra los tejidos o células xenogénicos. Son de interés particular los animales que están inmunocomprometidos debido a defectos genéticos que dan como resultado la inhabilidad para experimentar reorganización del ADN de la línea germinal en los loci que codifican inmunoglobulinas y receptores de antígenos de células T. También son de interés animales inmunocomprometidos que tienen uno o más defectos genéticos que conducen a números significativamente disminuidos o no detectables de células T y células B funcionales, y células citotóxicas (NK) en relación con los normales.

Son de interés particular los ratones que tienen una mutación homocigota en el locus *scid* (*scid/scid*). La mutación *scid* está asociada con una deficiencia en la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN y previene la recombinación de VDJ en los genes de receptores de inmunoglobulina y células T. Los animales homocigotos para la mutación *scid* carecen de genes de receptores de inmunoglobulina y células T recombinados funcionalmente y de esta manera son deficientes en linajes celulares tanto T como B. La mutación *scid/scid* está disponible o puede desarrollarse en varios fondos genéticos diferentes, por ejemplo, CB.17, ICR (de distinta estirpe), C3H, BALB/c, C57B1/6, AKR, BA, B10, 129, *etc.* La invención también puede beneficiarse de animales que tienen la mutación beige (*bg*), que está asociada con una deficiencia de células citotóxicas (NK). En una realización, los ratones se producen teniendo tanto la mutación *scid* como la mutación beige *bg*, lo que da como resultado un animal que no crea una respuesta inmune eficaz frente a células o tejidos alogénicos o xenogénicos introducidos en los organismos.

Otros hospedadores inmunocomprometidos ejemplares que actualmente están disponibles incluyen ratones transgénicos diseñados genéticamente para carecer de la función recombinasa asociada con RAG-1 y/o RAG-2 (por ejemplo, los transgénicos RAG-2 TIMTM disponibles en el mercado), para carecer de antígenos de MHC de Clase I y/o Clase II (por ejemplo, las cepas transgénicas C1D y C2D disponibles en el mercado) o para carecer de expresión del protooncogén Bcl-2. Otros ratones que pueden ser útiles como receptores son NOD *scid/scid*; SGB *scid/scid*, bh/bh; CB.17 *scid/hr*, NIH-3 *bg/nu/xid* y META *nu/nu*. Están disponibles ratones, ratas y cerdos transgénicos que carecen de células B y T funcionales debido a una alteración homocigota en el gen de CD3F. Las ratas inmunocomprometidas incluyen HsdHan:RNU-rnu; HsdHan:RNU-rnu/+; HsdHan:NZNU-rnu; HsdHan:NZNU-mu/+; LEW/HanHsd-rnu; LEW/HanHsd-rnu/+; WAG/HanHsd-rnu y WAG/HanHsd-rnu/+.

Expresión transgénica de uroquinasa

Como se analiza anteriormente, el ratón quimérico de la invención también es un transgénico “knock-in” para la expresión del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). En una realización, el transgén es el transgén Alb-uPA, que comprende un potenciador/promotor de albúmina murina, la región codificante del gen uPA murino y las secuencias no traducidas y flanqueantes 3’ del gen de la hormona de crecimiento (Heckel *et al.* Cell 62:447-56 (1990); Sandgren *et al.* Cell 66:245-56 (1991)). El animal es homocigoto, en lugar de heterocigoto, para el transgén

activador de plasminógeno de tipo uroquinasa. El transgén Alb-uPA produce un daño letal a los hepatocitos que lo portan y también produce una alta concentración local (intrahepática) de uroquinasa, que a su vez procesa el factor de crecimiento de los hepatocitos hasta su forma activa dentro del hígado. Sin quedar ligado a la teoría, las células viables halogénicas o xenogénicas que se introducen en un tiempo adecuado en el desarrollo de un animal transgénico Alb-uPA se estimulan para replicarse en este ambiente. Las células donadores de esta manera crecen para “reemplazar” los hepatocitos endógenos que mueren como resultado del daño letal por el transgén.

Aislamiento de Hepatocitos Humanos y Otras Células Adecuadas para el Trasplante

Los hepatocitos humanos para el trasplante en el ratón hospedador se aíslan del tejido hepático humano mediante cualquier método conveniente conocido en la técnica. En general, los hepatocitos humanos pueden ser tejido fresco (por ejemplo, obtenidos unas horas después de la muerte) o tejido fresco congelado (por ejemplo, tejido fresco congelado y conservado a aproximadamente 0° o menos). Idealmente, las células que se usan se han aislado recientemente (es decir, en un periodo de 2 a 4 horas) del tejido hepático humano obtenido recientemente. Los hepatocitos humanos que se colocan en un medio definido de crioconservación pueden almacenarse durante largos periodos de tiempo (por ejemplo, en nitrógeno líquido) y descongelados cuando se necesite, permitiendo de esta manera el desarrollo de bancos de hepatocitos almacenados. En general, normalmente es importante que el procedimiento de aislamiento y el protocolo de manipulación y almacenamiento sirvan para minimizar la isquemia caliente después del cese del flujo sanguíneo al hígado (por ejemplo, generalmente menos de aproximadamente 30 min a 60 min, preferiblemente menos de aproximadamente 20 min a aproximadamente 40 min) y para minimizar la isquemia fría que puede resultar del almacenamiento (por ejemplo, generalmente menos de aproximadamente 12 horas, normalmente menos de aproximadamente 1 h a 2 h). En una realización, el tejido humano es normal, por ejemplo, no tiene patógenos detectables, es normal en morfología e histología y está esencialmente libre de enfermedad). Normalmente el periodo de exposición de la isquemia caliente no es mayor de aproximadamente 20-50 minutos.

El tejido hepático puede disociarse mecánicamente o enzimáticamente para proporcionar una suspensión de células individuales o se pueden usar fragmentos de tejido hepático humano intacto. En una realización preferida, los hepatocitos se aíslan del tejido del donador mediante perfusión con colagenasa de rutina (Ryan *et al.* Meth. Cell. Biol. 13:29 (1976)) seguida de centrifugación a baja velocidad. Después los hepatocitos pueden purificarse mediante la filtración a través de un entramado de acero inoxidable (por ejemplo, de 100 μ m), seguida de una centrifugación en gradiente de densidad. Como alternativa, se pueden usar otros métodos para enriquecer los hepatocitos, por ejemplo, la clasificación de células activadas por fluorescencia, cribado, separación con perlas magnéticas, la decantación en un campo centrífugo, *etc.* La suspensión final que se usa para la implantación generalmente comprende al menos aproximadamente el 50-75% de hepatocitos, normalmente al menos aproximadamente el 80-99% de hepatocitos, normalmente con viabilidad mediante exclusión en azul tripán del 80-99%.

En otra realización, las células a transplantar son células madre no embrionarias o células precursoras de hepatocitos humanos que, después del trasplante al hígado del hospedador animal, se desarrollan o se diferencian en hepatocitos humanos susceptibles a la infección por VHC. En una realización específica, las células madre humanas se obtienen a partir de células sanguíneas del cordón umbilical humano. Las células sanguíneas del cordón umbilical humano no sólo son una fuente para la reconstitución de células madre de hepatocitos, sino también para la reconstitución del sistema inmune (véase, por ejemplo, Verstegen *et al.* Blood. 91(6):1966-76 (1998)).

Trasplante de Hepatocitos Humanos u Otras Células Adecuadas en Hospedadores

La temporización de la introducción de los hepatocitos del donador en el hospedador transgénico e inmunocomprometido puede ser importante para la producción de un hígado quimérico poblado con un número suficiente de hepatocitos humanos para hacer que el hígado quimérico sea susceptible a la infección mediante un patógeno hepatotropo y para soportar la replicación del patógeno. Esto puede ser particularmente cierto cuando el patógeno hepatotropo muestra bajas tasas de infectividad y/o bajas tasas de replicación (por ejemplo, VHC). Cuando el animal es murino (por ejemplo, un ratón), el hospedador tiene idealmente menos de 10 días a 2 semanas de edad y óptimamente aproximadamente de 7 a 10 días de edad o menos de o aproximadamente 1 semana (es decir, menos de o aproximadamente de 5 a 7 días de edad o más joven), en el momento del trasplante. En general, el trasplante se realiza preferiblemente entre aproximadamente 8-10 días y 15 días de edad. El intervalo para el trasplante puede ampliarse a aproximadamente 7-18 días de edad para ganar flexibilidad mientras que se mantienen buenos resultados. Sin quedar ligado a la teoría, la temporización del trasplante que se indica en la presente memoria está en un punto intermedio entre el exceso de mortalidad técnica asociado con el trasplante muy temprano (es decir, debido al pequeño tamaño de los animales) y el tiempo para el estímulo máximo replicativo (por ejemplo, el número de divisiones celulares en el hígado del receptor que ocurren antes del trasplante pueden influir en el éxito y la extensión del injerto de las células humanas donadoras). Además, la temporización del trasplante también es importante puesto que el estímulo para la repoblación de células hepáticas proporcionado por el transgén disminuye con el tiempo y generalmente se agota después de que el receptor tenga más de 6 semanas de edad (Rhim *et al.* (1994) Science 263:1149-52; aproximadamente 10-12 semanas para homocigotos).

Los hepatocitos humanos (u otras células adecuadas, por ejemplo, precursores de hepatocitos o células madre embrionarias no humanas) pueden transplantarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Preferiblemente, los hepatocitos humanos se inyectan por vía intraesplénica, por ejemplo, en el interior del polo esplénico inferior.

El éxito en el injerto se puede controlar mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante el examen de los niveles de proteínas humanas específicas de hígado en el suero del hospedador, por ejemplo, la albúmina sérica humana (AH) o la alfa-1 antitripsina humana. El hospedador quimérico se puede usar para la experimentación (por ejemplo, para la infección con un patógeno hepatotrofo, para explorar agentes candidatos, *etc.*) cuando sea posible.

- 5 Cuando el animal va a infectarse con un agente hepatotrofo de infectividad relativamente baja y/o poca capacidad replicativa, se puede inocular al animal quimérico aproximadamente de cuatro a seis semanas después del trasplante, generalmente aproximadamente seis semanas después del trasplante y puede ser tan pronto como tres semanas después del trasplante.
- 10 En general, el hospedador animal desarrolla quimerismo humano dentro de su hígado de modo que el porcentaje de células hepáticas que son células hepáticas humanas es desde al menos aproximadamente el 20% al 50%, generalmente aproximadamente del 40% al 60% o más y puede optimizarse hasta el 90% o más. El animal quimérico se puede mantener con hepatocitos trasplantados funcionales durante al menos varias semanas, generalmente al menos
- 15 meses o más y puede ser durante la vida útil del hospedador. Los animales quiméricos se pueden infectar con un patógeno hepatotrofo (por ejemplo, VHC), particularmente un patógeno hepatotrofo que tiene una gama de hospedadores limitados a primates, particularmente humanos. Dependiendo de la naturaleza del patógeno, los hospedadores quiméricos infectados crónicamente pueden mantenerse durante un período de semanas a meses. Por ejemplo, cuando el patógeno hepatotrofo es VHC, el animal quimérico puede infectarse crónicamente con VHC (por ejemplo, in-
- 20 fectado crónicamente) y mantener una infección activa por VHC durante un período de al menos aproximadamente 5 semanas, generalmente al menos de aproximadamente 14 semanas a aproximadamente 20 semanas o más, hasta aproximadamente 35 semanas o más y puede ser durante la vida útil del hospedador.

- La carga viral del hospedador infectado puede establecerse de modo que sea similar a la carga viral de un ser humano infectado. Por ejemplo, cuando el patógeno es VHC, el animal hospedador puede soportar la infección a un nivel de aproximadamente 10^3 o aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^6 partículas virales/ml de suero, generalmente desde aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^7 partículas virales/ml de suero.

- La carga viral del hospedador infectado es sustancialmente consistente, crónica y estable en el tiempo, por ejemplo, el número de partículas virales que pueden aislarse del suero del hospedador infectado y no tratado no fluctúa radicalmente entre periodos de muestreo semanales, por ejemplo, un hospedador infectado por VHC de la invención que contiene un gran número de partículas virales de VHC por ml de suero en un primer tiempo de muestreo es positivo para la infección por VHC en tiempos de muestreo posteriores y generalmente tiene el mismo nivel alto o uno similar de partículas de VHC por ml de suero, una vez la infección estable se implanta en el hospedador, generalmente
- 30 aproximadamente de 2 a 4 semanas después de la infección. En general, la carga viral del hospedador infectado no fluctúa radicalmente y así permite la evaluación del efecto de un agente antiviral candidato, por ejemplo, el título viral es crónico y razonablemente consistente.

Ensayos de Exploración

- El ratón quimérico de la invención puede usarse en una diversidad de otros ensayos de exploración. Por ejemplo, cualquiera de una diversidad de agentes candidatos que se sospecha que producen o contribuyen a la enfermedad hepática, así como los antagonistas y los agentes terapéuticos bloqueantes adecuados, se pueden explorar mediante su administración al ratón quimérico y la evaluación del efecto de estos agentes en la función de las células humanas injertadas.
- 45 El modelo de ratón quimérico de la invención se puede usar también para explorar compuestos con respecto a la toxicidad para las células del hígado, incluyendo terapias de moléculas pequeñas para el tratamiento de trastornos hepáticos o para el tratamiento de cualquier enfermedad humana no específica de hígado. En general, cualquier compuesto puede administrarse para evaluar su toxicidad para las células hepáticas. Por ejemplo, la evaluación de una terapia putativa importante contra el cáncer puede explorarse primero para la toxicidad hepática en el modelo animal de la invención. La función de las células hepáticas humanas injertadas puede evaluarse como se describe anteriormente (por ejemplo, mediante la evaluación de los niveles de la albúmina de suero humana o la alfa-1 antitripsina en el suero del hospedador). El daño a las células hepáticas se puede evaluar mediante el ensayo de enzimas específicas de hígado en el suero (ALT-alanina aminotransferasa), junto con la evaluación histológica para la prueba del daño a células humanas en el hígado. En pocas palabras, los ensayos para evaluar la toxicidad hepática pueden ser funcionales,
- 55 histológicos o ambos.

- En una realización de interés particular, el modelo animal de la invención se puede usar para identificar agentes candidatos que, por ejemplo, inhiben o previenen la infección por, la replicación de o los síntomas de la enfermedad producidos por un patógeno hepatotrofo (por ejemplo, bacterias, virus, parásitos, especialmente un virus hepatotrofo tal como el VHC). Aunque los ejemplos que se proporcionan en la presente memoria generalmente implican el uso de hospedadores quiméricos murinos con un único patógeno hepatotrofo, la invención también se puede usar para identificar un único agente candidato o cóctel de agentes candidatos que tienen una actividad contra la infección por uno o más agentes hepatotrofos.

- 65 “Agentes candidatos” pretende incluir moléculas sintéticas, de origen natural o producidas de un modo recombinante (por ejemplo, moléculas pequeñas; fármacos; péptidos; anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo que se unen a antígeno, por ejemplo, para proporcionar la inmunidad pasiva) u otros agentes inmunoterapéuticos, factores endógenos presentes en las células eucariotas o procariotas (por ejemplo, polipéptidos, extractos de plantas y

similares)); *etc.*). Son de particular interés los ensayos de exploración para agentes que tienen baja toxicidad para las células humanas. Los agentes candidatos abarcan numerosas clases químicas, aunque normalmente son moléculas orgánicas, preferiblemente compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 2.500 dalton. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlaces de hidrógeno, y normalmente incluyen al menos un grupo amino, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos a menudo comprenden estructuras de carbono cíclico o heterocíclico y/o estructuras aromáticas o poli aromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los agentes candidatos también se encuentran entre biomoléculas que incluyen, pero no se limitan a: péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de las mismas.

Los agentes candidatos se obtienen de una gran variedad de fuentes incluyendo bibliotecas de compuestos naturales o sintéticos. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una gran variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Como alternativa, las bibliotecas de compuestos naturales en la forma de extractos bacterianos, fúngicos, de animales y de plantas están disponibles o se producen fácilmente. Adicionalmente, las bibliotecas producidas de manera natural o sintética y los compuestos se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos se pueden someter a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como la acilación, alquilación, esterificación, amidificación, *etc.* para producir análogos estructurales.

Exploración de Agentes Candidatos Anti-VHC

En una realización, el modelo animal de la invención se usa para identificar agentes que mejoran los síntomas producidos por la hepatitis viral y más específicamente por la infección de VHC y/o para afectar más directamente un mecanismo patogénico del virus que infecta, por ejemplo, inhiben la infección viral, disminuyen la replicación viral o de otra manera alteran el ciclo de propagación viral. En general, el agente candidato se administra al modelo animal de la invención y los efectos del agente candidato se evalúan en relación a un control (por ejemplo, en relación con un animal no infectado, en relación con un animal infectado por VHC tratado con un agente que tiene un efecto anti-VHC conocido (por ejemplo, IL-2 α) y similares). Por ejemplo, el agente candidato se puede administrar a un animal infectado por VHC de la invención y el título viral del animal tratado (por ejemplo, como se mide mediante RT-PCR de muestras séricas) comparado con el título viral del animal antes del tratamiento y/o con un animal de control no tratado infectado por VHC. En general, una disminución detectable y significativa en el título viral de un animal infectado después del tratamiento con un agente candidato es indicativa de una actividad antiviral del agente.

El agente candidato se puede administrar de cualquier modo deseado y/o adecuado para el suministro del agente para ocasionar el resultado deseado. Por ejemplo, el agente candidato se puede *administrar* por inyección (por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea o directamente dentro del tejido en el que ha de conseguirse el efecto deseado), por vía oral o mediante cualquier otro medio deseable. Normalmente, la exploración *in vivo* implicará varios animales que reciben cantidades y concentraciones variables del agente candidato (desde ninguna cantidad de agente a una cantidad de agente que se aproxima a un límite superior de la cantidad que puede suministrarse con éxito al animal) y puede incluir el suministro del agente en distintas formulaciones y vías. Los agentes se pueden administrar de manera individual o se pueden combinar en combinaciones de dos o más, especialmente cuando la administración de una combinación de agentes puede dar como resultado un efecto sinérgico.

La actividad del agente candidato se puede evaluar de una diversidad de formas. Por ejemplo, cuando se infecta al animal hospedador con un patógeno hepatotrofo (por ejemplo, VHC, *etc.*), el efecto del agente se puede evaluar mediante el examen de las muestras séricas respecto a la presencia del patógeno (por ejemplo, el título, como en el título viral) o marcadores asociados con la presencia del patógeno (por ejemplo, una proteína específica de patógeno o un ácido nucleico codificante, *etc.*) Los métodos cualitativos y cuantitativos para detectar y evaluar la presencia y la gravedad de la infección viral se conocen bien en la técnica. En una realización, la actividad de un agente contra la infección por VHC se puede evaluar mediante el examen de las muestras séricas y/o secciones de tejido con respecto a la presencia de un virus (por ejemplo, VHC mediante RT-PCR, *etc.*). En otra realización, la actividad de un agente contra una infección viral se puede evaluar mediante el examen de las muestras de suero para la presencia de ácido nucleico viral (por ejemplo, ARN de VHC). Por ejemplo, se puede detectar el ARN de VHC usando, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), la RT-PCR competitiva o el ensayo de ADN ramificado (ADNb), la detección de la cadena negativa del ARN (el intermedio replicativo de VHC) mediante RT-PCR o la secuenciación del ARN viral para detectar mutaciones/cambios en el genoma viral (“evolución de las cuasiespecies”) con la terapia. Como alternativa o además, se puede biopsiar el hígado del hospedador y realizar la hibridación *in situ* RT-PCR para demostrar directamente cualquier alteración cualitativa o cuantitativa en la cantidad de partículas virales dentro de las secciones de tejido. Como alternativa o además, se puede sacrificar al hospedador y se puede examinar el hígado histológicamente para buscar signos de infección y/o toxicidad producidos por el agente.

Agentes Identificados

Los compuestos que tienen la actividad farmacológica deseada se pueden administrar a un hospedador en un vehículo fisiológicamente aceptable para el tratamiento. Los agentes terapéuticos se pueden administrar en una diversidad de formas, por vía oral, por vía tópica, por vía parenteral por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por

vía intravascular, por inhalación, *etc.* Dependiendo del modo de introducción, los compuestos se pueden formular en una diversidad de formas. La concentración del compuesto activo terapéuticamente en la formulación puede variar de aproximadamente 0,1-100% en peso.

- 5 Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar en diversas formas, tales como gránulos, comprimidos, píldoras, supositorios, cápsulas, suspensiones, pomadas balsámicas, lociones y similares. Los vehículos orgánicos o inorgánicos y/o diluyentes de uso farmacéutico adecuados para el uso oral y tópico se pueden usar para formar composiciones que contienen los compuestos terapéuticamente activos. Los diluyentes que se conocen en la técnica incluyen medio acuoso, aceites vegetales y animales y grasas. Los agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la presión osmótica o tampones para asegurar un valor adecuado de pH y los potenciadores de la penetración a través de la piel se pueden usar como agentes auxiliares.

Desarrollo de la Vacuna

- 15 El modelo animal de la invención, con algunas modificaciones, se puede usar también para explorar candidatos de vacunas respecto a su capacidad para prevenir o mejorar la infección mediante un patógeno hepatotropo. En general, una "vacuna" es un agente que, después de su administración, ayuda al hospedador en la creación de una respuesta inmune contra el patógeno diana. La respuesta inmune humoral, celular o humoral/celular que se induce puede facilitar la inhibición de la infección por el patógeno contra el cual la vacuna se desarrolla. Son de particular interés en la presente invención las vacunas profilácticas que inducen una respuesta inmune protectora que inhibe la infección y/o la replicación intrahepática de un patógeno hepatotropo, por ejemplo, un patógeno microbiano, viral o parasítico, particularmente un patógeno viral, por ejemplo, VHC. También son de interés las vacunas terapéuticas que proporcionan protección a través de la provisión de la inmunidad pasiva o que rápidamente aumentan la inmunidad activa específica (por ejemplo, inmunoglobulina anti-VHC y similares).

- 25 En esta realización de la invención, el sistema inmune del animal quimérico inmunocomprometido se reconstituye usando, por ejemplo, células madre no embrionarias, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células sanguíneas del cordón umbilical, células hematopoyéticas u otras células adecuadas de origen humano para proporcionar un sistema inmune humano en el animal. Los métodos de aislamiento de las células inmunes humanas y reconstitución del sistema inmune de un ratón inmunocomprometido con un sistema inmune humano se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Nature 335:256-59, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(25): 14720-25). En una realización, las células inmunes humanas se obtienen del mismo donador que los hepatocitos humanos que se usan en la producción del hígado quimérico. En una realización, las células inmunes humanas se introducen en el hospedador de acuerdo con métodos que se conocen bien en la técnica, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal.

- 35 La exploración para una vacuna eficaz es similar a los métodos de exploración que se describen anteriormente. En pocas palabras, el candidato a vacuna se administra al animal quimérico antes de la inoculación con el patógeno hepatotropo. El candidato a vacuna se administra generalmente proporcionando una dosis en embolada única (por ejemplo, inyección intraperitoneal o intramuscular, administración por vía tópica o administración por vía oral), seguido de una o más inmunizaciones de refuerzo. La inducción de una respuesta inmune se puede evaluar mediante el examen de las respuestas de células B y T que son específicas para el antígeno de acuerdo con métodos que se conocen bien en la técnica. Después se realiza una prueba de desafío al animal inmunizado con el patógeno hepatotropo; normalmente se realiza la prueba de desafío a varios animales inmunizados con títulos crecientes del patógeno. Los animales de control inmunizados y los animales no inmunizados después se analizan con respecto al desarrollo de la infección y la gravedad de la infección estudiada (por ejemplo, mediante la evaluación del título del patógeno presente; examinando los parámetros de la función hepatocítica humana como se describe anteriormente, *etc.*). Los candidatos a vacunas que proporcionan una disminución significativa en la infección por el patógeno y/o una disminución significativa en la gravedad de la enfermedad que se obtiene después de la prueba de desafío se identifican como vacunas viables.

Otros Usos

- 50 Los usos del ratón quimérico de la invención que son variaciones en las o además de las que se describen anteriormente se pondrán de manifiesto fácilmente para el experto habitual en la materia después de leer la presente memoria. Por ejemplo, se puede infectar al ratón quimérico, preferiblemente infectarlo crónicamente, con un agente hepatotropo y se puede usar como una fuente a partir de la cual se puede aislar el agente. Este uso del ratón quimérico de la invención es particularmente útil cuando, por ejemplo, el aislamiento del patógeno necesita la biopsia de un sujeto humano o es difícil de obtener en cantidades útiles; el patógeno no se puede cultivar fácilmente *in vitro*; el cultivo del patógeno *in vitro* (por ejemplo, cultivo en caldo de cultivo o en células cultivadas) conduce a cambios en el patógeno que pueden afectar su patogenicidad y/o relevancia clínica; *etc.* En general, el ratón quimérico se inocula con el patógeno aislado mediante una vía adecuada (por ejemplo, mediante administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal u oral), preferiblemente mediante la vía de infección que se relacione mejor con la vía natural de infección en la enfermedad humana. Después de que el patógeno establezca la infección de los hepatocitos humanos y después de que ha pasado una cantidad de tiempo suficiente para permitir la replicación del patógeno, se aísla el patógeno del animal quimérico infectado mediante un método adecuado (por ejemplo, aislamiento de una muestra sanguínea, hepática, *etc.*).

- 65 *Diagnóstico de la enfermedad hepática.* El ratón quimérico también se puede usar en el curso del diagnóstico de la enfermedad hepática en un ser humano. Por ejemplo, cuando el paciente padece una enfermedad hepática de origen no conocido o cuando el diagnóstico sin cultivar el patógeno no es definitivo, una muestra que se sospecha

que contiene el agente causante se puede aislar del paciente (por ejemplo, del suero del paciente o de una biopsia hepática). Se puede enriquecer la muestra para el agente de sospecha, fraccionar o procesar de otra manera para proporcionarlo en una forma administrable y suministrarlo al animal quimérico. El animal quimérico puede después evaluarse para analizar el efecto de la administración de la muestra en los hepatocitos humanos injertados. El efecto en los hepatocitos humanos se puede conseguir mediante, por ejemplo, el aislamiento y examen de las muestras séricas del animal quimérico, por ejemplo, para evaluar la función de los hepatocitos humanos injertados y/o para detectar un patógeno en el suero del animal, por ejemplo, para detectar la presencia de VHC u otros patógenos microbianos). También se pueden examinar los hepatocitos humanos histológicamente para determinar el efecto de la muestra del paciente.

La exploración usando muestras de pacientes. La invención también se puede adaptar para proporcionar el diagnóstico y la terapia de base lógica diseñados en una base individualizada. Por ejemplo, los hepatocitos humanos que se obtienen mediante la biopsia a un paciente (por ejemplo, la biopsia percutánea con aguja) pueden usarse para producir el hospedador quimérico murino. Este hospedador quimérico murino puede usarse después para evaluar el patógeno hepatotropo que infecta al paciente, evaluar la susceptibilidad del patógeno frente a agentes terapéuticos y para evaluar la toxicidad potencial de los hepatocitos del paciente frente a esta terapia. Por tanto la invención se puede diseñar para facilitar la confección a medida de terapias más eficaces contra un complemento de patógeno hepatotropo específico de un individuo (por ejemplo, contra uno o más patógenos hepatotropos que infectan).

Exploración para agentes que reducen los lípidos sanguíneos. También se puede adaptar la invención como un sistema para evaluar las terapias potenciales de la enfermedad vascular aterosclerótica humana (incluyendo la cardiovascular). La aterosclerosis es la causa primaria de ataque al corazón y accidente cerebrovascular en el mundo Occidental y en última instancia es la responsable de aproximadamente la mitad de la mortalidad en Canadá (Ross (1993) *Nature* 362: 801-809). Se ha realizado una relación positiva entre los altos niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la aterosclerosis durante varias décadas (Brown *et al.* *Ann. Rev. Biochem.* 52: 223-261 (1983)). LDL deriva de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el sistema circulatorio en virtud de series complejas de reacciones que implican hidrolasas y la transferencia de lípidos y apoproteínas entre lipoproteínas (Fielding *et al.* (1996) En "Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes", (D.E. Vance y J.E. Vance eds.) pág. 495-516, Elsevier Science Publishers, Amsterdam). VLDL se secreta en el torrente sanguíneo mediante una vía compleja (Gibbons, *Biochem. J.*, 268: 1-13 (1990); Dixon *et al.* *J. Lipid Res.* 34: 185-1 (1993); Sniderman *et al.* *Arterioscler. Thromb.* 13: 629-636 (1993); Yao *et al.* *Biochim. Biophys. Acta.* 1212:152-166 (1994); Davis *et al.* (1996) en "Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes" (D.E. Vance y J.E. Vance eds.) pág. 473-493, Elsevier, Amsterdam; Innerarity *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 2353-2356 (1996)).

La apolipoproteína (apo) B es una apoproteína principal de VLDL y, es la única apoproteína de LDL. Se ha identificado una relación entre los niveles altos de apo B en el plasma y el riesgo de enfermedad cardiovascular (Sniderman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 604-608 (1980)). Se ha observado la regresión de la enfermedad coronaria en hombres que se tratan agresivamente con fármacos que disminuyen los lípidos que también producen una disminución en la apo B plasmática (Brown *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 323: 1289-98 (1990)). Por tanto, existe una conexión positiva entre la secreción de apo B del hígado, la concentración ambiental de lipoproteínas que contienen apo B en el plasma y la incidencia de aterosclerosis. Apo B es una glicoproteína grande que es esencial en el ensamblaje y la secreción de lípidos, incluyendo triglicéridos y colesterol tanto de origen dietético como endógeno. Además, apo B es importante en el transporte intravascular y en la captación mediada por receptores y en el suministro de distintas clases de lipoproteínas. La importancia de apo B de este modo abarca una serie de funciones, desde la absorción y procesamiento de lípidos de la dieta a la regulación de los niveles circulantes de lipoproteínas. Esta última propiedad está por debajo de su importancia en términos de susceptibilidad aterosclerótica.

Existen dos formas de apo B en mamíferos. La apo B100 representa la proteína de longitud completa que contiene 4536 aminoácidos y es la forma exclusiva sintetizada en el hígado humano (Young, *Circulation* 82: 1574-1594 (1990)). Apo B100 es la proteína principal constituyente de LDL y contiene el dominio que se necesita para la interacción de esta especie de lipoproteína con el receptor LDL (Young, 1990, *supra*). Además, Apo B 100 contiene un resto cisteína no apareado, en la posición 4326, que media una interacción covalente con apo(a) y de este modo genera otra lipoproteína aterogénica distinta, que se denomina Lp(a) (Callow *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2130-2134 (1994); McCormick *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 28294-28299 (1996)). El intestino delgado de todos los mamíferos, al igual que el hígado de ciertas especies, sintetiza apo B48. En los seres humanos apoB48 circula en asociación con quilomicrones y remanentes de quilomicrones y a estas partículas, en virtud de su contenido de apo E, las capta un receptor distinto que se denomina proteína relacionada con el receptor LDL (Herz *et al.* *Curr. Opin. Lipidol* 6: 97-103 (1995)).

En seres humanos, las pruebas actuales indican que la susceptibilidad a la aterosclerosis se debe muy probablemente a combinaciones no favorables de mutaciones que afectan a genes en varias vías, pero el conocimiento acerca de qué genes están implicados es limitado (Ross, 1993, *supra*). Debido a la capacidad de introducir o mutar genes, el ratón se ha convertido en el modelo animal experimental más común para la investigación de la aterosclerosis. Los ratones de tipo silvestre en una dieta chow no desarrollan aterosclerosis. Las tres maneras de inducir aterosclerosis en ratones son: inducida por la dieta (Paigen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3763-3767 (1987)), por deficiencia de apo E inducida (Piedrahita *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4471-4475 (1992); Plump *et al.*, *Cell* 71: 343-353 (1992); Zhang *et al.*, *Science* 258: 468-471 (1992)) y por deficiencia del receptor LDL inducida (Ishibashi *et al.*, *J. Clin. Invest.* 92: 883-893 (1993)). Por tanto, los modelos transgénicos murinos que expresan genes humanos

implicados en el metabolismo de las lipoproteínas han servido cada vez más como modelos mamíferos pequeños en los que los espectros de perfiles lipídicos de suero humano tanto normales como patogénicos pueden estimularse y se ha demostrado en varios casos la formación de lesiones ateroscleróticas. Por ejemplo, las lesiones ateroscleróticas en ratones deficientes en apo E se han caracterizado bien y se parecen a las lesiones humanas en sus sitios de predilección y progresión a la fase fibroproliferativa. Estos modelos de ratones de aterosclerosis se están usando para identificar genes que modifican la susceptibilidad a la aterosclerosis y en el desarrollo de terapias antiaterogénicas.

El modelo de ratón de la presente invención puede del mismo modo servir como un modelo animal para la hiperlipidemia y la aterosclerosis y se pueden usar para identificar agentes candidatos que tienen actividad en la reducción del riesgo de tales enfermedades (por ejemplo, útiles en el tratamiento profiláctico) o en el tratamiento de tales enfermedades (por ejemplo, disminuyendo los lípidos sanguíneos). El estudio del suero del modelo animal transgénico quimérico de la invención ha demostrado la presencia de la lipoproteína humana apoB100. Puesto que esta molécula se ha establecido como un factor etiológico importante en el desarrollo de la enfermedad vascular aterosclerótica humana, la exploración para agentes que afectan los niveles de apoB100 (tanto cuantitativamente como cualitativamente) puede servir para identificar agentes que pueden modular los niveles lipídicos sanguíneos y de esta manera proporcionar una terapia para enfermedades en seres humanos. El control positivo para estos ensayos de exploración puede ser suero humano y con suero de ratones homocigotos no trasplantados Alb/uPA que sirve como el control negativo.

Los métodos para la detección de apoB100 se conocen bien en la técnica. Generalmente, los ensayos implican la detección de la formación de complejos de anticuerpo-apoB 100 después de poner en contacto una muestra biológica del animal (por ejemplo, sangre, suero, plasma y similares) con un anticuerpo que se une específicamente a apoB 100. La detección de la formación de complejos anticuerpo-apoB 100 puede conseguirse en una variedad de formas (por ejemplo, transferencia de Western, transferencia puntual, RIA y similares).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos habituales en la materia una descripción y divulgación completa de cómo realizar y usar la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni se pretende que representen que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos que se realizan. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión respecto a los números que se usan (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A no ser que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio, la temperatura es en grados Centígrados y la presión es o está cerca de la atmosférica.

Ejemplo 1

Producción de Ratones Transgénicos Alb-uPA

Para generar un ratón transgénico Alb-uPA tolerante a injertos de tejido humano, se cruzaron ratones heterocigotos para el transgén (cepa TgN(*Alb1Plau*) 144Br1 (The Jackson Laboratory)) con animales de un linaje C.b-17/SCID-beige (cepa C.b-17/GbmsTac-*scid-bgN7* (Taconic Farms), homocigoto). A través de series de retrocruzamientos, el rasgo SCID-beige se crió hasta la homocigosidad como se confirma mediante la cuantificación total de la IgG sérica total usando una técnica de ELISA sándwich para detectar la IgG de ratón de acuerdo con métodos que se conocen bien en la técnica. La cuantificación de IgG a partir de una curva patrón preparada en cada placa usando una IgG de ratón patrón (Cappel). La "pérdida" del rasgo SCID-beige se definió como >1% de IgG sérica normal (Bosma *et al.* Ann. Rev. Immun. 9: 323 (1991)); los animales con niveles de IgG sérica por encima de este límite se sacrificaron. En cada etapa, los animales que portaban el transgén Alb-uPA se identificaron mediante análisis por PCR del ADN genómico extraído de biopsias de cola, usando dos cebadores de 18 unidades que amplifican un producto de 151 pb de 3' UTR de la construcción del transgén (Jackson Laboratories technical support). Aunque el rasgo homocigoto Alb/uPA se ha asociado previamente con un alto porcentaje de mortalidad perinatal secundaria a complicaciones hemorrágicas y fallo hepático (Heckel *et al.* Cell 62: 447 (1990)), los inventores descubrieron que la mortalidad neonatal de la colonia animal scid/bg/Alb-uPA fue aproximadamente el 30%. La colonia que proporcionaba los animales se desarrolló inicialmente con parentales heterocigotos, pero con mortalidad neonatal moderada en ratones homocigotos, la colonia evolucionó a una completamente homocigota. Se ubicaron los animales en condiciones libres de virus/antígenos y se supervisaron de acuerdo con las directrices establecidas por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales (1993). Todos los experimentos en animales que se describen en la presente memoria se realizaron con la aprobación del Comité del Bienestar Animal de la Universidad de Alberta.

Los hepatocitos humanos para el trasplante se obtuvieron con la aprobación del Consejo de Ética de la Investigación Médica de la Universidad de Alberta. Los segmentos de tejido hepático humano (15-20 cm³) que se obtuvieron en la laparotomía se perfundieron con PBS libre de Ca/Mg congelado que contenía Na₂EDTA 0,5 mM. Los vasos de perfusión prominentes se canularon y se perfundió el tejido durante 30 minutos con solución transportadora recirculante (NaCl 35 mM, KCl 3,5 mM, CaCl₂ 2,5 mM, HEPES 50 mM, pH 7,6) que contenía 0,38 mg/ml de collagenasa Liberase CI (Boehringer-Mannheim) (Ryan *et al.* Surgery 113: 48 (1993); Seglen *et al.* Meth. Cell Biol. 13: 29 (1976)). Se filtraron los hepatocitos a través de un entramado de acero inoxidable de 100 µm, se purificaron mediante la centrifugación en gradiente de densidad (Percoll, densidad 1,04 g/ml; Sigma) a 400 g durante 5 minutos y se lavaron dos

veces en HBSS congelado antes de la suspensión en solución de Wisconsin de la Universidad de Belzer (DuPont) a 0°C para el almacenamiento a corto plazo antes del trasplante. Los recuentos celulares y la viabilidad se confirmaron mediante exclusión por azul tripán antes del trasplante; la viabilidad final fue rutinariamente >80%.

En experimentos iniciales, se cruzaron animales homocigotos para el rasgo SCID y heterocigotos para el transgén Alb-uPA y se trasplantaron 1×10^6 hepatocitos humanos viables aislados recientemente a la progenie de 7 días de edad. El trasplante se consiguió mediante la inyección intraesplénica. Los hepatocitos inyectados intraesplénicamente rápidamente se transfirieron al hígado mediante el sistema venoso portal y se injertaron en las vénulas portales terminales del parénquima circundante (Ponder *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1217 (1991); Gupta *et al.* Transplantation 50:472 (1990)). Puesto que la mortalidad asociada con la inyección intraesplénica es mínima, se seleccionó el bazo como el sitio óptimo para la implantación. Por consiguiente, la descendencia (5-17 días de edad) se anestesió con Halotano/O₂ y se realizó una pequeña incisión en el costado izquierdo. En el aumento operativo, se inyectaron 1×10^6 hepatocitos viables en el polo esplénico inferior con un juego de inyección butterfly de 27 g (Becton-Dickinson) y se situó una sola pinza de titanio estéril a través del sitio de inyección para la hemostasis. El bazo se devolvió al abdomen y la incisión en el costado se cerró en dos niveles.

Puesto que la producción de albúmina es una propiedad exclusiva de los hepatocitos (Clement *et al.* Hepatology 4: 373 (1984); Gonsalas *et al.* Nature Medicine 3: 48 (1997)), la detección de la albúmina humana (AH) en muestras de suero mediante inmunoprecipitación selectiva y se empleó la transferencia de Western como un indicador de la función de las células del injerto. Se tomaron muestras inicialmente de los ratones receptores mediante punción de la vena yugular a las cuatro semanas después del trasplante y a intervalos semanales de ahí en adelante. Las alícuotas de suero de ratón (20 μ l) se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-albúmina humana (Clon HSA-9; Sigma), y los complejos antígeno-anticuerpo se precipitaron con la proteína G-agarosa (Boehringer-Mannheim). Los inmunoprecipitados se calentaron durante 5 minutos a 98°C en tampón SDS que contenía ditiotretitol 0,2 M, se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a nitrocelulosa. Las transferencias de Western se prepararon de un modo convencional (Coligan *et al.* Current Protocols in Immunology (Wiley, Nueva York, 1997), vol. 2, cap. 8.10.7) usando un segundo anticuerpo monoclonal anti-albúmina humana (Clon HSA-11; Sigma) conjugado con biotina como el primario. Un conjugado de estreptavidina de HRP (Pierce) se empleó como el secundario y se usaron reactivos quimioluminiscentes (Pierce) para la detección de la señal.

Se demostró una fuerte señal de AH en el suero de 4/7 camadas trasplantadas, indicando la presencia de números significativos de hepatocitos humanos funcionales; el análisis de genotipo posterior reveló que todos los animales positivos para AH llevaban el transgén Alb-uPA, mientras que todos los animales negativos para AH también fueron negativos para el transgén. Las bandas claras AH se detectaron tan temprano como dos semanas después del trasplante, con un aumento en la intensidad a los puntos de tiempos de 4-6 semanas, lo que sugiere la expansión vigorosa de los injertos de células primarios (Fig. 1). Estos hallazgos indicaron que el microambiente dentro del hígado Alb-uPA fue suficiente para estimular a los hepatocitos humanos para empezar la proliferación rápida, y que había potencial para soportar el establecimiento de tejidos humanos a largo plazo.

Para confirmar la proliferación y estimar el alcance del reemplazamiento del parénquima murino con células derivadas de seres humanos, se obtuvieron secciones fijadas con formalina, incluidas en parafina de hígados de receptores a distintos tiempos después del trasplante y se inmunotñeron con un anticuerpo monoclonal específico para los hepatocitos humanos. Los segmentos hepáticos de ratón se fijaron en formalina al 10% y se incluyeron en parafina. Las secciones de 5 μ de grosor se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) de un modo convencional. Las secciones seleccionadas se trataron con un kit bloqueante endógeno de avidina/biotina (Zymed Laboratories, Inc.) y se inmunotñeron con un anticuerpo monoclonal anti-hepatocito humano (DAKO, dilución 1:20); el anticuerpo unido se detectó usando el Super Sensitive Immunodetection System (BioGenex).

Los resultados se muestran en las Figuras 2A-2F. En animales que portan el transgén, los grupos de células que se tiñen de manera positiva con el anticuerpo anti-hepatocito humano (las células marcadas de manera más oscura) se dispersaron uniformemente por todo el hígado del hospedador dos semanas después del trasplante, comprendiendo el 2-3% estimado de todos los hepatocitos. A las cuatro semanas el porcentaje de células teñidas positivamente había aumentado, cubriendo desde el 20 al 60% del área total de superficie de las secciones individuales. La interfase entre células de hombre y de ratón fue distinta, con cordones de células humanas que se extendían en el parénquima circundante murino. Las células humanas individuales mantuvieron una apariencia normal y desarrollaron arquitectura sinusoidal, aunque las estructuras de triada de la porta carecieron notablemente de nódulos regeneradores. Esta última observación no era inesperada, puesto que los nódulos derivados de seres humanos son el resultado de la expansión clónica de hepatocitos individuales (Sandgren *et al.* Cell 68: 245 (1991)). Estos nódulos no contendrían conducto biliar o células precursoras endoteliales; estas estructuras serían derivadas del hospedador y por lo tanto marginales alrededor del tejido humano proliferativo.

Análisis de la función de injertos de hepatocitos humanos. Se usaron dos ensayos diferentes basados en suero para evaluar el injerto de hepatocitos humanos en los ratones quiméricos. El primer ensayo es un ensayo de transferencia puntual que mide la albúmina sérica humana; el segundo ensayo es un ensayo ELISA que mide la alfa-1 antitripsina humana (hAAT). Los mismos ratones se ensayaron 6 y 12 semanas después del trasplante.

El ensayo de transferencia puntual se desarrolló mediante la dilución de 2 μ l de muestra o patrón en 40 μ l de tampón reductor y con calor durante 5 min a 100 grados (patrones = cantidades conocidas de albúmina humana en

ES 2 346 636 T3

blanco de suero de ratón). Un volumen de solución de 2 µl se transfirió a una membrana de Nitrocelulosa y se permitió que se secase durante 15 min. La membrana se impregnó en Solución de Transferencia de Western ser durante 10 min y después se bloqueó con TBST al 3% durante 1 hora. Se lavó la membrana y se aplicó anticuerpo monoclonal para la albúmina humana reducida a 1:5000 durante 2 horas. Después del lavado, se aplicó estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante a 1:10000 durante una hora, seguida del lavado y del desarrollo con la solución de quimioluminiscencia ECL-PLUS. La membrana después se leyó usando un phosphoimager. La curva patrón se trazó usando patrones y se usó esta curva para calcular los valores de muestra.

Se realizó el ELISA mediante el revestimiento de placas con anticuerpo policlonal de cabra anti-hAAT a 1:1000 durante una noche, se lavó y después se bloqueó con tampón TBST/leche durante una noche. Después del lavado, los patrones y muestras, diluidos apropiadamente en tampón de leche, se aplicaron y se incubaron durante 2 horas a TA. Después del lavado, se aplicó el anticuerpo secundario unido a HRP a 1:300 (diluido en tampón de leche) y se incubó durante 2 horas a TA. Después del lavado, se añadió el sustrato TMBD y la reacción se paró a los 5 minutos mediante la adición de H₂SO₄ 1 M. La placa se leyó a 450 nm. Se trazó una curva patrón usando patrones y esta curva se usó para calcular los valores de muestra.

La tabla a continuación muestra los resultados que se obtuvieron con cada ensayo.

Ratón	Edad después del trasplante	TRANSFERENCIA PUNTUAL (µg/ml albúmina humana)	ELISA (µg/ml AAT)
DfrP (HOMO)	6 semanas	2283	244
	12 semanas	1717	173
CfRP (HOMO)	6 semanas	385	86
	12 semanas	594	74
CfRM (HOMO)	6 semanas	no detectable	0,7
	12 semanas	muerte	Muerte
BfLM (HOMO)	6 semanas	154	17
	12 semanas	382	40
BmLP (HOMO)	6 semanas	608	45
	12 semanas	767	96
AfRP (HETERO)	6 semanas	99	7
	12 semanas	no detectable	1
AmLM (Hetero)	6 semanas	200	14
	12 semanas	no detectable	2
HOMO indica un animal que es homocigoto para el transgén; HETERO indica que el animal es heterocigoto para el transgén. Ambos ensayos muestran en general que las tendencias son las mismas, mostrando una mucha mayor producción de proteínas derivadas de humanos en el homocigoto para el transgén uPA comparado con los heterocigotos.			

Conclusión. Este ejemplo demuestra el trasplante exitoso del ratón inmunocomprometido scid/bg/Alb-uPA con hepatocitos humanos.

Ejemplo 2

Persistencia y Proliferación de Hepatocitos Humanos Injertados

Para determinar el resultado a largo plazo del injerto y la proliferación inicialmente exitosos, se trasplantó una segunda camada de 8 animales de un modo similar. Los hepatocitos disponibles para su uso en el momento de este experimento se obtuvieron a partir de un paciente que era un portador crónico del virus de la hepatitis B. El paciente exhibió tanto unos niveles séricos positivos en HBsAg y séricos negativos en ADN de VHB, indicando un estado portador crónico sin replicación viral activa (Davis, South. Med J. 90: 866 (1997)).

Se sacrificaron dos animales seleccionados aleatoriamente a las 4 semanas para el análisis histológico y los 6 animales restantes se siguieron a intervalos semanales. Las muestras de suero se sometieron a transferencia de Western como se describe anteriormente y las bandas AH de las transferencias de Western se cuantificaron usando software de análisis de imagen y la densitometría de bandas (Umax Astra 1200S scanner y VistaScan DA v. 1.2.2 imaging software (UMAX Copr, Fremont, CA). La cuantificación de los picos AH se realizó usando el software NIH Image 1.60/fat (Instituto Nacional de Salud) y se normalizó a un patrón de 50 ng de AH presente en cada transferencia.

De nuevo, la proliferación inicial del injerto se observó sólo en los 4 animales que portaban el transgén. En estos animales, las señales de AH permanecieron cerca del máximo a las 8 semanas en cuyo punto emergieron dos patrones distintos de función de injerto (Fig. 3; Ratón 3, cuadrado abierto; Ratón 4, triángulo cerrado; Ratón 5, círculo abierto; Ratón 6, círculo cerrado).

En tres animales la función de injerto empezó a disminuir lentamente, con la extinción de la señal de AH a las 10, 15 ó 16 semanas. Por el contrario, el cuarto animal transgénico (ratón nº 6) mostró una producción máxima de AH a todos los puntos de tiempo a los que se midió (Figs. 3 y 4), lo que indicó el injerto estable de hepatocitos humanos. La función del injerto prolongada ocurrió de manera repetida en aproximadamente el 25% de los animales que portaban el transgén. La señal proliferativa para los hepatocitos trasplantados es probablemente dependiente de la expresión total del transgén y se reduce cuando los hepatocitos derivados del hospedador espontáneamente se eliminan del transgén.

Para evaluar si el ratón trasplantado soportó la infección por VHB de las células trasplantadas infectadas con VHB, se exploraron muestras de suero de todos los ratones trasplantados para la producción del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) mediante ELISA sándwich. Se ensayaron alícuotas de suero (20 µl) con respecto a la presencia de HBsAg usando un kit de ELISA sándwich (Heprofile HbsAg; ADI Diagnostics) con análisis de placas que se realizó usando un espectrofotómetro para microplacas MRX Dynatech (Dynex). Tanto los controles positivos como los negativos de suero humano, al igual que los controles negativos de suero murinos se incluyeron en los ensayos.

Los resultados se resumen en la Tabla 1. Los controles negativos de suero humano y de ratón varían de 0,04-0,05 unidades de absorbancia; los controles positivos humanos varían de 0,30-0,40 unidades de absorbancia.

TABLA 1

Análisis de los marcadores séricos de la infección de hepatitis B después del trasplante de hepatocitos humanos infectados con VHB a ratones

Ratón	Genotipo Alb-uPA	Patrón de Expresión AH	Nivel de HBsAg Después del Trasplante*				
			6 sem.	8 sem.	10 sem.	12 sem.	16 sem.
1	-	Ausente	ND	0,04	0,04	0,04	ND
2	-	Ausente	0,04	0,03	ND	0,02	ND
3	+	Transitorio	0,04	0,03	0,08	0,05	ND
4	+	Transitorio	0,12	0,04	0,07	0,04	ND
5	+	Transitorio	0,04	0,03	ND	0,04	ND
6	+	Persistente	0,13	0,13 †	3,18 †	3,78 †	3,44 †
Claves: AH – albúmina humana; ND – no realizado; *niveles de HBsAg expresados como unidades de absorbancia.							
† Muestras positivas para ADN de VHB mediante análisis por PCR							

Como se esperaba, los ratones de control (Alb-uPA negativos, nº 1-2) tienen niveles no detectables de HBsAg y los tres animales transgénicos con función de injerto transitoria mostraron sólo aumentos mínimos esporádicos durante las semanas 6-12. Sin embargo, el ratón transgénico con el patrón de la función de injerto sostenida (ratón nº 6) demostró niveles claramente elevados a todos los puntos de tiempo medidos, con un aumento repentino después de 8 semanas de

permanecer en el intervalo de los niveles HBsAg en controles humanos infectados activamente. El aumento repentino sugirió la restauración de la replicación viral activa.

Para confirmar la replicación activa se analizaron las muestras de suero tomadas de este animal a las 8, 10, 12 y 16 semanas mediante PCR respecto a la presencia de ADN de VHB. El ADN aislado de 12,5 μ l de suero de ratón se sometió a PCR usando cebadores específicos de VHB y condiciones de amplificación previamente descritas (Tipples *et al. Hepatology* 24: 714 (1996)). Todos los análisis se realizaron de un modo ciego. Las cuatro muestras de suero fueron fuertemente positivas para la presencia de ADN viral (datos no mostrados). Este resultado fue de especial interés porque a pesar que no se estaba replicando activamente dentro de su donador humano, el virus se reactivó dentro del hospedador inmunodeficiente murino. Esta reactivación puede ser el resultado de la inmunidad antiviral inadecuada y es similar a la observada en portadores crónicos de VHB dada la inmunosupresión farmacológica después del trasplante de órganos (Terrault *et al. Gut* 40: 568 (1997)).

Este ejemplo por tanto demuestra que los hepatocitos humanos trasplantados en ratones quiméricos transgénicos pueden soportar la replicación viral del VHB.

Ejemplo 3

20 Establecimiento de la Infección Primaria con VHC

El éxito anterior en la producción de un animal quimérico que soporta la replicación del VHB quimérico apoya el uso de un animal como un modelo de VHB. Sin embargo, las grandes diferencias entre VHB y VHC que se han analizado anteriormente (Antecedentes) significan que no podría haber expectativas razonables respecto a que el modelo animal fuera susceptible a la infección por VHC a través de una vía normal de infección (por ejemplo, transmisión intravenosa) o que el hígado quimérico podría soportar una infección activa con VHC, particularmente en vistas al fracaso de otros en el desarrollo de modelos animales de VHC y lo poco común que son los sistemas celulares para VHC. El éxito comparativo con modelos animales de VHB y los fallos repetidos de otros con los modelos animales de VHC indican que se no puede simplemente extrapolar de VHB a VHC. Por tanto, se intentó establecer una infección primaria con VHC en ratones con hígados quiméricos usando suero humano infectado viralmente.

Se transplantó a siete camadas a los 7 días de edad hepatocitos humanos aislados de un paciente serológicamente negativo para las infecciones tanto con VHC como con VHB. Después de confirmar la función de injerto inicial en 5/7 animales a las 6 semanas después del trasplante, todos los ratones se inocularon por vía intravenosa con 0,25 ml de suero humano obtenido de un donador positivo para VHC no relacionado. El estado positivo para VHC del donador de suero humano se confirmó que era positivo para ARN de VHC mediante PCR, con títulos virales de 1×10^7 copias por ml de suero. Por tanto, en cada ratón se inoculó aproximadamente $2,5 \times 10^6$ partículas virales. Las muestras séricas que se tomaron de los siete ratones a las 11, 12 y 13 semanas después del trasplante (5, 6 y 7 semanas después de la infección) se analizaron con respecto a la presencia de ARN de VHC mediante análisis por RT-PCR usando el sistema Cobas Amplicor (Roche Diagnostics), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Dos ratones no trasplantados sirvieron como controles de infección simulada.

De los cinco animales con buen injerto inicial, cuatro mostraron el patrón de función de injerto transitoria y de nuevo un animal demostró niveles de AH a la máxima intensidad en todos los puntos de tiempos medidos. Las tres muestras que se tomaron del animal con quimerismo humano prolongado como se refleja mediante niveles de albúmina humana persistente en el suero fueron fuertemente positivas para ARN de VHC y persistentemente positivas a intervalos semanales hasta 36 semanas. El análisis RT-PCR fue uniformemente negativo para animales negativos para el transgén Alb-uPA o que sólo expresaban de manera transitoria el marcador AH para el transgén. Como 6 animales fueron negativos para el ARN de VHC, la posibilidad de las señales positivas de RT-PCR en el séptimo animal originadas del virus residual del inóculo es remota. Este ejemplo apoya la conclusión de que este animal se había desarrollado, y a las 23 semanas después del trasplante y 20 semanas después de la infección, propaga una infección activa de VHC a $1,2 \times 10^5$ - $1,8 \times 10^5$ viriones/ml de suero.

Esta serie de experimentos establece la capacidad del ratón transgénico SCID-beige/Alb-uPA de generar y sostener un hígado humano quimérico durante un tiempo prologando y quizás periodos de tiempo indefinidos después del trasplante de hepatocitos humanos. Estos órganos quiméricos se pueden infectar *de novo* con suero humano positivo para VHC y pueden soportar la replicación a largo plazo (por ejemplo, durante un periodo de semanas o meses a diferencia de unos cuantos días) de virus hepatotropos específicos de seres humanos a niveles que pueden igualarse a los niveles clínicos en seres humanos. Las partículas virales de VHC se pueden detectar en suero, sangre u otras fracciones derivadas de la sangre mediante técnicas convencionales, pudiendo dichas técnicas automatizarse para facilitar la exploración más rápida. Por ejemplo, las muestras del hospedador infectado con VHC se pueden diluir con suero no infectado conocido (por ejemplo, aproximadamente de una dilución doble a cuádruple), para proporcionar un volumen de muestra adecuado para su uso en una máquina automatizada y proporcionar intensidades de señal en los ensayos no distinguibles de muestras humanas aleatorias.

La replicación a largo plazo de VHC en el modelo de la invención (por ejemplo, durante un periodo más largo de aproximadamente 4 semanas, generalmente más largo de aproximadamente 12 semanas, por ejemplo, aproximadamente de 3 meses a 6 meses o más) permite el uso del modelo en el ensayo de fármacos durante largos periodos

de tiempo, pudiendo dichos periodos ser necesarios para un desarrollo adecuado del fármaco. Por ejemplo, el efecto de la administración de interferón- α (particularmente, interferón- α 2b), una terapia anti-VHC, generalmente sólo es detectable en humanos después de aproximadamente 12 semanas de tratamiento. En un modelo animal que sostuvo la replicación viral durante solo unos días o semanas y/o exhibió producción viral no consistente, sería difícil o imposible determinar si los cambios en los títulos virales se debieron a fluctuaciones terapéuticas candidatas o normales en títulos inherentes en el modelo animal. La presente invención proporciona un modelo que evita este problema.

En resumen, hasta dónde alcanza el conocimiento de los inventores, este es el primer informe en un modelo animal no primate que es susceptible de la infección por VHC mediante una vía normal de infección. El modelo es clínicamente relevante (por ejemplo, puede infectarse mediante una vía normal de infección y soportar la infección por VHC persistente similar a la observada en humanos), puede producirse regularmente y de manera fiable en números sustanciales y permitirá a los investigadores explorar directamente estrategias para inhibir la replicación viral *in vivo*.

Ejemplo 4

Infección con VHC de Ratones Alb-uPA

En este Ejemplo el trabajo anterior se expandió más para demostrar que el modelo animal de la invención puede soportar la replicación de VHC.

Métodos y Materiales

Los siguientes Métodos y Materiales se usaron en este ejemplo.

Desarrollo de la cepa scid/Alb-uPA. Los animales se ubicaron en condiciones libres de virus/antígeno y se supervisaron de acuerdo con las directrices establecidas por el Consejo Canadiense a Protección de Animales (1993). La aprobación de la experimentación animal se obtuvo del Comité del Bienestar Animal de la Universidad de Alberta.

Los ratones hemicígotos Alb-uPA (cepa TgN(Alb)Plau)144Bri, The Jackson Laboratory) se cruzaron con ratones homocígotos scid-bg (cepa C.b-17/Gbms Tac-scid-bgN7, Taconic Farms) y la progenie que portaba el transgén Alb-uPA se identificó mediante análisis por PCR del ADN genómico extraído de biopsias de cola (Jackson Laboratories technical support). A través del retrocruzamiento, el rasgo scid se crió hasta la homocigosidad como se confirma mediante la cuantificación de la IgG sérica total usando un ELISA sándwich. Se sacrificaron animales con > 1% de IgG sérica normal.

Aislamiento y purificación de hepatocitos humanos. La aprobación ética para el uso de tejido se obtuvo del Consejo de Ética de la Investigación Médica de la Universidad de Alberta; se obtuvo consentimiento informado de todos los donadores de hepatocitos. Los segmentos de tejido hepático humano (15-20 cm³) se obtuvieron de regiones de especímenes de resección hepática que normalmente se descartarían después del examen patológico; la mayoría de operaciones se realizaron para cáncer intrahepático.

Después de enfriar rápidamente los especímenes resecionados, se aislaron los hepatocitos y se purificaron mediante perfusión basada en la colagenasa de dos etapas convencional (Seglen Métodos Cell Biol. 13:29-83 (1976); Ryan *et al.* Surgery 113:48-54 (1993)) usando 0,38 mg/ml Liberase Cl (Boehringer-Mannheim) en el perfundido de colagenasa. Después de la purificación, se lavaron las células y se suspendieron en la solución de Belzer-UW (DuPont) a 0°C para el almacenamiento a corto plazo antes del trasplante. Los recuentos de células y la viabilidad se confirmaron mediante el hemocitómetro y la exclusión por azul tripan; la viabilidad final fue rutinariamente > 80%.

Trasplante de hepatocitos humanos. Se anestesió a los receptores (5-14 días de edad) con halotano/O₂ y se hizo una pequeña incisión en el costado izquierdo. En la ampliación operativa, se inyectaron 1x10⁶ hepatocitos viables en el polo esplénico inferior con un juego de inyección butterfly de 27 g (Abbott), con una única pinza estéril de titanio localizada a través del sitio de inyección para la hemostasis. Se reemplazó el bazo y se cerró la incisión del costado en dos niveles.

Detección de AH en el suero de ratón mediante inmunoprecipitación y transferencia de Western. El suero de ratón (20 µl) se incubó con anticuerpo monoclonal anti-AH (Clon HSA-9, Sigma) y los complejos antígeno-anticuerpo se recogieron con perlas de proteína G-agarosa (Boehringer-Mannheim). En condiciones reductoras, los inmunoprecipitados se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa. Las transferencias de Western se prepararon usando un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-AH (Clon HSA-11, Sigma), con conjugado de estreptavidina-HRP y sustrato quimioluminiscente (Pierce) para la detección de la señal.

Determinación de la cigosidad del transgén Alb-uPA. El ADN de ratón (3 µg) se digirió con PvuII, se fraccionó por tamaño en gel de agarosa al 0,7%, se transfirió a una membrana Hybond-N + (Amersham Life Science), y se hibridó con una sonda marcada con [³²P] del intrón final del gen uPA (posiciones 7312-7920, acceso GenBank M17922). Una banda de 2,88 kb derivó de los transgenes uPA (T) y una banda de 2,53 kb de genes endógenos uPA (E); la hibridación se cuantificó mediante un phosphorimager Fuji y por un Software Image Gauge.

Imunohistoquímica. Las biopsias de hígado de ratón se fijaron en formalina al 10% y se incluyeron en parafina. Las secciones de 5 μ de grosor se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E) de un modo convencional. Las secciones seleccionadas se trataron con un kit bloqueante endógeno de avidina/biotina (Zymed Laboratories, INC.) y se inmunotizó con un anticuerpo monoclonal anti-hepatocito humano (DAKO, dilución 1:20); el anticuerpo unido se detectó usando el Super Sensitive Immunodetection System (BioGenex).

Ensayo de transferencia puntual de proteínas para la cuantificación de la producción de AH. Las muestras de suero de ratón (2 μ l) se incubaron durante 5 minutos a 100°C en 40 μ l de tampón reductor y se transfirieron alícuotas de 2 μ l por triplicado sobre nitrocelulosa. Las membranas secadas se impregnaron en tampón de transferencia, se bloquearon con el 3% de PBS-Tween y se prepararon como transferencias de Western. Se cuantificó la quimioluminiscencia usando un phosphorimager STORM, a partir de una curva patrón preparada en cada transferencia.

Análisis cuantitativo de la cadena positiva de ARN de VHC en el suero de ratón. El análisis cuantitativo de VHC se realizó de un modo ciego mediante el Laboratorio de Salud Pública de Alberta Provincial (Edmonton, Alberta, Canadá) o el Centro Canadiense de Control de Enfermedades (Winnipeg, Manitoba, Canadá). Se realizó el análisis en muestras de suero usando el sistema Cobas Amplicor HCV Monitor (Roche Diagnostics) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Detección de la cadena negativa de ARN del VHC mediante una PCR para ARN con una transcriptasa inversa termoestable rTth. El ARN total se aisló de biopsias hepáticas de ratón o de suero humano infectado usando TRIZOL (Gibco BRL). La RT-PCR se realizó usando un kit de PCR para ARN con una transcriptasa inversa termoestable rTth (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN de cadena positiva se detectó con un cebador antisentido (5'-CTCGCAAGCCCCCTATCAGG-3' (SEC ID N°: 1)) y la cadena negativa con cebador sentido (5'-GAAAGCGTCTAGCCATGGCGT-3' (SEC ID N°: 2)) para la transcripción inversa. El ADNc específico de cadena se amplificó añadiendo el otro cebador para dirigirse a una región de 240 pares de bases (bp) de la región no codificante 5' (NCR) y se sometió a 35 ciclos de 30 s a 95°C, 45 s a 66°C y 90 s a 70°C, seguido de 5 minutos a 70°C. Los productos de la reacción se cargaron sobre un gel de agarosa al 2%, se transfirieron a una membrana de nylon Hybond-N + (Amersham Pharmacia Biotech) y se hibridaron con una sonda de ADN marcada con α -³²P para la NCR 5' de VHC a 42°C durante una noche.

Detección de la cadena negativa de ARN de VHC mediante un ensayo de protección de RNasa. El ARN total se aisló de hígado de ratón usando el reactivo Trizol (GIBCO/BRL) y de suero humano infectado con VHC usando el Mini Kit QIAamp Viral ARN (Qiagen), cada uno de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se aplicó una sonda marcada con ³²P al ARN extraído, la ribosonda antisentido purificada por el gel (detección de la cadena (+)), la ribosonda sentido (detección de la cadena (-)) y/o la ribosonda antisentido de β -actina.

Construcciones de Plásmidos. Se prepararon tres construcciones de plásmidos para la transcripción *in vitro* de ARN de VHC truncado. HCVPfix/KS + es una construcción desarrollada originalmente en los laboratorios para los estudios de expresión de la serina proteinasa de VHC. El ARN total preparado a partir de suero fresco obtenido de pacientes infectados con VHC (Chomczynski *et al.* Anal Biochem 162, 156-159 (1987)) se desnaturalizó durante 5 min. a 95°C. La síntesis de ADNc se realizó en un volumen de reacción de 20 μ l con super transcriptasa inversa de AMV (Molecular Genetic Resources) durante 90 min. a 42°C. El cebador oligonucleotídico antisentido que se usó fue 5'-TCTCTGTC GACTCACTGGGGCACTGCTGGTGG-3' (SEC ID N°: 3) (cebador 3'). Se realizó la PCR en un volumen total de 100 μ l y que contenía 2 μ l de la mezcla de reacción final de ADNc, Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, cada desoxirribonucleósido trifosfato a 200 μ M, el cebador 3' y el cebador 5' a 0,5 μ M (5'-GGAATTCGCGAC GACGATGACAAGGCACCCATTACGGCGTATGCCAGCAGA CAAGGGGCCTCTT-3' (SEC ID N°: 4)), y 2,5 U de Taq polimerasa de ADN (GIBCO/BRL). El cebador 5' añadió un sitio de escisión de enterocinasa y el fragmento entero de 623 pb se clonó en los sitios *Eco* RI y *Sal* I de pBluescript KS + (Stratagene, PDI).

Los dos plásmidos restantes se construyeron usando una estrategia de PCR para obtener una región de la región no codificante altamente conservada 5' (NCR) del ARN de VHC a partir de pCV-H77C (Masayuki *et al.* J. Proc Nat. Acad Sci USA 94, 8738-8743 (1994)). Los componentes de la PCR fueron como los anteriores excepto porque el molde usado fue 100 ng de pCV-H77C y los cebadores fueron 5'-GAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAG-3' (SEC ID N°: 5) (cebador 5') y 5'-GGCACTCGCAAGCACCTATCAGGC-3' (SEC ID N°: 6) (cebador 3'). Ambas orientaciones del producto de 245 bp se clonaron por TA dentro de pCR2.1 TOPO usando un kit de Clonación TOPO TA disponible en el mercado (Invitrogen) para generar plásmidos pCR 2.1/NCR sentido y pCR 2.1/NCR antisentido. Todos los clones se confirmaron mediante secuenciación del ADN (Instalación Principal de ADN de la Universidad de Alberta).

Preparación de las Ribosondas y los Transcritos Truncados de ARN de VHC. Las ribosondas se prepararon mediante transcripción *in vitro* usando la polimerasa de ARN T7 (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en presencia de [³²P] UTP. Para la detección de la cadena (+) de ARN de VHC, se transcribió una ribosonda antisentido de 383-nt a partir de pCR 2.1/NCR antisentido digerido por Kpn I y para la cadena (-), se transcribió una ribosonda sentido de 636-nt a partir de HCVPfix/KS + digerido por Sal I. Para la detección de β -actina, se usó pTRI-Actin-Mouse (AMBION) linearizado para generar una ribosonda de 304 nt. Para demostrar la especificidad de la detección específica de cadena del ARN de VHC, se prepararon también ribosondas sentido y antisentido radioinertes. En resumen se digirió pCR2.1/NCR/sentido/antisentido con KPN I y HCVPfix/KS + se digirió con Sal I antes de la transcripción *in vitro* usando la polimerasa de ARN T7. Adicionalmente, se linearizó el HCVPfix/KS + con Eco

R1 y se transcribió *in vitro* usando una polimerasa de ARN T3 (Promega). Todas las reacciones de transcripción *in vitro* fueron de 1 hora a 37°C seguidas de un tratamiento con DNasa libre de RNasa (DNase RQ1, Promega) durante 30 min a 37°C. Las ribosondas marcadas se purificaron en gel y las ribosondas radioinertes de ARN de VHC se precipitaron con 2,5 volúmenes de etanol absoluto después de añadir 0,5 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M. La integridad de los ARN radioinertes transcritos *in vitro* se evaluó mediante electroforesis a través de un gel de agarosa al 1%. Las muestras de ARN se desnaturalizaron y se hibridaron durante una noche a 42°C y la digestión de RNasa se realizó usando un kit de ensayo de protección de RNasa (AMBION RPA III Kit). Se resolvieron los productos en un gel de poliacrilamida al 5% que contenía urea 8 M y se expusieron a una película Kodak X-Omat AR.

Producción de Ratones Transgénicos y Trasplante de Hepatocitos Humanos

Los ratones que portaban Alb-uPA se cruzaron con animales de un linaje C.b-17/scid-bg, y a través de retrocruzamientos selectivos se crió el rasgo scid hasta la homocigosidad. En experimentos iniciales los animales homocigotos scid que portaban el transgén Alb-uPA de un modo hemicígote se cruzaron y se trasplantaron intrasplénicamente $0,5-1 \times 10^6$ hepatocitos humanos viables aislados recientemente en camadas de progenie de 4-12 días de edad. La albúmina humana, producida exclusivamente por los hepatocitos humanos, se empleó como un indicador de la función de injerto.

En un estudio piloto de 36 trasplantes, se demostró una fuerte señal de AH a las 4-5 semanas después del trasplante en el suero de 19 receptores. Las bandas AH se detectaron tan pronto como dos semanas después del trasplante y aumentaron en intensidad en los puntos de tiempo de 4-6 semanas sugiriendo expansión del injerto (Fig. 5). El análisis ciego del genotipo reveló que todos los animales fuertemente positivos para AH animales portaban el Alb-uPA mientras que los restantes no lo hacían.

A pesar de las fuertes señales iniciales AH, algunos receptores de injertos tuvieron la extinción de la señal alrededor de las 14 semanas, mientras que un segundo subconjunto mantuvieron señales fuertes más allá de las 30 semanas; los resultados representativos se muestran en la Fig. 7. Como estos receptores de injertos fueron progenie de cruces heterocigotos, la divergencia en la supervivencia de injertos como resultado de la cigosidad del transgén Alb-uPA se ensayó. Usando una sonda marcada con $[^{32}\text{P}]$ derivada del intrón final del gen uPA, los uPA transgénicos y endógenos se distinguieron mediante análisis de transferencia Southern, y la relación de señal podría usarse para determinar la cigosidad del conjunto de transgenes (Fig. 6). El análisis del ADN genómico confirmó que los animales que demostraban injertos humanos prolongados fueron homocigotos para Alb-uPA, mientras que el subconjunto con función de injerto fallido fueron hemicígotos.

El examen de las secciones de hígados homocigotos trasplantados reveló grandes nódulos de hepatocitos organizados en estructuras típicas de tipo cordón. Dentro de los nódulos, el citoplasma del hepatocito y los núcleos parecían histológicamente normales en comparación con los tejidos circundantes, donde las células fueron obviamente más pequeñas, con citoplasma vacuolado y núcleos picnóticos. Para poder ver las células humanas, se inmunotñieron secciones con un anticuerpo monoclonal anti-hepatocito humano que marcó de manera intensa el hígado humano de control pero no tuvo reacción cruzada sustancial con hígado de ratón homocigoto no trasplantado. Esto demostró que los nódulos eran claramente de origen humano, expandiéndose hacia el exterior en y comprimiendo tejidos circundantes derivados murinos. Mientras que los grandes nódulos humanos contenían hepatocitos sanos, todo el tracto biliar y las estructuras portales parecían que eran derivados del hospedador.

Infección por VHC

Con pruebas de injertos humanos prolongados, los ratones se infectaron con suero de donadores humanos infectados con VHC. Los hepatocitos de seres humanos no infectados se trasplantaron en 27 descendientes de los cruzamientos heterocigotos y a las 6 semanas después del trasplante todos los ratones se inocularon por vía intravenosa $\pm$ intraperitoneal con 0,25 ml de suero humano obtenido de uno de dos donadores positivos para VHC no relacionados (genotipos virales 1a y 6a). Las muestras de suero seleccionadas entre 3 y 40 semanas después de la inoculación se analizaron para la presencia de la cadena positiva de ARN de VHC mediante RT-PCR; los resultados del experimento se resumen en la Tabla 2. La duración del injerto se definió como el período de detectabilidad de AH mediante un procedimiento de inmunoprecipitación/transferencia de Western.

TABLA 2

Infección de ratones homocigotos con VHC humano

Genotipo Alb-uPA	n	Señal Inicial AH	Mediana de la Duración de Injerto (semanas)	ARN de VHC (RT-PCR)
-/-	8	Ninguna*	0	0/8
+/-	15	Fuerte	15,5	0/15
+/+	4	Fuerte	30,5†	4/4 ‡

3/8 animales que tuvieron una señal única débil AH sólo al punto de tiempo a las 5 semanas.

† p<0,00 contra hemocigotos y tipo silvestre mediante el ensayo de Kruskal-Allis.

‡ p<0,00 contra hemocigotos y tipo silvestre mediante el ensayo de Chi-cuadrado de Pearson.

Los 8 controles de tipo silvestre no tuvieron prueba de función de injerto inicial y fueron negativos persistentemente para ARN de VHC. Los animales hemocigotos tuvieron señales iniciales fuertes a AH, pero progresivamente perdieron la intensidad de señal con el tiempo a una duración de injerto media de 15,5 semanas; la cadena (+) de ARN de VHC no se detectó en ninguno de estos animales en puntos de tiempo múltiples. En gran contraste con esto, los cuatro animales homocigotos para el transgén Alb-uPA demostraron quimerismo humano sostenido (mediana 30,5 semanas) y fueron positivos para ARN de VHC mediante análisis de suero por RT-PCR. El análisis cuantitativo de ARN de VHC reveló niveles virales que variaban desde $1,4 \times 10^3$ a $1,4 \times 10^6$ copias de ARN/ml, dentro del intervalo de humanos infectados. Se establecieron infecciones exitosas con ambos genotipos de inóculo viral y duración de la infección que variaba de 10 a 21 semanas en esta cohorte inicial de cuatro animales.

Infección con VHC de Animales Homocigotos o Hemocigotos para el Transgén Alb-uPA

Mientras que la cadena positiva de ARN de VHC era persistentemente demostrable en animales homocigotos, el ARN de VHC fue indetectable en hemocigotos. Los investigadores formularon la hipótesis de que los hemocigotos no soportan la replicación de VHC a niveles detectables como resultado de un injerto inicial disminuido y la pérdida de injerto más temprana. Para ensayar esta hipótesis, se desarrolló un ensayo de transferencia puntual de proteínas usando quimioluminiscencia y diagnóstico por imágenes de fósforo (phosphorimaging) para cuantificar de manera más precisa la producción de AH. Después del trasplante de 1×10^6 hepatocitos humanos criopreservados de un único donador humano en 21 receptores (15 homocigotos y 6 hemocigotos), los animales seleccionados aleatoriamente se ensayaron para el análisis cuantitativo de AH y/o se sacrificaron para el análisis inmunohistoquímico. Los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 8.

Mientras que los animales hemocigotos y homocigotos inicialmente tenían similares señales de intensidad de AH, en las semanas 5-6 se puso de manifiesto una clara dicotomía y en las semanas 10-12 las señales de AH en ratones homocigotos fueron más de un orden de magnitud superiores a los hemocigotos (Fig. 8). Las secciones hepáticas aleatorias de receptores homocigotos y hemocigotos sacrificados a puntos seleccionados después del trasplante se inmunotizaron con un anticuerpo monoclonal anti-hepatocito humano para estimar el porcentaje de reemplazamiento del hígado murino con tejido humano. Estos datos inmunohistoquímicos confirman los hallazgos de la transferencia puntual de proteínas, con células humanas ocupando porciones sustanciales (> 50%) de áreas hepáticas transversales en animales homocigotos. En claro contraste, el examen de múltiples secciones de tejido de receptores heterocigotos reveló sólo pruebas mínimas de injerto humano. En conjunto, estos estudios sugieren una ventaja sustancial en tanto la magnitud como la duración del injerto de hepatocitos humanos para los receptores homocigotos Alb-uPA en comparación con sus equivalentes heterocigotos.

Mediante el trasplante en la progenie de cruces heterocigotos, se establecieron las infecciones exitosas en 4/27 ratones, todos homocigotos. Este porcentaje de éxito haría el modelo demasiado difícil para su uso rutinario. Como resultado de la ventaja cuantitativa en el tamaño de injerto atribuido a ratones homocigotos, la colonia parental se cambió a la producción exclusiva de ratones homocigotos Alb-uPA. Usando el ensayo de transferencia puntual que se ha descrito anteriormente para explorar de manera temprana con respecto a los niveles altos de injerto de hepatocitos (niveles AH > 250 µg/ml), ~ 75% de los animales inoculados con VHC desarrollaron títulos virales persistentes > 3×10^4 copias/ml, con muchos > 106 copias/ml. El resto de los estudios virales se realizaron en receptores homocigotos.

Confirmación de la persistencia a largo plazo de VHC

La persistencia a largo plazo de los títulos virales en humanos es el resultado de la proliferación activa continua. En animales quiméricos inmunocomprometidos, sin embargo, se puede atribuir la persistencia de VHC a la eliminación viral más lenta más que a la verdadera infección y replicación. Cinco receptores de injertos homocigotos se inocularon

con 250 μ l de suero humano infectado (genotipo 3a; $2,95 \times 10^6$ copias de ARN viral/ml); cada animal recibió por lo tanto un inóculo de $7,38 \times 10^5$ copias de ARN. Los resultados de este experimento se muestran en Fig. 9. En 3/5 receptores, los títulos virales aumentaron a 16, 27 y 36 veces sobre el inóculo inicial a las 5 semanas después de la inoculación; en los 2 receptores restantes los títulos aumentaron modestamente en 5 semanas (1,6 y 4,3 veces).

La detección en curso de la cadena positiva de ARN de VHC se ha confirmado más allá de las 15 semanas después de la inoculación en cuatro animales (uno muerto después de la toma de muestra de sangre). El aumento inicial en los títulos junto con los altos niveles virales persistentes a las 15 semanas es consistente con la replicación viral en lugar de con un artefacto de continuidad. En otro estudio, un sexto ratón quimérico se infectó con un inóculo viral mucho más pequeño ($1,35 \times 10^3$ copias de ARN). La carga viral de suero total a las 10 semanas después de la infección fue $1,33 \times 10^6$ copias, un aumento de 1.000 veces. Una "interacción" no productiva no podría sostener razonablemente un aumento de 3-log en carga viral, apoyando fuertemente el hecho de la replicación viral.

El VHC es un virus de ARN con una cadena positiva que se replica a través de un intermedio de cadena negativa; la detección de la cadena (-) de ARN de VHC dentro del hígado constituye una prueba de la replicación. Para reducir el riesgo de resultados positivos falsos (Lanford *et al.* Virology 202:606-614 (1994)), el análisis de la cadena (-) se realizó usando dos técnicas separadas pero complementarias.

Se confirmó que ocho receptores de injerto homocigotos inoculados con 5×10^5 copias de ARN viral de suero humano obtenido de manera reciente tenían la cadena (+) de ARN de VHC a las 3-4 semanas después de la inoculación. Las muestras de tejido hepático se obtuvieron por una hepatectomía parcial al 50% a las 2-5 semanas después de la inoculación en seis animales y a las 12-13 semanas en los dos restantes.

El análisis para la cadena (-) de ARN de VHC se realizó de un modo ciego mediante un laboratorio independiente (A.R.) usando un protocolo de PCR para ARN con una transcriptasa inversa termoestable rTth y cebadores específicos de cadena. Los resultados, que se muestran en las Figs. 10A-10C, confirmaron la producción del intermedio replicativo de VHC (ARN viral de cadena negativa) dentro de los hígados de ratones homocigotos Alb-uPA trasplantados e infectados. Las denominaciones de letras (A hasta J, especificadas posteriormente) en las Figs. 10A-10C son muestras de control; las denominaciones de números (1 hasta 10) representan muestras individuales de ARN aisladas de hígados de diez ratones homocigotos a los que se realizó el trasplante y después se inoculó con suero humano infectado con VHC.

La Fig. 10A muestra la detección de la cadena (+) de ARN (panel superior) o la cadena (-) de ARN (panel inferior) mediante el protocolo de PCR para ARN con una transcriptasa inversa termoestable rTth con cebadores específicos de cadena. A es un ratón control de tipo silvestre, no trasplantado, no infectado; B es un ratón trasplantado heterocigoto inoculado con VHC; C es un ratón trasplantado homocigoto, no inoculado con VHC; D es suero tomado de un humano infectado; E es un escalera de ADN patrón; F representa la unión de la sonda marcada a secuencias de ADN diana generadas a partir de la cadena (+) (panel superior) o la cadena (-) (panel inferior) de ARN viral; G es un ARN hepático de ratón (10 μ g) al que se le ha añadido ARN sérico de un humano positivo para VHC; H es ARN hepático de ratón (10 μ g) al que se le ha añadido 10^6 copias de ribosonda radioinerte antisentido (superior) o sentido (inferior); I es un ARN hepático de ratón (10 μ g) al que se le ha añadido 10^6 copias de ribosonda radioinerte sentido (panel superior) o antisentido (panel inferior); J son ribosondas hibridadas con 10 μ g de ARN hepático de ratón, todas las etapas posteriores son idénticas excepto por la adición de RNasa. Los fragmentos en este carril representan ribosondas no digeridas (flecha), con longitudes esperadas mayores que las de los fragmentos correspondientes protegidos por la hibridación a sus dianas. La replicación del genoma de VHC se observa claramente en 5/9 animales ensayados mediante este método.

La Fig. 10B muestra los resultados de un análisis de series de diluciones de animales seleccionados usando el protocolo de PCR para ARN con una transcriptasa inversa termoestable rTth. Tanto la cadena (+) como la (-) de ARN se detectan en diluciones 2-3 log. En este experimento, la cadena (-) de ARN viral no se detectó sólo en el ratón 5 aunque se observó anteriormente y se confirmó más tarde en múltiples análisis RPA. Los resultados de la detección de la cadena (+) de ARN de VHC (panel superior), la cadena (-) de ARN de VHC (panel medio) o ARN de β -actina (panel inferior) mediante un ensayo de protección de RNasa se muestran en Fig. 10C. Los carriles control se denominan como anteriormente; el ratón 10 se analizó sólo mediante el método RPA. Este ensayo está relacionado con los datos anteriores de los 5/6 animales, lo que confirma la presencia de la cadena (-) en 3/4. El no detectar la cadena (-) de ARN en el ratón 6 probablemente se deba a la sensibilidad reducida del ensayo RPA.

Análisis inmunohistoquímico

Para confirmar la localización de VHC en hígados de ratones trasplantados, las secciones hepáticas tomadas de ratones homocigotos a los que se había trasplantado hepatocitos humanos y después inoculado suero humano infectado con VHC se inmunotñeron con un anticuerpo monoclonal contra la región NS3-NS4 de la poliproteína viral. Las secciones control de hígado humano muestran una apariencia citoplásmica granular, con exclusión de la tinción de los núcleos (Fig. 11A). Las áreas de fibrosis y las estructuras de triada portales no se tñeron positivamente para NS3-NS4. Aunque la mayoría de hepatocitos se tñeron positivamente, había áreas de poca tinción. Las secciones de control de hígados de ratones no trasplantados no mostraron ninguna prueba de tinción (no mostrado). Las secciones experimentales tomadas de ratones trasplantados e infectados (Fig. 11B) mostraron áreas de tinción de hepatocitos que fueron similares en la apariencia citoplásmica granular a secciones de control humanas, sin embargo a una intensidad

de tinción reducida ligeramente. Este hallazgo inmunohistoquímico proporciona pruebas de que el VHC realmente infecta los hepatocitos humanos dentro del hígado quimérico de un ratón trasplantado Alb-uPA.

Conclusión

5

Estos ensayos separados y realizados independientemente claramente demuestran la presencia de la cadena negativa de ARN de VHC dentro de hígados quiméricos de los que se tomaron muestras a las 2-5 semanas después de la inoculación. Los experimentos con el análisis semanal secuencial mediante RT-PCR cuantitativa (Fig. 9) demostraron un aumento rápido en los títulos séricos de VHC en las semanas 2-4 después de la inoculación, que correspondieron a las tasas máximas de replicación viral dentro del hígado; se esperaría que esto sea paralelo a las cantidades máximas de cadena (-) de ARN viral. Esto puede explicar por qué la cadena (-) se detecta antes en las infecciones (5/6 animales de los que se tomaron muestras a las 2-5 semanas) en lugar de más tarde (0/2 de los que se tomaron muestras a las 12-13 semanas). En conjunto, estos datos apoyan la replicación viral activa en este modelo animal. Además, la infección con VHC es crónica. Más recientemente, los inventores han demostrado un modelo animal de la invención basado en un ratón quimérico transgénico Alb/uPA que tiene un injerto de hepatocitos humanos funcionales (como se determina mediante la detección de los altos niveles séricos de albúmina a las 35 semanas después del trasplante (mayores de aproximadamente 800 unidades mediante transferencia puntual)) y títulos altos de VHC en suero 35 semanas después del trasplante ($1,7 \times 10^5$ copias/ml).

20 Pasaje en serie de la infección con VHC

Después de confirmar la replicación, se intentó el pasaje en serie de la infección con VHC de ratón a ratón. El suero fresco de un donador humano ($250 \mu\text{l}$; $4,75 \times 10^5$ copias de ARN viral) se inoculó por vía intraperitoneal en un ratón quimérico sin tratamiento previo; cuatro semanas después de la inoculación, los títulos virales fueron $1,76 \times 10^6$ copias/ml. El suero que se tomó de este ratón ($125 \mu\text{l}$; $\sim 2,19 \times 10^5$ copias de ARN) se inoculó por vía intraperitoneal en un segundo ratón quimérico sin tratamiento previo, que desarrolló títulos de $1,75 \times 10^4$ copias/ml a las cuatro semanas después de la inoculación. El suero de este receptor de primer pasaje se inoculó después ($100 \mu\text{l}$; $\sim 1,75 \times 10^3$ copias de ARN) en un tercer ratón quimérico sin tratamiento previo. Cinco semanas después de la inoculación, este receptor de segundo pasaje tuvo títulos virales de $3,42 \times 10^6$ copias/ml. Si se asume la hipótesis nula de que la replicación no se produce sino que el inóculo humano inicial humano persiste, este receptor de segundo pasaje habría recibido ~ 6000 copias virales del inóculo inicial ($4,75 \times 10^5$ copias virales $\times 1:8$ dilución $\times 1:10$ dilución, asumiendo el volumen de suero de ratón $\sim 1000 \mu\text{l}$); el receptor de segundo pasaje tuvo 576X más ARN viral medido que lo que habría recibido del inóculo humano original. El suero de este receptor de segundo pasaje ($30 \mu\text{l}$) se inoculó en dos ratones sin tratamiento previo adicionales, los cuales desarrollaron posteriormente infecciones con VHC (receptores de tercer pasaje; cuantificación pendiente). Hasta ahora se ha demostrado la transmisión en serie en 7 animales incluyendo 2 animales después de tres generaciones de pasaje. Esta transmisión desde el humano $\rightarrow$ ratón $\rightarrow$ ratón $\rightarrow$ ratón $\rightarrow$ ratón representa tanto la replicación del genoma de VHC como la producción de partículas totalmente infecciosas.

Estos experimentos establecen que los ratones homocigotos scid/Alb-uPA con hígados humanos quiméricos pueden infectarse *de novo* con suero humano positivo en VHC, soportan la replicación de VHC a títulos clínicamente relevantes y son capaces de transmitir esta infección a otros ratones quiméricos. Las infecciones exitosas se han establecido con genotipos virales 1a, 1b, 3a y 6a, con rápidos aumentos en los títulos de ARN viral hasta niveles fácilmente detectables mediante ensayos comerciales convencionales. La homocigosidad de Alb-uPA es crítica para el establecimiento exitoso de la infección viral y mediante el uso de homocigotos como receptores, junto con la exploración temprana de la función de injerto mediante el análisis de transferencia puntual, las infecciones con VHC se establecen rutinariamente en $\sim 75\%$ de todos los animales inoculados.

El procedimiento del trasplante necesita el equipo de microcirugía básico y habilidades técnicas. En manos de los inventores un trasplante, incluyendo la inducción anestésica y el tiempo de recuperación, lleva 5/6 minutos por animal. Mientras que el acceso a los hepatocitos humanos puede ser limitante para algunos investigadores, los rendimientos de los aislamientos de hepatocitos en el laboratorio de la invención son de media $2-3 \times 10^8$ células humanas viables. La capacidad de crioconservar células sobrantes permite la utilización eficaz, así como el transporte a centros sin acceso al tejido humano. Mientras que los porcentajes de éxito han sido más bajos después del trasplante de hepatocitos crioconservados, la preexploración de estos receptores con hibridación por transferencia puntual ha permitido su uso eficaz en los estudios del VHC, con éxito en la infección viral en aproximadamente el 50% de los animales con la transferencia puntual > 250 unidades en el momento de la inoculación.

Ejemplo 5

60 Células sanguíneas de cordón umbilical humano como fuente de células para el trasplante

En la bibliografía actual, se ha probado que las células madre humanas son pluripotentes. Estas tienen la capacidad para regenerarse en células hematopoyéticas así como en hepatocitos dada la combinación adecuada de condiciones y estímulos. Las células madre humanas han demostrado tener la capacidad de repoblar las células hematopoyéticas en ratones NOD/SCID (véase, Bhatia. *et al.* J Exp Med 186(4):619-24 (1997); Bhatia *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 94(10):5320-5 (1997); Laroche *et al.* Nat Med 2(12):1329-37 (1996). Respecto a la repoblación del hígado, sin embargo, los estudios clínicos han usado trasplantes de células madre en hepatoblastomas pediátricos para regenerar el hígado.

La sangre de cordón umbilical humano es una fuente rica de células madre. Además, se han criconservado de manera fiable y la integridad celular se conserva después de descongelarse. La sangre del cordón umbilical humano también está disponible más fácilmente. Debido a la disponibilidad limitada del tejido hepático fresco, una fuente alternativa de hepatocitos humanos sería útil en el desarrollo del modelo animal de la invención. Las células sanguíneas de cordón umbilical humano trasplantadas en los ratones SCID.bg/Alb-uPa pueden ser capaces de regenerarse en hepatocitos humanos viables. Posteriormente, tendrían el potencial para injertarse y desarrollar un hígado quimérico ratón/humano. Además, las células repoblarían el sistema inmune de los ratones SCID.bg/Alb-uPa.

Materiales y Métodos

Siguiendo el protocolo que se describe en la presente memoria, se trasplantan hepatocitos humanos en ratones SCID.bg/Alb-uPa a los 10-14 días de edad. En vez de hepatocitos humanos, se trasplantan 5 millones de monocitos sanguíneos de cordón umbilical humano (fuente de células madre) mediante la inyección intraesplénica. El protocolo de ensayar sueros de ratón con respecto a la presencia de albúmina humana mediante la transferencia puntual cuatro semanas después del trasplante se sigue como se describe en la presente memoria.

Además, para determinar si el sistema inmune también se ha repoblado, se realiza un frotis de sangre periférica a las cuatro semanas de edad para la presencia de linfocitos. A las ocho semanas, el suero se ensaya con respecto a la presencia de IgG humana mediante ELISA y la presencia de células CD4+ y CD8+ con el análisis FACS. Si estas células están presentes, se realizará la estimulación con PHA para determinar la funcionalidad de las células.

Ejemplo 6

Tratamiento con Interferón Alfa-2b En Ratones Scid/uPA Infectados Con VHC

Los modelos animales de VHC de la invención se pueden usar para explorar la actividad anti-VHC de compuestos quimioterapéuticos candidatos. Se conoce que el interferón alfa-2b tiene actividad anti-VHC. Por tanto, el tratamiento de ratones infectados con VHC de la invención con recombinantes interferón alfa-2b dará como resultado una disminución significativa de los niveles de ARN de VHC.

Métodos y Materiales

Animales: Los hepatocitos humanos se aislaron de muestras de tejido hepático humano obtenidas de la sala de operaciones usando la perfusión continua con colagenasa (Liberase HI, Boehringer Mannheim). Se trasplantaron de $0,5 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^6$ hepatocitos humanos frescos en ratones homocigotos SCID/uPA mediante una inyección intraesplénica a los 10-15 días de edad. 4 semanas después del trasplante la sangre se extrajo y se ensayó con respecto a la concentración de albúmina humana (AH) usando un ensayo de transferencia puntual cuantitativo. Se consideró que los ratones que mostraban $> 200 \mu\text{g/ml}$ de AH tenían un injerto exitoso y se usaron para este experimento.

Infección con VHC: A las ocho semanas después del trasplante, se inyectó a los ratones intraperitonealmente $50 \mu\text{l}$ de suero de un paciente con trasplante hepático positivo, de genotipo 3. Se almacenó el suero a -70 grados Celsius y se descongeló en el momento de la inoculación. El suero del paciente demostró niveles de ARN de VHC de $2,56 \times 10^5$ IU/ml. Toda la cuantificación de VHC se realizó mediante el Laboratorio Provincial en el Hospital de la Universidad de Alberta usando el Cobas Amplicor HCV Monitor versión 2.0 (Roche Diagnostics).

Administración de interferón: Se dividieron los ratones en tres grupos de tratamiento: grupo 1 = controles ($n=5$), grupo 2 = IFN 135 IU/g/d ($n=1$), grupo 3 = 1350 IU/g/d ($n=2$). Se empezó el tratamiento 2 semanas después de la inoculación con VHC. El IFN (o un volumen equivalente de solución salina normal) se inyectó IM durante 15 días consecutivos. Se extrajo la sangre para el ensayo de los niveles de ARN de VHC y la función de injerto en el inicio del tratamiento, al final del tratamiento y a las 2 y 4 semanas después de que el tratamiento hubiera finalizado.

Los animales recibieron trasplantes de hepatocitos humanos y, después de la confirmación del injerto satisfactorio mediante el ensayo de transferencia puntual con respecto a la albúmina humana de > 250 unidades, se les inyectó $100 \mu\text{l}$ IP de suero de un portador humano de VHC genotipo 3. Los valores iniciales son copias virales/ml suero de ratón a partir de 2 semanas después de la inyección de VHC, cuando estudios previos revelaron el mayor aumento absoluto en copias de VHC. La terapia con *interferón* empezó al inicio en 3 animales a las dosis de 135 ($n=1$), o 1350 ($n=2$) IU/gramos de peso corporal/día durante 2 semanas de tratamiento. La semana 2 es el título de VHC mediante RT-PCR al final de la terapia con *interferón*, mientras que la semana 4 es 2 semanas después de la terapia; el ensayo se realizó con el kit Amplicor de Roche y lo llevó a cabo el Laboratorio Provincial de Salud Pública de Alberta. Las muestras se hicieron ciegas y se entremezclaron con muestras de suero humano de análisis clínicos. La sensibilidad del ensayo es 600 IU/ml o aproximadamente $1,2 \times 10^3$ copias virales/ml. Los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación ("E" indica el valor del exponente).

TABLA 3

Efecto de IFN tras la Infección con VHC en el Modelo Animal de la Invención

Tratamiento	Título de VHC (RT-PCR)		
	Inicio	semana 2	semana 4
Control	2,7x10E3	2,5x10E4	6,6x10E3
Control	2,4x10E4	7,5x10E5	1,4x10E6
Control	1,6x10E5	1,7x10E5	0,9x10E5
Control	7,5x10E5	2,1x10E6	1,5x10E6
Control	1,2x10E6	> 2x10E6	1,7x10E6
135 IU/g/d	2,2x10E5	3,6x10E4	4,5x10E4
1350 IU/g/d	1,8x10E3	ND	ND
1350 IU/g/d	3,3x10E4	ND	ND

Cuatro de los cinco ratones no tratados control demostraron títulos de VHC que aumentaban en ese periodo de tiempo, mientras que 1 mostraba niveles estables. Los 3 animales tratados demostraron títulos virales decrecientes con el 2 a dosis más alta demostrando la eliminación viral (ND = no detectado).

Ejemplo 7

Inmunidad Pasiva Frente a la Infección con Hepatitis B con la administración de IgHB

El modelo de VHC descrito en la presente memoria se basa en la presencia de un hígado quimérico de ratón/humano en un animal inmunocomprometido, como ejemplo específico, el ratón SCID.bg/Alb-uPa. Este modelo no solo soporta un virus de la hepatitis C replicativo, sino que también soporta la infección por hepatitis B. Puesto que no hay vacunas actuales no probadas para la hepatitis C, los ratones infectados con VHB se usan para ensayar la validez del modelo animal en los ensayos de vacunas. Actualmente están disponibles tanto la inmunización pasiva como la activa para VHB.

La Inmunoglobulina contra la Hepatitis B (IgHB) es una vacuna pasiva desarrollada contra el antígeno de superficie de la hepatitis B. Se desarrolla mediante la recogida y combinación de plasma de donadores positivos anti-HB. El resultado final es un título alto de elaboración de anti-HB. En el entorno clínico, esto ha limitado la aplicabilidad por 1) la eficacia parcial 2) la corta semivida y 3) interfiere con la inmunidad a largo plazo. Sin embargo, en ciertas situaciones, se ha demostrado que es útil.

En el trasplante hepático, la inmunoprofilaxis de IgHB se usa y está aceptada ampliamente. Se ha mostrado que reduce significativamente la tasa de recurrencia de VHB después del trasplante en pacientes positivos para hepatitis B. Por consiguiente, esto ha reducido la morbilidad tanto en el injerto como en el paciente. Los pacientes se tratan con una dosis en embolada grande durante la etapa anhepática del trasplante. El tratamiento continúa durante un año y la dosis se determina mediante el título de anticuerpos anti-HB. Después de la exposición al pinchazo, la administración de IgHB previene la transmisión de VHB en el 80% de los casos.

El modelo animal de la invención se puede usar en el desarrollo de vacunas. Se usa una vacuna inmunoprolifática probada disponible para VHB como un control para mostrar la utilidad del modelo animal en el desarrollo de vacunas. A través de inyecciones de la inmunoglobulina contra la hepatitis B (IgHB), los ratones SCID.bg/Alb-uPa obtendrán inmunidad pasiva en una inoculación posterior de la hepatitis B, de esta manera previniendo y activa la infección viral.

Como se enfatiza arriba, VHB y VHC no son virus comparables. Sin embargo, puesto que no hay inmunoterapia pasiva actualmente disponible contra el VHC, el uso de VHB y de IgHB proporciona una exploración inicial para mostrar que una inmunoterapia que se conoce que es eficaz contra la infección con VHB es eficaz en el modelo animal de la invención lo que proporciona otra prueba de que el modelo animal de hecho proporciona una herramienta de exploración valiosa para la inmunoterapia pasiva.

Materiales y Métodos

Siguiendo el protocolo que se describe en los Ejemplos anteriores, se trasplantan hepatocitos humanos a los 10-14 días de edad en los ratones SCID.bg/ALB-uPa. Cuatro semanas después del trasplante, los ratones se ensayan para la transferencia puntual de albúmina humana. Los animales con una fuerte señal se eligen para el uso experimental.

Día 0: A las ocho semanas de edad, los ratones asignados al grupo experimental reciben una alta dosis de inyección intramuscular de IgHB (1 cc/kg) mientras que en el grupo control recibe una inyección con solución salina normal.

ES 2 346 636 T3

Día 1: Todos los ratones se inoculan con 100 μ l de suero de alto título de VHB (inyección intraperitoneal).

Día 1-14: Los ratones experimentales se tratan con una dosis de mantenimiento de IgHB (comparable a aquella de los pacientes con trasplante hepático) de 0,12 cc/kg una vez al día. Los ratones control continuaron con inyecciones de solución salina normal.

Para ensayar el efecto de IgHB, las muestras séricas se obtuvieron para los títulos de VHB a las 2, 4, 6, 8, 10 y 12 semanas después de la infección con VHB. El anticuerpo de superficie de la hepatitis B se ensaya el día 1 antes de la inoculación con VHB y de nuevo ocho semanas después de la infección.

Ejemplo 8

Uso de un Modelo Animal Inmunoreconstituido de VHC para Analizar la Respuesta Inmune en la Infección con VHC

El modelo animal de la invención proporciona una herramienta valiosa para estudiar las respuestas inmunes humanas en el contexto de células hepáticas autólogas infectadas con VHB o VHC. Los ratones que portan células hepáticas humanas se pueden inmunoreconstituir con células mononucleares de sangre periférica autólogas (PBMC, $2-3 \times 10^7$ células/ratón), para proporcionar un sistema modelo de la infección por VHB y VHC para realizar los siguientes estudios. Este modelo puede usarse después en las siguientes formas ejemplares.

Los experimentos descritos a continuación pueden proporcionar comprensión sobre el papel crítico de distintos componentes del sistema inmune, por ejemplo, células presentadoras de antígenos, ciertas citoquinas y células T y mecanismos bajo la inmunomodulación en la infección con hepatitis crónica. Estos estudios pueden proporcionar la base para el diseño e investigación de estrategias nuevas y candidatos nuevos de vacunas para la inmunoterapia de las infecciones crónicas con el virus de la hepatitis. Estos estudios también establecerán el sistema de modelo de ratón como un modelo preclínico para la evaluación de tratamientos futuros quimioterapéuticos y/o inmunoterapéuticos para las infecciones de hepatitis crónica.

Evaluación de la respuesta inmune y modulación en la infección con VHC crónico

Los ratones infectados con VHC, que se trasplantan con células hepáticas humanas y se reconstituyen con PBMC autólogas, se usan para evaluar la competencia celular inmune total y/o la supresión inmune en el contexto de la infección progresiva con VHC. Un estudio a lo largo del tiempo se realiza cuando las células T esplénicas o del ganglio linfático se obtienen a partir de los ratones y se establecen en cultivos *in vitro* para examinar la respuesta contra mitógenos, APC alogénicas, epítomos promiscuos Th (por ejemplo, toxoide tetánico, péptidos PADRE etc.) se evalúan mediante el ensayo de proliferación de células T. En los mismos cultivos, se examina la secreción de citoquinas en el sobrenadante de cultivo o la producción intracelular. Además, en estas células cultivadas, los marcadores de la activación de células T se examinan mediante citometría de flujo. Estos experimentos se realizan a lo largo del tiempo, de modo que las células T se recuperarán de los ratones en distintos tiempos (por ejemplo, 1, 4, 8, 12, 16 semanas después de la inyección y la reconstitución de PBMC) y se examinarán para su respuesta a los estímulos policlonales como se indica anteriormente. La carga viral de VHC también se evalúa a cada punto de tiempo, de modo que la respuesta inmune total se puede relacionar con la carga viral.

Junto con el estímulo policlonal, las respuestas de las células T contra conocidos epítomos ayudantes promiscuos de VHC se examinan *in vitro* y su estimulación se relaciona con la carga viral en experimentos a lo largo del tiempo. De modo similar, las células B se aíslan al mismo tiempo y se cultivan con estímulos policlonales de células B, por ejemplo, LPS, α -CD40 etc. y se examinan respecto a la secreción de citoquinas al igual que la producción total de Ig en cultivo tras la estimulación policlonal. Los ratones no infectados reconstituidos con PBMC se usan como controles. Las competencias totales de las células T y B en infecciones con VHC en curso también se pueden evaluar.

Como alternativa, se realizan pruebas de desafío a los ratones *in vivo* con epítomos Th promiscuos que son de VHC y los que no son de VHC a distintos tiempos después de la infección y la reconstitución con PBMC seguida del examen de las células T péptido reactivas mediante la producción de citoquinas, la expresión del marcador de activación y la proliferación. De nuevo, en estos experimentos *in vivo*, las respuestas totales de células T se relacionan con la carga viral, tiempo desde la infección etc. Las células T que se obtienen de los ratones no inmunizados pero inmunoreconstituidos e infectados con VHC se evalúan para las relaciones totales de CD4/CD8, moléculas MHC y otras células T/moléculas de activación y se comparan con ratones no infectados pero inmunoreconstituidos. En experimentos alternativos, las PBMC humanas normales se estimulan de manera policlonal en presencia de sueros de ratones infectados con VHC y se examinan respecto a cualquier modulación de las respuestas de células T. Después de estos experimentos, se examina la fosforilación de distintas moléculas TCR, la movilización de Ca^{2+} etc. para determinar las bases bioquímicas de cualquier defecto observado en las respuestas de células T. Adicionalmente, se examinará si las células T experimentan apoptosis después de la estimulación.

Citoquinas y moléculas inmunoregulatoras en las infecciones crónicas por el virus de la hepatitis

Para examinar el papel de diversas citoquinas (tipo 1 frente a 2) en la infección con VHC, se recogen sueros de ratones infectados con VHC y reconstituidos con PBMC y se examinan respecto a la prevalencia de citoquinas de tipo 1 frente al 2. Estos experimentos se realizan a lo largo del tiempo para relacionar la producción de citoquina con la

carga viral de VHC y se comparan con ratones de control no infectados pero inmunoreconstituidos. Por otro lado, el tipo de citoquinas predominante 1 ó 2, por ejemplo, IL-2, γ -IFN, IL-4, IL-10 e IL-12 se inyecta o se anula (mediante la inyección de anticuerpos anti-citoquina) en estos ratones y se evalúan sus efectos en la carga viral, la respuesta de células T a péptidos promiscuos que son de VHC y de los que no son de VHC así como los estímulos policlonales. 5 Adicionalmente, la progresión en el cambio de citoquinas, los defectos en la producción de citoquinas o su modulación, se evalúan inmediatamente después de la infección o después de un largo tiempo (es decir, 2-3 meses en ratones). En los experimentos *in vitro*, el papel de la adición de ciertas citoquinas *in vitro* a las respuestas de células T.

Células presentadoras de antígenos (células dendríticas, DC) en infecciones con VHC crónicas y modulación de la función de DC para proporcionar respuestas inmunes protectoras

Existen ciertas pruebas que sugieren que en la infección crónica con VHC en seres humanos, la función de las células dendríticas está alterada. Las células dendríticas (DC) son los estimuladores más potentes de las células T CD4+ para inducir la inmunidad eficaz. Por lo tanto, el examen de la función de DC en el contexto de la infección con VHC es esencial para entender la respuesta inmune frente a la infección con VHC. 15

Se aíslan los monocitos de ratones reconstituidos con PBL infectados con VHC de los bazo o de la sangre y se cultivan con GM-CSF e IL-4 para generar DC inmaduras. Estas DC inmaduras se hacen madurar en presencia de γ -IFN, α -IFN, LPS o α -CD40 y se examinan con respecto a la expresión de marcadores de activación de DC mediante citometría de flujo, la producción de IL-12 en el sobrenadante y la capacidad de estimular la presentación de células T alogénicas y epítomos promiscuos Th de VHC a células T autólogas. Estos experimentos se realizan a lo largo del tiempo y se examina la progresión en el cambio de la función de DC como un factor de tiempo y la carga viral del VHC. 20

En experimentos adicionales, los ratones que portan la infección de VHC y reconstituidos con PBMC humano se inyectan con DC maduros activados *in vitro* y se examinan respecto a las respuestas de células T y la carga viral. 25

Inmunización de epítomos promiscuos ayudantes humanos y CTL en la infección por VHC

En numerosos estudios que presentan las respuestas de células T Th y citotóxicas (CTL) en individuos infectados de manera crónica con VHC, varios epítomos promiscuos Th y CTL de regiones conservadas de VHC se han identificado *in vitro*, lo que sugiere que el cebado de Th y CTL ocurre en los individuos infectados con VHC. Sin embargo, aparentemente esta respuesta natural de células T en curso no es suficiente por sí misma para eliminar la infección del virus y/o la replicación. El modelo animal de la invención se puede usar para evaluar distintas estrategias de inmunización (como se enumeran posteriormente) usando los epítomos conocidos promiscuos Th y CTL para inducir respuestas inmunes fuertes. Se evalúan los ratones respecto a la generación de respuestas de células CTL y Th después de la inmunización. En paralelo, se evalúa la carga viral. El modelo animal puede de este modo usarse para determinar la modulación adecuada de las respuestas de Th y CTL para proporcionar inmunidad frente a la infección con VHC. 30 35

La inmunización con antígenos se podría examinar en el contexto de formulaciones de partículas, por ejemplo, liposomas; péptidos de antígenos modificados, por ejemplo, péptidos modificados con extensiones de lípidos; ciertas formulaciones de adyuvantes y de citoquinas como adyuvantes o adjuntas; células dendríticas cargadas con antígenos; inmunizaciones mediadas por ADN; terapia adoptiva de células T con células T específicas de antígeno expandidas *in vitro* y similares. 40

Inmunogenicidad de los péptidos sintéticos (o lipopéptidos modificados) derivados de proteínas estructurales y no estructurales de VHB y VHC

Una hipótesis alternativa para la no resolución de la infección con VHC en curso en portadores crónicos de VHC se centra en la prueba de que las respuestas de Th y CTL contra a estos epítomos realmente no son capaces de suprimir la replicación viral o eliminar las células infectadas por el virus y las respuestas inmunes contra otros determinantes epítomos son necesarias para generar la inmunidad protectora. Para determinar los epítomos nuevos de células T en la poliproteína de VHC, se realizan estudios iniciales *in silico* para identificar epítomos putativos de Th y CTL de proteínas virales estructurales así como funcionales conservadas. Estos epítomos identificados después se modifican y se evalúan en el modelo de animal reconstituido de la invención para su capacidad de generar fuertes respuestas de células T, lo que indica que son vacunas inmunoterapéuticas candidatas. 50 55

Examen de procedimientos de estudio terapéuticos combinados (vacunas basadas en antígenos y pequeñas moléculas que inhiben la replicación viral y/o inducen inmunomodulación)

Este procedimiento de estudio tiene en cuenta la respuesta inmune en la infección crónica con VHC y usa el modelo animal reconstituido de la invención para identificar terapias antivirales que se aprovechan de una combinación de terapias basadas en antígenos y terapias basadas en pequeñas moléculas, en las que las pequeñas moléculas tienen actividad en la inhibición de la replicación viral y/o la inmunomodulación. Las combinaciones que proporcionan supresión eficaz de la replicación viral o eliminación viral se identifican usando animales infectados con VHC, inmunoreconstituidos como se describe anteriormente. Los candidatos a vacunas se evalúan en combinación con citoquinas (tales como IL-2 o IL-2 liposomal) para proporcionar inmunidad eficaz para suprimir y/o eliminar la infección con VHC. 60 65

Ejemplo 9

Uso del modelo para la evaluación de terapias de hiperlipidemia

5 Como se analiza anteriormente, la Apo B 100 es un marcador aceptado en la técnica para el riesgo de aterosclerosis que produce la hiperlipidemia. Para evaluar el uso del modelo de ratón de la invención en la exploración respecto a agentes que tienen actividad frente a la hiperlipidemia, se usó un anticuerpo monoclonal de ratón específico para la Apo B 100 humana para detectar la producción de la Apo B 100 humana mediante las células humanas injertadas. Se recogieron muestras de suero de un animal trasplantado quimérico Alb/uPA y de un animal no trasplantado Alb/uPA, 10 (control negativo). El suero humano sirvió como un control positivo. Se analizó el suero mediante transferencia de Western usando un anticuerpo anti-Apo B 100 de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

Como se muestra en la Fig. 12 mientras que el anticuerpo que se unía a Apo B 100 se detectó en el animal de control no trasplantado (carril 3), la unión de anticuerpo se detectó tanto en el control positivo de suero humano 15 (carril 1) como en el animal trasplantado quimérico Alb/uPA (carril 2). Estos datos muestran que el hígado de ratón Alb/uPA con quimerismo humano sostenido secreta apo B 100 humana. Esta observación indica que el modelo de ratón Alb/uPA puede proporcionar bases para desarrollar tratamientos selectivos que disminuyen la cantidad de apo B 100 del hígado y, como consecuencia, disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular y accidente cerebrovascular mediante la aterosclerosis.

20

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma 25 parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 30 • US 5709843 A [0008] • US 5866757 A (0008)
 • US 5652373 A [0008] • WO 9916307 A [0008]
 • US 5804160 A [0008] • WO 4899096 A [0173]
 35 • US 5849288 A [0008] • WO 09528120 A [0173]
 • US 5858328 A [0008].

40 **Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción**

- Choo *et al. Science*, 1989, vol. 244,359-361 [0002]
 • Sarbah *et al. Cell*, 1990, vol. 62,447-456 [0002]
 45 • Cramp *et al. Gut*, 1999, vol. 44, 424-429 [0004]
 • Shapiro. *Surgical Clin North Amer.*, 1995, vol. 75 (6), 1047-56 [0006]
 50 • Sells *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, vol. 84, 1005 [0007]
 • Ito *et al. J. Gen. Virol.*, 1995, vol. 77, 1043 [0007]
 • Dhillon *et al. Histopathology*, vol. 26, 297-309 [0007]
 55 • Xie *et al. Virology*, vol. 244, 513-20 [0008]
 • Sureau. *Arch. Virol.*, vol. 8, 3-14 [0008]
 60 • Lampertico *et al. Hepatology*, vol. 13, 422-6 [0008]
 • Fournier *et al. J Gen Virol.*, vol. 79, 2367-74 [0008]
 • Galun *et al. J. Infect. Dis.*, 1995, vol. 172, 25-30 [0008]
 65 • Bronowicki *et al. Hepatology*, 1998, vol. 28, 211-8 [0008]
 • Lerta *et al. Hepatology*, 1998, vol. 28, 498A [0008]

ES 2 346 636 T3

- **Heckel et al.** *Cell*, 1990, vol. 62, 447-56 [0010] [0042]
- **Sandgren et al.** *Cell* 1991, vol. 66, 245-56 [0010] [0042]
- 5 • **Rhim et al.** *Science*, 1994, vol. 263, 1149-52 [0010] [0046]
- **Rhim et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 4942-6 [0010]
- **Petersen et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 310-5 [0010]
- 10 • **Liu et al.** *Biochim et Biophys Acta*, 1993, vol. 1216, 299-303 [0010]
- **Heckel et al.** *Cell*, 1980, vol. 62, 447 [0038]
- 15 • **Ryan et al.** *Meth. Cell Biol.*, 1976, vol. 13, 29 [0044]
- **Verstege et al.** *Blood*, 1998, vol. 91 (6), 1966-76 [0045]
- *Nature*, vol. 335, 256-59 [0062]
- 20 • *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. vol. 93 (25), 14720-25 [0062]
- **Ross.** *Nature*, 1993, vol. 362, 801-809 [0067]
- 25 • **Ponder et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 1217 [0076]
- **Gupta et al.** *Transplantation*, 1990, vol. 50, 472 [0076]
- **Clement et al.** *Hepatology*, 1994, vol. 4, 373 [0077]
- 30 • **Gunsalas et al.** *Nature Medicine*, 1997, vol. 3, 48 [0077]
- **Coligan et al.** *Current Protocols in Immunology*. Wiley, 1997, vol. 2 [0077]
- 35 • **Sandgren et al.** *Cell*, 1991, vol. 68, 245 [0080]
- **Davis.** *South. Med J.*, 1997, vol. 90, 866 [0086]
- **Terrault et al.** *Gut*, 1997, vol. 40, 568 [0093]
- 40 • **Seglen.** *Methods Cell Biol.*, 1976, vol. 13, 29-83 [0106]
- **Brown et al.** *Ann. Rev. Biochem.*, 1983, vol. 52, 223-261 [0067]
- 45 • **Fielding et al.** *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Elsevier Science Publishers*, 1996, 495-516 [0067]
- **Gibbons.** *Biochem J.*, 1990, vol. 268, 1-13 [0067]
- 50 • **Dixon et al.** *J. LipidRes.*, 1993, vol. 34, 185-1 [0067]
- **Sniderman et al.** *Arterioscler. Thromb.*, 1993, vol. 13, 629-636 [0067]
- **Yao et al.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, vol. 1212, 152-166 [0067]
- 55 • **Davis et al.** *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 1996, 473-493 [0067]
- **Innerarity et al.** *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 2353-2356 [0067]
- 60 • **Sniderman et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, vol. 77, 604-608 [0068]
- **Brown et al.** *N. Engl. J. Med.*, 1990, vol. 323, 1289-98 [0068]
- **Young.** *Circulation*, 1990, vol. 82, 1574-1594 [0069]
- 65 • **Callow et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, vol. 91, 2130-2134 [0069]
- **McCormick et al.** *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 28294-28299 [0069]

ES 2 346 636 T3

- **Herz** *et al.* *Curr. Opin. Lipidol.*, 1995, vol. 6, 97-103 [0069]
- **Paigen** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 3763-3767 [0070]
- 5 • **Piedrahita** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4471-4475 [0070]
- **Plump** *et al.* *Cell*, 1992, vol. 71, 343-353 [0070]
- **Zhang** *et al.* *Science*, 1992, vol. 258, 468-471 [0070]
- 10 • **Ishibashi** *et al.* *J. Clin. Invest.*, 1993, vol. 92, 883-893 [0070]
- **Bosma** *et al.* *Ann. Rev. Immun.*, 1991, vol. 9, 323 [0074]
- 15 • **Heckel** *et al.* *Cell*, 1990, vol. 62, 447 [0074]
- **Ryan** *et al.* *Surgery*, 1993, vol. 113, 48 [0075]
- **Seglen** *et al.* *Meth. Cell Biol.*, 1976, vol. 13, 29 [0075]
- 20 • **Ryan** *et al.* *Surgery*, 1993, vol. 113, 48-54 [0106]
- **Chomczynski** *et al.* *Anal Biochem*, 1987, vol. 162, 156-159 [0115]
- 25 • **Masayuki** *et al.* *J. Proc Nat Acad Sci USA*, 1994, vol. 94, 8738-8743 [0116]
- **Lanford** *et al.* *Virology*, 1994, vol. 202, 606-614 [0129]
- **Bhatia** *et al.* *J Exp Med*, 1997, vol. 186 (4), 619-24 [0139]
- 30 • **Bhatia** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, vol. 94(10), 5320-5 [0139]
- **Larochelle** *et al.* *Nat Med*, 1996, vol. 2 (12), 1329-37 [0139].

REIVINDICACIONES

1. Ratón transgénico quimérico huésped infectado con el virus de la hepatitis C humano (VHC) que comprende:

un ratón transgénico inmunodeficiente, deficiente en linfocitos T y B singénicos funcionales que tiene un genoma que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido activador del plasminógeno de tipo uroquinasa, en el que el polinucleótido está unido operativamente a un promotor de manera que el polipéptido se expresa en células hepáticas del ratón huésped, y en el que el huésped es homocigoto para el polinucleótido, y

un hígado quimérico que comprende hepatocitos humanos aislados de tejido hepático humano injertado en un hígado de ratón huésped,

en el que el hospedador infectado se **caracteriza** por la producción de al menos aproximadamente 10^3 partículas virales/ml de suero,

en el que los hepatocitos humanos constituyen al menos aproximadamente el 20% de hepatocitos en el hígado quimérico y

son funcionales durante al menos aproximadamente 15 semanas y

en el que la infección con VHC se mantiene durante al menos 5 semanas.

2. El ratón quimérico huésped de la reivindicación 1, en el que el huésped infectado mantiene una infección por VHC detectable de manera constante durante un periodo de al menos 15 semanas.

3. El ratón quimérico huésped de la reivindicación 1, en el que el promotor es un promotor de albúmina de ratón.

4. El ratón quimérico huésped de la reivindicación 1, en el que la inmunodeficiencia es resultado de un defecto genético en la reorganización del gen receptor de célula T e inmunoglobulina.

5. El ratón quimérico huésped de la reivindicación 1, en el que la inmunodeficiencia del huésped está producida por una mutación scid.

6. Procedimiento de producción de un ratón transgénico quimérico huésped infectado con el virus de la hepatitis C humano (VHC), comprendiendo el procedimiento:

la implantación de hepatocitos humanos aislados de tejido hepático humano en un ratón transgénico inmunodeficiente huésped deficiente en linfocitos T y B singénicos funcionales y que tiene un genoma que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido activador de plasminógeno de tipo uroquinasa, en el que el polinucleótido está unido operativamente a un promotor, de manera que el polipéptido se expresa en células hepáticas de ratón huésped y en el que el huésped es homocigoto para el polinucleótido; de manera que los hepatocitos humanos se injertan en el hígado huésped para producir un hígado quimérico humano-ratón, y

la inoculación de VHC humano al huésped;

en el que se produce un ratón transgénico quimérico huésped que comprende un hígado quimérico humano-ratón y que tiene una infección por VHC humano y en el que el huésped infectado se **caracteriza** por la producción de al menos aproximadamente 10^3 partículas virales/ml de suero

en el que los hepatocitos humanos constituyen al menos el 20% de los hepatocitos en el hígado quimérico y son funcionales durante al menos 15 semanas, y;

en el que la infección con VHC se mantiene durante al menos 5 semanas.

7. Procedimiento de cultivo del virus de la hepatitis C humana (VHC), comprendiendo el procedimiento:

la administración de VHC humano al ratón transgénico quimérico huésped de la reivindicación 1; y

el aislamiento del VHC humano del huésped infectado después de la replicación del VHC humano en el huésped.

8. Procedimiento para cribar agentes candidatos con respecto a la actividad frente a un patógeno hepatotrofo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

la administración de un agente candidato al ratón transgénico quimérico huésped de la reivindicación 1, y
el análisis del efecto del agente candidato tras la infección con VHC;

en el que una disminución en la carga infecciosa del VHC humano en relación con un ratón transgénico quimérico huésped no tratado o en relación con una carga infecciosa en el ratón transgénico quimérico huésped antes de la administración del agente candidato es indicativa de actividad anti-VHC del agente.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el agente candidato se administra antes de la infección con VHC humano.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende la reconstitución del sistema inmune del ratón transgénico quimérico huésped, en el que el agente candidato es un candidato a vacuna para inmunoterapia activa.

11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo anti-VHC o un fragmento del mismo de unión a VHC.

12. El procedimiento de la reivindicación 8, que comprende la reconstitución del sistema inmune del ratón transgénico quimérico huésped en el que el agente candidato es un candidato a vacuna para la vacunación terapéutica.

13. El procedimiento de la reivindicación 8, que comprende la reconstitución del sistema inmune del ratón transgénico quimérico huésped en el que el agente candidato es un agente inmunoterapéutico.

14. Procedimiento para cribar agentes candidatos con respecto a la actividad en alcanzar una disminución de los lípidos en la sangre, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

la administración de un agente candidato al ratón transgénico quimérico huésped de la reivindicación 1, y
el análisis del efecto del agente candidato en la lipoproteína sérica apoB100;

en el que la detección de un nivel de apoB100 después de la administración del agente candidato que está disminuido en relación con el nivel de apoB100 antes de la administración del agente candidato indica que el agente candidato tiene actividad en disminuir los lípidos de la sangre.

15. Procedimiento para evaluar la toxicidad en el hígado de un agente, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

la administración de un agente candidato a un ratón transgénico quimérico huésped inmunodeficiente de acuerdo con la reivindicación 1

el análisis del efecto del agente candidato en la función hepática o en la histología hepática

en el que una disminución en la función del hígado o una alteración adversa en la histopatología del hígado en el huésped tratado en relación a un ratón quimérico huésped no tratado o en relación con la función o histología hepática antes de la administración del agente candidato indica que el agente es tóxico para las células hepáticas.

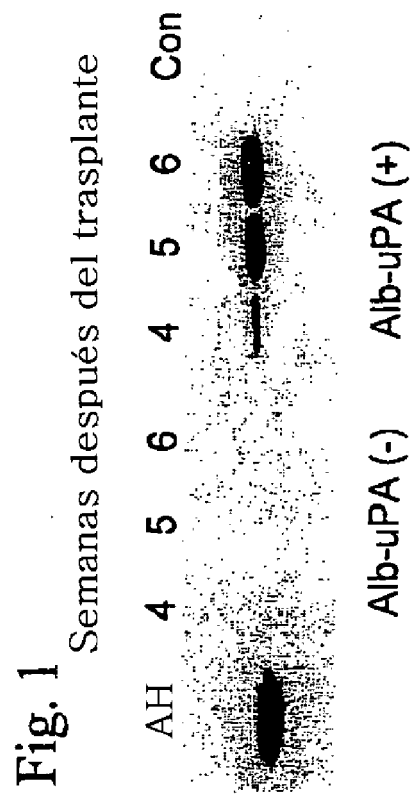


Figura 2A



Figura 2B



Figura 2C

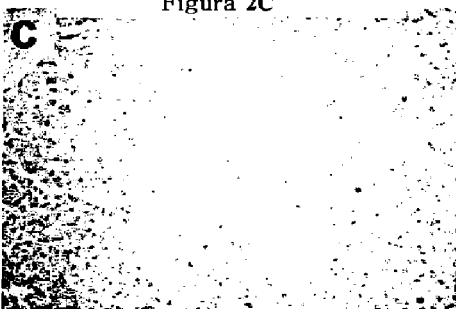


Figura 2D

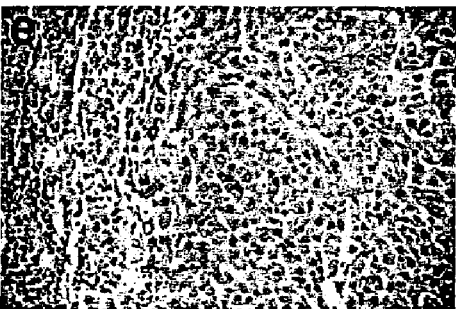
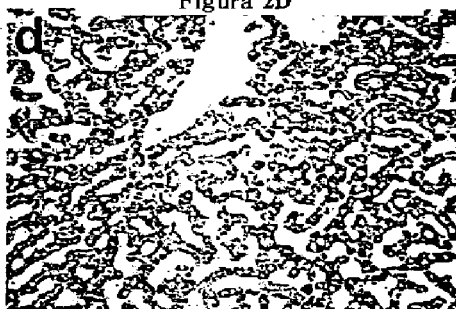


Figura 2E



Figura 2F

Figura 3

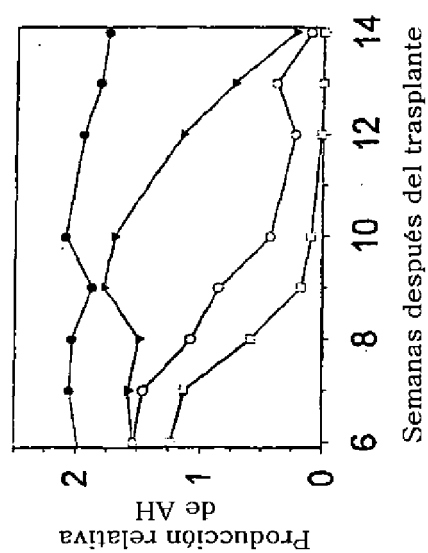


Figura 4



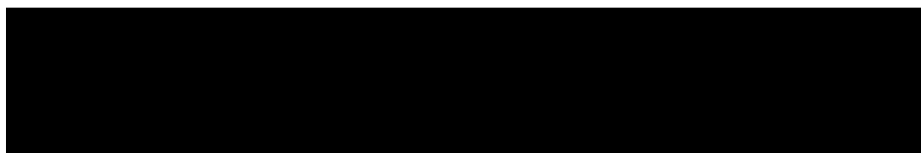


Figura 5

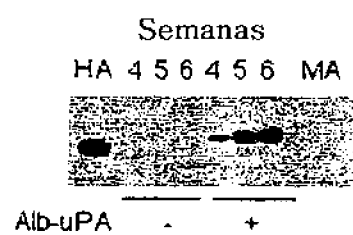


Fig. 6

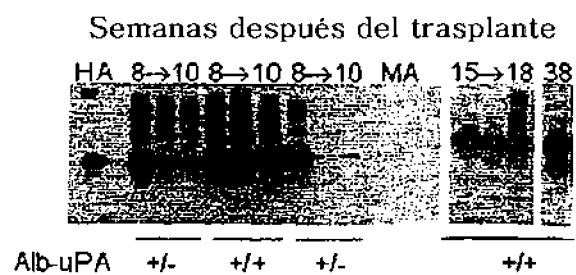
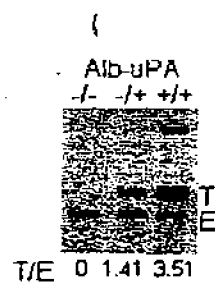


Figura 7



Figura 8

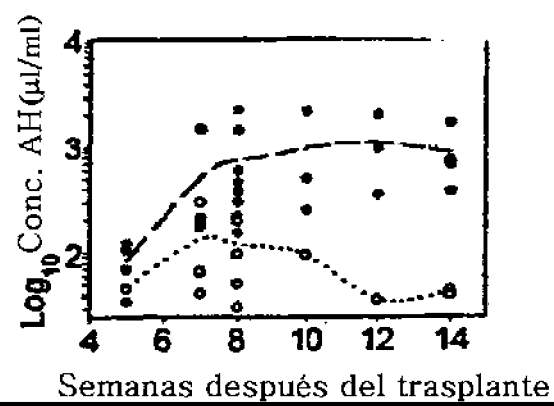
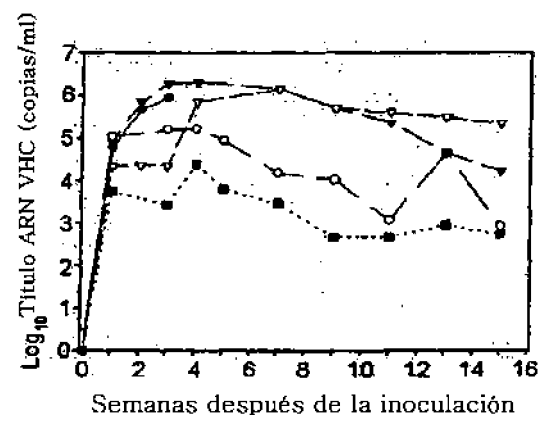
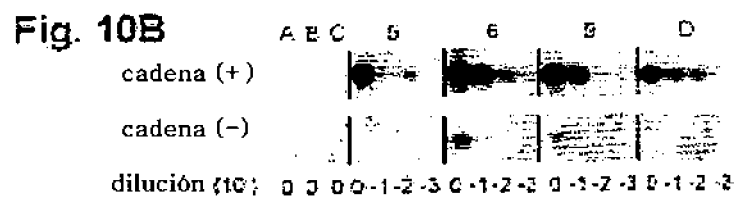
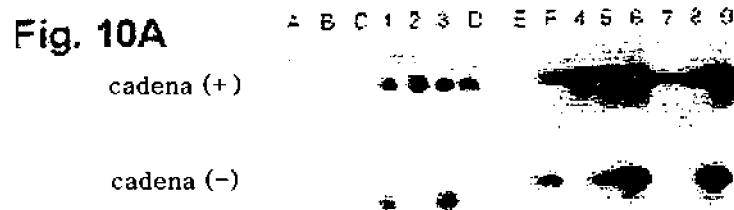


Figura 9





**Fig.
11A**



**Fig.
11B**

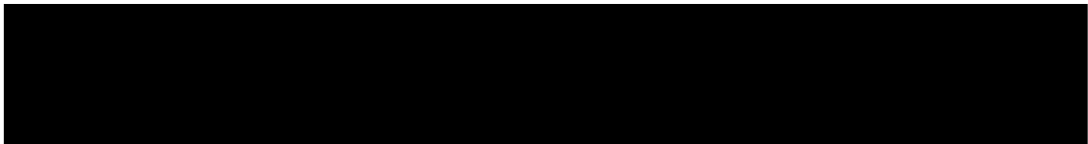


Fig. 12



ES 2 346 636 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Kneterman, Norman M.
Tyrrell, D. Lorne
Mercer, David F.
- <120> Modelo de Animal Quimérico Susceptible a la Infección por el Virus de la Hepatitis C Humano
- 10 <130> 48990-96
- <150> 09/528.120
- 15 <151> 17-03-2000
- <160> 6
- 20 <170> FastSEQ para la Versión de Windows 4.0
- <210> 1
<211> 19
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- <220>
30 <223> Cebador
- <400> 1
35 ctcgcaagcc cctatcagg 19
- <210> 2
<211> 21
40 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- <220>
45 <223> Cebador
- <400> 2
50 gaaagcgtct agccatggcg t
- <210> 2
<211> 32
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- <220>
60 <223> Cebador
- <400> 3
65 tctctgtcga ctactgggg cactgctggt gg 32
- <210> 4
<211> 65

ES 2 346 636 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Cebador

10 <400> 4

ggaattcgcg acgacgatga caaggcaccc attacggcgt atgccagca gacaaggggc 60

ctctt

65

15

<210> 5

<211> 24

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

25 <400> 5

gaaagcgtct agccatggcg ttag 24

30

<210> 6

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Cebador

40 <400> 6

ggcactcgca agcaccctat caggc 25

45

50

55

60

65