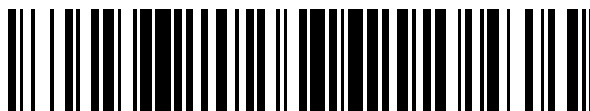


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 906**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2011** **PCT/EP2011/054544**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011** **WO11117352**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2011** **E 11709745 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017** **EP 2549859**

54 Título: **Modelo primate de la familia de los cercopitécidos infectado por una cepa del VHB de genotipo humano**

30 Prioridad:

24.03.2010 EP 10305291

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.11.2017

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (33.0%)
101 Rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
HOSPICES CIVILS DE LYON (33.0%) y
UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1 (33.0%)**

72 Inventor/es:

**CHEMIN, ISABELLE y
TREPO, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 640 906 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 primate de la familia de los cercopitécidos infectado por una cepa del VHB de genotipo humano

5 **[0001]** La solicitud describe un nuevo modelo primate no humano del virus de la hepatitis B (VHB).

[0002] Los cinco tipos de hepatitis viral, genotipos de hepatitis A, B, C, D, E, son ahora bastante bien conocidos. En cada caso, el virus invade el hígado y provoca un estado inflamatorio con destrucción de las células hepáticas.

10 **[0003]** La hepatitis B es causada por un virus, el virus de la hepatitis B humana (VHB). En la mayoría de los casos, la infección por VHB no da lugar a ningún síntoma y es responsable de la hepatitis aguda asintomática. La hepatitis aguda se caracteriza por trastornos digestivos, dolores abdominales, coloración de la orina y heces decoloradas, anormales, astenia e ictericia. La hepatitis aguda puede convertirse en una forma fulminante con necrosis hepática rápida.

15 **[0004]** La infección viral también puede convertirse en una forma crónica, ya sea en pacientes que han mostrado hepatitis aguda, o en individuos para los que la infección era asintomática. El 10% de los adultos infectados y el 90% de los recién nacidos infectados se convierten en portadores crónicos (Ganem, 1996; Maddrey, 2000). Las infecciones crónicas con frecuencia progresan a cirrosis y cáncer de hígado (Beasley, 1988). Los portadores crónicos presentan lesiones hepáticas de gravedad variable y un mayor riesgo de desarrollar cirrosis y cáncer de hígado primitivo. En Asia y África, donde las infecciones son a menudo crónicas, los cánceres de hígado primitivos representan un problema de salud pública importante. Además, los portadores crónicos son reservorios de virus y permiten que se extiendan, transponiendo el problema de salud pública a un problema global.

25 **[0005]** El virus VHB fue descubierto por Blumberg et al, 1965. Este virus portado en la sangre también puede ser adquirido por contacto sexual o por transmisión perinatal. VHB es un pequeño virus de ADN con un diámetro de 42 nm, que pertenece al grupo de los virus de ADN hepatotropos (hepadnavirus) y se clasifica en la familia Hepadnaviridae. Su estructura genómica es notablemente compacta. El virus comprende una envoltura externa y una nucleocápside. La envoltura se compone principalmente de tres antígenos de superficie (HBsAg: los antígenos de superficie de hepatitis B) que desempeñan un papel importante en el diagnóstico de infecciones por VHB. La nucleocápside contiene el antígeno del núcleo (HBcAg), una ADN polimerasa/transcriptasa inversa, así como el genoma viral, y la membrana externa lleva el determinante antigénico principal (epítipo) del virus, el antígeno HBs. El núcleo viral (aproximadamente 28 nm de diámetro) permanece dentro de la envoltura que lleva el determinante antigénico principal (el determinante "a").

35 **[0006]** Las partículas de VHB contienen predominantemente rcADN con una cadena completa negativa y una cadena parcialmente sintetizada positiva. Durante la iniciación de la infección, el ADN del virión se convierte en un cccADN que sirve como molde para la transcripción de un intermedio de ARN, el pregenoma. A continuación, se sintetiza un genoma de ADN circular relajado, parcialmente de doble cadena, de ~ 3-kb mediante transcripción inversa del pregenoma. El mecanismo de síntesis de ADN dirigida por ARN ha sido bien caracterizado mediante estudios genéticos, así como bioquímicos, que han sido descritos en varias revisiones. En cambio, los eventos tempranos del ciclo de vida viral, incluyendo la entrada, eliminación de la envoltura, y la liberación del genoma viral en el núcleo de la célula, no están bien comprendidos. Esto es, en parte, debido a la ausencia hasta hace poco de líneas de células que sean susceptibles a la infección por hepadnavirus.

45 **[0007]** Los genotipos del virus de la hepatitis B (VHB) tienen una distribución geográfica característica. El virus de la hepatitis B (VHB) se ha clasificado en 8 genotipos (AH) en base a una divergencia intergrupo del 8% o más en la secuencia de nucleótidos completa. Los genotipos A y C predominan en los EE.UU. Sin embargo, los genotipos B y D también están presentes en los EE.UU. El genotipo F predomina en América del Sur y en Alaska, mientras que A, D y E predominan en África. El genotipo D predomina en Rusia y en todos sus dominios anteriores, mientras que en Asia, predominan los genotipos B y C. Mediante la secuenciación y el análisis filogenético de los aislados locales de VHB, se ha descrito que el genotipo VHB dominante en el Tíbet es un híbrido C/D (Chaoyin Cui et al., 2002).

55 **[0008]** A pesar de que se ha desarrollado una vacuna eficaz (véase, por ejemplo Lemon y Thomas, 1997, para una revisión), la infección por el VHB sigue siendo un problema de salud pública en todo el mundo, con 400 millones de portadores crónicos del VHB haciendo que las infecciones por VHB sean la cuarta causa principal de muerte por enfermedades infecciosas (Wright et al., 1993). Cada año, casi 1 millón de personas sucumben a la enfermedad hepática asociada al VHB, especialmente cirrosis y carcinoma hepatocelular. El número de portadores crónicos ya infectados y la posible aparición de mutantes de escape de vacunas ponen de relieve la necesidad de tratamientos más eficaces contra el VHB. De hecho, los tratamientos existentes de la infección crónica por VHB aún no son satisfactorios. Por lo tanto, el desarrollo de mejores modelos animales para probar nuevos enfoques terapéuticos es altamente deseable.

65 **[0009]** La falta de sistemas de infección in vitro adecuados y modelos animales convenientes ha obstaculizado en gran medida el progreso de la investigación del VHB.

[0010] La generación de líneas celulares de hepatoma humano VHB transfectadas ha contribuido de manera significativa a dilucidar varios aspectos de la replicación viral y la expresión génica. Además, VHB se ha crecido con éxito en cultivos primarios de hepatocitos humanos, pero la susceptibilidad a la infección es baja y hepatocitos cultivados convertido no permisiva para el VHB muy rápido después de la siembra. Sólo recientemente, Gripon et al. (2002) se describe una línea celular de hepatoma altamente diferenciadas que, en condiciones específicas, parece ser susceptible a la infección por VHB.

[0011] Los chimpancés fueron los primeros animales que se encontró que eran susceptibles a la infección por VHB como se ha demostrado por la inducción de la infección aguda y hepatitis en estos animales después de la inyección de suero de portadores del virus de la hepatitis B humana (Barker et al., 1973). Son los únicos primates conocidos para desarrollar una respuesta inmune celular similar a la observada en los seres humanos infectados de forma aguda con el VHB (Bertoni et al., 1998). Sin embargo, no desarrollan la enfermedad hepática crónica. Además, su uso está estrictamente limitado por su coste y por las restricciones éticas obvias, su uso está prohibido incluso en algunos países, entre ellos Francia. Además, están en peligro de extinción y son inasequibles (Will et al, 1982; Mac Donald et al., 2000). La infección por VHB natural en chimpancé, aunque se ha observado durante mucho tiempo, se ha demostrado muy recientemente (Hu et al, 2000).

[0012] El descubrimiento de los virus relacionados con el VHB en el pasado, primero en patos, gansos, garzas, marmotas, ardillas, y más recientemente en monos lanudos, gibones, gorilas y orangutanes, ofreció oportunidades para los estudios in vivo en varios animales con hepadnavirus naturales. Sin embargo, la mayoría de los animales correspondientes son difíciles de manejar en cautividad o no están fácilmente disponibles o filogenéticamente están lejos del ser humano. Los patos, marmotas, ardillas y ratones humanizados recientemente desarrollados son muy buenos modelos para estudiar el ciclo viral, pero están filogenéticamente lejos del ser humano con respecto de la respuesta inmune, y no desarrollan lesiones inflamatorias hepáticas, excepto de la marmota. Las infecciones experimentales y de origen natural con VHB se han descrito en gibones, orangutanes y gorilas (Shouval, 1994; Warren et al., 1999; Lanford et al, 2000; Takahashi et al., 2000). Sin embargo, no hay informes que demuestren el desarrollo de lesiones hepáticas y elevación de las enzimas hepáticas en estos animales.

[0013] En base a la estrecha relación filogenética entre musarañas de árbol y primates, la especie de musaraña de árbol *Tupaia belangeri* ha sido analizada para el estudio de la infección por VHB tanto in vitro como in vivo, tomando ventaja de estos animales en el entorno de laboratorio (Walter et al., 1996; Köck et al, 2001; von Weizsacker et al., 2004, Baumert et al, 2005). Sin embargo, la inoculación de VHB en musarañas de árbol sólo causa una infección transitoria que da lugar a una seroconversión y no conduce a un estado de portador crónico. Esta es una limitación importante para el uso de este modelo animal experimental.

[0014] La marmota es uno de los modelos animales más utilizados intensamente para VHB. Esto se debe al hecho de que VHM (virus de la hepatitis de la marmota) es más similar al VHB en términos de organización genómica que los hepadnavirus aviares y permite la investigación de todo el ciclo de vida viral en hepatocitos naturales del huésped, incluyendo durante el desarrollo de HCC. El VHM es morfológicamente indistinguible de VHB y su genoma comparte aproximadamente el 60% de identidad de secuencia de nucleótidos con su homólogo humano. Sin embargo, una desventaja general respecto para el uso de las marmotas es que son animales genéticamente heterogéneos, difíciles de criar en cautividad y de manipular en muchos laboratorios. Finalmente, el sistema inmune de las marmotas no está bien caracterizado, y sólo muy pocos anticuerpos monoclonales contra moléculas de MHC de marmota están disponibles.

[0015] Más recientemente, un nuevo hepadnavirus con un huésped intermedio entre los humanos y los roedores se ha aislado de un mono lanudo, *Lagothrix lagotricha*, un primate del nuevo mundo en peligro de extinción. El análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos de los genes del virus de hepatitis B del mono lanudo (WMVHB) indicó que el virus era distinto de VHB y probablemente representa un progenitor de los virus humanos. Desafortunadamente, el pariente más cercano no en peligro de extinción del mono lanudo, el mono araña de manos negras (*Ateles geoffroyi*), demostró que era sólo marginalmente permisivo para WMVHB, y sólo se observó una replicación mínima después de la inoculación de un chimpancé con WMVHB.

[0016] Todos los modelos animales disponibles actualmente tienen inconvenientes: ninguno es filogenéticamente próximo al ser humano, no están en peligro de extinción, de fácil manejo en el laboratorio, y susceptibles para desarrollar lesiones hepáticas y respuesta inmune innata o celular similar a la observada en los seres humanos de forma aguda o infectados crónicamente con VHB.

[0017] El desarrollo de un nuevo modelo experimental más cerca de los seres humanos y susceptible a la infección por VHB es de particular importancia, ya que representará una herramienta esencial para nuevas pruebas de estrategia terapéutica y estudio de variantes de VHB.

[0018] El virus de VHB siempre se ha considerado altamente específico del huésped por la comunidad científica.

[0019] En 2002, Gheit et al. han inoculado intrahepáticamente tres monos *M. sylvanus* de Marruecos con una construcción de ADN de VHB de genotipo D humano. Muestran que, después de la transfección directa de ADN del

VHB humano de hígado de *M. sylvanus*, se detectan cantidades crecientes de ADN circulante se detectan en el suero durante varias semanas con la presencia de HBsAg, se confirma la presencia de partículas de virus en el suero y el aumento de los niveles de transaminasas siguió a la presencia de marcadores de virus en el suero. Esto demuestra la aparición de la replicación del VHB asociada con hepatitis aguda después de la transfección intrahepática de monos *M. sylvanus* con ADN del VHB.

[0020] Los presentes inventores han mostrado sorprendentemente, por primera vez, en dos especies de la familia de cercopitécidos, una infección natural por una cepa de VHB de un genotipo humano.

[0021] Las muestras biológicas de un total de 50 macacos *cynomolgus* se incluyeron en el estudio (hígado y suero). La PCR subgenómica y la detección de HBsAg permitieron la identificación de marcadores del VHB entre el 42% (21/50) de los animales probados. La PCR cuantitativa indicó cargas virales del VHB entre macacos *cynomolgus* que iban desde 10^2 a 10^4 copias de ADN de VHB por ml de suero. La secuencia de VHB completa que circula en estos macacos *cynomolgus* mostró una secuencia cerca de la secuencia de VHB de genotipo D humano que circula entre los usuarios europeos de drogas intravenosas (U 95551/gi 2182117).

[0022] Además, en una muestra de hígado de un *Cercopithecus cephus* que murió en un zoológico francés de hepatitis severa, también se identificó la presencia de proteínas de la cubierta (AgHBs), proteínas de la cápside (AgHBc) y secuencias de ADN de VHB.

[0023] Esto proporciona un nuevo enfoque para obtener modelos primates con VHB, más cerca de los humanos que los modelos disponibles actualmente, susceptibles a la infección por VHB.

[0024] La invención en su sentido más amplio se define como en las reivindicaciones independientes.

Uso de una cepa de VHB humano para infectar modelos animales primates

[0025] Por lo tanto, la presente solicitud describe el uso de una cepa de VHB aislada de un genotipo humano o una cepa de VHB híbrida de genotipos humanos para infectar, preferiblemente infectar artificialmente, un primate no humano de la familia de los cercopitécidos y para producir un modelo animal.

[0026] Un "modelo animal" significa en el presente documento un animal aislado de su entorno natural que ha sido infectado, preferiblemente infectado artificialmente, y puede ser utilizado como modelo para la enfermedad del VHB humano.

[0027] Preferiblemente, dicho genotipo humano de VHB se selecciona del grupo que consiste en genotipo A humano de VHB, genotipo B humano de VHB, genotipo C humano de VHB, genotipo D humano de VHB, genotipo E humano de VHB, genotipo F humano de VHB, genotipo G humano de VHB y genotipo H humano de VHB.

[0028] Más preferiblemente, dicho genotipo humano de VHB se selecciona del grupo que consiste en genotipo A humano de VHB y genotipo D humano de VHB.

[0029] Preferiblemente, dicha cepa de VHB híbrida es un híbrido de dos genotipos humanos como se definió anteriormente.

[0030] En un aspecto preferido, la cepa de VHB comprende o consiste en una secuencia de al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idéntica a SEQ ID NO: 1.

[0031] Los cercopitécidos son un grupo de primates, cayendo en la superfamilia Cercopithecoidea en el clado Catarrhini. Desde el punto de vista de la apariencia superficial, no se parecen a los simios en que la mayoría tienen colas (el nombre de la familia significa "simio con cola"), y a diferencia de los monos del Nuevo Mundo en que sus colas no son prensiles.

[0032] Los cercopitécidos son nativos de África y Asia hoy en día, pero también son conocidos de Europa en el registro fósil. Incluyen muchas de las especies más familiares de primates no humanos. Los cercopitécidos incluyen dos subfamilias, la *Cercopithecinae*, que son principalmente de África pero incluye el género diverso de macacos que son de Asia y el norte de África, y la *Colobinae*, que incluye la mayoría de los géneros de Asia, pero también los monos colobos africanos.

[0033] Preferiblemente, el modelo animal primate aislado de la familia de los cercopitécidos infectado artificialmente es de la subfamilia *Cercopithecinae*.

[0034] Preferiblemente, el modelo animal primate aislado de la subfamilia *Cercopithecinae* es un macaco, más preferiblemente de la especie *Macaca sylvanus* o *Macaca cynomolgus*, o un guenon, más preferiblemente de la especie *Cercopithecus cephus*.

[0035] En un aspecto específico, los babuinos están excluidos del alcance de los cercopitécidos descritos en el presente documento.

[0036] "Aislado" cuando se usa en referencia a las cepas de VHB y/o secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento significa que la cepa o secuencia de nucleótidos han sido sometidos al menos a una etapa de purificación del fluido corporal y/o tejido natural o que no está presente en su entorno nativo. Alternativamente, las cepas pueden mantenerse en fluido corporal y/o tejido aislado o pueden estar en forma de nucleótidos. Típicamente, esto significa que la cepa de virus o la secuencia de nucleótidos está libre de al menos una de las proteínas del huésped y/o ácidos nucleicos del huésped. En general, la cepa de virus o secuencia de nucleótidos aisladas está presente en un entorno in vitro. "Aislado" no significa que la cepa de virus o secuencia de nucleótidos deba ser purificada u sea homogénea, aunque dichas preparaciones caen dentro del alcance del término. "Aislado" significa simplemente elevado a un grado de pureza, en la medida requerida con exclusión de producto de la naturaleza y anticipaciones accidentales del alcance de las reivindicaciones. "Aislado" significa que incluye cualquier material biológico tomado ya sea directamente de un ser humano o animal infectado, o después del cultivo (enriquecimiento).

[0037] Una "cepa" significa una variante genética o subtipo de un virus.

[0038] Un "genotipo de VHB" es un grupo VHB basado en el 92% de homología o más en la secuencia de nucleótidos genómica completa.

[0039] El grado de "homología" se establece mediante el registro de todas las posiciones para las cuales los nucleótidos de las dos secuencias comparadas son idénticos, en relación con el número total de posiciones.

[0040] Una "cepa híbrida α/β " significa una cepa cuya secuencia de ADN genómico resulta de una recombinación entre una secuencia de nucleótidos genómica del genotipo α y una secuencia de nucleótidos genómica del genotipo β .

[0041] El término "recombinación" significa en este documento el mecanismo por el cual genes localizados en diferentes secuencias genómicas homólogas se encuentran en la misma estructura genómica recombinante.

[0042] Una "secuencia de nucleótidos genómica del genotipo A humano de VHB" significa el material genético total de una cepa de VHB del genotipo A humano.

[0043] "Del genotipo λ humano de VHB" significa de una cepa de VHB clasificada en el genotipo λ humano.

[0044] "Artificialmente" significa que el encuentro entre el virus y el animal no se produce al azar, sino que es un encuentro forzado (es decir, el animal se inocula con la cepa de VHB o secuencia de nucleótidos de VHB por intervención humana).

[0045] "Infectado" significa en este documento el desarrollo de signos de infección.

[0046] "Signos de infección" incluyen la presencia de ADN genómico de VHB en el hígado o en el suero, la presencia de proteínas virales en el hígado o en el suero y/o una carga viral de al menos 10^2 copias genómicas/ml

[0047] La presencia de ADN genómico de VHB se puede ensayar por transferencia de puntos de los ácidos nucleicos o suero o por PCR seguido de transferencia Southern seguido por hibridación con una sonda específica de VHB, o por análisis de transferencia Northern o por RT PCR para el análisis del ARN. La presencia de las proteínas virales puede ensayarse por inmunofluorescencia, FACS o ensayos de transferencia Western, inmunoensayos (ELISA).

[0048] La carga viral se puede medir por PCR en tiempo real.

[0049] Preferiblemente, la carga viral del VHB en el suero de un modelo animal de acuerdo con la invención está comprendida entre 10^2 y 10^8 copias/ml, más preferiblemente entre 10^3 y 10^8 copias/ml, lo más preferiblemente entre 10^4 y 10^8 copias/ml.

Uso de un primate de la familia de los cercopitécidos para fabricar un modelo animal infectado por VHB

[0050] Un objeto adicional descrito en este documento es el uso de un primate aislado de la familia de los cercopitécidos para fabricar un modelo animal infectado por una cepa de VHB de un genotipo humano o una cepa de VHB híbrida de dos genotipos humanos.

[0051] La solicitud también describe el uso de un primate aislado de la familia de los cercopitécidos infectado, por ejemplo infectado artificialmente, por una cepa de VHB de un genotipo humano o una cepa de VHB híbrida de dos genotipos humanos como un modelo animal para la infección para la enfermedad de VHB humano.

[0052] Preferiblemente, dicho genotipo humano de VHB se selecciona del grupo que consiste en genotipo A humano de VHB, genotipo B humano de VHB, genotipo C humano de VHB, genotipo D humano de VHB, genotipo E humano de VHB, genotipo F humano de VHB, genotipo G humano de VHB y genotipo H humano de VHB.

5 [0053] Más preferiblemente, dicho genotipo humano de VHB se selecciona del grupo que consiste en genotipo A humano de VHB y genotipo D humano de VHB.

[0054] Preferiblemente, dicha cepa de VHB híbrida es un híbrido de dos genotipos humanos.

10 [0055] En un aspecto preferido, la cepa de VHB comprende o consiste en una secuencia de al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idéntica a SEQ ID NO: 1.

[0056] Preferiblemente, el primate aislado de la familia de los cercopitécidos es de la subfamilia *Cercopithecinae*.

15 [0057] Preferiblemente, el modelo animal primate aislado de la subfamilia *Cercopithecinae* es un macaco, más preferiblemente de la especie *Macaca sylvanus* o *Macaca cynomolgus*, o un guenon, más preferiblemente de la especie *Cercopithecus cephus*.

20 [0058] En un aspecto específico, los babuinos están excluidos del alcance de los cercopitécidos descritos en el presente documento.

[0059] Un "primate aislado" significa un primate aislado de su entorno natural.

Modelos de VHB de primates no humanos

25 [0060] Un objeto adicional descrito en este documento es un modelo animal primate de la familia de los cercopitécidos infectado con una cepa de VHB de un genotipo humano o una cepa de VHB híbrida de genotipos humanos.

30 [0061] Preferiblemente, dicho modelo animal primate de la familia de los cercopitécidos está infectado artificialmente con una cepa de VHB aislada de un genotipo humano o una cepa de VHB híbrida de genotipos humanos.

[0062] Preferiblemente, dicho genotipo humano de VHB se selecciona del grupo que consiste en genotipo A humano de VHB, genotipo B humano de VHB, genotipo C humano de VHB, genotipo D humano de VHB, genotipo E humano de VHB, genotipo F humano de VHB, genotipo G humano de VHB y genotipo H humano de VHB.

35 [0063] Más preferiblemente, dicho genotipo humano de VHB se selecciona del grupo que consiste en genotipo A humano de VHB y genotipo D humano de VHB.

[0064] Preferiblemente, dicha cepa de VHB híbrida es un híbrido de dos genotipos humanos.

40 [0065] En un aspecto preferido, la cepa de VHB comprende o consiste en una secuencia de al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idéntica a SEQ ID NO: 1.

[0066] Preferiblemente, el primate aislado de la familia de los cercopitécidos es de la subfamilia *Cercopithecinae*.

45 [0067] Preferiblemente, el modelo animal primate aislado de la subfamilia *Cercopithecinae* es un macaco, más preferiblemente de la especie *Macaca sylvanus* o *Macaca cynomolgus*, o un guenon, más preferiblemente de la especie *Cercopithecus cephus*.

50 [0068] En un aspecto específico, los babuinos están excluidos del alcance de los cercopitécidos descritos en el presente documento.

[0069] Preferiblemente, el modelo animal primate tiene una carga viral del VHB en el suero comprendida entre 10^2 y 10^8 copias/ml, más preferiblemente entre 10^3 y 10^8 copias/ml, lo más preferiblemente entre 10^4 y 10^8 copias/ml.

55 [0070] Un objeto adicional descrito en este documento es un procedimiento para proporcionar un modelo animal primate, que comprende las siguientes etapas que consisten en:

- aislar un animal de la familia de los cercopitécidos;
- infectar dicho animal con una cepa de VHB aislada de un genotipo humano o una cepa de VHB híbrida de genotipos humanos;
- ensayar una carga viral de al menos 10^2 copias genómicas de VHB/ml de suero.

Secuencias de nucleótidos y procedimientos de expresión

65 [0071] Otro objeto descrito en este documento es una secuencia de nucleótidos o un ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% idéntica a SEQ ID NO: 1, o una

secuencia complementaria de la misma.

[0072] SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos genómica de la cepa de VHB aislada por los inventores en *Macaca cynomolgus* de Isla Mauricio. Esta secuencia se ha demostrado que se clasifica en el genotipo D humano es decir, que tiene más del 92% de homología con la secuencia genómica de un genotipo D humano.

[0073] Los términos "polinucleótido", "ácido polinucleico", "ácido nucleico", "secuencia de ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos", "molécula de ácido nucleico", "oligonucleótido", "sonda" o "cebador", cuando se usan en este documento se refieren a nucleótidos, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos de péptidos o nucleótidos bloqueados, o una combinación de los mismos, en una forma polimérica de cualquier longitud o cualquier forma (por ejemplo, ADN ramificado). Dichos términos incluyen además polinucleótidos de doble cadena (ds) y de cadena sencilla (ss), así como polinucleótidos de cadena triple. Dichos términos también incluyen modificaciones de nucleótidos conocidos, tales como metilación, ciclización y "caps" y sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, tal como inosina o por monómeros no amplificables, tales como HEG (hexetilenglicol).

[0074] Los ribonucleótidos se indican como PNT, desoxirribonucleótidos como dNTP y didesoxirribonucleótidos como ddNTP.

[0075] Los nucleótidos pueden marcarse en general radioactivamente, de forma quimioluminiscente, fluorescente, fosforescente o con colorantes infrarrojos o con una etiqueta de Raman de mayor superficie o partícula resonante plasmónica (PRP).

[0076] Por un nucleótido que tiene una secuencia al menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de consulta, se entiende que la secuencia del nucleótidos objeto es idéntica a la secuencia de consulta excepto que la secuencia de nucleótidos objeto puede incluir hasta cinco alteraciones de ácido nucleico por cada 100 ácidos nucleicos de la secuencia de consulta. En otras palabras, para obtener un nucleótido que tiene una secuencia al menos 95% idéntica a una consulta, hasta un 5% (5 de 100) de los ácidos nucleicos en la secuencia objeto pueden estar insertados, eliminados o sustituidos por otro ácido nucleico.

[0077] Los procedimientos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Se puede utilizar, por ejemplo, el programa "needle", que utiliza el algoritmo de alineación global de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970 J. Mol Biol. 48: 443-453) para encontrar la alineación óptima (incluidos los huecos) de dos secuencias cuando se considera toda su longitud. El programa "needle" está, por ejemplo, disponible en el sitio web ebi.ac.uk. El porcentaje de identidad descrito en el presente documento se calcula preferiblemente usando el programa EMBOSS::needle (global) con un parámetro de "Gap Open" igual a 10,0, un parámetro "Gap Extend" igual a 0,5, y una matriz Blossum62

[0078] Un objeto adicional descrito en este documento se refiere a un vector que comprende una secuencia de nucleótidos descrita en este documento colocada bajo el control de los elementos que aseguran la expresión de la secuencia de nucleótidos.

[0079] "Elementos que aseguran la expresión de dicha secuencia de nucleótidos" se refiere en particular a los elementos necesarios para asegurar la expresión de dicha secuencia de nucleótidos después de su transferencia a una célula diana. Se aplica en particular a secuencias promotoras y/o secuencias reguladoras que son efectivas en dicha célula, y opcionalmente las secuencias requeridas que permiten que un polipéptido se exprese en la superficie de las células diana. El promotor utilizado puede ser un promotor viral, ubicuo o específico de tejido, o un promotor sintético. Como ejemplos podemos mencionar los promotores, tales como los promotores de los virus RSV (Virus del sarcoma de rous), MPSV, SV40 (Virus de simio), CMV (Cytomegalovirus) o del virus vaccinia. Además, es posible seleccionar una secuencia de promotor específica para un tipo de célula dada, o que se pueda activar en condiciones definidas. La literatura contiene un gran volumen de información relativa a dichas secuencias promotoras.

[0080] Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) puede introducirse en una célula huésped, a fin de transformar el huésped y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Los vectores incluyen plásmidos, fagos, virus, etc.; se discuten en mayor detalle a continuación.

[0081] Los vectores comprenden típicamente el ADN de un agente transmisible, en el que se inserta el ADN extraño. Una forma común para insertar un segmento de ADN en otro segmento de ADN implica el uso de enzimas denominadas enzimas de restricción que escinden el ADN en sitios específicos (grupos específicos de nucleótidos) denominados sitios de restricción. Un "casete" se refiere a una secuencia codificante de ADN o segmento de ADN que codifica un producto de expresión que puede insertarse en un vector en sitios de restricción definidos. Los sitios de restricción de casete están diseñados para garantizar que la inserción del casete en el marco de lectura apropiado. Generalmente, se inserta el ADN extraño en uno o más sitios de restricción del ADN vector, y a continuación es transportado por el vector en una célula huésped junto con el ADN vector transmisible. Un segmento o secuencia de ADN que tiene ADN insertado o añadido, tal como un vector de expresión, también puede ser llamado una "construcción de ADN". Un tipo común de vector es un "plásmido", que generalmente es una molécula autocontenida

de ADN de doble cadena, normalmente de origen bacteriano, que puede aceptar fácilmente ADN (extraño) adicional y que puede introducirse fácilmente en una célula huésped adecuada. Un vector plásmido contiene a menudo ADN codificante y ADN promotor y tiene uno o más sitios de restricción adecuados para la inserción de ADN extraño. El ADN codificante es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos particular para una proteína o enzima particular. El ADN promotor es una secuencia de ADN que inicia, regula, o en cualquier caso media o controla la expresión del ADN codificante. El ADN promotor y el ADN codificante pueden ser del mismo gen o de genes diferentes, y pueden ser del mismo o de diferentes organismos. Un gran número de vectores, incluyendo plásmidos y vectores fúngicos, se han descrito para la replicación y/o expresión en una variedad de huéspedes eucariotas y procariotas. Los ejemplos no limitantes incluyen plásmidos pKK (Clontech), plásmidos pUC, plásmidos pET (Novagen, Inc., Madison, WI), plásmidos pRSET o pREP (Invitrogen, San Diego, CA), o plásmidos pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA), y muchas células huésped apropiadas, usando procedimientos descritos o citados en este documento o de otra manera conocidos para los expertos en la técnica relevante. Los vectores de clonación recombinantes a menudo incluirán uno o más sistemas de replicación para la clonación o expresión, uno o más marcadores para la selección en el huésped, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión. Los vectores de expresión pueden comprender ácido nucleico viral que incluye, pero no se limita a, virus vaccinia, adenovirus, retrovirus y/o ácido nucleico del virus adeno-asociado. La secuencia de nucleótidos o vector descrito en este documento también pueden estar en un liposoma o un vehículo de suministro que pueden ser recogidos por una célula a través de endocitosis mediada por receptor u otro tipo de endocitosis.

[0082] Los términos "expresar" y "expresión" significa permitir o provocar que la información en un gen o secuencia de ADN se manifieste, por ejemplo produciendo una proteína mediante la activación de las funciones celulares implicadas en la transcripción y traducción de un gen o secuencia de ADN correspondiente. Una secuencia de ADN se expresa en o por una célula para formar un "producto de expresión", tal como una proteína. El propio producto de expresión, por ejemplo la proteína resultante, también puede decirse que es "expresado" por la célula. Un producto de expresión puede caracterizarse como intracelular, extracelular o secretado. El término "intracelular" significa algo que está dentro de una célula. El término "extracelular" significa algo que está fuera de una célula. Una sustancia es "secretada" por una célula si aparece en medida significativa fuera de la célula, desde algún lugar dentro o fuera de la célula.

[0083] Otro objeto descrito en este documento es una célula huésped que contiene un vector descrito en este documento, por ejemplo, mediante transfección, transformación o infección.

[0084] Esta célula huésped se origina a partir de un organismo procariota o eucariota.

[0085] Numerosas herramientas se han desarrollado para la introducción de varios genes y/o vectores heterólogos en las células, especialmente células de mamíferos. Estas técnicas se pueden dividir en dos categorías: la primera categoría implica técnicas físicas, tales como microinyección, electroporación o bombardeo de partículas. La segunda categoría se basa en el uso de técnicas en biología molecular y celular mediante las cuales el gen se transfiere con un vector biológico o sintético que facilita la introducción del material en la célula in vivo. En la actualidad, los vectores más eficientes son los vectores virales, especialmente los vectores adenovirales y retrovirales. Estos virus poseen propiedades naturales para atravesar las membranas plasmáticas, evitar la degradación de su material genético e introducir su genoma en el núcleo de la célula. Estos virus han sido ampliamente estudiados y algunos ya están siendo utilizados de forma experimental en aplicaciones humanas en la vacunación, en inmunoterapia, o para compensar las deficiencias genéticas. Sin embargo, este enfoque viral tiene limitaciones, debido en particular a la capacidad restringida para la clonación en estos genomas virales, el riesgo de propagación de las partículas virales producidas en el organismo y el medio ambiente, el riesgo de mutagénesis por artefacto mediante la inserción en la célula huésped en el caso de los retrovirus, y la posibilidad de inducir una fuerte respuesta inmune inflamatoria in vivo durante el tratamiento, lo que limita el posible número de inyecciones (McCoy et al, 1995, Human gene Therapy 6: 1553-1560; Yang et al, 1996, Inmunidad 1: 433-422). Existen alternativas a estos sistemas de vectores virales. El uso de procedimientos no virales, por ejemplo co-precipitación con fosfato de calcio, el uso de receptores que imitan los sistemas víricos (para un resumen, ver Cotten y Wagner 1993, Current Opinion in Biotechnology, 4: 705-710), o el uso de polímeros, tales como poliamidoaminas (Haensler y Szoka 1993, Bioconjugate Chem., 4: 372-379). Otras técnicas no virales se basan en el uso de liposomas, cuya eficacia para la introducción de macromoléculas biológicas, tales como ADN, ARN, proteínas o sustancias farmacéuticamente activas ha sido ampliamente descrita en la literatura científica. En este área, los equipos han propuesto el uso de lípidos catiónicos que tienen una fuerte afinidad por las membranas celulares y/o ácidos nucleicos. De hecho se ha demostrado que una molécula de ácido nucleico en sí era capaz de cruzar la membrana plasmática de ciertas células in vivo (WO 90/11092), dependiendo la eficacia en particular de la naturaleza polianiónica del ácido nucleico. Desde 1989 (Felgner et al, Nature 337: 387-388) se han propuesto lípidos catiónicos para facilitar la introducción de grandes moléculas aniónicas, que neutralizan las cargas negativas de estas moléculas y favorecen su introducción en las células. Varios equipos han desarrollado lípidos catiónicos de este tipo: DOTMA (Felgner et al, 1987, PNAS 84: 7413-7417), DOGS o Transfectam (TM) (Behr et al, 1989, PNAS 86: 6982-6986), DMRIE y DORIE (Felgner et al, 1993 methods 5: 67-75) DC-CHOL (Gao y Huang 1991, BBRC 179: 280-285), DOTAP (TM) (McLachlan et al, 1995, Gene Therapy 2: 674-622) o Lipofectamine T, y las otras moléculas descritas en las patentes WO9116024, WO9514651, WO9405624. Otros grupos han desarrollado polímeros catiónicos que facilitan la transferencia de macromoléculas, especialmente macromoléculas aniónicas, en las células. La Patente WO 95/24221 describe el uso de polímeros dendríticos, el documento WO96/02655 describe

el uso de polietilenimina o polipropilenimina y los documentos de patente de Estados Unidos. No. 5595897 y FR2719316 describen el uso de conjugados de polilisina.

[0086] El término "célula huésped" significa cualquier célula de cualquier organismo que es seleccionada, modificada, transformada, producida, o utilizada o manipulada de cualquier modo, para la producción de una sustancia por la célula, por ejemplo la expresión por la célula de un gen, una secuencia de ADN o ARN, una proteína o una enzima. Las células huésped se pueden usar además para el cribado u otros ensayos, tal como se describe *infra*.

[0087] El término "sistema de expresión" significa una célula huésped y vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño transportado por el vector e introducido en la célula huésped. Los sistemas de expresión comunes incluyen células huésped de *E. coli* y vectores plásmido, células huésped de insectos y vectores de *baculovirus*, y células huésped de mamíferos y vectores. Las células adecuadas incluyen células de hepatocitos. Lo más preferiblemente, una célula huésped descrita en este documento es una línea celular de hepatoma HuH7, HepG2 o célula HepaRG, los hepatocitos humanos o de primates no humanos en cultivo primario o cualquier línea celular de hepatocitos.

Procedimientos para evaluar un agente terapéutico o una vacuna

[0088] Otro objeto descrito en este documento es un procedimiento para evaluar un agente terapéutico según el cual un modelo animal descrito en este documento se administra con dosis definidas, en una dosis o en dosis repetidas y a intervalos específicos de tiempo, de un agente terapéutico o un proceso o un agente o proceso de diagnóstico, se toman muestras biológicas antes y a intervalos de tiempo definidos después de la administración de dicho agente terapéutico y se llevan a cabo y se comparan mediciones cualitativas y cuantitativas de las proteínas virales de VHB en dichas muestras biológicas.

[0089] Los agentes o procesos terapéuticos pueden afectar a cualquier etapa de la infección: fijación de membrana, fagocitosis, decapsidación, replicación del ADN, maduración de proteínas virales, ensamblaje de viriones. Incluyen análogos de nucleósidos, inhibidores de proteasas virales, inhibidores de la glicosilación, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, y compuestos inmunomoduladores. Los agentes o procesos de diagnóstico incluyen ensayos para la detección de la presencia o cantidades de linfocinas, citocinas, quimiocinas, antígenos, epítopos de antígenos, anticuerpos particulares u otras macromoléculas biológicas asociadas con la infección por VHB.

[0090] Un objeto adicional descrito en este documento se refiere a un procedimiento para evaluar una vacuna de acuerdo con el cual se administra un animal primate de la familia de los cercopitécidos con dosis definidas, en una dosis o en dosis repetidas y a intervalos específicos de tiempo, de una vacuna, dicho animal es infectado artificialmente con una cepa de VHB aislada de un genotipo humano o una cepa de VHB híbrida de dos genotipos humanos, se toman muestras biológicas antes y a intervalos definidos de tiempo después de la infección y llevan a cabo y se comparan mediciones cualitativas y cuantitativas de las proteínas virales de VHB en dichas muestras biológicas.

[0091] Las vacunas incluyen VHB vivo atenuado, VHB inactivado y composiciones de vacuna que comprenden proteínas de subunidades, especialmente proteínas recombinantes, ADN que codifica genes virales, solos o en combinación con compuestos inmunomoduladores.

[0092] Tal como se pretende en el presente documento, el término "terapéutico" significa la capacidad de una sustancia para tratar una reacción patológica a la infección por VHB.

[0093] Tal como se pretende en el presente documento, el término "vacuna" se refiere a la capacidad de una sustancia para prevenir una reacción patológica a la infección por VHB.

[0094] En el contexto de la invención, los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento", significa invertir, aliviar, o inhibir el transcurso de una reacción patológica o uno o más síntomas de la misma.

[0095] En el contexto de la invención, los términos "prevenir" o "prevención", significa el inicio de una reacción patológica o uno o más síntomas de la misma.

[0096] La evaluación de la eficacia de un agente terapéutico y el seguimiento terapéutico *ex vivo* se determinan de la siguiente manera: los agentes terapéuticos a ensayar para la actividad terapéutica y/o para el seguimiento terapéutico se administran por diversas vías, tales como intramuscular, subcutánea u otras vías. Se administran varias dosis. Una o más administraciones pueden llevarse a cabo con diferentes intervalos de tiempo entre cada administración que van desde unos pocos días hasta unos pocos años. Las muestras biológicas se toman a intervalos de tiempo definidos después de la administración del agente terapéutico, preferiblemente de la sangre y del suero. Se llevan a cabo diversos análisis en estas muestras. Justo antes de la primera administración del agente terapéutico, se toman dichas muestras y también se realizan los mismos análisis. El examen clínico y el examen biológico clásicos también se llevan a cabo en paralelo con los análisis complementarios que se describen a continuación, a diferentes tiempos de análisis.

[0097] Se llevan a cabo los siguientes análisis: la medición cualitativa y cuantitativa de las proteínas virales de VHB

en el suero o en la sangre mediante ELISA y/o transferencia Western, usando anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que son capaces de fijarse a al menos una de las proteínas o a uno de sus fragmentos y/o medición de la actividad de dichas proteínas y/o ensayo de anticuerpos específicos para las proteínas de interés o de sus fragmentos en las muestras de sangre o suero mediante ELISA y/o transferencia Western usando una proteína natural aislada y purificada o un fragmento de la proteína natural y/o una proteína sintética o un fragmento de dicha proteína sintética o un polipéptido sintético, y/o ensayo de la respuesta inmune celular inducida contra la proteína o proteínas de interés y cualquier péptido inmunogénico derivado de estas proteínas, como se describe anteriormente, y/o la detección de fragmentos de ADN y/o ARN que codifican la proteína o proteínas de interés o un fragmento de dichas proteínas de interés por hibridación de nucleótidos mediante técnicas que son familiares para una persona experta en la técnica (transferencia Southern, transferencia Northern, ELOSA "Enzyme-Linked Oligosorbent Assay" (Katz JB et al., Am. J. Vet. Res., 1993 Dec; 54 (12): 2021-6 y François Mallet et al, Journal of Clinical Microbiology, junio de 1993, p. 1444-1449)) y/o mediante la amplificación ADN y/o ARN, por ejemplo por PCR, RT-PCR, utilizando fragmentos de ácido nucleico que codifican la proteína o proteínas de interés, y/o mediante biopsia de tejidos, preferiblemente del hígado, y la observación de los marcadores de la infección por VHB. Se puede realizar por ejemplo mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia para la detección HBVAg en el hígado, o mediante hibridación in situ o mediante PCR para la detección de ADN del VHB en las secciones de hígado.

[0098] La invención se ilustrará adicionalmente en vista de las siguientes figuras y ejemplos.

FIGURAS

[0099]

Figura 1: Mapa de transcripción y traducción de VHB. La figura muestra el mapa físico del genoma de VHB. El círculo interno representa el rcADN con la transcriptasa inversa unida al extremo 5' del ADN completo de cadena negativa (esfera sólida) y un oligómero de ARN bloqueado unido al extremo 5' del ADN incompleto de cadena positiva (media esfera sólida). Las posiciones de las repeticiones directas, DR1 y DR2, así como las posiciones de los dos potenciadores, EN1 y EN2, están indicadas. El círculo exterior representa los tres principales ARN virales, el núcleo (C) o pgARN, los pre-S (L) de ARNm, y el ARNm S. Los extremos 3' comunes de los tres mARN se indican por las letras A. No se muestra en la figura el posible ARNm X que abarca la región codificante de X y termina en el sitio indicado para los otros tres mARN. Las cuatro regiones de codificación de proteínas se muestran entre los círculos interno y externo. Incluyen el prenúcleo (PC) y genes de núcleo, el gen de la polimerasa, y el gen X. Los genes de la envoltura pre-S1 (L), pre-S2 (M), y la superficie (S) solapan con el marco de lectura abierto de la polimerasa.

Figura 2: Estrategia de aislamiento de VHB de macaco cynomolgus.

Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa de genoma de VHB amplificado por PCR (Günther et al, 1995) e hibridación de transferencia Southern.

Figura 4: secuencia del gen X de VHB de macaco cynomolgus en el árbol filogenético del gen X de VHB en humanos y primates no humanos.

Figura 5: marcaje IHC de HBsAg (A) o marcaje IF de HBsAg en las secciones de C. cephus (B) y M. cynomolgus (C) con anticuerpos anti-HBs (Dako, F) (Ampliación: X20). Las flechas amarillas indican los hepatocitos marcados.

Figura 6: análisis de Southern de los productos PCR de VHB obtenidos a partir de fracciones de gradiente de sacarosa del 22,5%, 42,5% y 48%.

Figura 7: Observación por microscopía electrónica de partículas "virales" en la fracción de gradiente de sacarosa del 42,5% positivo para ADN del VHB y PCR.

Figura 8: Seguimiento de marcadores de infección en macacos sylvanus BL12, BL13, BL14.

Figura 9: análisis de transferencia Southern de productos de PCR (145 pb y 118 pb) en los genes S y C de VHB.

Figura 10: marcaje IF de HBcAg en secciones de hígado de M. sylvanus (BL14). Las flechas muestran células positivas para HBcAg (X20).

Figura 11: análisis de transferencia Southern de los productos PCR del VHB en el gen S (118 pb). Seguimiento desde el día 1 al 10 después de la infección.

Figura 12: detección de HBsAg en los hepatocitos infectados con sobrenadante en cultivo primario de M cynomolgus. Valor de corte de la prueba fue 1.

Figura 13: Seguimiento de marcadores de infección AgHB y transaminasas en macacos sylvanus BL01, BL3, BL04 después de la inoculación con un conjunto de sueros humanos altamente virémicos (10^9 copias/ml).

Figura 14: Seguimiento de marcadores de infección AgHB y transaminasas en macacos sylvanus BL12, BL13, BL14 después de la inoculación con un conjunto de sueros de macacos Cynomolgus hallados infectados de forma natural por VHB (10^3 copias/ml).

Ejemplos

MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS

Animales

[0100] Macacos. Las muestras de suero e hígado de 50 macacos cynomolgus provenían de una gran instalación de cría en Isla Mauricio. Las muestras de suero e hígado se obtuvieron de veinte M sylvanus capturados en la naturaleza (montañas del Atlas Medio), se pusieron en cuarentena y se mantuvieron en el Instituto Pasteur de Casablanca

(Marruecos). Todos los animales fueron negativos para los marcadores serológicos de infección con virus de hepatitis A, C, HTLV I y HTLV II.

[0101] *Cercopithecus cephus*. Una muestra de hígado de un *C. cephus* que murió en un zoológico francés de hepatitis severa se congeló en la necropsia y se mantuvo a -80°C para su posterior estudio. Ningún otro órgano, excepto el hígado, mostró ninguna lesión.

Serología

[0102] Se usó MONLISA AgHBs Plus (BIORAD, Marne La Coquette, Francia) para la detección de HBsAg. También se usó VIDAS II HBs Ag Ultra para detectar HBs, así como ORTHO HBsAg Elisa Test system 3 (Ortho-Clinical Diagnostics, Levallois Perret, F), VIDAS HBCT II para anti-HBc, VIDAS HBST para anti-HBs, VIDAS HBeAg para la detección de HBeAg (bioMérieux, Lyon, F).

Detección de ADN de VHB mediante reacción en cadena de la polimerasa e hibridación de transferencia de Southern

[0103] Se extrajeron ácidos nucleicos de 140 µl de suero o de 10 mg de tejido hepático con kit de extracción QiaAmp respectivamente (Qiagen, Courtaboeuf, F) y kit de purificación de ADN y ARN completo puro máster (Epicentre, Le Perray, F). También se realizó extracción con fenol cloroformo mediante un procedimiento descrito en detalle en otro lugar (Jilbert et al., 1992).

[0104] Los cebadores para la amplificación por PCR fueron seleccionados de secuencias que solapan el núcleo y el gen de superficie, que están altamente conservadas entre todos los genotipos de VHB humanos (Gheit et al., 2002). Una región de 118 pb en el gen de superficie se amplificó (sentido: 5'-GGA GTG GGC CTC AGC CCG TTT CTC-3'; inverso: 5'-GCC CCC AAT ACC ACA TCA TCC ATA-3'). Una región de 145 pb en el gen de núcleo también se amplificó (sentido: 5'-TCG GAG TGT GGA TTC GCA CTC CTC-3'; inverso: 5' GAT-TGA GAC CTT CCT CCT CTG CGA GGA-3').

[0105] La especificidad de las bandas amplificadas se confirmó por hibridación de transferencia Southern utilizando una sonda de ADN de VHB cebada al azar marcada con ³²P. Las condiciones de hibridación fueron de formamida al 50%/SDS al 7%/fosfato de sodio 0,25 M, pH 7,2/NaCl 0,25 M/EDTA 1 mM a 42°C 20 minutos dos veces, seguido de lavados en 2X-0,5X SSC-0,1% de SDS a 65°C 10 minutos.

Aislamiento de ADN del VHB y la cuantificación de la carga viral mediante PCR en tiempo real

[0106] Se extrajo ADN de VHB de 100 µl de sobrenadante utilizando el kit de ácidos nucleicos virales de alta pureza de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche, Grenoble, Francia). El análisis cuantitativo de la carga viral se realizó mediante PCR en tiempo real (LightCycler, Roche, Grenoble, Francia). Los cebadores se diseñaron con el software Oligo5 (MedProbe, Oslo, Noruega) a secuencias de ácido nucleico diana dentro del gen C que se conservan entre todos los genotipos de VHB (A-G) conocidos.

[0107] Para cuantificar el ADN del VHB en el suero de pacientes con VHC con VHB oculto, se realizó un ensayo de PCR a tiempo real (Roche Diagnostic Corporation, Mannheim, Alemania) utilizando cebadores (CASB y CSB) que reconocen sitios altamente conservados en la región del gen C de VHB. El umbral de sensibilidad de este ensayo (10 copias virales/ml) se evaluó de acuerdo con los estándares y se expresó en copias genómicas/ml. Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando un volumen total de 20 µl incluyendo 10 µl de molde de ADN, 2 µl de mezcla de hibridación master de ADN Light Cycler (Taq ADN polimerasa, tampón de reacción, mezcla de dNTP y 10 mM de MgCl₂), 3,2 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,3 µl cada uno de los cebadores 20 µM. Las muestras se cargaron en capilares desechables, se centrifugaron, y se colocaron en el Light Cycler con el siguiente programa:

1) desnaturalización del ADN y activación de la polimerasa FastStart: 95°C durante 10 min. pendiente 20°C/s. 2) 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, hibridación a 58°C durante 5 segundos, y extensión a 72°C durante 15 segundos. La velocidad de transición de temperatura programada fue de 20°C/segundo. El seguimiento por PCR a tiempo real se consiguió mediante la medición de la fluorescencia al final de cada ciclo. 3) Curva de fusión: se generó un solo ciclo de fusión mediante el mantenimiento de la reacción a 95°C durante 0 segundos, a continuación a 65°C durante 15 segundos, seguido de calentamiento lento a una velocidad de transición de 0,1°C/s a 95°C. 4) Refrigeración: 40°C durante 30 segundos con una pendiente de 20°C/segundo.

[0108] El seguimiento de la fluorescencia se produjo a intervalos regulares durante la fase de hibridación y de forma continua durante toda la fase de fusión.

[0109] Para cada desarrollo, se generó una curva estándar en un rango de 5-log (de 10 a 50.000 copias/ml) mediante diluciones en serie del estándar biológico de ADN del VHB en el kit de ADN del VHB Versant (Bayer diagnostics, Puteaux, F). La curva de fusión y el análisis cuantitativo se llevaron a cabo mediante el uso de software de análisis Light Cycler 3.5 siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics, Meylan, Francia).

Amplificación por círculo rodante

[0110] El molde de ADN circular se desnaturalizó para convertirse en una sola cadena. Después de que los cebadores protegidos de exonucleasa se unan al ADN en múltiples sitios, se extienden mediante el ADN polimerasa *Phi29*. A continuación, la actividad de desplazamiento de la cadena de ADN polimerasa *Phi29* hace que la cadena naciente se desplace cuando *Phi29* alcanza un cebador extendido en dirección 3'. El alargamiento continuado y el desplazamiento de cadena dan lugar a la ramificación y la exposición de nuevos sitios de unión para los cebadores. Una cascada de sucesos de iniciación da lugar a la amplificación exponencial y genera copias del ADN molde de doble cadena, de alto peso molecular, repetidas en tándem.

[0111] Las cantidades apropiadas de ADN se mezclaron con 9 cebadores modificados con fosforotioato (Tabla 1) a una concentración de 10 μ M cada uno y 1X tampón *Phi29* (New England Biolabs, St Quentin en Yvelines, F) en un volumen final de 10 μ l. La mezcla de ADN se desnaturalizó a 95°C durante 3 minutos. A continuación, se enfrió a temperatura ambiente haciendo algunos pasos intermedios, a saber: 50°C durante 15 segundos, 30°C durante 15 segundos y 20°C durante 10 minutos. Para terminar, el producto desnaturalizado se colocó en hielo antes de proceder con la reacción de RCA.

[0112] Las mezclas de muestras se combinaron con 10 μ l de mezcla de reacción que contenía: 1x tampón de *Phi29*, los 9 cebadores modificados con fosforotioato a una concentración de 10 μ M cada uno, 0,4 mg/ml de BSA, 2 mM de dNTPs y 1 U/ μ l de ADN polimerasa *Phi29* (New England Biolabs, St Quentin en Yvelines, Francia). Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C durante 18 horas y se terminaron a 65°C durante 10 minutos para inactivar la ADN polimerasa *Phi29*. Los productos RCA son multímeros de VHB que puede ser digeridos por la enzima de restricción *SpeI*. Este sitio de restricción siendo único dentro del genoma de VHB, se pueden obtener productos de 3200 bp correspondientes a un genoma completo de VHB.

Secuencias y posiciones de los cebadores usados para la RCA.

Nombre	Secuencia (15 nt)	Posición en el genoma de VHB
RCA1	5'-AATCCTCACAATA*C*C-3'	226-240
RCA2	5'-GATGGGATGGGAA*T*A-3'	615-601
RCA3	5'-CCTATGGGAGTGG*G*C-3'	637-652
RCA4	5'-GCAACGGGGTAAA*G*G-3'	1154-1140
RCA5	5'-ATGCAACTTTTTTC*A*C-3'	1814-1829
RCA6	5'-TCCAAATTCTTTA*T*A-3'	1916-1930
RCA7	5'-TAGAAGAAGAAGT*C*C-3'	2374-2389
RCA8	5'-AGAATATGGTGAC*C*C-3'	2820-2834
RCA9	5'-TAAGAGACAGTCA*T*C-3'	3188-3202

Amplificación por PCR del genoma completo de VHB

[0113] Se amplificó el genoma de VHB de longitud completa mediante el uso de un procedimiento de PCR de una sola etapa utilizando cebadores P1 P2 *nar* (5'-CCG GAA AGC TTA TGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCC TAA TCA), P2 *nar* (5'-CCG GAG AGC TCG AGC TCT TCA AAA AGT TGG CAT GGT GCT GG-3') en las condiciones descritas por Gunther et al (1995) y el sistema de PCR de alta fidelidad FastStart (Roche Diagnostics, Meylan, Francia). Los productos de amplificación se desarrollaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio.

Análisis de los productos de PCR y los productos RCA mediante transferencia Southern

[0114] De cinco a diez microlitros de los productos de PCR o 2 μ l de productos de RCA se sometieron a electroforesis y transferencia Southern usando una sonda de oligonucleótido de gen S específico marcado con 32 P-dCTP por la desoxinucleótido transferasa terminal (Roche Diagnostics, Boehringer Mannheim, Meylan, F).

Inmunofluorescencia o IHC en secciones de hígado para el antígeno de superficie y el antígeno del núcleo de VHB

[0115] Secciones de tejido de hígado congelado de 5 micrómetros de espesor se fijaron en acetona durante 10 minutos a -20°C, se bloquearon durante 10 min con PBS-BSA al 3%, y se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente con anticuerpos policlonales de antisuero de conejo producidos contra el antígeno del núcleo de VHB (dilución 1/2) (Serotec, Cergy St Christophe, Francia) o con anticuerpos monoclonales de ratón producidos contra antígeno de superficie de la hepatitis Be (dilución 1/40) (Dako, Trappes, F). Después de esta incubación, los cubreobjetos de vidrio se lavaron en PBS y se marcaron con anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo de cabra conjugado con fluoresceína (1/100) (BIORAD, Marne La Coquette, Francia). Los cubreobjetos de vidrio se tiñeron con azul de Evans, se montaron y finalmente se examinaron con un microscopio confocal Leica DM RXE. Para los tejidos del hígado embebidos en parafina, las secciones de hígado se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en etanol graduado.

Las actividades de la peroxidasa endógena se bloquearon con peróxido de hidrógeno al 0,3% en metanol durante 30 minutos a temperatura ambiente antes del marcaje.

Observación por microscopía electrónica

[0116] Tres mililitros de ADN positivo de VHB y HBsAg de suero de macaco cynomolgus se centrifugaron durante 4 horas a 40.000 rpm, 4°C. Los sedimentos se suspendieron en 500 µl de TNE (Tris pH 7,5 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) y después se diluyeron en 20 ml de TNE. Una segunda centrifugación se realizó a 40.000 rpm durante la noche a 4°C. Los sedimentos que contienen las partículas virales se resuspendieron en 300 µl de TNE y se conservaron a -80°C.

[0117] El producto de purificación se cargó en un gradiente de sacarosa del 10% al 60% y se centrifugó a 100.000 g durante 16 h. Se recogieron veinte fracciones de 0,6 ml y se ensayaron mediante PCR para el ADN de VHB con cebadores situados en el gen S y C de VHB. Las fracciones positivas se cargaron en rejillas revestidas de carbono y se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 4%, pH 7,2 antes del examen por microscopía electrónica (Jeol 100 CX).

Preparación de hepatocitos de macaco cynomolgus

[0118] Los hepatocitos fueron aislados de *M. cynomolgus* después de la anestesia y los hígados fueron extraídos quirúrgicamente. Las células se aislaron mediante un procedimiento de perfusión de colagenasa en dos etapas (Gibco, Cergy-Pontoise, Francia) tal como se ha descrito previamente (Guguen-Guillouzo, 1992). Los hepatocitos recién aislados se sembraron en placas de seis pocillos a una densidad de $1,8 \times 10^6$ células viables/cm². Esta alta densidad es esencial para obtener una supervivencia a largo plazo de hepatocitos primarios (Rumin et al., 1996). La adhesión se realizó durante la noche en un medio de Williams complementado con glutamina (Biomedica, Boussens, F) complementado con 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco, Cergy Pontoise, F), 5 mg/l de insulina bovina (Sigma), bicarbonato de sodio al 0,35% y suero de ternera fetal inactivado con calor al 10% (FCS) (Gibco Cergy-Pontoise, F). El día siguiente, el medio se sustituyó por E de William suplementado tal como se describe anteriormente, más dimetilsulfóxido al 2% (DMSO; Sigma, St Quentin, F), y hemisuccinato de hidrocortisona 5×10^{-5} M (Upjohn, SERB, París, F). Se infectaron las células 1 día después de la siembra de la siguiente manera. Los cultivos se incubaron durante 20 horas a 37°C en presencia de 100 µl del inóculo y 900 µl de medio fresco por pocillo. Las células de control no infectadas se incubaron en medio fresco más 2% de suero humano normal. Se recogió el sobrenadante de cada cultivo en el día 1 y las células se lavaron cinco veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y a continuación se mantuvieron en medio de William complementado como antes. Los sobrenadantes de cada cultivo se recogieron a continuación en los días 3, 5, 7, 10 y 12, y se analizaron para HBsAg usando Monolisa HBsAg Plus (BIORAD, Marne la Coquette, Francia) y para el ADN de VHB por PCR.

"Pase" *in vitro*

[0119] Un fragmento de hígado de un macaco cynomolgus, positivo de HBsAg y ADN de VHB, se enjuagó en PBS antes de la inoculación y se mezcló usando un homogeneizador Ultra-Turrax T25 (Karayannis et al, 1989). El homogenizado se clarificó por centrifugación a 4°C a 6000 rpm durante 30 min. Los hepatocitos primarios de *M. cynomolgus* fueron infectados con 100 µl de extracto de hígado en PBS (20%, p/v).

"Pase" *in vivo*

[0120] Se utilizaron dos grupos de *M. sylvanus* en este experimento (montañas del atlas, Marruecos). Con el fin de estudiar si el VHB detectado en *M. cynomolgus* era infeccioso a otros macacos, se utilizó 3 *M. sylvanus* que recibieron un grupo de suero de *M. cynomolgus* que contenía 10^3 partículas/ml. En paralelo, se monitorizaron los mismos parámetros virales y biológicos en un grupo control de 3 *M. sylvanus* que no recibieron ningún tratamiento. Los experimentos *in vivo* se realizaron bajo anestesia general utilizando Imalgene (Merial, Lyon, Francia) que contenía ketamina (1 mg/kg).

Seguimiento de los animales infectados

[0121] El seguimiento de la infección se realizó mediante análisis de sangre semanal de *M. sylvanus* (5 a 10 ml). Las transaminasas fueron controladas, así como HBsAg y el ADN de VHB mediante cuantificación con Amplicor/monitor (Roche, Meylan, F) y PCR cualitativo en el gen S y C de VHB.

Secuenciación

[0122] Los productos de PCR se secuenciaron mediante Genome Express (Meylan, F) usando secuenciación automática Biosystem 373 A. Los análisis de secuencias se realizaron utilizando Mac Vector 6.5.1 y la alineación se realizó usando el programa "BLAST" en el Genbank.

Clonación

[0123] Los productos de PCR (genomas subgenómicos o completos de VHB) se purificaron usando "kit de purificación Qiaquick PCR" (Qiagen, Courtaboeuf, Francia). En todos los casos, se ligaron 25 ng de ADN plásmido con el inserto en una relación en exceso de 1 a 3 en comparación con el vector con ADN ligasa de T4 en un tampón de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, BSA al 3% que contenía DTT 1 mM, ATP 0,1 mM. La ligación se realizó durante 16 horas a 16°C.

Transformación

[0124] El plásmido que contenía el producto de PCR se introdujo en bacterias quimiocompetentes con inserto pCAP Le plasmide (de Escherichia coli M15) siguiendo las instrucciones del kit (Promega, Lyon, Francia). La extracción del plásmido se realizó siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Transfección de amplicón en células Huh7

[0125] El genoma completo de VHB generado por PCR se purificó usando "kit de purificación Qiaquick PCR" (Qiagen, Courtaboeuf, F) y se digirió durante 20 horas con NarI (Promega, Lyon, Francia). Por lo tanto, el ADN se diluyó a una concentración final de 0,25 µg/µl. Las células Huh7 se cultivaron en un matraz de 25 cm² que contenía 1300000 células por matraz. La transfección se realizó utilizando Fugen siguiendo el protocolo de Roche Applied (Meylan, Francia) 24 horas después del comienzo del cultivo. Las células HuH7 se recogieron y se mantuvieron en un medio que contenía 500 ml de DMEM/HamF12, 50 ml de SVF, 10 ml de glutamina (200 mM), 5 ml de HEPES (1M), 2,5 ml de penicilina/estreptomina y 2,5 ml de piruvato sódico. Después de 60 horas, las células se tripsinaron y se resuspendieron en medio de cultivo de cultivo concentrado dos veces con ADNasa I y se incubaron durante 45 minutos a 37°C. Después de la granulación, las células se resuspendieron en medio de cultivo y se distribuyeron en 96 pocillos recubiertos de colágeno. Por lo tanto, los cultivos de células se trataron durante 4 días con varios medicamentos antivirales (lamivudina y adefovir). Cuatro días después de haber lavado las células de tratamiento con PS y se añadieron 50 µl de tampón de extracción (Tris 25 mM, CaCl₂ 0,5 mM, MgCl₂ 2,5 mM, pH 8, 0,4 mg/ml de ADNasa, 0,4 mg/ml de ARNasa, NP40 al 1%). Las células se incubaron durante 1 hora a 37°C bajo agitación, a continuación se añadieron 15 µl de NaOH 0,4 M y la incubación duró 1 hora adicional a 37°C. La alcalinización se detuvo con 15 µl de tris 1 M (pH 7). 5 µl de ADN extraído se utilizó para la cuantificación de ADN de VHB mediante PCR en tiempo real.

RESULTADOS

Aislamiento VHB en macacos cynomolgus (Figura 2)

[0126] Se incluyeron muestras biológicas de un total de 50 macacos cynomolgus en el estudio (hígado y suero). La PCR subgenómica (ver Tablas 2 y 3 para secuencias de los cebadores) y la detección de HBsAg usando la prueba de Ortho Diagnostic permitieron identificar marcadores del VHB entre el 42% (21/50) de los animales probados. La PCR cuantitativa por Amplicor/monitor (Roche) y la PCR Light Cycler indicaron las cargas virales del VHB entre macacos que iban de 10² a 10⁴ copias de ADN de VHB por ml de suero. La PCR Light Cycler para la detección de ADN del VHB de 10 ng de ADN total extraído de hígado dio una estimación de 0,2 a 10² copias de VHB por hepatocito.

Tabla 2: cebadores directos

Secuencias 5'-3'	posición genómica
L1: 5' - TCC TGC TGG TGG GCT CCA GTT CA - 3'	55-76
Pol1 : 5' - CCT GCT GGT GGC TCC AGT TC - 3'	58-77
Pol4: 5' - CTC ACA ATA CCG CAG AGT CTA GAC T - 3'	230-254
Pol3: 5' - CAA GGT ATG TTG CCC GTTT GTC	455-476
L2: 5' - CCT GTA TTC CCA TCC CAT C - 3'	597-615
Fw S: 5' - GGA GTG GGC CTC AGC CCG TTT CTC -3'	645-668
E1: 5' - TAA AAC AAT GCA TGA ACC TTT ACC CCG TTG C - 3'	1134-1154
Por5: 5' - CAA GTG TTT GCT GAC GCA - 3'	1178-1197
R5: 5' - AAG TGT TTG CTG ACG CAA CC - 3'	1179-1200
P197: 5' - CCA TAC TGC GGA ACT CCT - 3'	1268-1287
B1: 5' - GGC AGC ACA SCC TAG CAG CCA TGG - 3'	1372-1386
C1: 5' - ACM TCS TTT CCA TGG CTG CTA GG - 3'	1363-1386
68: 5' - CAT AAG AGG ACT CTT GGA TC - 3'	1653-1672
A3: 5' - TGC GCA CCG CGG CCG AAC TTT TTC ACT CTG CC - 3'	1817-1843
P1: 5'-TTTT TTC ACC TCT GCCTAATCAT- 3'	1821-1841
P1: 5' - CCC GAA AGC TTA TGC TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CAT C - 3'	1824-1843
C2: 5' - CCT TCC GTC AGA GAT CTC C - 3'	1973-1992
Fw C: 5' - TCG GAG TGT GGA TTC GCA CTC CTC - 3'	2267-2290
TP2: 5' - ACC ACC AAA TGC CCC TAT CTT A - 3'	2299-2320
C3: 5'-CCT ATC TTA TCA ACA CTT CC - 3'	2314-2333

PS1: 5' - GGG TCA CCA TAT TCTT GGG AA - 3'	2830-2850
PS4: 5'-GGA ACA AGA GCT ACA GCA TG - 3'	2833-2852
TPR 1: 5'-TCG GGA AAG AAT CCC AGA GGA TTG G - 3'	2909-2923
Fw TPR 2: 5' - TGG GGT GGA GCC CTC AGG C - 3'	3077-3095

Tabla 3: cebadores inversos

Secuencias 5'-3'	posición genómica
R3: 5' - GGC TCA GTT TAC TAG TGC CAT TTG T - 3'	693-669
Rev S: 5' - GCC CCC AAT ACC ACA TCA TCC ATA - 3'	763-739
Por4: 5' - TAC CCA AAG ACA AAA GAA AAT TGG - 3'	828-805
RV5: 5' - AAG TGT TTG CTG ACG CAA CC - 3'	1197-1178
P198: 5' - TTT TGC TCG CAG CCG GTC TG - 3'	1295-1394
P2: 5' - CCG GAG AGC TCA TGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG GTG - 3'	1823-1803
P201: 5' - ATT AGG CAG AGG TGA AAA AG - 3'	1841-1822
P'2: 5'-ATG ATT AGG CAG AGG TGA AAA A - 3'	1842-1821
67: 5' - GTG GAG TTA CTC TCG TTT TTG CC - 3'	1959-1937
D2: 5' - CTA AGG GTC GAC GAT ACA GAG GTC AGG CG - 3'	2016-2000
C6: 5'- AAG AAC TCC CTC GCC TCG - 3'	2397-2380
Rev C: 5' - GAT GAC TGA CTT CCT CCT CTG CGA GGA - 3'	2412-2388
C7: 5' - GGG GCT TTA TTC CTC TAC AGT ACC T - 3'	2516-2492
Ps5: 5'-GGT TGA AGT CCC AAT CTG GAT - 3'	2992-2972
Rev TPR 2: 5 'GCC TGA GGG CTC CAC CCC A - 3'	3095-3077

- 5 [0127] Para obtener la secuencia completa de VHB circulante en macacos cynomolgus se realizó la amplificación del VHB completo usando el procedimiento descrito por Günther (1995) utilizando los cebadores P1 *nar* y P2 *nar* en extractos de ADN de hígado de los animales de 4 animales (38, 40, BL13 y BL14).

- 10 [0128] BL13 y BL14 fueron macacos sylvanus infectados con el VHB de macacos cynomolgus. Hemos sido capaces de amplificar amplicones de 3200 pb, que se hibridan con una sonda de ADN del VHB después de transferencia de Southern (Figura 3). La secuenciación se realizó directamente sobre el amplicón sin clonación.

Análisis de secuencias

- 15 [0129] La secuencia del VHB amplificado a partir de tejido hepático de 38 macacos cynomolgus analizada por BLAST permitió establecer que esta secuencia está próxima al genotipo D de VHB. La longitud total es de 3182 pb. Se observó una delección de 33 pb de la región preS1 del nucleótido 1905 y 1938. Esta delección se observa entre todos los genomas de VHB no humanos, pero también en el genotipo D de VHB.

- 20 [0130] Las sustituciones de nucleótidos observadas no modifican los marcos de lectura abierta de VHB.

- 25 [0131] El análisis en el Genbank mostró que el VHB aislado de M. cynomolgus está muy próximo a una secuencia de VHB de genotipo D que circula entre IVDU Europea (U 95551/gi 2182117) (Figura 4). Se observaron sustituciones menores en comparación con la secuencia ya descrita. La arginina en la posición 122 y la lisina en la posición 160 clasificaron este genoma de VHB como subtipo ayw3. El análisis filogenético de las secuencias del gen S confirmó la clasificación de la proteína S entre el genotipo D. El marco de lectura abierto de la polimerasa viral abarca todo el gen S, parte del gen X y el extremo terminal C del gen de núcleo (48aa). La proteína codificada de la polimerasa viral es idéntica al genotipo D de VHB/ayw3. Se identificaron una sustitución de una guanina a adenina en la posición 1479 (dentro de la proteína X) y una sustitución de prolina a serina en la posición 67 (dentro de la proteína preS1). La sustitución G1479A no conduce a ninguna pérdida de función o expresión de la proteína X. Se aisló la misma secuencia de VHB con 100% de homología de BL14, un macaco sylvanus inoculado con un grupo de suero de M cynomolgus, positivo de VHB de Isla Mauricio.

- 35 [0132] Los genomas completos de VHB o amplicones subgenómicos se han clonado y se han analizado un número de secuencias para confirmar los resultados obtenidos. Se produjeron las secuencias recién generados que cubren 3/4 del genoma de VHB y coincidió con la secuencia obtenida directamente.

Cuantificación del VHB en ambos modelos

- 40 [0133] Para macacos cynomolgus para los cuales el suero estaba disponible la prueba de Monitor amplicor (Roche) permitió estimar la carga viral en un rango entre 10^2 a 10^4 copias/ml.

- 45 [0134] La PCR Light cycler realizada en extractos de hígado permitió estimar el número de copias de VHB en el Cercopithecus cephus sobre 1000 por mg de hígado, que es mil veces mayor en comparación con el macaco cynomolgus. En el modelo Cercopithecus se pudo detectar CCCDNA por PCR (Werle et al, 2002). La transferencia

de puntos realizada en extractos de hígado de ambas especies fue lo suficientemente sensible para estimar la cantidad de ADN de VHB presente en los animales infectados.

Expresión de proteínas de VHB en el hígado de *C. cephus* y *M. cynomolgus*

[0135] El estudio histológico después de la tinción con Hematoxilina/eosina mostró lesiones de hepatitis severa en el *C. cephus*, mientras que ninguno de los macacos infectados crónicamente mostró lesiones hepáticas. La tinción por IF o IHC reveló una fuerte expresión de HBsAg en aproximadamente el 30% de los hepatocitos (Figura 5). HBcAg también fue detectado en el 10% de los hepatocitos.

Infectividad del VHB aislado en *M. cynomolgus*

Infección *in vivo* de macaco *sylvanus* por un grupo de macacos *cynomolgus*, positivo en ADN del VHB, positivo en HBsAg

[0136] Se purificaron partículas víricas de VHB por ultracentrifugación (10X concentración) de suero macaco *cynomolgus* (HBsAg y ADN del VHB positivos). El material concentrado se cargó después en un gradiente de sacarosa del 10% al 60% y se centrifugó. Se recogieron veinte fracciones de 0,6 ml y se ensayaron a continuación por PCR en los genes S y C de VHB. Las fracciones 12 y 14 que corresponden respectivamente al 42,5% y 48% de sacarosa fueron positivas en PCR (Figura 6).

[0137] Se observaron fracciones positivas mediante microscopía electrónica (Figura 7). En las fracciones 12 y 14 se pudieron observar partículas cuya forma y tamaño pueden corresponder a partículas de Dane (Figura 7). En la fracción 4 (22,5% de sacarosa) se pudieron observar esferas que pueden corresponder a las esferas de 20 nm descritas durante infecciones por VHB.

Infección de macaco *sylvanus* por partículas de VHB de *M. cynomolgus*.

[0138] La infección por VHB productiva se obtuvo en macaco *sylvanus* después de la infección con un grupo de macacos *cynomolgus*, como se controla mediante marcadores de la infección por VHB (Figuras 8 y 9). Se detectaron secuencias virales después de la infección durante al menos 9 semanas en 3/3 animales infectados. El inóculo de 1 ml contenía una concentración de 10^3 copias por ml, 9 semanas después de la infección, se pudo estimar, por ejemplo, para el animal BL14, que la carga viral era de 10^4 copias por ml. Se midió un pico de transaminasas (aproximadamente 250 U/L) en la novena semana después de la infección en BL12 *M. sylvanus* y en la tercera semana en BL13 y 14 de *M. sylvanus*. El examen histológico en la necropsia (32 semanas) mostró lesiones similares a las observadas después de la hepatitis aguda en humanos (infiltrado de linfocitos, hepatocitos aclarados, modificación de la estructura de parénquima). No se observó ninguna modificación en los animales no infectados.

[0139] La detección de HBsAg que aparece en la cuarta a la novena semana después de la infección sugieren una replicación del VHB activo después de infección. HBsAg y HcAg se detectaron por inmunofluorescencia tal como se ilustra en la Figura 10.

Infección *in vitro* de un cultivo primario de hepatocitos de *M. cynomolgus* con el VHB aislado de macaco *cynomolgus* procedente del mismo aislado.

[0140] Con el fin de estudiar la propiedad infecciosa del virus de VHB aislado, se incubaron hepatocitos primarios de *M. cynomolgus* en cultivo con extracto de hígado de un *M. cynomolgus* con VHB positivo. Se detectaron secuencias virales de VHB en el sobrenadante celular después de la infección e intracelularmente (Figura 11).

[0141] También se controló HBsAg en el sobrenadante de los hepatocitos primarios infectados después de la infección tal como se ilustra (Figura 12). Se realizó un segundo pase en cultivo primario de hepatocitos de *M. cynomolgus* con éxito utilizando el sobrenadante positivo en ADN del VHB, HBsAg de las células infectadas.

Establecimiento de un modelo de macaco de la infección por VHB

[0142] Son posibles dos enfoques diferentes para el desarrollo de un modelo de macaco de la infección por VHB.

[0143] Un primer enfoque se basa en la producción *in vitro* de partículas infecciosas. Se utilizan aislados de Cercopithecidae con VHB descritos anteriormente, con un diseño de partícula como una unidad de genoma 1,1 en un plásmido o un baculovirus, en paralelo con una cepa de VHB humano (genotipo D). Estas construcciones son evaluadas por su capacidad de replicación e infectividad en líneas celulares de hepatoma susceptibles (por ejemplo HepaRG) y en hepatocitos de macaco (por ejemplo, hepatocitos de macaco primarios). Las construcciones que mostraron ser infecciosas se inyectan a macacos por inyección intravenosa en serie de las partículas de VHB producidas *in vitro*, infectando de este modo los macacos.

[0144] Un segundo enfoque se basa en el uso de partículas de infección para la transfección intrahepática, obteniendo

de este modo VHB simio infeccioso para la infección de macaco de novo.

[0145] En ambos enfoques, se monitoriza la aparición de marcadores de VHB para la infección. Se lleva a cabo durante dos meses el seguimiento de los macacos transfectados intrahepáticos con los clones de aislados de VHB simio, así como con el VHB humano. Las muestras de suero se analizan una vez a la semana con el fin de detectar antígenos HBs y HBe por ELISA y con el fin de determinar la carga viral por PCR cuantitativa. Las biopsias también se llevan a cabo con el fin de identificar intermedios replicativos virales, antígenos virales y lesiones hepáticas. Las muestras de suero en el pico de viremia se utilizan para infectar macacos, que se estudian en una manera similar. Los animales transfectados e infectados también se analizan por los marcadores serológicos de infección después de seis meses, y se lleva a cabo un examen histopatológico del hígado.

Seguimiento de la infección por VHB de macacos *Sylvanus* después de la inoculación del grupo de partículas de VHB de macacos *cynomolgus* o un grupo de partículas de VHB de los seres humanos

[0146] Se inocularon por vía intravenosa un grupo de 3 macacos *sylvanus* (BL 01, 03, 04) con un grupo de sueros humanos altamente virémicos (10^9 copias/ml) y la infección se monitorizó mediante la medición de los títulos de AgHBs y transaminasas. Los virus de VHB del grupo son VHB de genotipo D y la secuenciación de la secuencia de VHB demuestra que el nucleótido en la posición 1479 es una guanina.

[0147] Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 13.

[0148] Esta figura ilustra para cada uno de macacos *Sylvanus* BL 01, BL 03 y BL 04 el cambio en los títulos de AgHBs (panel izquierdo) y los títulos de las transaminasas (panel derecho) durante los días siguientes a la inoculación de VHB.

[0149] Esta figura muestra un pico de AgHBs justo después de la inoculación de partículas de VHB seguido por una disminución continua de títulos de AgHBs hasta que AgHBs ya no puede ser detectado después de aproximadamente 3 semanas después de la infección. Se observó un pico de transaminasas (llegando a 292 U/L) en los 3 animales después de la desaparición de HBsAg.

[0150] Una señal de PCR débil para el ADN de VHB fue detectable durante 32 semanas (genes S y C) (datos no mostrados).

[0151] Este patrón es típico de un aclarado de las partículas de VHB inoculadas originalmente (sueros de VHB humano inoculó por vía intravenosa a macacos *sylvanus* conducen a un perfil de desaparición del inóculo sin replicación "de novo") y sugiere que el VHB de sueros humanos no puede desencadenar una infección productiva, es decir, virus de sueros humanos son incapaces de replicarse de manera eficiente.

[0152] Estos resultados confirman un estudio realizado por Lazizi et al. 1993, que también mostró la falta de sensibilidad a la infección de una especie macaco estrechamente relacionada (*Macaca Mulata*) por inoculación intravenosa del virus. En este estudio, HBsAg y HBeAg fueron detectables durante 3 y 2 semanas, respectivamente, y las secuencias virales fueron detectables durante 3 meses, lo que demuestra un secuestro de partículas virales después de la inoculación. En el momento del sacrificio, 9 meses después de la infección, las secciones de hígado fueron negativas para la tinción de HBs y HBc.

[0153] Se inocularon por vía intravenosa un grupo de 3 macacos (BL 12, 13, 14) con un ml de un grupo de sueros de macacos *Cynomolgus* infectados de forma natural por VHB, comprendiendo dicho grupo de sueros 10^3 copias de VHB/ml. La secuencia genómica de partículas de VHB del grupo de sueros se muestra en la SEQ ID NO: 1 (el grupo de sueros provenía de Macacos *Cynomolgus* que fueron identificados anteriormente como infectados de forma natural por partículas de VHB que tienen un genoma de la SEQ ID NO: 1).

[0154] Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 14.

[0155] Esta figura ilustra para cada uno de los macacos *Sylvanus* BL 12, BL 13 y BL 14 el cambio en los títulos de AgHBs (panel izquierdo) y títulos de transaminasas (panel derecho) en los días siguientes a la inoculación de VHB.

[0156] Esta figura muestra un pico de AgHBs justo después de la inoculación de partículas de VHB seguido por una disminución continua de títulos de AgHBs hasta que AgHBs ya no puede ser detectado después de aproximadamente 3 semanas después de la infección. Se observó un pico de transaminasas (llegando a 292 U/L) en los 3 animales después de la desaparición de HBsAg.

[0157] Después de la inoculación con el grupo de sueros de macacos *cynomolgus* que comprendía sólo 10^3 copias de VHB/ml, se detectó HBsAg en puntos de tiempo individuales (4 o 7 semanas después de la inoculación), que es indicativo de la producción "de novo" de HBsAg después de la infección. Se observó un pico de transaminasas (250 U/L) después de 9 semanas para BL12 y la tercera semana para BL13 y BL14. Nueve meses después de la infección, la tinción de HBsAg y HBcAg fue positiva en secciones de hígado de los animales.

[0158] Además, las secuencias de ADN virales fueron detectadas por PCR que reconocían los genes S y C de VHB durante todo el seguimiento. Después de 9 semanas, el ADN del VHB se cuantificó usando un ensayo comercial (Amplicor Monitor) en el *M. sylvanus* BL14 que dio un título de 1×10^3 copias/ml. Este título no es insignificante en comparación con el inóculo que contenía 10^3 copias, y se confirma una producción "de novo" de nuevas secuencias genómicas.

[0159] En general, los resultados demuestran que un grupo de sueros que comprende tan pocas como 10^3 copias de VHB con una secuencia genómica de SEQ ID NO: 1 es capaz de iniciar una infección productiva en macacos *sylvanus*, mientras que un grupo de sueros humanos altamente virémicos que comprende 10^9 copias de VHB de genotipo D no pueden desencadenar la infección en macacos *sylvanus*. Además, estos resultados ponen de manifiesto que el VHB con la secuencia genómica de SEQ ID NO: 1 está particularmente bien adaptado para infectar macacos, en particular macacos *cynomolgus* y macacos *sylvanus*.

[0160] También se realizó la inoculación directa de ADN de VHB SEQ ID NO: 1 en el hígado de macacos *sylvanus* y se demostró que inducía una infección (es decir, se observó un perfil típico de infección con persistencia de HBsAg (incluso si esporádica), incremento de ADN de VHB y persistencia de marcadores en el momento del sacrificio (9 meses después de la inoculación) tal como se demuestra por i) la presencia de ADN del VHB en el hígado detectado por PCR, y ii) HBsAg y HBcAg detectable por inmunofluorescencia en secciones de hígado).

[0161] En conjunto, estos experimentos proporcionan evidencia de que partículas de VHB humanos o ADN del VHB humano no son infecciosos para los macacos en ausencia de mutaciones de adaptación y que el ADN de VHB de la SEQ ID NO: 1 está ajustado para infectar macacos.

REFERENCIAS

[0162]

- Barker, L. F., Chisari, F. V., McGrath, P. P., Dalgard, D. W., Kirschstein, R. L., Almeida, J. D., Edington, T. S., Sharp, D. G. and Peterson, M. R. (1973). "Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees". *J Infect Dis.* 127. (6). 648-62.
- Baumert et al., 2005
- Beasley, R. P. (1988). "Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma". *Cancer.* 61. (10). 1942-56.
- Bertoni R, Sette A, Sidney J, Guidotti LG, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. (1998). Human class I supertypes and CTL repertoires extend to chimpanzees. *J Immunol.* Oct 15;161(8):4447-55.
- Blumberg et al.: A "new" antigen in leukemia sera, *JAMA* 191: 541, (1965)
- Chaoyin Cui et al., *Journal of General Virology* (2002), 83, 2773-2777, "The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid"
- Ganem, D. (1996) in *Fields Virology*, eds. Fields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M. (Lippincott-Raven, Philadelphia), pp. 2703-2737.
- Gheit, T. (2002), "Experimental transfection of *Macaca sylvanus* with cloned human hepatitis B virus", *Journal of General Virology*, 83, 1645-1649
- Gripon et al. (2002)
- Hu, X., Margolis, H. S., Purcell, R. H., Ebert, J. and Robertson, B. H. (2000). "Identification of hepatitis B virus indigenous to chimpanzees". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97. (4). 1661-4.
- Köck J, Nassal M, MacNelly S, Baumert TF, Blum HE, von Weizsacker F, Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus, *J Virol.* 2001 Jun;75(11):5084-9.
- Lanford, R. E., Chavez, D., Rico-Hesse, R. and Mootnick, A. (2000). "Hepadnavirus infection in captive gibbons". *J Virol.* 74. (6). 2955-9.
- Lemon, S. M. and Thomas, D. L. (1997). "Vaccines to prevent viral hepatitis". *N Engl J Med.* 336. (3). 196-204.
- MacDonald, D. M., Holmes, E. C., Lewis, J. C. and Simmonds, P. (2000). "Detection of hepatitis B virus infection in wild-born chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): phylogenetic relationships with human and other primate genotypes". *J Virol.* 74. (9). 4253-7
- Maddrey, W. C. (2000). "Hepatitis B: an important public health issue". *J Med Virol.* 61. (3). 362-6.
- Pillot, 1990
- Shouval, 1994
- Takahashi, K., Brotman, B., Usuda, S., Mishiro, S. and Prince, A. M. (2000). "Full-genome sequence analyses of hepatitis B virus (VHB) strains recovered from chimpanzees infected in the wild: implications for an origin of VHB". *Virology.* 267. (1). 58-64
- von Weizsacker et al., 2004
- Walter, E., Keist, R., Niederost, B., Pult, I. and Blum, H. E. (1996). "Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo". *Hepatology.* 24. (1). 1-5.
- Warren, K. S., Heeney, J. L., Swan, R. A., Heriyanto and Verschoor, E. J. (1999). "A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*)". *J Virol.* 73. (9). 7860-5.
- Will, H., Cattaneo, R., Koch, H., Darai, G., Scalier, H. and Schellekens, H. (1982a). "Cloned VHB DNA causes hepatitis in chimpanzees". *Nature.* 299. 740-742.
- Will, H., Kuhn, C., Cattaneo, R. and Schaller, H. (1982b). "Structure and function of the hepatitis B virus genome".

Princess Takamatsu Symp. 12. 237-47.
- Wright et al., 1993

LISTADO DE SECUENCIAS

5

[0163]

<110> INSTITUT NOTIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

<120> Un nuevo modelo primate no humano de VHB

<130> BET11P0276

10

<160> 51

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 3182

<212> ADN

15

<213> virus de la hepatitis B

<400> 1

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 640 906 T3

	ttccacaacc	tttcaccaa	ctctgcaaga	tcccagagtg	agaggcctgt	atctccctgc	60
5	tggtggctcc	agttcaggag	cagtaaacc	tggtccgact	actgcctctc	ccttatcgtc	120
	aatcttctcg	aggattgggg	accctgcgct	gaacatggag	aacatcacat	caggattcct	180
	aggacccctt	ctcgtgttac	aggcgggggt	tttcttggtg	acaagaatcc	tcacaatacc	240
10	gcagagtcta	gactcgtggg	ggacttctct	caatttttcta	gggggaacta	ccgtgtgtct	300
	tgggcaaaat	tcgcagtc	caacctccaa	tcactcacca	acctcctgtc	ctccaacttg	360
15	tcctgggttat	cgctggatgt	gtctgcggcg	ttttatcatc	ttcctcttca	tcctgctgct	420
	atgcctcatc	ttcttggttg	ttcttctgga	ctatcaaggt	atgttgccc	tttgtcctct	480
20	aattccagga	tcctcaacca	ccagcacggg	accatgccga	acctgcatga	ctactgctca	540
	aggaacctct	atgtatccct	cctgttgctg	taccaaacct	tcggacggaa	attgcacctg	600
25	tattcccatc	ccatcatcct	gggctttcgg	aaaattccta	tgggagtggg	cctcagccc	660
	tttctcctgg	ctcagtttac	tagtgccatt	tggtcagtg	ttcgtagggc	tttccccac	720
	tgtttggtt	tcagttatat	ggatgatgtg	gtattggggg	ccaagtctgt	acagcatctt	780
30	gagtcctttt	ttaccgctgt	taccaatttt	cttttgtctt	tgggtataca	tttaaaccct	840
	aacaaaacaa	agagatgggg	ttactctctg	aattttatgg	gttatgtcat	tggaagttat	900
35	gggtccttgc	cacaagaaca	catcatacaa	aaaatcaaag	aatgttttag	aaaacttcct	960
	attaacaggc	ctattgattg	gaaagtatgt	caacgaattg	tgggtccttt	gggttttgct	1020
40	gccccattta	cacaatgtgg	ttatcctgcg	ttaatgccct	tgtatgcatg	tattcaatct	1080
	aagcaggctt	tcactttctc	gccaacttac	aaggcctttc	tgtgtaaaca	atacctgaac	1140
45	ctttacccc	ttgcccggca	acggccaggt	ctgtgccaa	tggttgctga	cgcaaccccc	1200
	actggctggg	gcttggtcat	gggccatcag	cgcgtgcgtg	gaaccttttc	ggctcctctg	1260
	ccgatccata	ctgcggaact	cctagccgct	tgttttgctc	gcagcaggtc	tggagcaaac	1320
50	attatcggga	ctgataactc	tggtgtcctc	tcccgcaaat	atacatcgta	tccatggctg	1380
	ctaggctgtg	ctgccaactg	gacctgcgc	gggacgtcct	ttgtttacgt	cccgtcggcg	1440

55

60

65

ES 2 640 906 T3

	ctgaatcctg	cggacgaccc	ttctcggggt	cgcttgagac	tctctcgtcc	ccttctccgt	1500
	ctgccgttcc	gaccgaccac	ggggcgcacc	tctctttacg	cggactcccc	gtctgtgcct	1560
5	tctcatctgc	cggaccgtgt	gcacttcgct	tcacctctgc	acgtcgcacg	gagaccaccg	1620
	tgaacgcccc	ccgaatgttg	cccaagggtct	tacataagag	gactcttgga	ctctctgcaa	1680
10	tgtcaacgac	cgaccttgag	gcataacttca	aagactgttt	gtttaaagac	tgggaggagt	1740
	tgggggagga	gattagatta	aagggtctttg	tactaggagg	ctgtaggcat	aaattgggtct	1800
15	gcgcaccggc	gccatgcacc	tttttcacct	ctgcctaata	atctcttggt	catgtcctac	1860
	tgttcaagcc	tccaagctgt	gccttggggtg	gctttggggc	atggacatcg	acccttataa	1920
20	agaatttgga	gctactgtgg	agttactctc	gtttttgcct	tctgacttct	ttccttcagt	1980
	acgagatctt	ctagataccg	cctcagctct	gtatcgggaa	gccttagagt	ctcctgagca	2040
	ttgttcacct	caccatactg	cactcaggca	agcaattctt	tgctgggggg	aactaatgac	2100
25	tctagctacc	tgggtgggtg	ttaatttgga	agatccagca	tctagagacc	tagtagtcag	2160
	ttatgtcaac	actaatatgg	gcctaaagtt	caggcaactc	ttgtgggttc	acatttcttg	2220
30	tctcactttt	ggaagagaaa	ccgttataga	gtatttggtg	tctttcggag	tgtggattcg	2280
	cactcctcca	gcttatagac	caccaaagtc	ccctatccta	tcaacacttc	cggaaactac	2340
35	tgttggttaga	cgacgaggca	ggtcccctag	aagaagaact	ccctcgcctc	gcagacgaag	2400
	gtctcaatcg	ccgcgtcgca	gaagatctca	atctcgggaa	cctcaatggt	agtattcctt	2460
40	ggactcataa	ggtggggaac	tttactggtc	tttattcttc	tactgtacct	gtctttaatc	2520
	ctcattggaa	aacaccatct	tttcctaata	tacatttaca	ccaagacatt	atcaaaaaat	2580
45	gtgaacagtt	tgtaggccca	cttacagtta	atgagaaaag	aagattgcaa	ttgattatgc	2640
	ctgctagggt	ttatccaaag	gttaccaaag	atttaccatt	ggataagggg	attaaacctt	2700
	attatccaga	acatctagtt	aatcattact	tccaaactag	acactattta	cacactctat	2760
50	ggaaggcggg	tatattatat	aagagagaaa	caacacatag	cgctcatttt	tgtgggtcac	2820
	catattcttg	ggaacaagat	ctacagcatg	gggcagaatc	tttccaccag	caatcctctg	2880
55	ggattctttc	ccgaccacca	gttggatcca	gccttcagag	caaacacagc	aaatccagat	2940
	tgggacttca	atcccaacaa	ggacacctgg	ccagacgcca	acaaggtagg	agctggagca	3000
60	ttcgggctgg	gtttcactcc	accgcacgga	ggccttttgg	ggtggagctc	tcaggctcag	3060
	ggcatactac	aaactttgcc	agcaaataccg	cctcctgcct	ccaccaatcg	ccagacagga	3120
	aggcagccta	ccccgctgtc	tccacctttg	agaaacactc	atcctcaggc	catgcagtgg	3180
65	aa						3182

<210> 2
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 2
 aatcctcaca atacc 15
 <210> 3
 10 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 15 <400> 3
 gatgggatgg gaata 15
 <210> 4
 <211> 15
 <212> ADN
 20 <213> artificial
 <220> >
 <223> cebador
 <400> 4
 cctatgggag tgggc 15
 25 <210> 5
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 30 <223> cebador
 <400> 5
 gcaacggggt aaagg 15
 <210> 6
 <211> 15
 35 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 6
 40 atgcaacttt ttcac 15
 <210> 7
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> cebador
 <400> 7
 tccaaattct ttata 15
 <210> 8
 50 <211> 15
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 55 <400> 8
 tagaagaaga actcc 15
 <210> 9
 <211> 15
 <212> ADN
 60 <213> artificial
 <220> >
 <223> cebador
 <400> 9
 agaatatggt gaccc 15
 65 <210> 10
 <211> 15

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 10
 taagagacag tcatac 15
 <210> 11
 <211> 42
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 11
 ccggaaagct tatgctcttc ttttcacct ctgccctaata ca 42
 15 <210> 12
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 20 <223> cebador
 <400> 12
 ccggagagct cgagctcttc aaaaagttgg catgggtgctg g 41
 <210> 13
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 13
 30 tcctgctggt gggctccagt tca 23
 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 14
 cctgctggtg gctccagttc 20
 <210> 15
 40 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 15
 ctcacaatac cgcagagtct agact 25
 <210> 16
 <211> 22
 <212> ADN
 50 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 16
 caaggatatgt tgcccgtttg tc 22
 55 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 60 <223> cebador
 <400> 17
 cctgtattcc catcccatc 19
 <210> 18
 <211> 24
 65 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> cebador
 <400> 18
 ggagtgggcc tcagccggt tctc 24
 5 <210> 19
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 10 <223> cebador
 <400> 19
 taaaacaatg catgaacctt taccgccgtg c 31
 <210> 20
 <211> 18
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 20
 20 caagtgttg ctgacgca 18
 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> > artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 21
 aagtgttg tgacgcaacc 20
 <210> 22
 30 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 22
 ccatactgcg gaactcct 18
 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 23
 ggacgacac ctagcagcc atgg 24
 45 <210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 50 <223> cebador
 <400> 24
 acmtcsttc catggctgct agg 23
 <210> 25
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 25
 60 cataagagga ctcttgact 20
 <210> 26
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> artificial
 65 <220>
 <223> cebador

<400> 26
 tgcgcaccgc ggccgcgcaa cttttcact ctgcc 35
 <210> 27
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 27
 10 ttttcacct ctgcctaatac at 22
 <210> 28
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 28
 ccgaaagct tatgctcttt ttacactctg cctaatacatc 40
 <210> 29
 20 <211> 19
 <212> ADN
 <21 3> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 29
 ccttcggtca gagatctcc 19
 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 30
 tcggagtgtg gattcgact cctc 24
 35 <210 > 31
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 31
 accaccaaata gccctatct ta 22
 <210> 32
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223 > cebador
 <400> 32
 50 cctatcttat caacacttcc 20
 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 55 <220>
 <223> cebador
 <400> 33
 gggtcaccaat attcttgga a 21
 <210> 34
 60 <211> 20
 <212 > ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 65 <400> 34
 ggaacaagag ctacagcatg 20

<210> 35
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 35
 tcgggaaaga atcccagagg attgg 25
 <210> 36
 10 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 15 <400> 36
 tgggggtggag ccctcaggc 19
 <210> 37
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 37
 ggctcagttt actagtcca ttgt 25
 25 <210> 38
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 30 <223> cebador
 <400> 38
 gcccccaata ccacatcatc cata 24
 <210> 39
 <211> 24
 35 <212> DN A
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 39
 40 tacccaaaga caaaagaaaa ttgg 24
 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> cebador
 <400> 40
 aagtgtttgc tgacgcaacc 20
 <210> 41
 50 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 55 <400> 41
 tttgtctgc agccggtctg 20
 <210> 42
 <211> 42
 <212> ADN
 60 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 42
 ccggagagct catgctcttc aaaaagttgc atggtgctgg tg 42
 65 <210> 43
 <211> 20

<212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 43
 attaggcaga ggtgaaaaag 20
 <210> 44
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 44
 atgattaggc agaggtgaaa aa 22
 15 <210> 45
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 20 <223> cebador
 <400> 45
 gtggagttac tctcgtttt gcc 23
 <210> 46
 <211> 29
 25 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 46
 30 ctaagggtcg acgatacaga gcwgaggcg 29
 <210> 47
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 47
 aagaactccc tcgcctcg 18
 <210> 48
 40 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 48
 gattgagacc ttctcctct gcga gga 27
 <210> 49
 <211> 25
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 49
 ggggctttat tcctctacag tacct 25
 55 <210> 50
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 < 220>
 60 <223> cebador
 <400> 50
 ggttgaagtc ccaatctgga t 21
 <210> 51
 <211> 19
 65 <212> ADN
 <213> artificial

ES 2 640 906 T3

<220>

<223> cebador

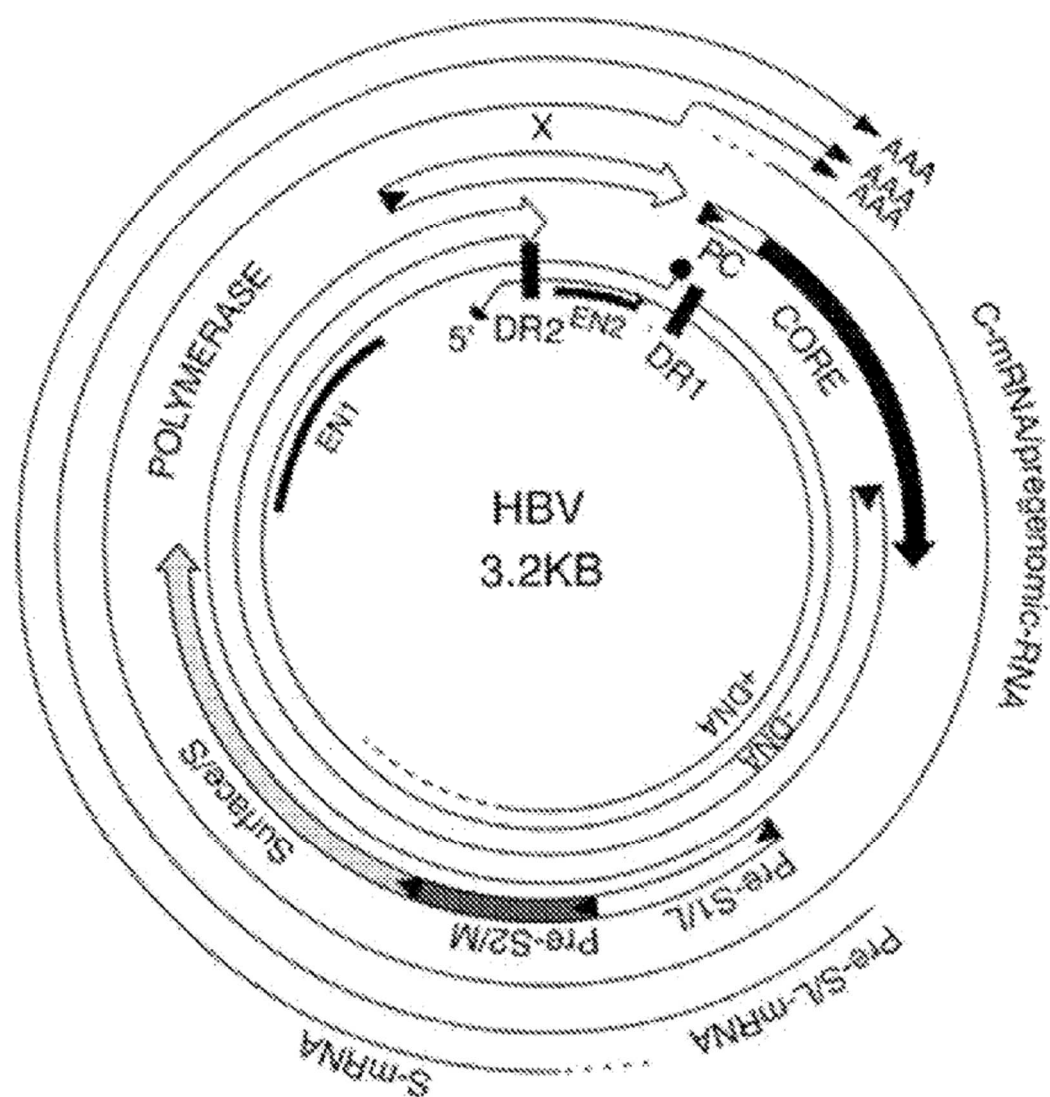
<400> 51

gcctgagggc tccaccca 19

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de una cepa de VHB aislada de un genotipo D humano que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 para infectar un macaco de la subfamilia *Cercopithecinae* para producir un modelo primate para la enfermedad del VHB humano.
- 10 2. Utilización de un macaco aislado de la subfamilia *Cercopithecinae*, preferiblemente de la especie *Macaca sylvanus* o *Macaca cynomolgus*, para generar un modelo primate para la enfermedad del VHB humano, en la que dicho macaco está infectado con una cepa de VHB de un genotipo D humano que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 15 3. Utilización, según la reivindicación 1 ó 2, teniendo dicho modelo primate una carga viral de VHB en el suero comprendida entre 10^2 y 10^8 copias genómicas/ml.
- 20 4. Modelo animal primate para la enfermedad del VHB humano, en el que dicho primate es un macaco de la subfamilia *Cercopithecinae*, preferiblemente de la especie *Macaca sylvanus* o *Macaca cynomolgus*, infectado con una cepa de VHB de un genotipo D humano que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 25 5. Modelo animal primate, según la reivindicación 4, que es infectado artificialmente con una cepa de VHB aislada de un genotipo D humano, en el que dicha cepa de VHB comprende la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 30 6. Modelo animal primate, según la reivindicación 4 ó 5, teniendo dicho modelo primate una carga viral de VHB en el suero comprendida entre 10^2 y 10^8 copias genómicas/ml.
- 35 7. Procedimiento para proporcionar un modelo primate para la enfermedad de VHB humana, que comprende las siguientes etapas que consisten en:
 - aislar un macaco de la subfamilia *Cercopithecinae*;
 - infectar dicho primate con una cepa de VHB aislada de un genotipo D humano que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1;
 - ensayar una carga viral de al menos 10^2 copias genómicas de VHB/ml.
- 40 8. Procedimiento para evaluar un agente terapéutico, según el cual, un modelo animal, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, es administrado con dosis definidas, en una dosis o en dosis repetidas y a intervalos específicos de tiempo, de un agente terapéutico, se toman muestras biológicas antes y a intervalos de tiempo definidos después de la administración de dicho agente terapéutico y se llevan a cabo y se comparan mediciones cualitativas y cuantitativas de las proteínas virales de VHB en dichas muestras biológicas.
- 45 9. Procedimiento para evaluar una vacuna para prevenir una reacción patológica a una infección por VHB, según el cual:
 - se administra un macaco con dosis definidas, en una dosis o en dosis repetidas y a intervalos específicos de tiempo, de una vacuna,
 - se infecta artificialmente dicho macaco con una cepa de VHB aislada de un genotipo D humano que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1,
 - se toman muestras biológicas antes y a intervalos de tiempo definidos después de la infección,
 - y
 - se llevan a cabo y se comparan mediciones cualitativas y cuantitativas de proteínas virales de VHB en dichas muestras biológicas.



Polymerase: Polimerasa

HBV: VHB

DNA: ADN

RNA: ARN

CORE: NÚCLEO

pregenomic-RNA: ARN pregenómico

Figura 1

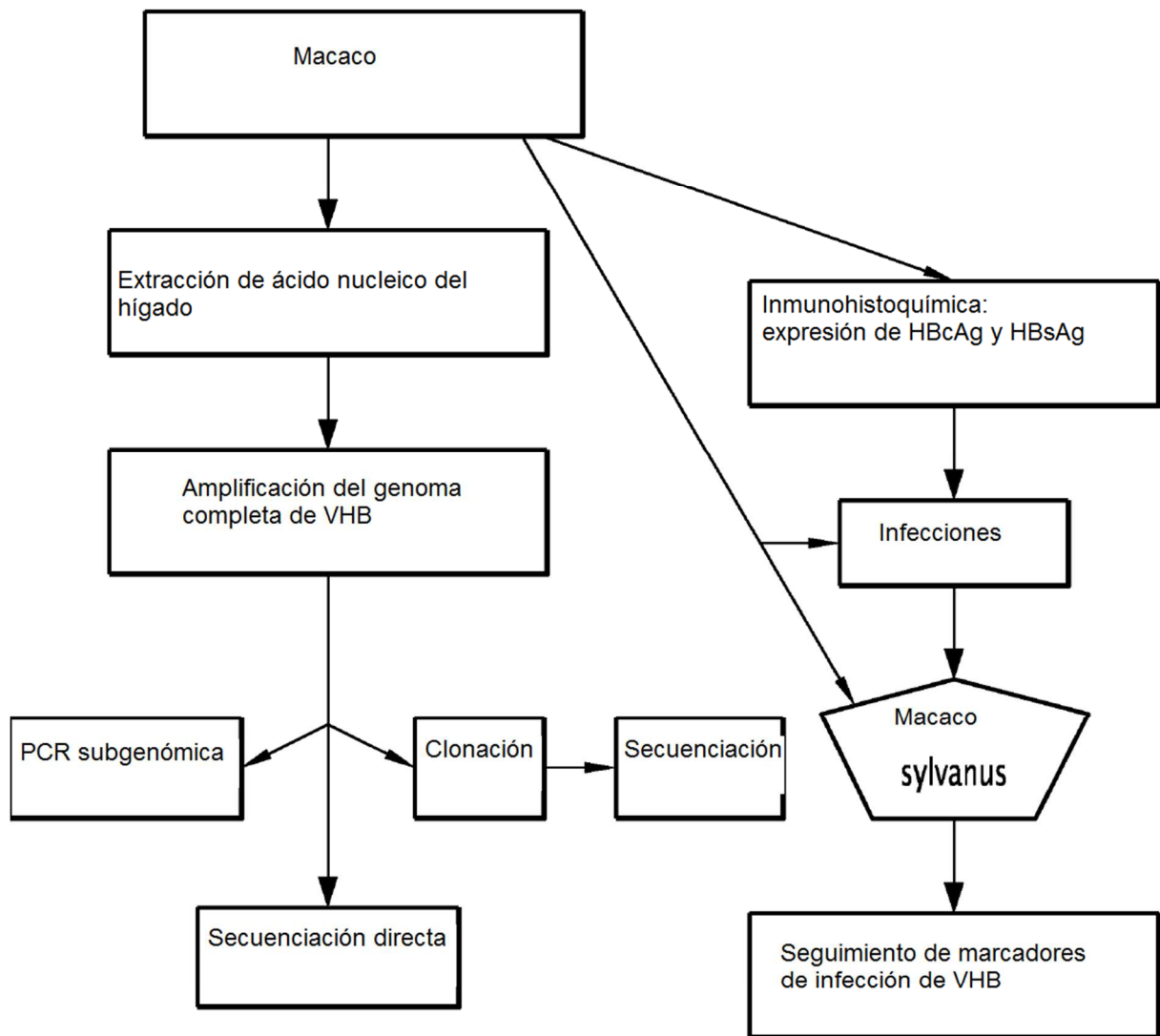


Figura 2

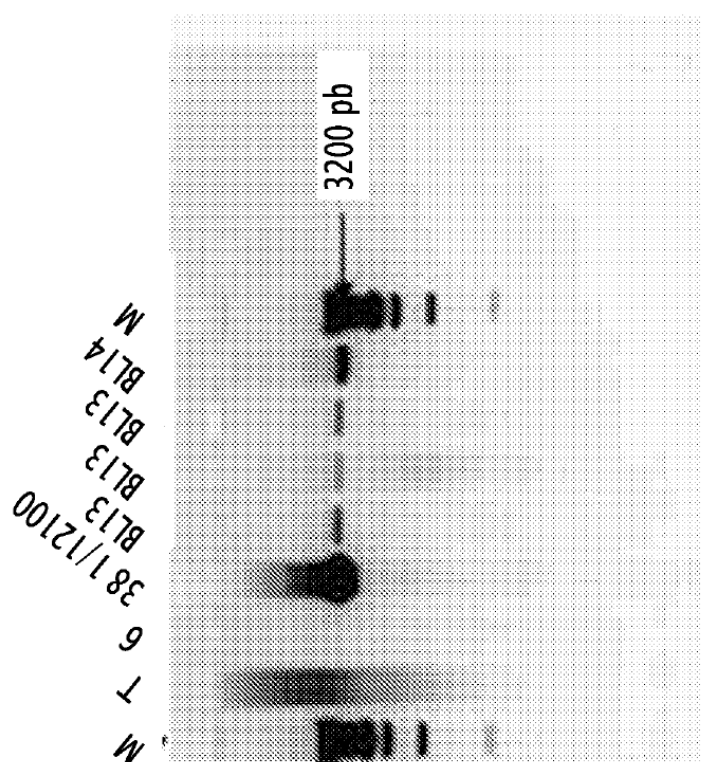
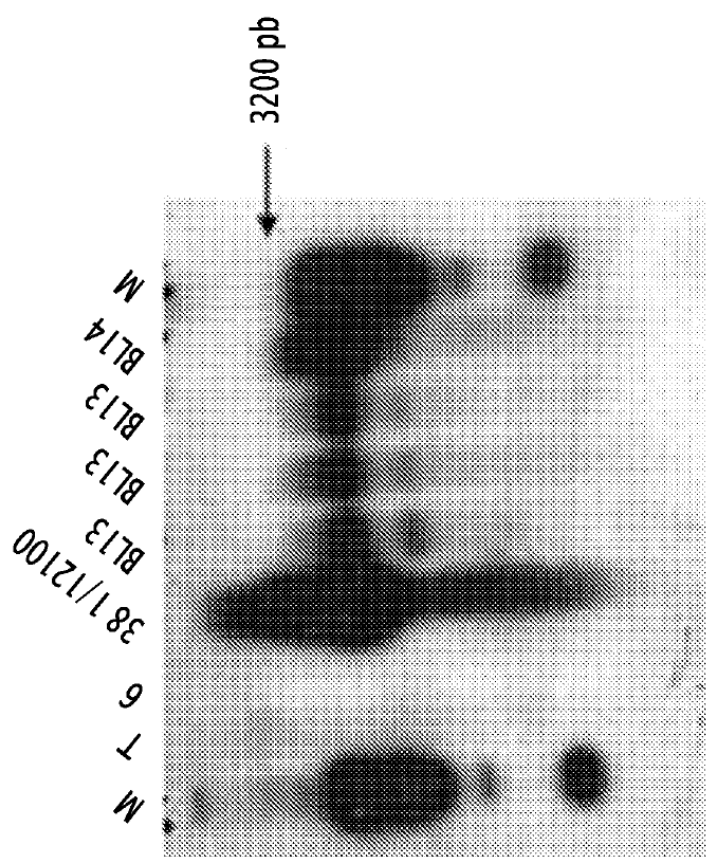


Figura 3

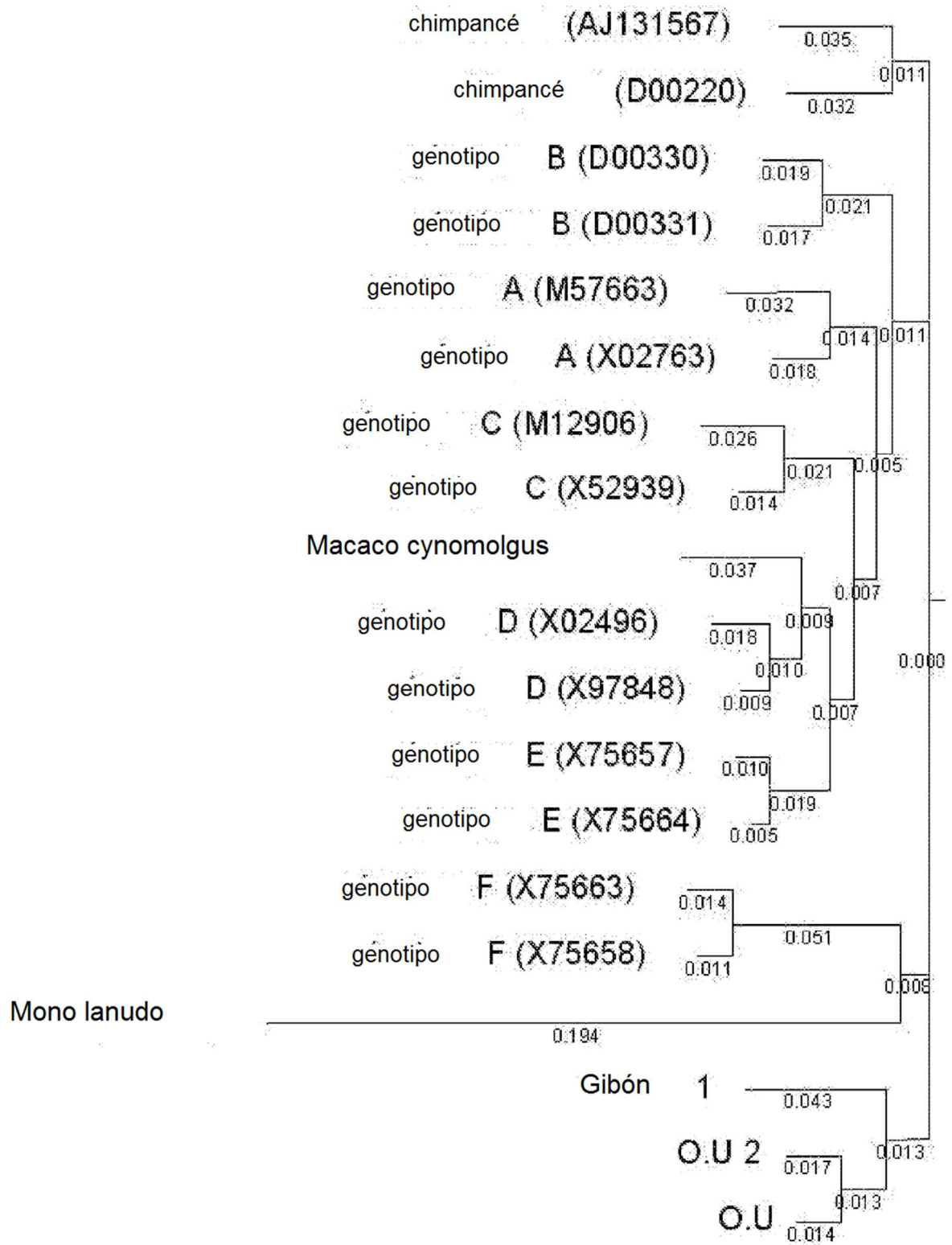


Figura 4

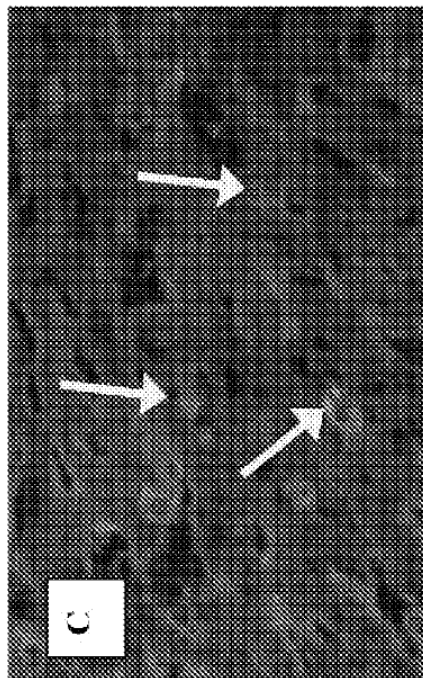
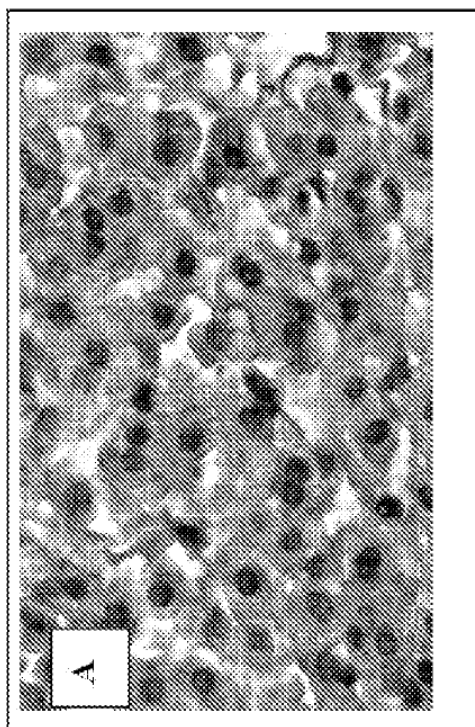
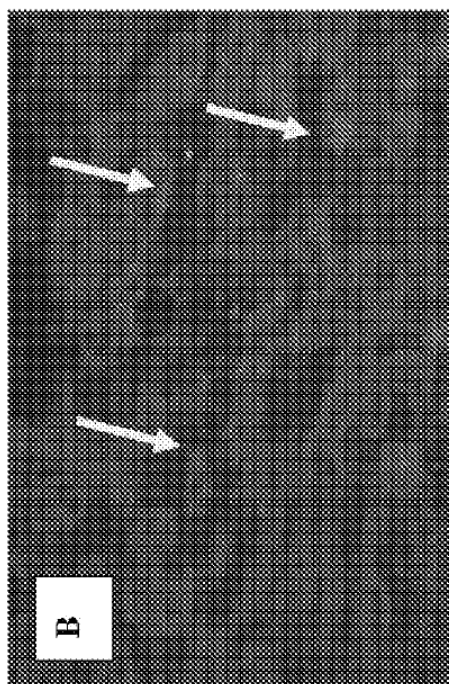


Figura 5

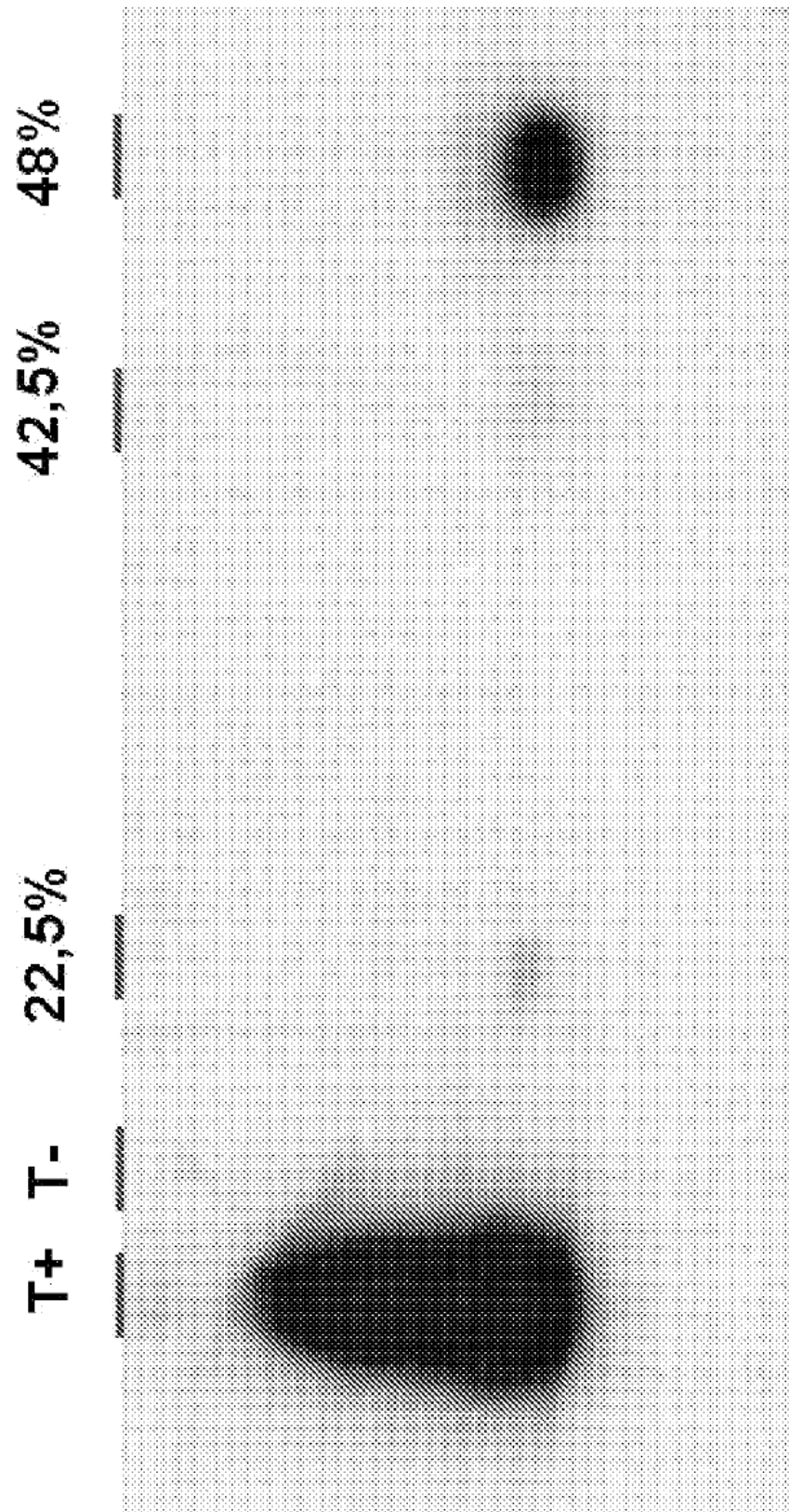


Figura 6

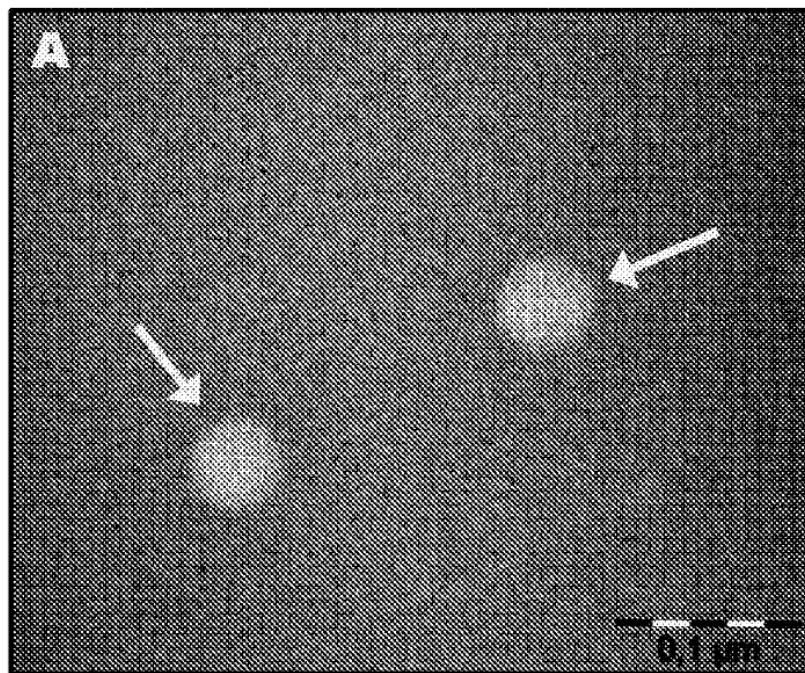


Figura 7

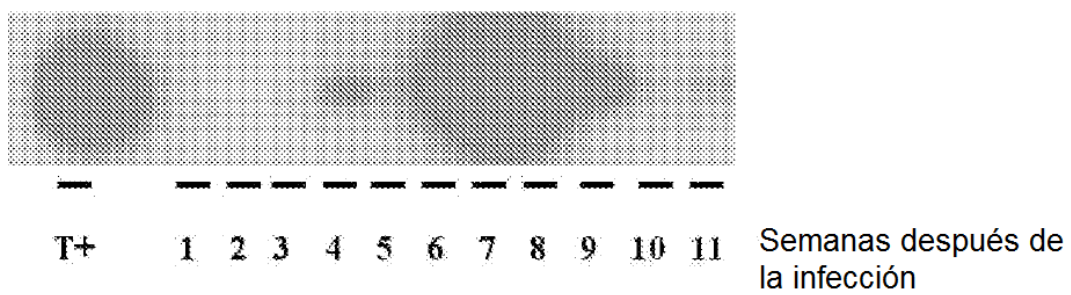


Figura 9

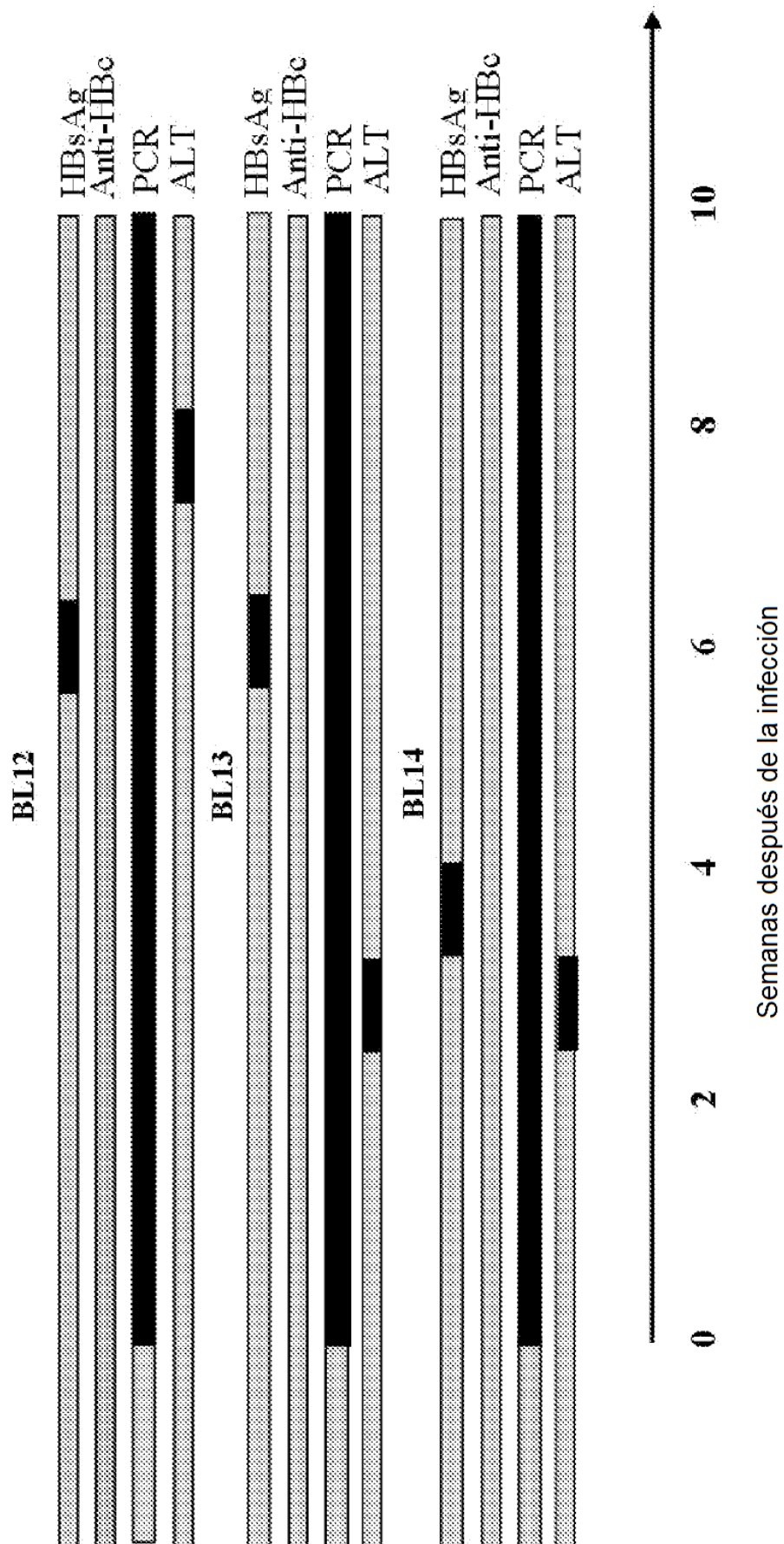


Figura 8

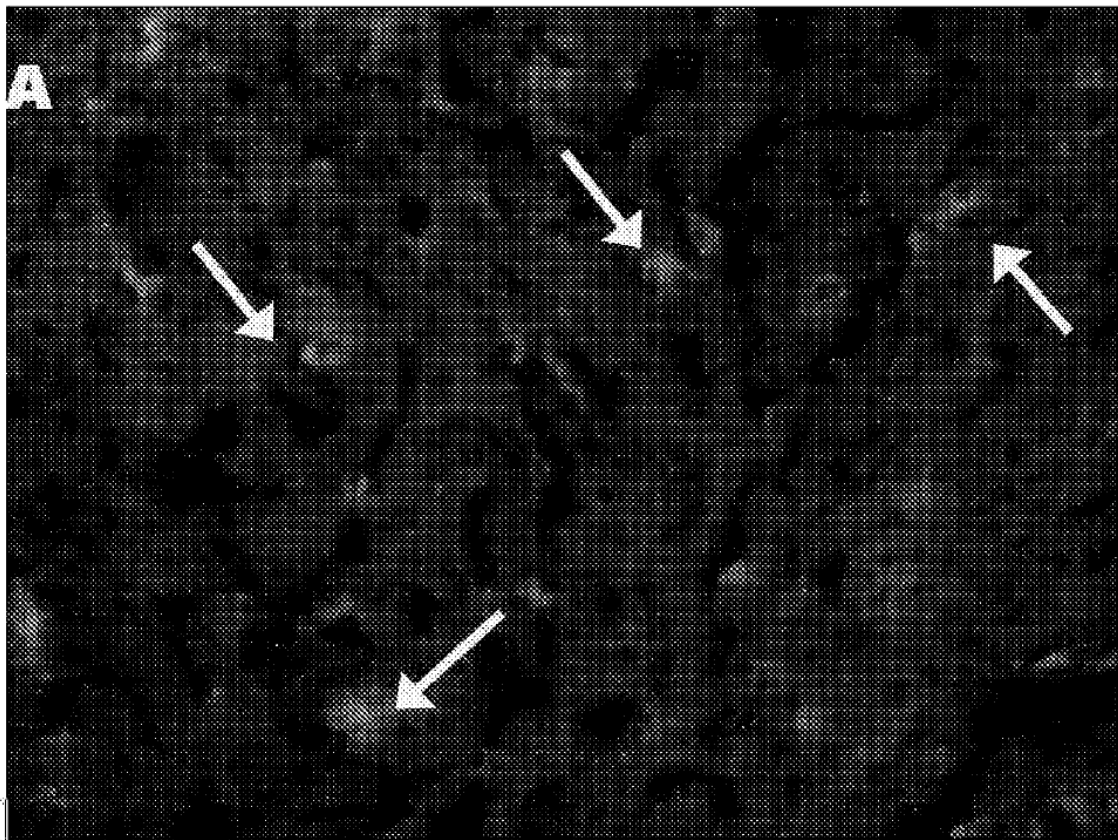


Figura 10

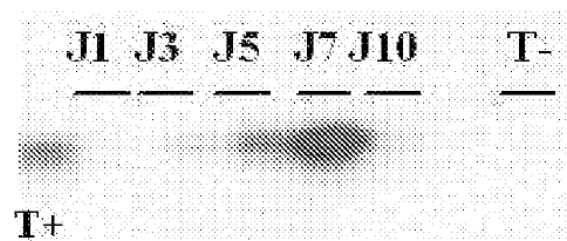


Figura 11

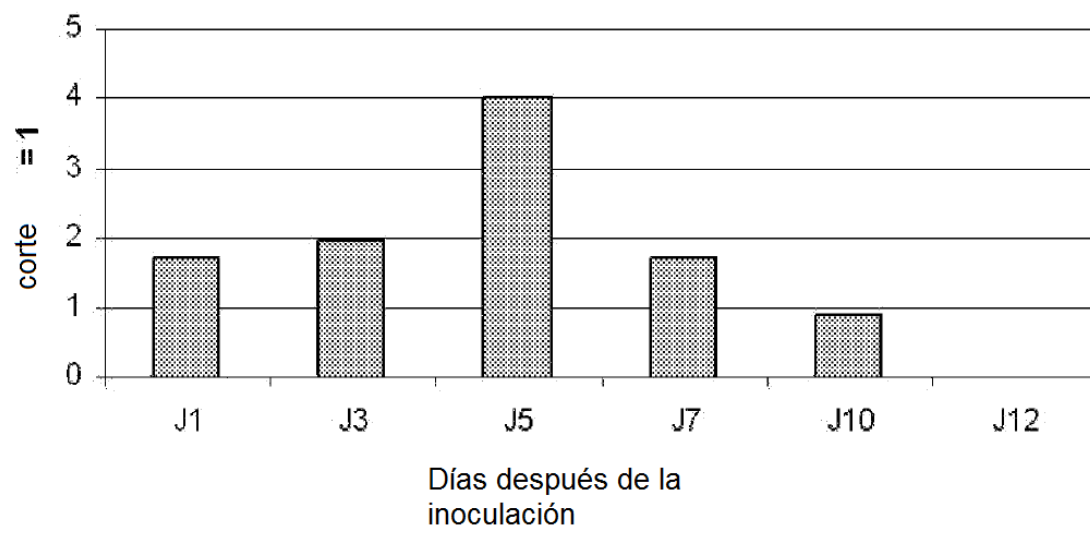
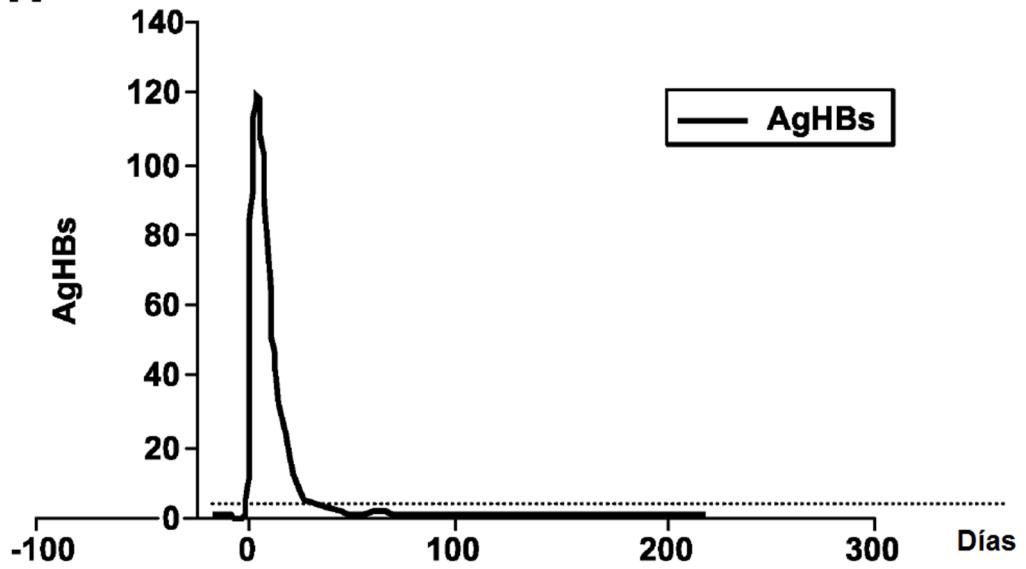


Figura 12

BL01.

AgHBs



BL01.

Transaminasas

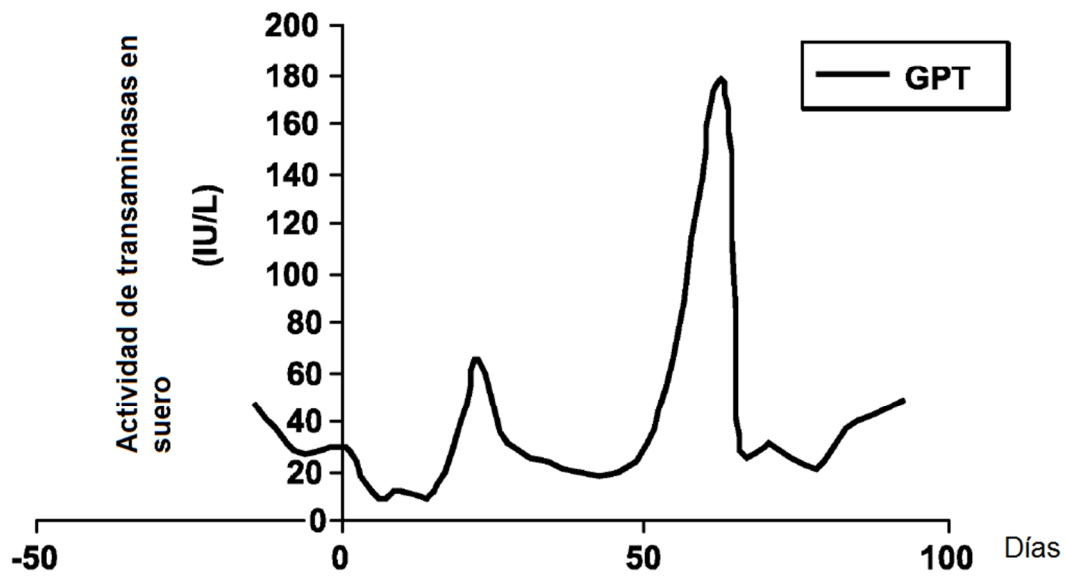
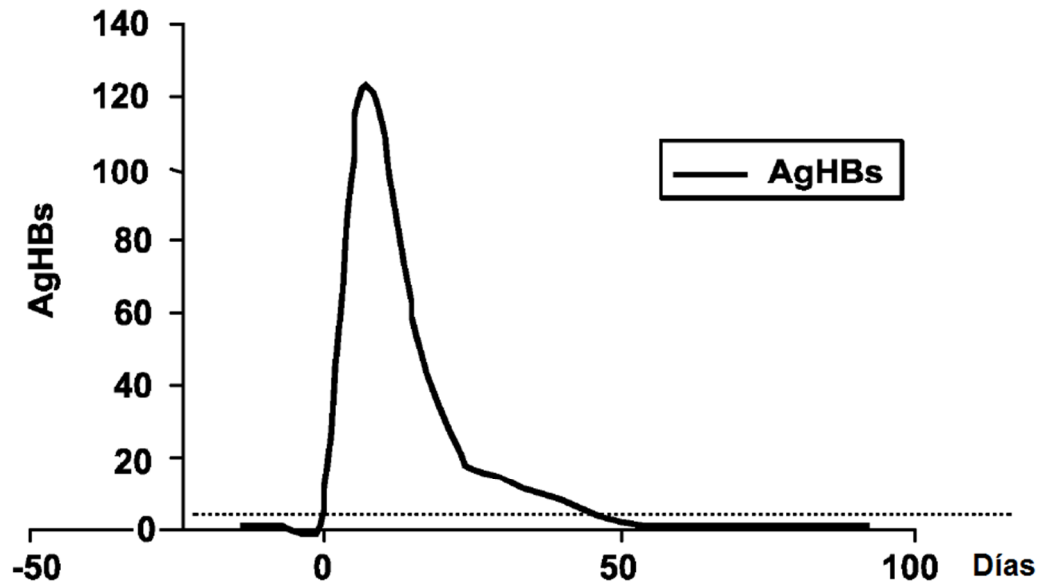


Figura 13 Inicio

BL03.

AgHBs



BL03.

Transaminasas

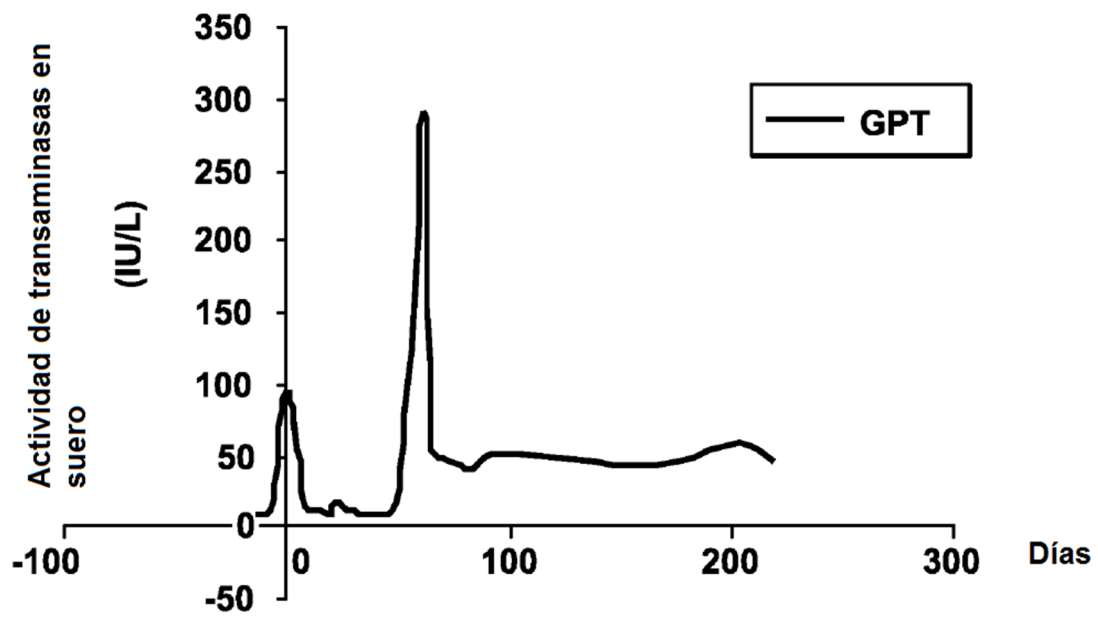
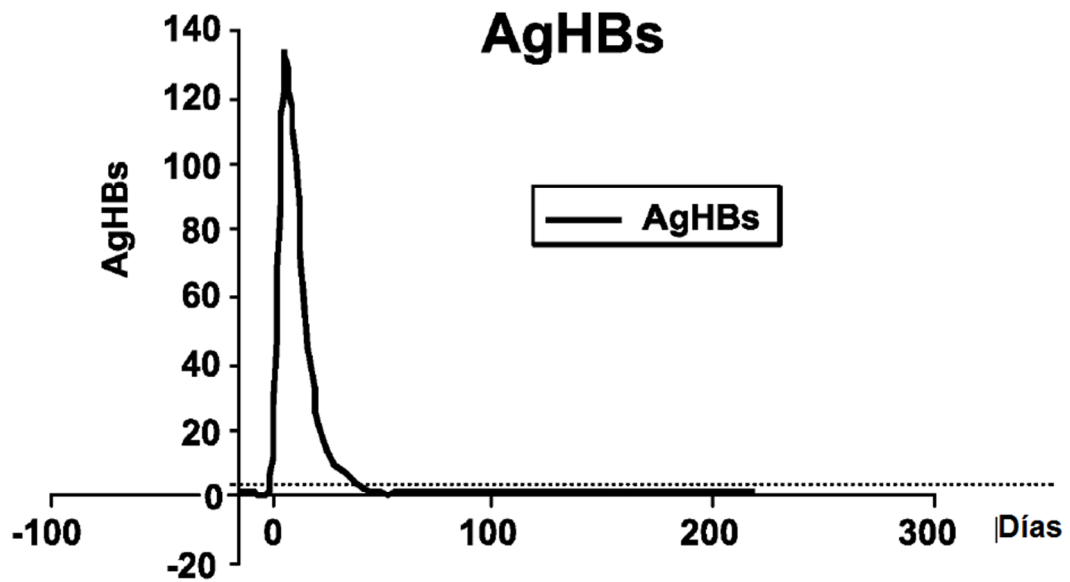


Figura 13 Desarrollo

BL04.



BL04.

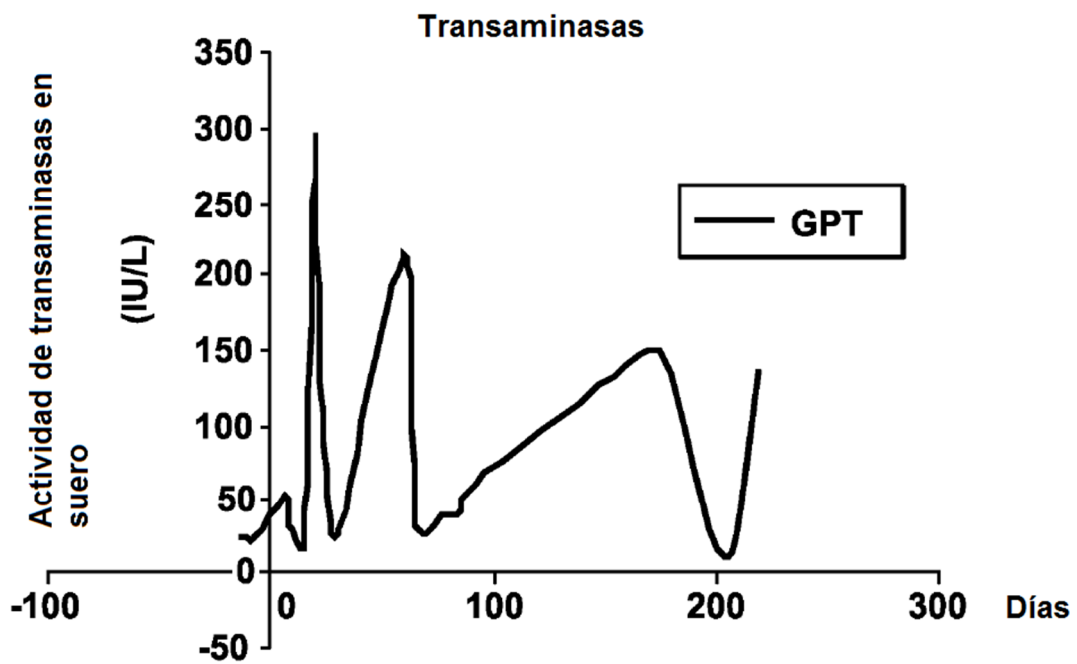
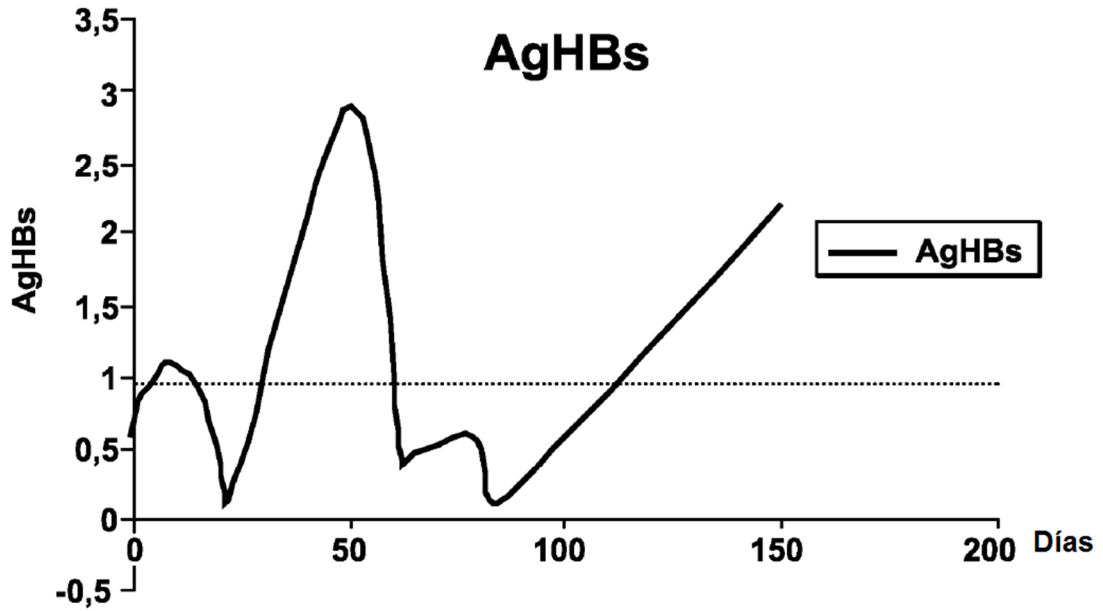


Figura 13 Final

BL12.



BL12.

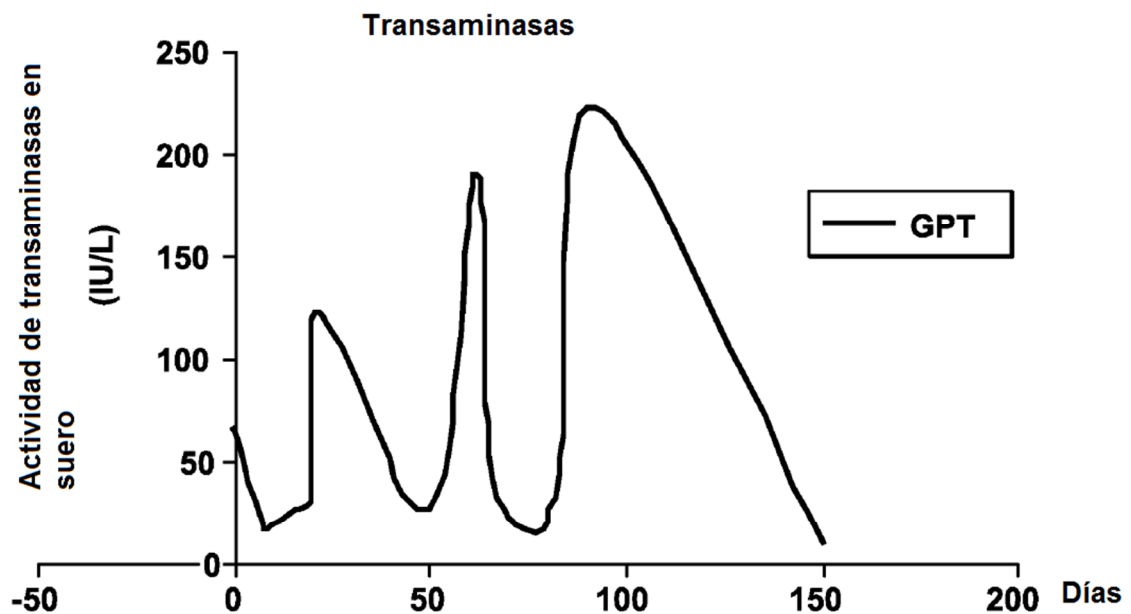
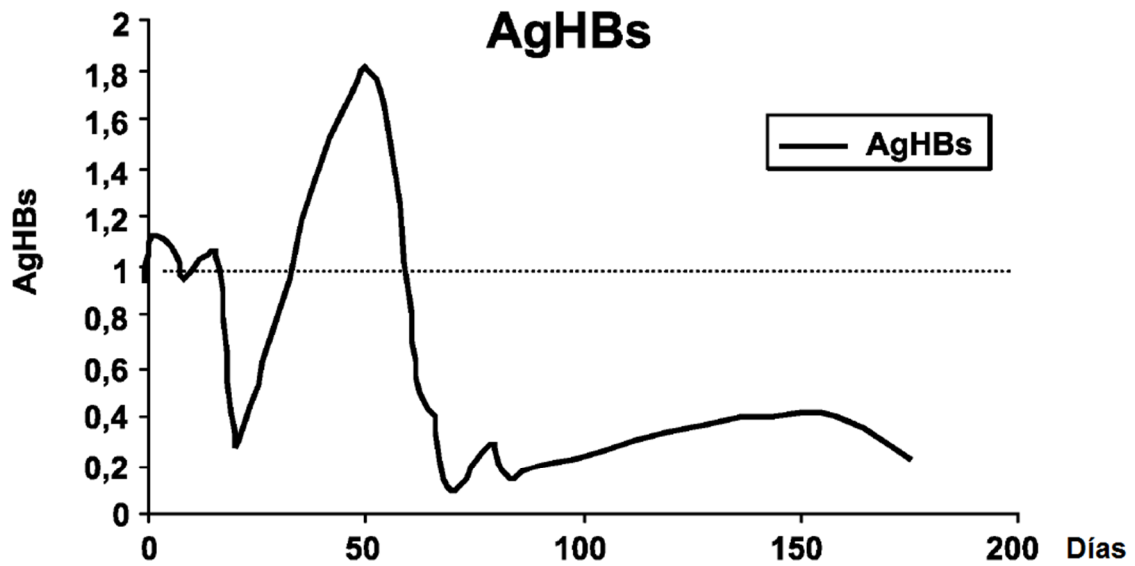


Figura 14 Inicio

BL13.



BL13.

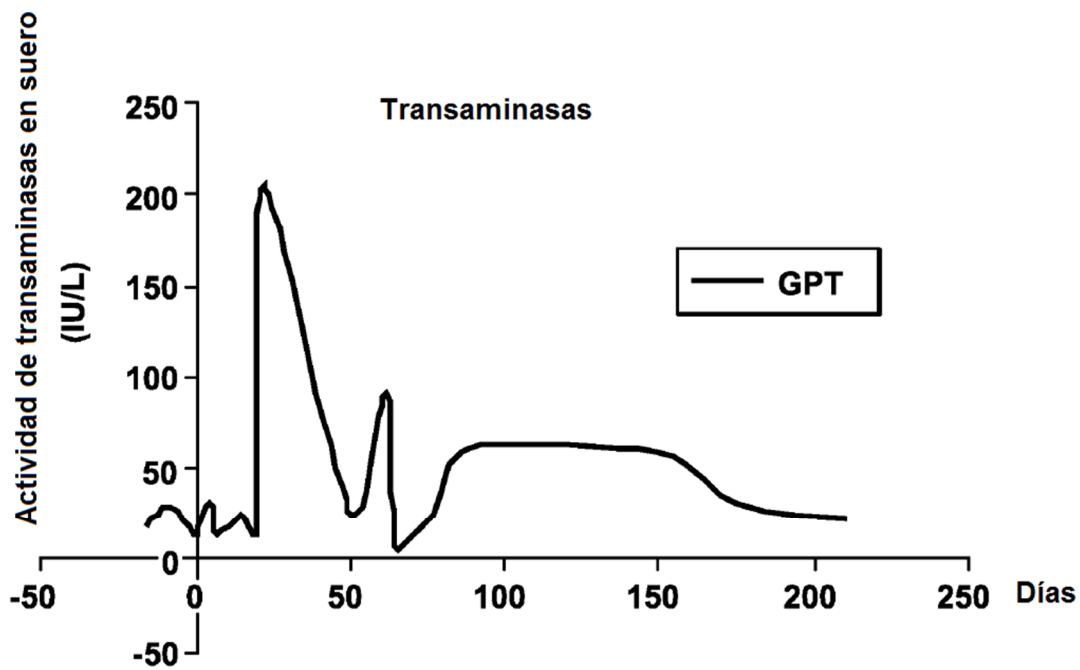
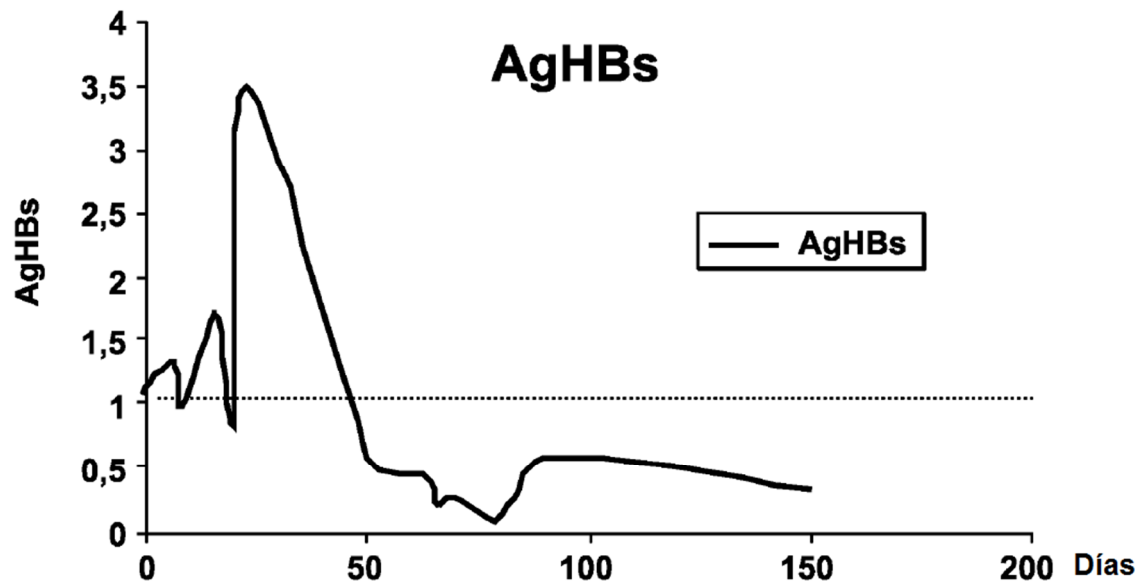


Figura 14 Desarrollo

BL14.



BL14.

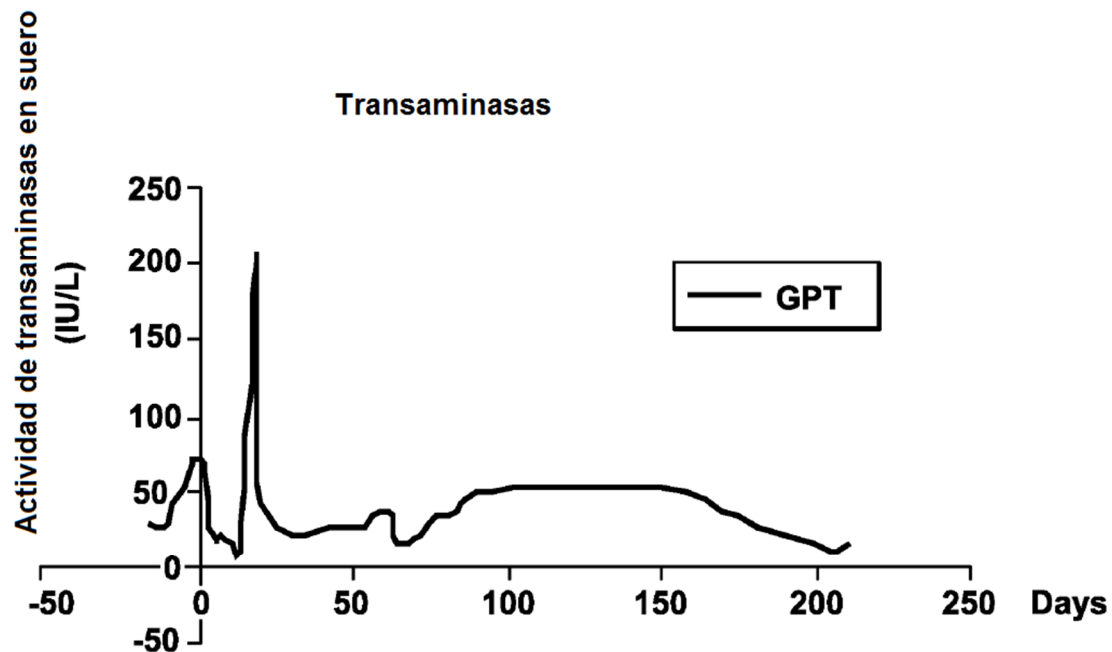


Figura 14 Final