



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 287 929**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **94917988 .1**

⑧6 Fecha de presentación : **13.05.1994**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **0699235**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **06.03.1996**

⑤4 Título: **Modelo animal para la infección por el virus de la hepatitis.**

③0 Prioridad: **17.05.1993 US 61706**
08.09.1993 IL 106951

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

⑦3 Titular/es:
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT Co., Ltd.
The Weizmann Institute of Science
P.O. Box 95
Rehovot 76 100, IL

⑦2 Inventor/es: **Reisner, Yair**

⑦4 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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 para la infección por el virus de la hepatitis.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con un modelo animal para la infección por el virus de la hepatitis (VH) en seres humanos, particularmente la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC).

10 **Estado de la técnica**

A continuación sigue una lista del estado de la técnica y referencias consideradas oportunas para la descripción posterior:

15 1. **Choo, Q-L, Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M.** Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *1989 Science* **244**: 359-362.

20 2. **Kuo, G, Choo, Q-L, Alter, H.J., Gitnick, G.L., Redeker, A.G., Purcell, R.H., Miyamura, T., Dienstag, J.L., Alter, H.J., Stevenes, C.E., Tegtmeier, G.E., Bonnino, F., Colombo, M., Lee, W-S, Kuo, C., Berger, K., Shuster, J.R., Overby, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M.** 1989. An essay for circulating antibodies to major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* **244**: 362-344.

3. **Princev, A.M., Brotman, B., Huima, T., Pascual, D., Jaffery, M. Inchauspe, G.** 1992. Immunity in hepatitis C infection. *J. Infec. Dis.* **165**: 438-443.

25 4. **Shimizu, Y.K., Weiner, J., Rosenblatt, J., Wong, D.C., Shapiro, M., Popkin, T., Houghton, M., Alter, H.J., Purcell, R.H.** 1990. Early events in hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **87**: 6441-6444.

30 5. **Shimizu, Y.K., Iwamoto, A., Hijikata, M., Purcell, R.H., Yoshikura, H.** 1992. Evidence for *in vitro* replication of hepatitis C virus genome in a human T cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **89**: 5477-5481.

6. **Shimizu, Y.K., Purcell, R.H., Yoshikura, H.** 1993. Correlation between the infectivity of hepatitis C virus *in vivo* and its infectivity *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **90**: 6037-6041.

35 7. **Nakamura, T., Good, R.A., Yasumizu, R., Inoue, S., Oo, M.M., Hamashima, Y., Ikehara, S.** 1986. Successful liver allografts in mice by combination with allogeneic bone marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **83**: 4529-45326.

40 8. **Bosma, M.J., Carroll, A.M.** 1991. The SCID mouse mutant: Definition, characterization, and potential uses. *Ann. Rev. Immunol.* **9**: 323-350.

9. **Soriano, H.E., Adams, R.M., Darlington, G., Finegold M., Steffen, D.L., Ledley, F.D.** 1992. Retroviral transduction of human hepatocytes and orthotopic engraftments in SCID mouse after hepatocellular transplantation. *Trans. Proc.* **24**: 3020-3021.

45 10. **Aldrovandi, G.M., Feurer, G., Gao, L., Jamieson, B., Kristeva, M., Chen, I.S.Y., Zack, J.A.** 1993. The SCID-hu mouse as a model for HIV-1 infection. *Nature* **363**: 732-736.

50 11. Solicitud de Patente Europea accesible al público, No. de Publicación: 438053.

12. Solicitud de Patente Europea accesible al público, No. de Publicación: 517199.

55 Las citas de las publicaciones anteriores se dan aquí para permitir una apreciación del estado anterior de la técnica. Estas citas no se deberían, sin embargo, interpretar como una indicación que esta técnica es en cualquier caso relevante para la patentabilidad de la invención, según se define en las reivindicaciones adjuntas.

Las publicaciones anteriores se reconocerán aquí indicando su número en la lista anterior.

60 **Antecedentes de la invención**

Se han identificado cinco virus diferentes como causas de la hepatitis vírica. Estos incluyen los virus de la hepatitis A, B, C, D y E. De estos, los virus que causan las infecciones más graves son el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC).

65 El virus de la hepatitis A tiene un único serotipo y causa una infección aguda autolimitada. Un gran porcentaje de la población, que se acerca al 50%, tiene anticuerpos contra la hepatitis A en suero y es probablemente inmune a la enfermedad. La infección con hepatitis A no evoluciona a enfermedad crónica.

El VHB está implicado tanto en hepatitis aguda como crónica. La enfermedad es endémica en Asia, está aumentando su prevalencia en los EE UU y Europa. La enfermedad crónica del hígado, que resulta en una morbilidad significativa y una mortalidad aumentada, es una secuela de la infección en el 1-10% de los individuos infectados. La infección por VHB también se correlaciona con el desarrollo de cáncer primario de hígado.

Recientemente se ha mostrado que el VHC es el principal agente causante de la hepatitis no A, no B, que se transmite por vía parenteral ⁽¹⁾. Se estima que el 0.5-1% de la población mundial está infectado con VHC, y en algunos países en vías de desarrollo la tasa de prevalencia es de hasta el 40%. Además, el 40-60% de los nuevos pacientes infectados desarrollan infecciones de VHC persistentes ⁽²⁾ y tienen riesgo de desarrollar hepatitis aguda fulminante y varias enfermedades crónicas del hígado (incluyendo cirrosis, hepatitis crónica activa y en algunos casos carcinoma hepatocelular).

El virus de la hepatitis D ("Virus Delta") es un virus ARN defectivo que solo puede infectar el hígado en presencia de una infección activa por VHB. El virus de la hepatitis E parece ser un virus de ARN de cadena sencilla. No se sabe que la infección con el virus de la hepatitis E evolucione a enfermedad crónica del hígado.

Aunque el VHB y el VHC se han identificado y caracterizado, el desarrollo de nuevas estrategias antivirales se ha visto impedido en gran manera por la falta de sistemas modelos de animales adecuados, simples y de bajo coste.

Actualmente, los ensayos biológicos para el VHB y el VHC se limitan a la inoculación experimental de chimpancés ^(3,4), que son caros y limitados en número. Además, se ha desarrollado un sistema *in vitro* para la propagación del VHC en líneas de células T humanas infectadas con retrovirus murinos, HPB-Ma⁽⁵⁾ y Molt4-Ma⁽⁶⁾, en el que se consigue la replicación del VHC.

Recientemente se ha demostrado en varios estudios que órganos humanos sólidos tales como el timo fetal o el hígado fetal así como varios tipos de tumores se han injertado con éxito en ratones SCID bajo la cápsula renal. Además, también se ha informado del trasplante de otros órganos como los nódulos linfáticos y espículas de médula ósea e injertos de órganos en otros lugares (es decir, subcutáneo y peritoneo).

Se ha informado de un ratón SCID que mantiene la implantación de célula humana, es decir, el trasplante de un solo hepatocito ^(8,9), y que se utilizó también como modelo para enfermedades infecciosas humanas, esto es, infección por VIH-1⁽¹⁰⁾.

Se ha divulgado que ratones irradiados letalmente, radio-protegidos con médula ósea de ratones SCID, desarrollaron una inmunodeficiencia acusada y fueron compatibles con el trasplante de linfocitos humanos de sangre periférica (PBL) durante un largo período de tiempo ⁽¹¹⁾. También se ha divulgado que estas quimeras aceptaron implantes humanos de origen no hematopoyético y los mantuvieron durante largo tiempo tras el trasplante bajo las cápsulas renales ⁽¹²⁾.

Descripción general de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un modelo animal no humano conveniente para la infección por VH.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para evaluar los agentes preventivos y terapéuticos para el tratamiento y profilaxis de las infecciones por VH utilizando el modelo animal no humano anterior.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar métodos para la producción de anticuerpos xenogénicos o células T anti-VH, y particularmente anticuerpos monoclonales humanos y células T citotóxicas, utilizando mamíferos quiméricos no humanos trasplantados con células hematopoyéticas humanas y tejido hepático humano infectado con VH antes o después del trasplante.

La presente invención proporciona, mediante su primer aspecto, un animal quimérico no humano útil como modelo para la infección por VH humano, que comprende un mamífero no humano M5 que tiene células xenogénicas; derivando el mamífero M5 de un mamífero no humano M1 tratado para destruir sustancialmente sus células hematopoyéticas y después trasplantado con células hematopoyéticas que derivan de uno o más mamíferos M2 y trasplantado con tejido hepático infectado con VHB o VHC de un mamífero M3, siendo el uno o más mamíferos M2 y el mamífero M3 de la misma o de diferentes especies; siendo las células hematopoyéticas trasplantadas de uno o más mamíferos M2 de una preparación de células hematopoyéticas de un animal deficiente en células T o de una preparación de células troncales o de médula ósea en la que se han eliminado las células T o de ambas; siendo el tejido hepático trasplantado del mamífero M3 una preparación de tejido hepático humano o una preparación de tejido hepático de un mamífero no humano capaz de ser infectado por el VH.

El mamífero no humano M1, puede ser típicamente un ratón o una rata, aunque el mamífero M1 también puede ser un mamífero no humano de un orden mayor como un primate, por ejemplo, el tití pigmeo.

ES 2 287 929 T3

Para la obtención de un mamífero no humano M5 a partir de dicho mamífero no humano M1, el mamífero M1 se trata primero de modo que se destruye sustancialmente su sistema hematopoyético. El término “sustancialmente destruido” se debería entender significando que el número de células hematopoyéticas que sobreviven tras el tratamiento son insuficientes para proteger inmunológicamente al animal en ausencia del trasplante a partir del mamífero M2. Tras el tratamiento que pretende destruir sustancialmente las células hematopoyéticas, algunas de dichas células sobreviven pero el número es tan pequeño que el animal no podría sobrevivir en condiciones normales de laboratorio.

Un tratamiento que pretende destruir sustancialmente las células hematopoyéticas puede, por ejemplo, ser una irradiación corporal total (“total body irradiation”, TBI) a dosis fraccionada. Una TBI efectiva para destruir el sistema hematopoyético requiere típicamente una dosis acumulativa de 4-50 Gy (1 Gy = 100 rad.). En el caso de un ratón, la irradiación puede, por ejemplo, ser de 4 Gy en el día 1 y 9-15 Gy tres días después. Una dosis de irradiación similar se encontró que era efectiva para destruir las células hematopoyéticas también en ratas y tífes pigmeos.

El mamífero M2 puede ser de la misma o de una especie diferente que el mamífero M1. En principio, cualquier mamífero con una deficiencia de células T puede servir como donante para las células hematopoyéticas trasplantadas. Un ejemplo de un donante M2 es un ratón con una inmunodeficiencia combinada grave (SCID) o un animal SCID de otra especie o género de mamíferos. La preparación de células hematopoyéticas trasplantadas en este caso es apropiadamente una preparación de médula ósea.

Las células hematopoyéticas trasplantadas del mamífero M2 pueden ser una preparación de células troncales hematopoyéticas con las células T eliminadas de un mamífero donante M2, tal como un primate, por ejemplo, un mono o un ser humano. En el caso de los seres humanos, una preparación de células troncales enriquecida se puede, por ejemplo, obtener a partir de sangre periférica de donantes pretratados con el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o de pacientes con cáncer que reciben quimioterapia que se sabe que causa migración de las células troncales a la periferia. Tras extraer la preparación sanguínea de tales donantes, la preparación se trata típicamente para suprimir varios componentes sanguíneos y eliminar las células T de la misma. Para la eliminación de las células T, la preparación de células hematopoyéticas de M2 se puede someter a un tratamiento con la finalidad de enriquecimiento en células que muestran el antígeno CD34 (células CD34⁺). Cada una de las preparaciones de células troncales enriquecidas anteriores, con las células T eliminadas se puede usar directamente tras la extracción del donante, o puede ser una preparación celular con uno o una pluralidad de pases *in vitro*.

Las células hematopoyéticas trasplantadas también pueden ser una preparación de médula ósea con las células T eliminadas.

El mamífero M1 también puede ser trasplantado con una preparación de células hematopoyéticas de un mamífero deficiente en células T y con una preparación de células troncales de mamífero con las células T eliminadas. Un ejemplo específico es un trasplante combinado de médula ósea de un mamífero SCID, por ejemplo, un ratón SCID, y una preparación de médula ósea humana con las células T eliminadas.

Para obtener el mamífero M5, el mamífero M1 se puede trasplantar con tejido hepático infectado con VH. Tal tejido hepático infectado por VH se puede obtener de un mamífero M3 infectado con el VH, por ejemplo, una biopsia de hígado de un ser humano infectado con el VH. Además, una preparación de tejido hepático infectado con VH también se puede obtener mediante infección *in vitro* de una preparación de tejido hepático no infectado *a priori* con VH obtenida de un mamífero donante M3 no infectado con VH.

Además de preparaciones de tejido hepático humano, también es posible utilizar preparaciones de tejido hepático de mamífero no humanos M3 susceptibles de ser infectados por VH tales como chimpancés y otros primates no humanos.

El modelo animal de la invención es particularmente adecuado para el estudio de la patología por infecciones por VHB y VHC y el desarrollo de terapias para las mismas. Modelos tanto para VHB como para VHC son particularmente preferidos según la invención, ya que actualmente no hay disponibles modelos simples y de bajo coste para estas infecciones víricas.

La invención proporciona además, mediante el segundo de sus aspectos, un método para evaluar el potencial de un agente o una combinación de agentes en la terapia de una infección con VH utilizando un mamífero no humano M5 según se ha definido anteriormente; dicho método comprende:

- (a) administrar dicho agente o dicha combinación de agentes a dicho mamífero M5; y
- (b) evaluar la efectividad de dicho agente o dicha combinación de agentes en la prevención de la propagación de la infección por VH, reducción de sus síntomas fisiológicos o reducción de la evidencia de una infección activa en dicho mamífero M5.

Mediante una modificación del mismo, el método anterior también se puede aplicar en la determinación de la dosis efectiva de dicho agente o dicha combinación de agentes en la terapia o prevención, según sea el caso.

Mediante un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para obtener células inmunes o anticuerpos anti-VH utilizando un mamífero no humano M5, según se ha definido anteriormente, en donde al menos uno de los dichos uno o más mamíferos M2 es humano; dicho método comprende:

- (a) aislar las células inmunes o anticuerpos de la sangre de dicho mamífero M5, y
- (b) seleccionar las células inmunes o anticuerpos que tienen reactividad anti-VH.

Opcionalmente, según este aspecto, el mamífero M5, se trata de modo que aumente la respuesta inmune contra el VH, tal como por ejemplo mediante vacunación.

Las células inmunes seleccionadas pueden ser células T citotóxicas reactivas contra las células de hígado infectadas por VH. Tal preparación de células T citotóxicas se puede obtener haciendo crecer líneas de células T obtenidas a partir del mamífero M5 y después seleccionando aquellas líneas que desarrollan una respuesta celular citotóxica contra las células que expresan antígenos VH. Tal preparación de células T citotóxicas se puede inyectar en pacientes en el marco de una terapia anti-VH.

Las células inmunes seleccionadas también pueden ser células B productoras de anticuerpos inmortalizadas y seleccionadas para aquellas que producen anticuerpos anti-VH. Los anticuerpos producidos por estas células B se pueden usar entonces como agentes terapéuticos en terapias anti-VH en pacientes con hepatitis.

La manera de hacer crecer líneas de células T citotóxicas, la manera de inmortalizar las células B para producir líneas de células B, así como la manera de seleccionar células T citotóxicas o líneas B inmortalizadas específicas para obtener aquellas que tienen la reactividad deseada, se conocen generalmente *per se* y la explicación completa de tales métodos va más allá del presente escrito.

La invención se describirá ahora con referencia a algunas formas de realización específicas en los siguientes ejemplos y las figuras adjuntas.

Descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra la histología del tejido hepático trasplantado bajo la cápsula renal de quimeras SCID-BNX, un mes después del trasplante de fragmentos de hígado de un ratón BNX (A), rata Lewis (B) o ser humano (C). Todos los animales trasplantados que sobrevivieron la implantación renal subcapsular del tejido hepático se evaluaron para injerto mediante microscopía óptica de los riñones utilizando tinción con H&E.

La Fig. 2 muestra hepatocitos y estructuras similares a conductos biliares (marcadas con flechas) en un fragmento de hígado humano trasplantado 30 días después del injerto a un aumento de 240x (A); hepatocitos y células epiteliales a un aumento de 1200x (B); estructuras similares a conductos biliares a un aumento de 1200x (C).

La Fig. 3 muestra (A) la histología de un segmento de hígado antes del trasplante (H&E, 100x) (B), tinción inmunohistológica de HBsAg de un hígado humano, infectado con VHB (100x) (C), tinción con ácido peryódico de Schiff para glucógeno del segmento de un hígado humano (L) trasplantado bajo la cápsula renal (K) de una quimera SCID-BNX (50x) y (D), tinción inmunohistológica de HBsAg de un hígado humano infectado con VHB, observado 19 días después del trasplante en el área subcapsular del riñón de una quimera SCID-BNX (50x). La tinción se llevó a cabo utilizando, como anticuerpo primario, anti-HBsAg de ratón (Zymed Lab, San Francisco).

La Fig. 4 es un electroforetograma de ADNc de muestra de ARN extraídas de suero de quimeras SCID-BNX, trasplantadas bajo la cápsula renal con hígado humano infectado con VHC, y sometido a amplificación mediante RT-PCR utilizando dos conjuntos de cebadores según se describe en el Ejemplo 3. Cada carril representa un ratón diferente que se sacrificó en el día de la toma de la muestra. Los primeros 13 carriles, que se muestran en la parte superior de la Fig. 4, son de ratones en el día 9 tras el trasplante. Los carriles restantes son de los días 14-53 después del trasplante (los días se indican encima de los carriles). Los dos últimos carriles son el control negativo (-) y el control positivo (+).

Ejemplos

Ejemplo 1

Injerto de segmentos de hígado humano de pacientes no HVC

Los ratones BNX (6-10 semanas de edad, hembras) se compraron de Harlan Sprague-Dawley (Indianápolis, IN) y los ratones CB17/SCID procedían del centro de cría animal, Instituto Weizman, Rehovot, Israel. Los animales se mantuvieron en jaulas pequeñas (5 animales en cada jaula) y se alimentaron con comida estéril y agua ácida que contenía ciprofloxacina (20 mg/ml). Antes del trasplante, los ratones BNX se condicionaron con 12 Gy TBI y se radioprotegieron al día siguiente con 2-3 x 10⁶ células de médula ósea de SCID con células T reducidas. El TBI

se administró de una fuente de rayos gamma 150-A ^{60}Co (Atomic Energy of Canada, Kanata, Ontario) con F.S.D. de 75 cm y una velocidad de dosis de 0.7 Cy/min. Las células de médula ósea obtenidas de ratones SCID (4-10 semanas de edad) se fraccionaron mediante aglutinación diferencial con aglutinina de soja (para eliminar los linfocitos T que pueden estar presentes en ratones SCID ocasionalmente "porosos") según se ha descrito previamente ⁽¹¹⁾. Un día tras el trasplante de médula ósea, se injertaron fragmentos de hígado humano, de rata o de ratón bajo la cápsula renal.

Los fragmentos de tejido hepático de rata y ratón se recogieron mediante laparotomía, en la que se cortó del hígado del animal una biopsia en cuña y se mantuvo en condiciones estériles a 4°C, en medio de Eagle modificado por Dulbecco con suero fetal de ternera al 10% o ViaSpan (solución UW-Belzer, Du Pont Pharmaceuticals, Hertogenbosch, Países Bajos).

Los segmentos de hígado humano se obtuvieron durante la segmentectomía hepática cuando se llevó a cabo para tumores de hígado primarios y secundarios. En todos los casos, el tejido no tumoral era no cirrótico, según se confirmó mediante tinción con hematoxilina y eosina (H&E). Los segmentos de hígado se mantuvieron, hasta dos horas en solución UW antes del trasplante. Para el injerto de tejido hepático, los ratones BNX se anestesiaron con Nembutol o Avertin. Se hizo entonces una incisión de aprox. 1 cm en el flanco derecho o izquierdo, se expuso el riñón y el tejido hepático (cortado en trozos de 1 mm²) se colocó bajo la cápsula renal utilizando pinzas finas. Para cerrar la herida se colocó una sutura. Los riñones, con el tejido trasplantado unido, se retiraron a varios intervalos de tiempo (de 8 días hasta 3 meses), se fijaron en líquido de Bouin, se incluyeron en parafina y se tiñeron secciones de 4 μm con H&E.

Un resumen de los trasplantes de fragmentos de hígado en los ratones quiméricos SCID-BNX se muestra en la siguiente Tabla 1.

TABLA 1

Número de ratones			Fuente del hígado	Seguimiento (semanas)
Trasplantados	Supervivientes	Injertados		
10	9	4	Ratón	10
20	12	8	Ratón	3
10	7	4	Ratón	14
10	10	8	Rata	10
20	8	5	Rata	8
20	7	2	Rata	2
10	5	2	Rata	14
20	11	5	Humano	14
20	11	5	Humano	14
20	11	5	Humano	12
20	10	2	Humano	6
20	9	3	Humano	4
20	16	12	Humano	2
20	15	14	Humano	2
16	12	9	Humano	2

Como se ve de la tabla anterior, la tasa de supervivencia de los ratones quiméricos que recibieron injertos de hígado humano fue del orden de alrededor del 50-60%.

El examen histológico de los fragmentos de hígado trasplantado en esta zona subcapsular de las quimeras SCID-BNX trasplantadas mostró que tras el trasplante, la arquitectura típica de las células del hígado desapareció y, en la mayoría de los trasplantes, se produjo isquemia central mientras que el tejido periférico del trasplante era marcadamente fibrótico (ver Fig. 1). En la mayoría de los casos, se reconocieron hepatocitos además de células epiteliales en proliferación (Fig. 2) y el tejido injertado tenía principalmente las características morfológicas del epitelio biliar (Fig. 2B y 2C). Ocasionalmente se observó una reacción inflamatoria muy suave que consistía en unas pocas células polimorfonucleares y plasmáticas.

La evaluación de la tasa de injertos de hígado mostró que entre los ratones que recibieron injertos de hígado humano, 15 de 33 mantuvieron el injerto durante más de 12 semanas mientras que 40 de 62 fueron injertados establemente en seis semanas o menos (Tabla 1).

Ejemplo 2

Trasplante de tejido hepático de un ser humano infectado con el virus de la hepatitis B (VHB)

Se obtuvo una biopsia de hígado de un paciente infectado con el virus de la hepatitis B (VHB) y se trasplantó bajo la cápsula renal de ratones quiméricos SCID-BNX según se ha descrito en el Ejemplo 1. El examen inmunohistológico del segmento de hígado antes del trasplante mostró que los hepatocitos se teñían positivamente para la proteína de superficie del VHB (HBsAg) (Fig. 3B). Después del trasplante, se proporcionó evidencia del origen humano de las células trasplantadas utilizando tinción con ácido peryódico-reacción de Schiff que identifica el glucógeno en hepatocitos humanos (Fig. 3C). 19 días después del trasplante, la zona subcapsular del riñón de la quimera SCID-BNX se teñió inmunohistológicamente y se detectó el HBsAg en zonas discretas del citoplasma en el tejido injertado pero no en las células adyacentes de riñón de ratón.

Ejemplo 3

Trasplante de fragmentos de hígado infectados in vitro con el VHB

Los fragmentos de hígado se obtuvieron de seres humanos no infectados con HVB según se ha descrito en el Ejemplo 1. Los fragmentos de hígado humano no infectado se incubaron *in vitro* con VHB resultando en su infección con VHB. Los fragmentos de hígado infectados *in vitro* se trasplantaron bajo las cápsulas renales de ratones SCID-BNX según se ha descrito en el Ejemplo 1 y la detección de VHB en los ratones trasplantados se evaluó mediante inmunohistología de los hepatocitos según se ha descrito en el Ejemplo 2 o midiendo el nivel de VHB en el suero de los ratones mediante reacción de PCR (RT-PCR) como sigue: el ADN se disolvió en 30 μ l de H₂O libre de DNasa. La PCR se realizó en un volumen de mezcla de reacción de 100 μ l que contenía tampón de Taq polimerasa (Promega), dNTP 2 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 500 ng de cada cebador directo (Bs) e inverso (Bas), y 2.5 unidades de Taq polimerasa (Promega). La reacción se llevó a cabo mediante 35 ciclos de PCR que consistieron en 94°C durante 1.5 min, 55°C durante 1.5 min y 72°C durante 3 min.

Se utilizaron los siguientes cebadores:

Bs:	1778-1806	5'-GGA-GGC-TGT-AGG-CAT-AAA-TTG-GTC-TGC-GC-
Bas:	2446-2408	5'-CCC-GAG-ATT-GAG-ATC-TTC-TGC-GAC-GCG-GCG-ATT-GAG-ACC-

(Tabla pasa a página siguiente)

Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 2:

TABLA 2

Resultados del trasplante de hígados humanos infectados con virus de la hepatitis B *in vitro* en ratones SCID-BNX

No. de animales	No. de animales que sobreviven	No. de animales injertados	Vía de infección*	Indicadores de infección y comentarios**
10	5	5	Incubación <i>in vitro</i> pretrasplante de fragmentos de hígado con VHB-ADN, suero +vo	PCR +va (3/5)
10	7	ND***	Incubación <i>in vitro</i> pretrasplante de fragmentos de hígado con VHB-ADN, suero +vo	PCR +va 1/7 en el día 11 PCR +va 4/7 en el día 30
10	5	ND	Incubación <i>in vitro</i> pretrasplante de fragmentos de hígado con VHB-ADN, suero +vo	PCR +va 1/5 en el día 11

* suero +vo = suero positivo para viremia

** PCR +va = ensayo de PCR positivo para el ADN del virus de la hepatitis

*** ND = no hay datos. Los ratones no se han sacrificado aún para examen histológico.

Como se ve en la tabla anterior, las secuencias del VHB se observaron en el suero de algunos animales trasplantados alrededor de diez días después del trasplante y con el paso de tiempo tras el trasplante las secuencias del VHB se observaron en un número mayor de ratones trasplantados.

Ejemplo 4

Detección del VHC en suero de ratones trasplantados con fragmentos de hígado de pacientes infectados con VHC

Se obtuvieron fragmentos de hígado de tres pacientes con infección crónica por VHC y se trasplantaron bajo las cápsulas renales de ratones SCID-BNX según se ha descrito en el Ejemplo 1. La presencia y nivel de VHC en el suero de los ratones trasplantados se evaluó mediante reacción de transcriptasa inversa y en cadena de la polimerasa anidada (RT-PCR) según sigue: el ARN se disolvió en 10 μ l de agua libre de RNasa. Se sintetizó el ADNc utilizando 50 ng del cebador inverso ASI en una mezcla de reacción que contenía tampón de Taq polimerasa 2x (Promega Corp., Madison, WI), dNTP 0.5 mM, 20 unidades de RNAsin (Promega), ditiotritol 10 mM y 30 unidades de transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (Life Science, Bethesda, MD) durante 60 min a 42°C. La PCR se llevó a cabo en un volumen de mezcla de reacción de 50 μ l que contenía tampón de Taq polimerasa (Promega), dNTP 2 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 20 ng de cebador directo SI y 2.5 unidades de Taq polimerasa (Promega). La reacción se llevó a cabo mediante 35 ciclos de PCR que consistieron en 94°C durante 1.5 min, 55°C durante 1.5 min y 72°C durante 3 min. La segunda

reacción de PCR se llevó a cabo como antes, con 5 µl de la mezcla de la primera reacción de PCR y el conjunto de cebadores anidados SII (directo) y ASII (inverso). Los dos conjuntos de cebadores utilizados son de la región 5' no traducida (5'UTR) altamente conservada.

Se utilizaron los siguientes cebadores:

SI 7-26: 5'-CAC-TCC-ACC-ATA-GAT-CAT-CCC-3'

ASI 248-222: 5'-ACC-ACT-ACT-CGG-CTA-GCA-GT-3'

SII 46-65: 5'-TTC-ACG-CAG-AAA-GCG-TCT-AG-3'

ASII 190-171: 5'-GTT-GAT-CCA-AGA-AAG-GAC-CC-3'

Los resultados obtenidos tras el trasplante de fragmentos de hígado infectados con VHC se muestran en la siguiente Tabla 3:

TABLA 3

Resultados del trasplante de fragmentos de hígado de pacientes humanos con VHC en ratones SCID-BNX

Número de ratones			
Trasplantados con fragmentos de hígado infectados con VHC	Supervivientes	Injertados establemente	Positivos para viremia
20	17	15	8
17	14	10	7
13	11	6	5
12	10	ND*	6

ND* = no hay datos: los ratones no se han sacrificado todavía para el examen histológico.

Las secuencias del VHC se observaron por primera vez en el suero de ratones trasplantados dos semanas después del trasplante y continuaron siendo detectadas de forma intermitente durante alrededor de dos meses tras el trasplante, tiempo en el que se sacrificaron los animales (un experimento típico se muestra en la Fig. 4). Previamente se han observado fluctuaciones similares en la detección del ARN del VHC en chimpancés infectados experimentalmente con VHC y en pacientes con infecciones crónicas, probablemente como resultado de los niveles muy bajos de virus en suero.

Ejemplo 5

Trasplante de fragmentos de hígado infectados in vitro con VHC a ratones C3H

Los ratones C3H, que no son una cepa inmunodeficiente, se irradiaron mediante irradiación corporal total (TBI) fraccionada (una primera dosis de 400 rads y una segunda dosis de 1200 rads) y se radioprotegieron al día siguiente con 3 x 10⁶ células de médula ósea de SCID (según se ha descrito en el Ejemplo 1 anteriormente).

Los fragmentos de hígado se obtuvieron de seres humanos no infectados con VHC según se ha descrito en el Ejemplo 1 y los fragmentos de hígado humano no infectados se incubaron *in vitro* con el VHC resultando en su infección por VHC. Los fragmentos de hígado infectados *in vitro* con VHC se trasplantaron bajo las cápsulas renales de ratones C3H según se ha descrito anteriormente y la detección del VHC en los ratones trasplantados se evaluó ensayando el nivel del VHC en el suero de los ratones mediante RT-PCR según se ha descrito en el Ejemplo 4 anteriormente.

ES 2 287 929 T3

Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 4:

TABLA 4

Resultados del trasplante de hígados humanos infectados *in vitro* con el virus de la hepatitis C en ratones C3H

No. de animales	No. de animales que sobreviven	No. de animales injertados	Vía de infección	Indicadores de infección y comentarios***
10	10	ND*	Incubación <i>in vitro</i> pretrasplante de fragmentos de hígado con VHC-ADN, suero +VHC**	PCR +VHC 2/10 en el día 14

* ND = no hay datos: los ratones no se han sacrificado aún para el examen histológico

** suero +VHC = suero positivo para VHC

*** PCR +VHC = ensayo de PCR positivo para el ADN del virus de la hepatitis C

Los resultados mostrados en la tabla anterior, demuestran por primera vez, que fragmentos de hígado humano infectados *in vitro* con VHC se pueden injertar y resulta en la infección del ratón trasplantado con VHC según se evaluó mediante la detección de las secuencias de VHC en el suero de los ratones trasplantados.

Además, los resultados anteriores, por primera vez, muestran que hígados humanos infectados con VHC se pueden trasplantar bajo las cápsulas renales de ratones C3H, que no es una cepa inmunodeficiente.

REIVINDICACIONES

1. Un animal quimérico no humano útil como un modelo para la infección por el virus de la hepatitis (VH) humano,
que comprende un mamífero no humano M5 que tiene células xenogénicas; derivando el mamífero M5 de un mamífero
no humano M1 tratado para destruir sustancialmente sus células hematopoyéticas y después trasplantado con células
hematopoyéticas derivadas de uno o más mamíferos M2 y trasplantado con tejido hepático infectado con VHB o VHC
de un mamífero M3, siendo el uno o más mamíferos M2 y el mamífero M3 de la misma o de diferentes especies; siendo
las células hematopoyéticas trasplantadas de uno o más mamíferos M2 de una preparación de células hematopoyéticas
de un mamífero deficiente en células T o de una preparación de células troncales o de médula ósea de mamífero con
las células T eliminadas o de ambas; siendo el tejido hepático trasplantado del mamífero M3 una preparación de tejido
hepático humano o una preparación de tejido hepático de un mamífero no humano capaz de ser infectado por VH.
2. Un animal no humano según la reivindicación 1, en donde las células hematopoyéticas de dicho mamífero M1
se destruyen sustancialmente mediante irradiación corporal total (TBI).
3. Un animal no humano según la reivindicación 2, en donde la irradiación es una irradiación corporal total (TBI)
fraccionada.
4. Un animal no humano según las reivindicaciones 1-3, en donde al menos uno de dichos mamíferos M2 es un
mamífero deficiente en células T.
5. Un animal no humano según la reivindicación 4, en donde el mamífero M2 deficiente en células T es un mamí-
fero con inmunodeficiencia combinada grave (SCID).
6. Un animal no humano según la reivindicación 5, en donde dicho mamífero M2 es un ratón SCID.
7. Un animal no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la preparación de células hema-
topoyéticas es una preparación de médula ósea con las células T eliminadas.
8. Un animal no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha preparación de células
troncales es una preparación de células troncales con las células T eliminadas obtenida de la sangre periférica de dicho
mamífero M2.
9. Un animal no humano según la reivindicación 8, en donde dicho mamífero M2 es un ser humano que está
sometido a un tratamiento que produce la migración de células troncales al sistema de la sangre periférica.
10. Un animal no humano según la reivindicación 9, en donde dicho tratamiento comprende administrar factor
estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a dicho ser humano.
11. Un animal no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho mamífero M3 es un
mamífero infectado con VHB o VHC.
12. Un animal no humano según la reivindicación 11, en donde el mamífero infectado con VHB o VHC es un
paciente de hepatitis humano.
13. Un animal no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho mamífero M3 es un
mamífero no infectado con VH y el tejido hepático se infecta *in vitro* con VH antes del trasplante del mismo al
mamífero M1.
14. Un animal no humano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde las células hematopoyéticas
de uno o más mamíferos M2 comprenden células hematopoyéticas de un mamífero SCID y una preparación de células
troncales o de médula ósea con las células T eliminadas.
15. Un animal no humano según la reivindicación 14, en donde las células hematopoyéticas del uno o más ma-
míferos M2 comprenden células hematopoyéticas de un mamífero SCID y una preparación de células troncales o de
médula ósea con las células T eliminadas.
16. Un método para evaluar el potencial de un agente o una combinación de agentes en la terapia o prevención
de una infección por VH utilizando el mamífero no humano M5, según se ha definido en la reivindicación 1, dicho
método comprende:
 - (a) administrar dicho agente o combinación de agentes a dicho mamífero M5; y
 - (b) evaluar la eficacia de dicho agente o combinación en prevenir la expansión de la infección por VH o reducir
sus síntomas fisiológicos en dicho mamífero M5.

ES 2 287 929 T3

17. Un método para obtener células inmunes o anticuerpos anti-VH utilizando el mamífero no humano M5, según se ha definido en la reivindicación 1, dicho método comprende:

(a) aislar las células inmunes o anticuerpos de la sangre de dicho mamífero M5; y

(b) seleccionar las células inmunes o anticuerpos que tienen reactividad anti-VH.

18. Un método según la reivindicación 17, en donde las células inmunes seleccionadas son células B productoras de anticuerpos anti-VH, comprendiendo además el método un paso de inmortalización de dichas células.

19. Un método según la reivindicación 17, en donde las células inmunes seleccionadas son células T citotóxicas.



FIG. 1A

FIG. 1B



FIG. 1C



FIG. 2A



FIG. 2B



FIG. 2C



FIG. 3A



FIG. 3B



FIG. 3C



FIG. 3D

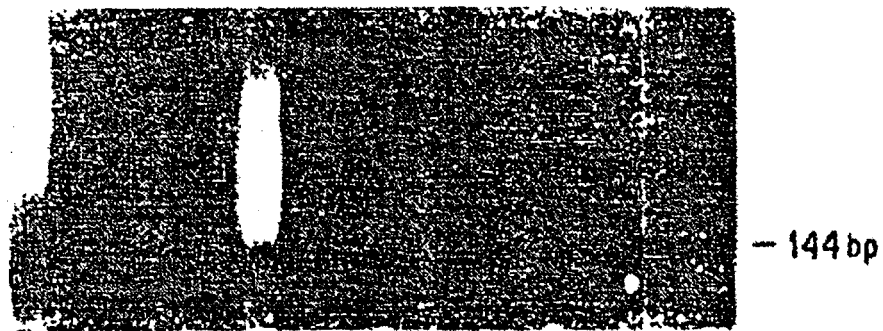


FIG. 4A

14 19 28 38 44 53 - +



FIG. 4B