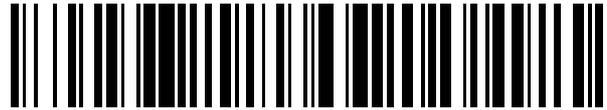


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 922**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2010 E 10774280 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2488633**

54 Título: **Método in vitro de obtención de fibroblastos intrahepáticos infectados por el virus de la hepatitis C**

30 Prioridad:

**16.10.2009 FR 0904962**

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

**15.01.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (50.0%)  
12, rue de l'Ecole de Médecine  
75006 Paris, FR y  
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**CALMUS, YVON y  
CONTI, FILOMENA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 437 922 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

Método *in vitro* de obtención de fibroblastos intrahepáticos infectados por el virus de la hepatitis C.

El virus de la hepatitis C es un virus con envoltura con un genoma RNA monocatenario y polaridad positiva. Pertenece al género Hepacivirus, del cual es el único miembro, y forma parte de la familia *Flaviviridae*. La replicación del RNA genómico pasa a través de una cadena anti-genómica de polaridad negativa, que servirá a su vez como matriz para la síntesis de los ARN genómicos. Los ARN genómicos neosintetizados servirán, o bien para la síntesis de una poliproteína escindida de forma co- y post-traducciona por proteasas celulares y virales con el fin de producir las proteínas virales estructurales y no estructurales, o bien para la síntesis de nuevas cadenas de ARN de polaridad negativa, o bien se encapsidarán tras la oligomerización de la proteína capsidial. Las nucleocápsides formadas en el citoplasma adquieren su envoltura por gemación a nivel del retículo endoplasmático donde quedan retenidas las glicoproteínas E1 y E2, y a continuación se liberan las partículas virales en el medio exterior.

La infección por este virus representa un importante problema de salud pública debido a la alta prevalencia de la infección y al importante riesgo de evolución hacia una hepatitis crónica, estimado entre un 50 y un 80 %. En efecto, el virus de la hepatitis C (VHC) infecta aproximadamente al 3 % de la población y es responsable de aproximadamente 170 millones de infecciones crónicas. La infección crónica conduce de forma progresiva a una hepatitis fibrosa que puede evolucionar a una cirrosis y a un carcinoma hepatocelular.

Actualmente, el tratamiento antiviral más eficaz consiste en un tratamiento combinado que se basa en el uso conjunto de interferón alfa pegilado y de un análogo nucleosídico, la ribavirina. Sin embargo, este tratamiento solo es eficaz en aproximadamente el 50 % de los pacientes tratados y, por otra parte, es mal tolerado por numerosos pacientes.

La lucha contra el virus de la hepatitis C sigue siendo, por lo tanto, un importante problema de salud pública, y resulta imperativo desarrollar nuevas moléculas dirigidas al ciclo viral, o que puedan interrumpir, e incluso impedir, que se produzcan fibrosis provocadas tras la infección por el VHC.

La fibrosis hepática es la complicación común de las enfermedades crónicas del hígado, y en particular de la hepatitis viral C. Se caracteriza por la acumulación de matriz extracelular (MEC) compuesta principalmente por colágenos de tipo I, III, IV y V. Durante la fibrogénesis hepática, las células hepáticas estrelladas (o « HSC » por « hepatic stellate cell ») y los fibroblastos intrahepáticos (FIH) se activan o se transdiferencian en miofibroblastos hepáticos que adquieren la capacidad de expresar la alfa-SMA (« smooth muscle alpha-actin »), los cuales producen matriz extracelular (MEC) e inhiben la degradación de esta última degradando las metaloproteasas.

El mecanismo de las lesiones hepáticas inducidas durante la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) no se conoce bien y el vínculo entre infección de los hepatocitos por este virus y la activación de la fibrogénesis sigue siendo una hipótesis. Se ha propuesto en particular que la inflamación crónica, que es resultado de la infección de los hepatocitos por el VHC, produciría un estímulo que induciría la activación de los fibroblastos intrahepáticos (FIH). De acuerdo con esta hipótesis, las citocinas liberadas por los hepatocitos infectados por el VHC, las células endoteliales, las células de Kupffer o los linfocitos infiltrados podrían ser responsables de la activación (Friedman S. L., J. Biol. Chem., 275, págs. 2.247-2.250, 2000; Schulze-Krebs y otros, Gastroenterology, 129 (1), págs. 246-258, 2005).

Con el fin de desarrollar antivirales que se dirijan de forma eficaz a la fibrosis inducida durante la infección por el VHC, es necesario aclarar los mecanismos que están en el origen de esta fibrosis inducida por el virus.

Los inventores han descubierto ahora que el VHC puede infectar *in vivo* los fibroblastos intrahepáticos (FIH) y activarlos, lo que sugiere firmemente que los hepatocitos podrían desempeñar una función de depósito del virus, pero que la fibrosis se debería esencialmente a la infección de los fibroblastos. Este descubrimiento es sorprendente ya que, hasta ahora, se sabía que el VHC solo infectaba a los hepatocitos, monocitos, linfocitos y a algunas células secretoras (Shimizu y col., Hepatology, 23, págs. 205-209, 1996; Wong y col., J. Virol., 75, págs. 1.229-1.235, 2001; Caussin-Schwemling y col., J. med. Virol., 65, págs. 14-22, 2001; Arrieta y col., Am. J. Pathol., 158, págs. 259-264, 2001; Steffan y col., Microb. Infect. 3, págs. 193-202, 2001; Bartolomé y col., J. Med. Virol. 80, págs. 1.588-1.594, 2008). Ningún dato sugería que los fibroblastos intrahepáticos fuesen sensibles y permisibles a la infección por el VHC.

De este modo, un primer objeto de la presente invención se refiere a un método de obtención de fibroblastos intrahepáticos infectados por el virus de la hepatitis C que comprende una etapa de aislamiento de los fibroblastos intrahepáticos a partir de un tejido hepático proveniente de un paciente VHC-positivo.

Se entiende por « paciente VHC-positivo » cualquier persona que, al extraerle tejido hepático, está infectada por el VHC. Puede tratarse, en particular, de un paciente afectado por una hepatitis C crónica.

Los fibroblastos intrahepáticos se pueden aislar mediante diferentes métodos conocidos en sí mismos, por ejemplo el que describen Tiggelman MBC y col. (J. Hepatol., 23, págs. 307-317, 1995) o el que describen Win K. M. y col. (Hepatology, 18, págs. 137-145, 1993). Estas células pueden caracterizarse y diferenciarse fácilmente de otros tipos

de células, en particular mediante el método descrito por Aoudjehane y col (Lab. Invest., 88, págs. 973-985, 2008). Por otra parte, al ser los fibroblastos intrahepáticos células activadas que expresan la alfa-SMA y la vimentina, estos marcadores permiten caracterizarlos, en asociación con la presencia de la molécula de superficie CD90 y la ausencia de la molécula CD31.

5 Los inventores también han constatado que los fibroblastos intrahepáticos podían infectarse *in vitro* por el VHC. Por lo tanto, la invención también tiene por objeto otro método de obtención de fibroblastos intrahepáticos infectados por el virus de la hepatitis C que comprende una etapa de puesta en contacto *in vitro* de fibroblastos intrahepáticos con partículas infecciosas del virus de la hepatitis C. Las reservas de partículas virales infecciosas pueden provenir de sueros de pacientes o de cultivo *in vitro* del virus. En este último caso, las partículas infecciosas pueden ser en particular las partículas VHC-JFH1 producidas al transfectar el RNA genómico transcrito a partir del plásmido pJFH-1  
10 en células Huh-7.5 (Wakita y col., Nat. Med., 11, págs. 791-796, 2005). También se pueden utilizar otras partículas infecciosas distintas del VHC-JFH1, que expresan genotipos diferentes o genotipos quiméricos, en particular las que describen Gottwein y col., (Gastroenterology, 133, págs. 1.614-1.626, 2007) y Pietschmann y otros (P.N.A.S., 103, págs. 7.408-7.413, 2006).

15 Los fibroblastos intrahepáticos infectados por el virus de la hepatitis C, en particular los que se obtienen mediante los métodos descritos con anterioridad, también forman parte de la presente invención. Por «fibroblastos intrahepáticos infectados por el virus de la hepatitis C», se entiende, no solo los fibroblastos intrahepáticos infectados tras la fijación del virus a la célula y la penetración de la partícula viral en la célula, sino también cualquier célula que comprenda el ARN genómico (cadena de polaridad positiva) y/o el ARN anti-sentido (cadena de polaridad negativa) del VHC, o  
20 cualquier otro ARN que comprenda todo o parte del ARN genómico del VHC y que conserve la capacidad de replicarse en la célula, por ejemplo los replicones bicistrónicos descritos por Lohmann y col., (Science, 285, págs. 110-113, 1999).

Otro objeto de la presente invención se refiere a un método de replicación *in vitro* del genoma del virus de la hepatitis C que comprende una etapa de cultivo *in vitro* de fibroblastos intrahepáticos aislados infectados por el virus de la hepatitis C. De manera ventajosa, los fibroblastos intrahepáticos aislados infectados se obtienen por medio de los métodos de acuerdo con la invención definidos con anterioridad. Las condiciones óptimas de cultivo las puede  
25 determinar fácilmente el experto en la materia mediante trabajos rutinarios.

Por otra parte, al infectarse los fibroblastos intrahepáticos *in vivo* y al ser responsables de la fibrosis hepática, resulta esencial someter a ensayo los fibroblastos intrahepáticos infectados como dianas de medicamentos contra el VHC o de medicamentos que buscan reducir las lesiones hepáticas inducidas por el VHC, y en particular la fibrosis.  
30

La invención también se refiere, por lo tanto, a un método de selección de moléculas contra el VHC que comprende las siguientes etapas:

- poner en contacto fibroblastos intrahepáticos infectados por un virus de la hepatitis C, como se ha definido con anterioridad, con la molécula a ensayar;
- 35 - medir la replicación del genoma del VHC y/o la producción de partículas del VHC, en particular en el sobrenadante de cultivo.

Cuando se mide la replicación del genoma viral, se cuantifica la cadena de ARN de polaridad positiva y/o la cadena de ARN de polaridad negativa del VHC.

La producción de partículas virales se puede medir mediante diferentes métodos conocidos en sí mismos, por ejemplo, las técnicas de inmunodetección, en particular mediante la cuantificación de las proteínas estructurales (C, E1, E2) en el sobrenadante, o mediante la observación por microscopía electrónica tras el enriquecimiento mediante un gradiente de densidad (Lindenbach B. D. y col., Science, 309, págs. 623-626, 2005).  
40

La invención también tiene por objeto un método de selección de moléculas antifibrogénesis que comprende las siguientes etapas:

- 45 - poner en contacto fibroblastos intrahepáticos infectados por un virus de la hepatitis C, como se ha definido con anterioridad, con la molécula a ensayar;
- medir la expresión de dichos fibroblastos intrahepáticos de al menos un gen implicado en la fibrosis.

Por « gen implicado en la fibrosis » se entiende cualquier gen que se exprese en los fibroblastos intrahepáticos activados y que contribuya a la fibrogénesis responsable de la fibrosis hepática (para revisión véase la publicación World. J. Gastroenterol., 15 (20), págs. 2.433-2.440, 28 de mayo de 2009, y en particular la Tabla 1). Se citarán en particular los genes de los colágenos de tipo I, III, IV y V.  
50

De manera ventajosa, los dos métodos de selección anteriores comprenden, además, una etapa de comparación del resultado de la medición obtenida con los fibroblastos intrahepáticos infectados por el VHC puestos en contacto con la molécula a ensayar, con el que se obtiene con fibroblastos intrahepáticos infectados por el VHC que no han estado en contacto con la molécula a ensayar.  
55

Las principales clases de medicamentos que pueden someterse a ensayo son, en particular i) los antivirales, que pueden reducir la infección de los hepatocitos, pero cuyo efecto sobre los fibroblastos se desconoce, ii) los medicamentos antifibróticos, que solo se han sometido a ensayo en fibroblastos no infectados, iii) los inmunosupresores, que pueden modular a la vez la replicación del VHC y la activación de los fibroblastos.

5 Por otra parte, al infectarse los fibroblastos intrahepáticos *in vivo* y al ser responsables de la fibrosis hepática, es al menos tan importante considerar tanto los FIH como los hepatocitos para someter a ensayo la toxicidad de los medicamentos que se van a utilizar en los pacientes portadores del VHC. Otro objeto de la invención se refiere, por lo tanto, a un método de evaluación de la toxicidad de una molécula con respecto a los fibroblastos hepáticos de un paciente afectado por la hepatitis C, que comprende las siguientes etapas:

- 10 - poner en contacto fibroblastos intrahepáticos infectados por un virus de la hepatitis C o fibroblastos intrahepáticos que comprenden el genoma de un virus de la hepatitis C o un replicón de este, con la molécula a ensayar;
- evaluar la mortalidad de dichos fibroblastos intrahepáticos en contacto con la molécula a ensayar.

15 Por mortalidad celular se entiende la apoptosis y/o la necrosis de las células. Las técnicas que permiten evaluar la mortalidad celular se conocen bien en sí mismas. Se trata en particular de la citometría de flujo tras el marcado con la anexina V y el yoduro de propidio, y de la técnica TUNEL (inmunocitoquímica), técnicas descritas en el artículo de Aoudjehane y col. (FASEB J., 21 (7), págs. 1.433- 1.444, 2007).

De manera ventajosa, las fibroblastos intrahepáticos, en los que se ensaya la toxicidad de una molécula, son fibroblastos intrahepáticos infectados por el virus de la hepatitis C, como se han definido con anterioridad.

20 La presente invención se entenderá mejor mediante la siguiente descripción complementaria, que se refiere a ejemplos no limitativos que ilustran, en particular, el aislamiento de fibroblastos intrahepáticos (FIH) infectados *in vivo* por el virus de la hepatitis C, la infección *in vitro* de FIH por el VHC, y la puesta de manifiesto de que la infección de los fibroblastos intrahepáticos por el VHC induce la expresión de los colágenos I, III y IV.

#### **Ejemplo 1: aislamiento y cultivo de fibroblastos intrahepáticos humanos (FIH)**

25 Se han aislado fibroblastos intrahepáticos (FIH) a partir de tejidos hepáticos provenientes o bien de pacientes que han experimentado una hepatectomía por metástasis o tumores benignos, o bien de pacientes que padecen una infección crónica por el virus de la hepatitis C y que han desarrollado un hepatocarcinoma u otro tipo de tumores. Los tejidos hepáticos extirpados durante una hepatectomía mayor se han extirpado lo más lejos posible del tumor, evitando la zona peritumoral inmediata. La disociación de los tejidos se ha realizado mediante un método de perfusión de colagenasa en dos etapas, separándose las células por centrifugación en gradiente, como describen Hillaire y col. (Gastroenterology, 107, págs. 781-788, 1994).

30 Los vasos visibles se perfundieron, en primer lugar, por medio de un tampón HEPES-EDTA, a continuación con la solución Liver Digest (Gibco, Cergy-Pontoise, Francia) que comprende un 0,05 % de colagenasa, a razón de 10 ml por catéter por minuto durante 30 minutos. Los fragmentos de hígado se han agitado entonces suavemente para liberar las células hepáticas sueltas y a continuación se han filtrado y centrifugado. Los hepatocitos se han aislado a partir del sedimento, mientras que los fibroblastos intrahepáticos se han aislado a partir del sobrenadante. Los fibroblastos intrahepáticos se han separado de las otras células del sobrenadante por centrifugación a 1.800 rpm durante 10 minutos como describen Win K. M. y col. (Hepatology, 18, págs. 137-145, 1993). La viabilidad celular se ha determinado mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano, y los fibroblastos intrahepáticos se han sembrado en una placa de cultivo en medio DMEM (Gibco) complementado con 10 % de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina y se han cultivado a 37 °C en una atmósfera al 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se ha sustituido un día después de la siembra. En confluencia, se han cultivado las células de nuevo y se han mantenido en un frasco de 75 cm<sup>2</sup>.

35 La pureza de los fibroblastos intrahepáticos en cultivo se ha analizado mediante citometría de flujo, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia como han descrito con anterioridad Aoudjehane y col. (Lab. Invest., 88, págs. 973-985, 2008). De este modo, se han evaluado la pureza y la activación de los fibroblastos intrahepáticos midiendo la expresión de la alfa-SMA, marcador de las células hepáticas estrelladas, y de la vimentina un marcador de las células de origen mesenquimatoso. Además, también se han caracterizado los fibroblastos intrahepáticos mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia midiendo la expresión de CD90, un marcador de fibroblastos, y de CD31, un marcador de células endoteliales. Más del 95 % de las células poseían el marcador CD90 y únicamente un 1 % de las células presentaban el marcador CD31, lo que indica que el cultivo de fibroblastos intrahepáticos aislados mediante el método descrito con anterioridad es casi puro.

45 En los experimentos que se describen a continuación, solo se han utilizado las células procedentes de los paseos dos a seis. Además, cada experimento se ha realizado a partir de células provenientes de al menos seis hígados humanos diferentes.

**Ejemplo 2: evaluación de la expresión de cd81 y del receptor del LDL (LDL-R) en la superficie de los fibroblastos intrahepáticos humanos (fih)**

Se ha evaluado la expresión de CD81 y del receptor LDL-R mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo.

2.1 Evaluación mediante *inmunohistoquímica*

5 Los fibroblastos intrahepáticos se han cultivado sobre un portaobjetos en placas de seis pocillos ( $2 \cdot 10^4$  células por pocillo) en medio DMEM (Gibco) complementado con 10 % de suero bovino fetal y a continuación se han fijado en PBS que contiene 4 % de paraformaldehído. De manera alternativa, cuando las células se cultivan en una placa, las células se vuelven a poner en suspensión en PBS y a continuación se citocentrifugan en portaobjetos SuperFrost Plus Slides (CML, Nemours, Francia). Las células se secan entonces al aire durante la noche a temperatura ambiente, se fijan durante 10 minutos con acetona y a continuación se utilizan directamente o se conservan a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta el análisis mediante inmunohistoquímica.

15 La expresión de la molécula de superficie CD81 y del receptor LDL-R se ha estudiado mediante una técnica inmunoenzimática indirecta que utiliza un complejo fosfatasa alcalina/antifosfatasa alcalina como han descrito con anterioridad Conti y col. (Transplantation, 76, págs. 210-216, 2003). En pocas palabras, la detección de CD81 se ha realizado por medio de un anticuerpo monoclonal anti-CD81 diluido al 1/50 utilizado como anticuerpo primario y de una IgG de conejo anti-ratón utilizado como anticuerpo secundario. Para detectar el receptor LDL-R, se han utilizado anticuerpos policlonales anti-LDL-R diluidos al 1/10 e IgG de ratón anti-conejo respectivamente como anticuerpo primario y secundario. A continuación se ha incubado la placa en presencia de complejos fosfatasa alcalina/antifosfatasa alcalina, y se ha revelado la actividad fosfatasa alcalina 20 minutos en soluciones de fast-red TR (1 mg/ml) y de naftol fosfato (0,2 mg/ml) (Sigma, Saint Quentin-Fallavier, Francia) que contiene 0,24 g/ml de lavamisol. Para finalizar, se realizó tinción de contraste de las placas con hematoxilina (tinción nuclear). También se han analizado controles negativos, para los cuales el anticuerpo primario se había omitido o reemplazado por un anticuerpo no específico. Además, también se ha analizado un control positivo, es decir, células PBMC que expresan de forma natural en su superficie la molécula CD81 y el LDL-R.

25 Los resultados del análisis mediante inmunohistoquímica se presentan en la Figura 1. Las Figuras 1.A a 1.C son fotografías en blanco y negro de fibroblastos intrahepáticos fijados en placas de control (no tratadas con los anticuerpos anti-CD81 o anti-LDL-R), las Figuras 1B y 1D representan los resultados obtenidos para los fibroblastos intrahepáticos fijados en placas tratadas respectivamente con los anticuerpos anti-CD81 y anti-LDL-R.

30 Esta figura muestra que las células de control no están teñidas (aparecen en gris claro en las Figuras 1.A y 1.C) mientras que las células puestas en contacto con un anticuerpo anti-CD81 o con un anticuerpo anti-LDL-R están teñidas (aparecen en gris oscuro en las Figuras 1.B y 1.D), lo que indica que los anticuerpos se fijan en la superficie celular.

Estos resultados indican, por lo tanto, que los fibroblastos intrahepáticos expresan en la superficie celular la molécula CD81 y el LDL-R, los dos receptores supuestos del VHC.

35 Hay que señalar que, como se esperaba, las células PBMC (control positivo) se han marcado por los anticuerpos anti-CD81 y anti-LDL-R (resultados no presentados).

2.2 Evaluación mediante citometría de flujo

40 Los niveles de expresión de la molécula CD81 y del LDL-R también se han analizado mediante citometría de flujo. Para ello, las células se han puesto en contacto con un anticuerpo de conejo anti-LDL-R humano o con un anticuerpo de ratón anti CD-81 humano durante 60 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . A continuación se han lavado e incubado las células respectivamente con un anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón. A continuación se han lavado las células en PBS y luego se han fijado en PBS que contiene 4 % de paraformaldehído. Se ha utilizado un anticuerpo conjugado con un fluorocromo no específico de CD81 o LDL-R como control negativo. A continuación se han analizado las células mediante FACS. Los experimentos se han realizado al menos 3 veces.

45 Los resultados del análisis mediante citometría de flujo obtenidos para CD81 y LDL-R se presentan respectivamente en las Figuras 2 y 3. En estas figuras, el número de sucesos (número de células) se indica en ordenadas, la intensidad de fluorescencia (que corresponde al marcado de las células con el anticuerpo anti-CD81 o al anticuerpo anti-LDL-R) se representa en abscisas.

50 El análisis del pico de distribución indica que más del 95 % de los fibroblastos intrahepáticos están marcados por el anticuerpo anti-CD81 (véase la figura 2.A) y más del 70 % están marcados por el anticuerpo anti-LDL-R (véase la figura 3.A), mientras que los controles negativos no presentan ningún marcado (figuras 2.B y 3.B).

Estos resultados confirman que los fibroblastos intrahepáticos expresan en su superficie celular el CD81 y el LDL-R.

**Ejemplo 3: evaluación de la infección de fibroblastos intrahepáticos humanos (FIH) por el VHC**3.1. Preparación de reservas de VHC-JFH1

Se cultivaron líneas hepatocelulares Huh-7 o Huh-7.5.1 (Zhong y otros, P.N.A.S., 102, págs. 9.294- 9.299) a 37 °C en atmósfera húmeda y al 5 % de CO<sub>2</sub> en medio DMEM (Invitrogen) complementado con 10 mM de HEPES (pH 7,3), aminoácidos no esenciales (Invitrogen), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen) y 10 % de suero bovino fetal inactivado. Las partículas virales VHC resultantes de la infección de células Huh-7 se prepararon utilizando el método descrito por Wakita y col. (Nat. Med., 11, págs. 791- 796, 2005). En pocas palabras, las células se han transfectado con el RNA genómico obtenido por transcripción *in vitro* a partir del plásmido pJFH1. Después de varios pases se ha extraído el sobrenadante de cultivo cuando la titulación viral alcanzaba al menos 1.10<sup>5</sup> unidades formadoras de focos por ml. La valoración se realiza como describen Pène y col. (J. Virol. Hepat., 2009). Para ciertas preparaciones de VHC-JFH1, se ha realizado una amplificación adicional del virus infectando células Huh-7.5.1. Se han filtrado las reservas de sobrenadante que contienen los virus en membranas de 0,45 µm y a continuación se han concentrado por ultrafiltración en una membrana que tiene un umbral límite de 100.000 daltons. Se han dividido entonces las reservas virales en partes alícuotas y se han conservado a -80 °C. Las reservas se han evaluado como describen Pène y col. (J. Virol. Hepat., 2009). En pocas palabras, se han cultivado células Huh-7.5.1 en presencia de dilución en serie de reservas virales filtradas, a continuación, 3 días después de la inoculación, la infección de las células se ha evaluado mediante inmunofluorescencia *in situ*. Las células infectadas por el VHC aparecen como pequeños grupos de células, considerándose cada grupo como un foco infeccioso. El título infeccioso se expresa en unidades formadoras de focos (en lo sucesivo abreviado « ffu ») por ml de reserva, determinado por el número de focos en la dilución más grande.

3.2. Infección de fibroblastos intrahepáticos por el VHC

Los fibroblastos intrahepáticos se han infectado un día después de su puesta en cultivo por el VHC-JFH1 a una multiplicidad de infección de 0,1 ffu por célula. Después de una noche de incubación a 37 °C, se han lavado las monocapas celulares tres veces con un tampón fosfato salino y a continuación se han cultivado en condiciones estándar (Aoudjehane y col, Lab. Invest., 88, págs. 973-985, 2008) en medio DMEM (Gibco) al 10 % de SVF en presencia de penicilina y de estreptomycin (1 %) así como de piruvato (1 %).

## A. Análisis de la replicación del genoma del VHC en los fibroblastos intrahepáticos

Con el fin de determinar si el genoma del VHC puede replicarse en fibroblastos intrahepáticos inoculados por VHC-JFH1, se han cuantificado las cadenas de ARN positivo (ARN genómico) y las cadenas de ARN negativo (ARN antisentido). Para ello, se han extraído las células en los días D3, D6 y D9 después de la infección, se han lavado en tampón PBS, a continuación se han preparado usando del kit de extracción « RNeasy minikit » (QIAGEN S. A., Courtaboeuf, Francia) siguiendo las recomendaciones del fabricante, habiéndose lisado la células en 300 µl de tampón para 3.10<sup>5</sup> células. Se han cuantificado los ARN intracelulares mediante una RT-PCR cuantitativa específica de cada cadena como han descrito Carriere y col. (J. Med. Virol., 79, págs. 155-160, 2007). Los resultados de esta cuantificación se presentan en la Figura 4.

La Figura 4 es un histograma que muestra los resultados obtenidos para la cuantificación de la cadena de ARN positivo (barras negras) y la cuantificación de la cadena de ARN negativo (barras grises). El número de copias de la cadena de ARN por µg de ARN total se indica en ordenadas, el número de días después de la inoculación se indica en abscisas.

Estos resultados muestran que los ARN positivos, pero también los ARN negativos (ARN presentes únicamente cuando se produce la replicación del VHC), se pueden detectar 3 días después de la inoculación. Esto indica claramente que el VHC se puede replicar de forma eficaz en los fibroblastos intrahepáticos.

## B. Análisis de la expresión del genoma del VHC en los fibroblastos intrahepáticos

Para determinar si la poliproteína del VHC se traduce y madura en los fibroblastos intrahepáticos, se analizó la expresión de la proteasa NS3 y de la proteína capsidial del VHC por transferencia Western. Se lavaron fibroblastos intrahepáticos infectados o no infectados (control) en PBS frío y a continuación se sometieron a lisis en cajas de cultivo mediante la adición de tampón Laemmli que comprendía 1,2 % de β-2 mercaptoetanol (40 mM de tris-HCl, pH 6,8, 5 mM de DTT, 1 % de SDS, 7,5 % de glicerol y 0,01 % de azul de bromofenol). Después de hervir el lisado celular, las muestras (que comprendían 50 mg de proteínas totales por pocillo) se sometieron a migración en condiciones reductoras en gel de poliacrilamida al 15 %-dodecil sulfato de sodio (para el análisis de la proteína capsidial) o en gel de poliacrilamida al 10 % (para análisis de la proteína NS3), a continuación se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas de nitrocelulosa se saturaron durante 1 hora en PBS que comprendía 5 % de leche y 0,1 % de Tween 20, a continuación se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-cápside de VHC (anticuerpo C7-50, Alexis Biochemicals) diluido al 1:1.000 o con un anticuerpo de ratón anti-NS3 de VHC (anticuerpo 1847, Virostat, Protland, MA) diluido al 1:100. Después, las membranas se lavaron, se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa diluida al 1:5.000, se lavaron y después se incubaron con un reactivo quimioluminiscente (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). Los resultados

se representan en la Figura 5.

La Figura 5 muestra que la proteína capsial (« core ») se puede detectar el día D3 y D9. Esta proteína aparece en forma de una sola banda de 21 kDa, se trata probablemente de la forma madura de la cápside. La proteasa NS3 se puede detectar el día D3 y posee la masa molecular esperada (70 kDa).

- 5 Este experimento confirma que la poliproteína del VHC se expresa y madura correctamente en los fibroblastos intrahepáticos inoculados con el VHC-JFH1.

#### C. Análisis del potencial infeccioso de los sobrenadantes de cultivo

10 Los resultados anteriores demuestran que el genoma del VHC puede replicarse y expresar las proteínas del VHC en los fibroblastos hepáticos, se estudió la capacidad del VHC para multiplicarse y para producir nuevas partículas infecciosas. Para ello, se ha determinado la presencia de ARN positivo y negativo en el sobrenadante de cultivo de células infectadas como se ha descrito con anterioridad. La Figura 6 es un histograma que muestra los resultados obtenidos para la cuantificación de la cadena de ARN positivo. El número de copias de la cadena de ARN positivo por ml de sobrenadante se indica en ordenadas, el número de días posteriores a la inoculación se indica en abscisas. Tres días después de la infección, se puso de manifiesto el ARN (ARN genómico), disminuyendo la cantidad con el tiempo. Por el contrario, no se ha detectado la cadena de ARN negativo, que nunca está presente en las partículas virales. Esto indica que el ARN genómico presente en el sobrenadante no se ha liberado en el medio mediante un mecanismo no-específico, sin el cual el ARN negativo probablemente también se habría detectado.

Sin embargo, el sobrenadante se ha mostrado no infeccioso durante la inoculación de células Huh-7.5.1.

#### **Ejemplo 4: neutralización de la infección de fibroblastos intrahepáticos humanos (FIH)**

##### 20 4.1 Ensayo de neutralización mediante anticuerpos anti-CD81

Numerosos resultados publicados estos últimos años muestran que la molécula CD81 sería un receptor de superficie del VHC esencial para su fijación en la célula y para su entrada. Con el fin de determinar si la infección de los fibroblastos intrahepáticos por el VHC-JFH1 depende de la molécula de superficie CD81, se preincubaron fibroblastos intrahepáticos durante una hora a 37 °C con cantidades en aumento de anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD81 humano o de anticuerpos no específicos (control). Se lavaron las células y a continuación se infectaron con el VHC-JFH1 a una multiplicidad de infección de 0,1 ffu por célula. Con el fin de evaluar el porcentaje de neutralización, se determinaron las cantidades de ARN positivo y negativo intracelulares, así como la cantidad de ARN positivo extracelular en el sobrenadante, tres días después de la infección como se ha descrito en el punto 2.3.A. Los resultados se presentan en la Figura 7.

30 La figura 7.A es un histograma que muestra los resultados obtenidos para la cuantificación de la cadena de ARN positivo (barras negras) y la cuantificación de la cadena de ARN negativo (barras grises) intracelulares. El número de copias de la cadena de ARN por µg de ARN total se indica en ordenadas, la concentración de anti-CD81 se indica en abscisas. Esta figura muestra una gran reducción de la cantidad de ARN de cadena positiva y de ARN de cadena negativa cuando las células se preincuban con 10 µg de anti-CD81 por ml de medio de cultivo con respecto al control: fibroblastos intrahepáticos infectados incubados con un anticuerpo no-específico extraídos 3 días después de la incubación (barras D3). Del mismo modo, la Figura 7B, que es un histograma que representa los resultados obtenidos para la cuantificación de la cadena de ARN positivo extracelular, muestra que la cantidad de ARN positivo en el sobrenadante de cultivo disminuye de manera dependiente de la dosis.

40 Estos resultados muestran que la infección de los fibroblastos intrahepáticos por el VHC-JFH1 depende mayoritariamente de la presencia de CD81 en la superficie de las células, lo que indica que el VHC infecta las células utilizando el CD81 como principal receptor celular.

##### 4.2 Ensayo de neutralización mediante el interferón-alfa

45 El interferón-alfa inhibe la replicación del VHC en los hepatocitos infectados *in vitro* y se utiliza desde hace muchos años para tratar a los pacientes afectados por hepatitis C, se preincubaron fibroblastos intrahepáticos durante una hora a 37 °C en presencia de 500 U/ml de interferón- alfa, se lavaron y se infectaron con el VHC- JFH1 a una multiplicidad de infección de 0,1 ffu por célula. Los resultados se presentan en la Figura 8. Esta figura muestra que las cantidades de ARN de cadena positiva y de ARN de cadena negativo disminuyen cuando las células se preincuban con el interferón-alfa.

#### **Ejemplo 5: evaluación de la apoptosis inducida durante la infección de los fibroblastos intrahepáticos humanos (FIH) por el VHC**

50 Con el fin de determinar si la infección por el VHC induce la apoptosis de los fibroblastos intrahepáticos, se ha realizado un ensayo *in vitro* de apoptosis Anexina V-FITC utilizando el kit Annexine V-FITC (Immunotech, Marsella, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo se basa en la externalización de la fosfatidilserina mediante las células apoptóticas, y en la fijación de la Anexina V-FITC en esta molécula. También se ha

determinado la necrosis efectuando una tinción de contraste con yoduro de propidio. Después de 48 horas de cultivo, los fibroblastos intrahepáticos se infectaron con el VHC-JFH1 a una multiplicidad de infección de 0,1 ffu por célula, o se trataron con 20  $\mu$ M de C2-Ceramide (Sigma) (control positivo de apoptosis). A los 3, 6 y 9 días después de la infección, las células se suspendieron en un tampón de unión que contenía  $Ca^{2+}$  y se incubaron con 1  $\mu$ g/ml de Anexina V-FITC y 1  $\mu$ g/ml de yoduro de propidio. La señal emitida por el FITC (isotiocianato de fluorosceína) se midió entonces mediante citometría de flujo con el fin de determinar la apoptosis, la necrosis se determina entonces midiendo el número de células marcadas con yoduro de propidio. Se muestra que la infección por el VHC-JFH1 induce la apoptosis de un número mínimo de fibroblastos intrahepáticos y que la infección no es tóxica para los fibroblastos intrahepáticos (resultados no presentados).

**Ejemplo 6: efecto de la infección por el VHC sobre la proliferación de fibroblastos intrahepáticos humanos y la expresión de genes implicados en la fibrosis**

6.1. Evaluación de la proliferación de fibroblastos intrahepáticos tras la infección por el VHC

Se sembraron fibroblastos intrahepáticos en placas de 96 pocillos ( $5 \cdot 10^4$  células por pocillo) en un medio DMEM (Gibco) asérico. Cuarenta y ocho h después de la siembra, las células se infectaron con el VHC-JFH1 a una multiplicidad de infección de 0,1 ffu por célula. También se realizó un control de células no infectadas. La proliferación celular se midió después de 16 horas de cultivo en presencia de timidina tritiada [3H] (1  $\mu$ Ci/pocillo) utilizando un contador de escintilación. Estos resultados se presentan en la Figura 9.

La figura 9 es un histograma en el que el control de células no infectadas se representa por las barras negras y los ensayos relativos a las células infectadas se representan por las barras grises. El número de recuentos por minuto (« CCPM1 ») se indica en ordenadas y en abscisas, se precisa el número de días después de la infección. Esta figura muestra que la proliferación se inhibe de forma significativa ( $P = 0,01$ ) tres días después de la infección con respecto al control de células no infectadas. Sin embargo, 6 días después de la infección las células infectadas proliferan de forma significativa más que el control ( $p = 0,02$ ). Nueve días después de la infección, las células alcanzan la confluencia y los resultados ya no se pueden interpretar.

6.2. Análisis de la expresión de genes del colágeno de tipo I y de tipo IV, y del alfa-SMA en fibroblastos intrahepáticos infectados por el VHC

Se analizó la expresión de los genes del GAPDH, del colágeno de tipo I, del colágeno de tipo IV, del alfa-SMA, así como la expresión de los genes del HNF-1 $\beta$ , del Citocromo P450 y de la albúmina, mediante RT-PCR utilizando el kit « DNA Fast Start SYBR green » (Roche Diagnostics), y el equipo LightCycler® (Roche Diagnostics), en los fibroblastos intrahepáticos no-infectados (control) o infectados por el VHC.

Se realizó amplificación por PCR en un volumen total de 20  $\mu$ l/ml en capilar que contenía 20 ng de cada cebador de los pares de cebadores descritos en la siguiente Tabla I (Sigma-Genosys Ltd.), 3 mM de  $MgCl_2$ , 2  $\mu$ l de composición Light Cycler Fast Start Master SYBR Green (que contenía 1,25 unidades de polimerasa Fast StartTaq, tampón Taq 10X, 2 mM de cada uno de los dNTP, 10 ml de SYBR Breen 10X (Roche Diagnostics) y 2  $\mu$ l de ADNc (previamente diluido a 1/10) procedente de cada cepa y obtenido como describen Zhong y col. (P.N.A.S., 102, págs. 9.294-9.299, 2005) y col (J. Med. Virol., 79, págs. 155-160, 2007).

**Tabla I**

Gen	Cebadores: secuencia en sentido (+) secuencia antisentido (-)	SEC.ID (Nº)
GAPDH	(+) 5'-ACAGTCCATGCCATCACTGCC-3'	(1)
	(-) 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'	(2)
Colágeno de tipo I	(+) 5'-CCTCAAGGGCTCCAACGAG-3'	(3)
	(-) 5'-TCAATCACTGTCTTGCCCCA-3'	(4)
Colágeno de tipo IV	(+) 5'-ATGTCAATGGCACCCATCAC-3'	(5)
	(-) 5'-CTTCAAGGTGGACGGCGTAG-3'	(6)
Alfa-SMA	(+) 5'-TGAAGAGCATCCCACCCT-3'	(7)
	(-) 5'-ACGAAGGAATAGCCACGC-3'	(8)
HNF-1 $\beta$	(+) 5'-GAAACAATGAGATCACTTCCTC-3'	(9)
	(-) 5'-CTTTGTGCAATTGCCATGACTC-3'	

		(10)
Citocromo P450	(+) 5'-AGCACAACCTCTGAGATATGG-3'	(11)
	(-) 5'-ATAGTCACTGTACTTGAACCT-3'	(12)
Albúmina	(+) 5'-TTAGGATCCCCCAGGAAGACATCCTTTGC-3'	(13)
	(-) 5'-CCTGAGCCAGAGATTTCC-3'	(14)

La amplificación se realizó en las siguientes condiciones:

- 5 - desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 min;
- 40 ciclos de amplificación comprendiendo cada uno 3 fases:
  - 10 i) 95 °C durante 10 segundos (desnaturalización);
  - ii) hibridación de los cebadores con el ADN durante 5 segundos a 70 °C para el GAPDH, 58 °C para el colágeno de tipo I, 65 °C para el colágeno de tipo IV, 63 °C para el alfa-SMA, 66 °C para el HNF-1 $\beta$ , 60 °C para el CP450, 70 °C para la albúmina;
  - 10 iii) 72 °C durante 5 segundos (polimerización).

El nivel de expresión relativo a los ARNm del colágeno IV, del alfa-SMA, del HNF-1 $\beta$ , del CP450 y de la albúmina se calculó utilizando el método del « 2 <sup>$\Delta\Delta CT$</sup>  » descrito por Livak y Schmittgen (Methods, 25, págs. 402-408, 2001).

15 Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 10. La expresión del colágeno de tipo I, del colágeno de tipo IV y del alfa-SMA se representa respectivamente por las barras negras, gris oscuro y gris claro. La expresión relativa se indica en ordenadas. El origen de la muestra, es decir, células no infectadas (C control) o células infectadas, se precisa en abscisas (« C » para control y « J » para los ensayos de células infectadas). También se precisa el día después de la infección en el que se ha extraído la muestra. Esta figura muestra que en D3, la expresión del colágeno de tipo I, del colágeno de tipo IV y del alfa-SMA por las células infectadas es inferior a la de las células no infectadas. Sin embargo, los días 6 y 9 posteriores a la infección, la expresión de estos tres genes es significativamente superior a la del control de células no infectadas ( $p = 0,02$ )

El conjunto de los resultados presentados en el ejemplo 6 indica que en los fibroblastos intrahepáticos infectados por el VHC-JFH1 la proliferación y la activación celular se inhiben en un primer momento, para aumentar después.

#### Ejemplo 7: aislamiento de fibroblastos intrahepáticos humanos infectados *in vivo* por el VHC

25 Se aislaron fibroblastos intrahepáticos de hígado de pacientes infectados por el VHC como se ha descrito en el ejemplo 1. La pureza de los fibroblastos intrahepáticos se evaluó midiendo la expresión del alfa-SMA, marcador de células hepáticas estrelladas, y de la vimentina, un marcador de células de origen mesenquimatoso. Por otra parte, también se caracterizaron los fibroblastos intrahepáticos midiendo la expresión de CD90 y de CD31. Con el fin de excluir una contaminación de fibroblastos intrahepáticos por hepatocitos infectados, se cuantificaron los ARNm de tres genes específicamente expresados por los hepatocitos. Estos tres genes son:

- 30 i) el gen del factor de transcripción HNF-4 (« hepatocyte nuclear factor »), regulador clave en el mantenimiento del fenotipo hepatocito;
- ii) el gen de la albúmina, que se expresa en los hepatocitos primarios;
- iii) el gen CYP2E1, un marcador de la función de desintoxicación de los hepatocitos.

35 Los resultados se presentan en la Figura 11. El número de pases se precisa en abscisas (« p0 », « p1 »). FIH, FIH2 y FIH4 representan diferentes lotes de fibroblastos intrahepáticos. Como se muestra en esta figura, mientras que el control de hepatocito humano (« HH ») expresa cada uno de estos genes, los fibroblastos intrahepáticos no expresan ninguno de estos 3 genes, ni siquiera después de un pase.

Por lo tanto, los fibroblastos intrahepáticos aislados de hígado de pacientes infectados por el VHC no se han contaminado con los hepatocitos infectados durante su aislamiento.

40 Con el fin de determinar si los fibroblastos intrahepáticos aislados de pacientes VHC positivos están infectados por el VHC, los ARN positivos y negativos intracelulares del VHC se cuantificaron como se ha descrito en el ejemplo 3.2.A. Además, se cuantificó el RNA positivo en el sobrenadante.

45 Los resultados se presentan en la Figura 12. En la figura 12.A, que representa los resultados de la cuantificación de los RNA virales intracelulares, el número de copias de ARN positivo (barras negras) y de ARN negativo (barras grises) se indica en ordenadas (en log<sub>10</sub> por  $\mu\text{g}$  de ARN total), en abscisas se precisa el número de pasos (« p0 », « p1 », « p2 »). Esta figura muestra que los fibroblastos intrahepáticos aislados expresan aproximadamente  $1.10^5$  cadenas de ARN positivo por  $\mu\text{g}$  de ARN total y por lo tanto se infectan efectivamente *in vivo* por el VHC. Además, la

detección de  $1.10^4$  cadenas de ARN negativo por  $\mu\text{g}$  de ARN total muestra en efecto que el VHC se replica en los fibroblastos intrahepáticos *in vivo*. Después de un pase de células, el número de ARN positivo disminuye, y continúa disminuyendo durante pases sucesivos.

5 La Figura 12.B muestra los resultados obtenidos para la cuantificación de la cadena de ARN positivo en el sobrenadante. El número de copias de la cadena de ARN positivo por ml de sobrenadante se indica en ordenadas, el número de pases se indica en abscisas. El ARN genómico está muy presente en el sobrenadante, siguiendo la evolución del número de cadenas positivas la observada en el caso de los RNA virales intracelulares.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> UNIVERSITE PARIS DESCARTES
- <120> MÉTODO DE OBTENCIÓN DE FIBROBLASTOS INTRAHEPÁTICOS INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C
- 15 <130> F1405-6WO
- <160> 14
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 21
- 20 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Cebador en sentido de GAPDH
- <400> 1
- 25 acagtcctatg ccatcactgc c 21
- <210> 2
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 30 <220>
- <223> Cebador antisentido de GAPDH
- <400> 2
- gcctgcttca ccaccttctt g 21
- <210> 3
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Cebador en sentido del colágeno de Tipo I
- 40 <400> 3
- cctcaagggc tccaacgag 19
- <210> 4
- <211> 20
- <212> ADN
- 45 <213> Artificial
- <220>
- <223> Cebador antisentido del colágeno de Tipo I

ES 2 437 922 T3

<400> 4  
tcaatcactg tcttgcccca 20

5  
<210> 5  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador en sentido del colágeno de Tipo IV

10  
<400> 5  
atgtcaatgg cacccatcac 20

15  
<210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador antisentido del colágeno de Tipo IV

20  
<400> 6  
cttcaaggtag gacggcgtag 20

25  
<210> 7  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador en sentido de Alfa-SMA

30  
<400> 7  
tgaagagcat cccaccct 18

35  
<210> 8  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador antisentido de Alfa-SMA

40  
<400> 8  
acgaaggaat agccacgc 18

45  
<210> 9  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador en sentido de HNF-1 beta

<400> 9  
gaaacaatga gatcactcc tc 22

50  
<210> 10  
<211> 22

<212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador antisentido de HNF-1 beta  
 5 <400> 10  
  
 cttgtgcaa tgcctatgac tc 22  
  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador en sentido de CP450  
  
 <400> 11  
  
 agcacaactc tgagatatgg 20  
 15 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Cebador antisentido de CP450  
  
 <400> 12  
  
 atagtcactg tacttgaact 20  
  
 <210> 13  
 <211> 29  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador en sentido de albumina  
  
 <400> 13  
 30 ttaggatccc ccaggaagac atcctttgc 29  
  
 <210> 14  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador antisentido de albumina  
  
 <400> 14  
  
 cctgagccag agatttcc 18  
  
 40

**REIVINDICACIONES**

1. Método de obtención de fibroblastos intrahepáticos infectados por el virus de la hepatitis C, que comprende una etapa puesta en contacto *in vitro* de fibroblastos intrahepáticos con partículas infecciosas del virus de la hepatitis C.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el virus de la hepatitis C es el VHC-JFH1.
- 5 3. Método de obtención de fibroblastos intrahepáticos infectados por el virus de la hepatitis C, que comprende una etapa de aislamiento de fibroblastos intrahepáticos a partir de una muestra de un tejido hepático previamente extraído de un paciente VHC-positivo.
4. Fibroblasto intrahepático aislado infectado por un virus de la hepatitis C, o que comprende el genoma de un virus de la hepatitis C o un replicón del mismo, que se puede obtener mediante uno cualquiera de los métodos definidos en las reivindicaciones 1 a 3.
- 10 5. Procedimiento de replicación *in vitro* del genoma del virus de la hepatitis C, **caracterizado porque** comprende una etapa de cultivo *in vitro* de fibroblastos intrahepáticos aislados infectados por el virus de la hepatitis C.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por que** los fibroblastos intrahepáticos aislados infectados por el virus de la hepatitis C se obtienen mediante uno cualquiera de los métodos definidos en las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 7. Método de selección de moléculas contra el VHC que comprende las siguientes etapas:
- poner en contacto fibroblastos intrahepáticos infectados por un virus de la hepatitis C o fibroblastos intrahepáticos que comprenden el genoma de un virus de la hepatitis C o un replicón del mismo, con la molécula a ensayar;
  - 20 - medirla replicación del genoma del VHC y/o la producción de partículas del VHC.
8. Método de selección de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** la etapa de medición de la replicación del genoma del VHC se realiza mediante la cuantificación de la cadena de ARN de polaridad positiva y/o de la cadena de ARN de polaridad negativa del VHC.
9. Método de selección de moléculas antifibrogénesis que comprende las siguientes etapas:
- 25 - poner en contacto fibroblastos intrahepáticos infectados por un virus de la hepatitis C o fibroblastos intrahepáticos que comprenden el genoma de un virus de la hepatitis C o un replicón del mismo, con la molécula e ensayar;
- medir la expresión de al menos un gen implicado en la fibrosis.
10. Método de selección de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado porque** el gen o los genes implicados en la fibrosis, cuya expresión se mide, se selecciona entre los genes de los colágenos de tipo I, III, IV y V.
- 30 11. Método de evaluación de la toxicidad de una molécula con respecto a los fibroblastos hepáticos de un paciente afectado por hepatitis C que comprende las siguientes etapas:
- poner en contacto fibroblastos intrahepáticos infectados por un virus de la hepatitis C o fibroblastos intrahepáticos que comprenden el genoma de un virus de la hepatitis C o un replicón del mismo con la molécula a ensayar;
  - 35 - evaluar la mortalidad de dichos fibroblastos intrahepáticos.

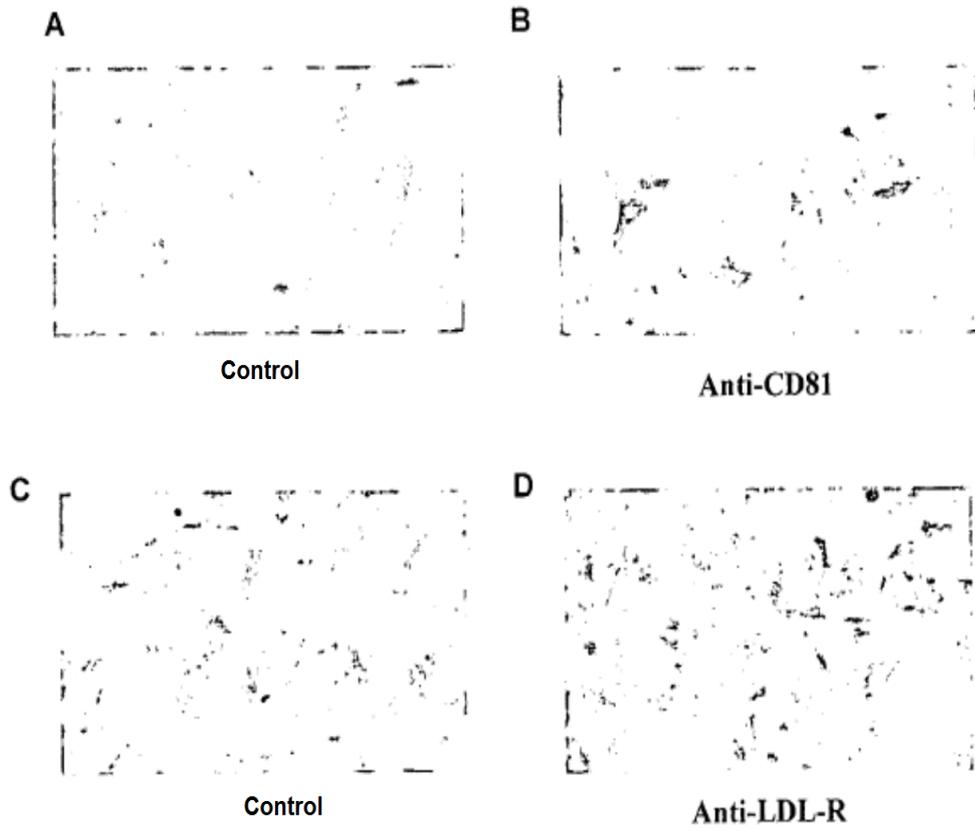


Figura 1

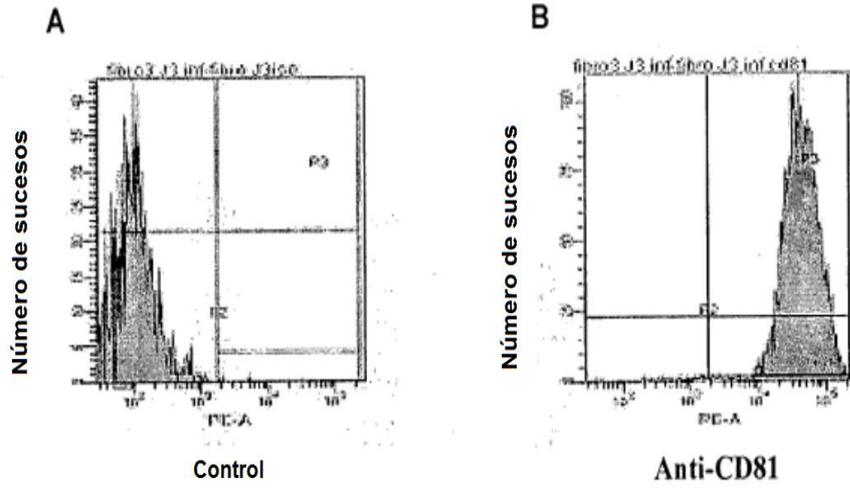


Figura 2

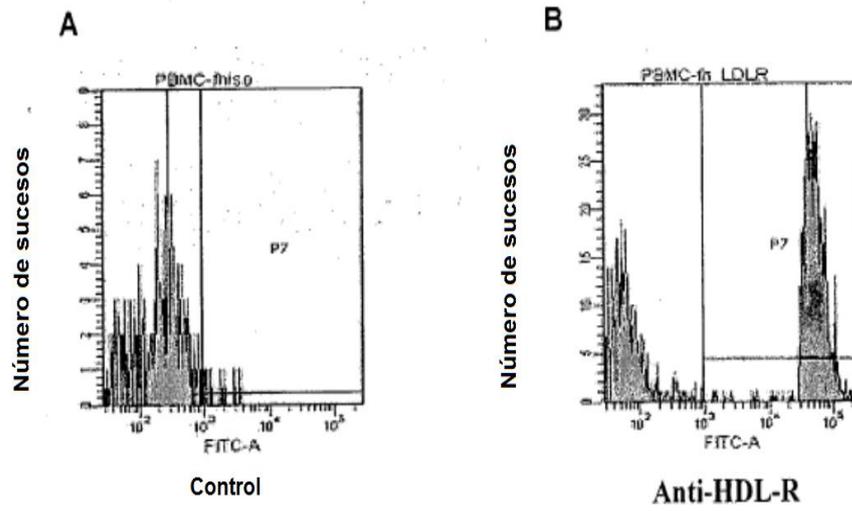


Figura 3

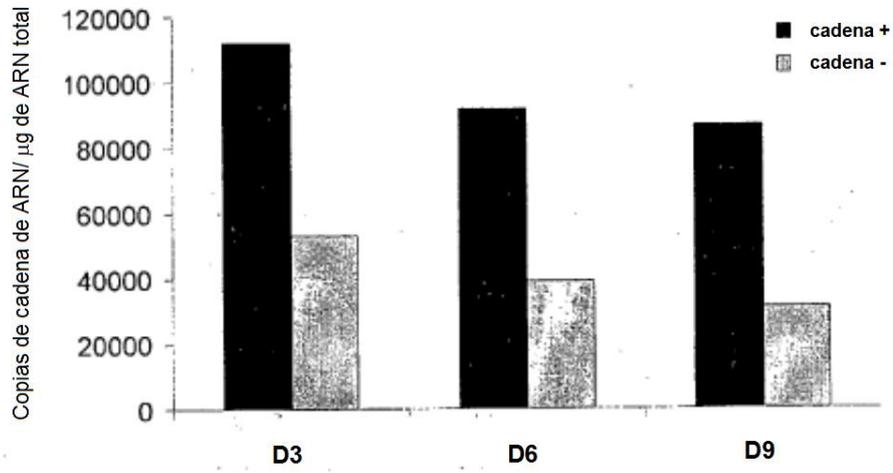


Figura 4

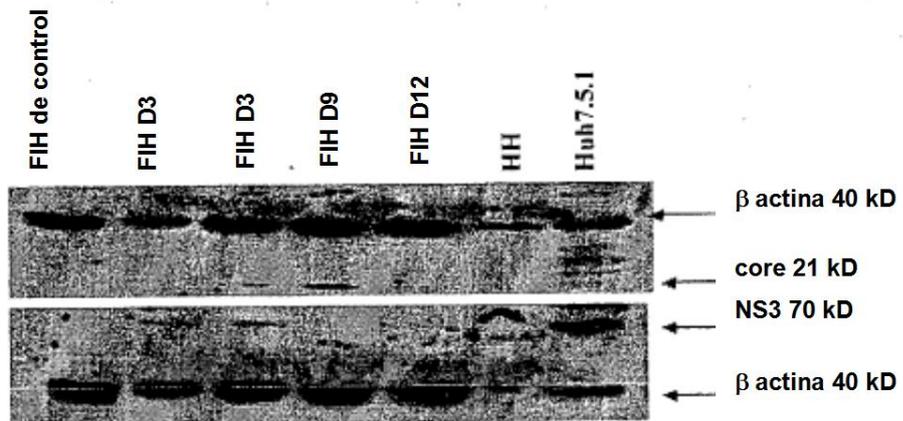


Figura 5

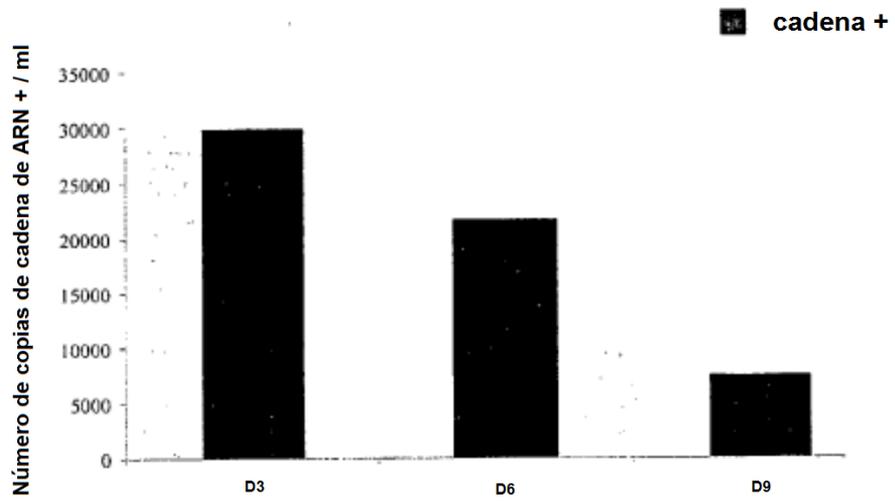
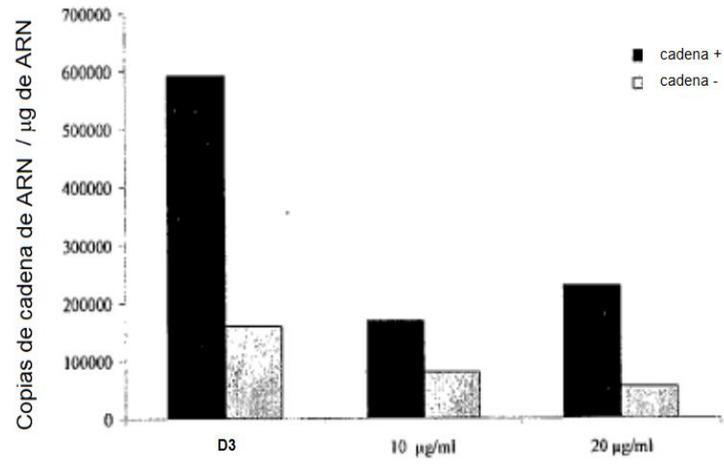
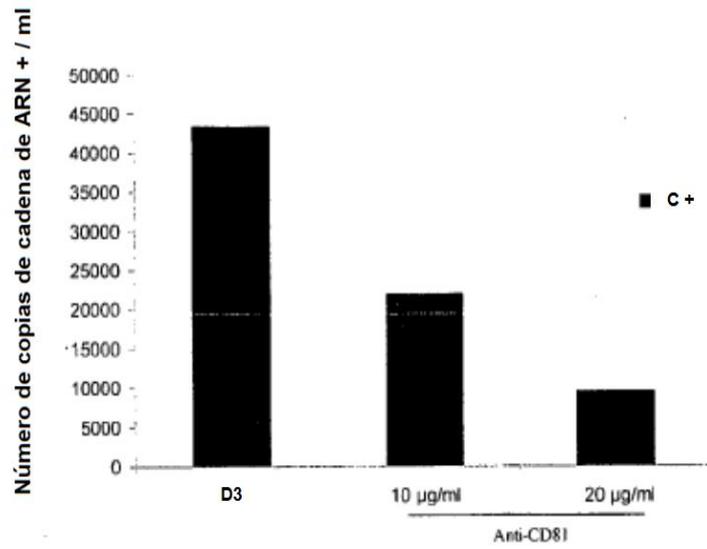


Figura 6

**A**



**B**



**Figura 7**

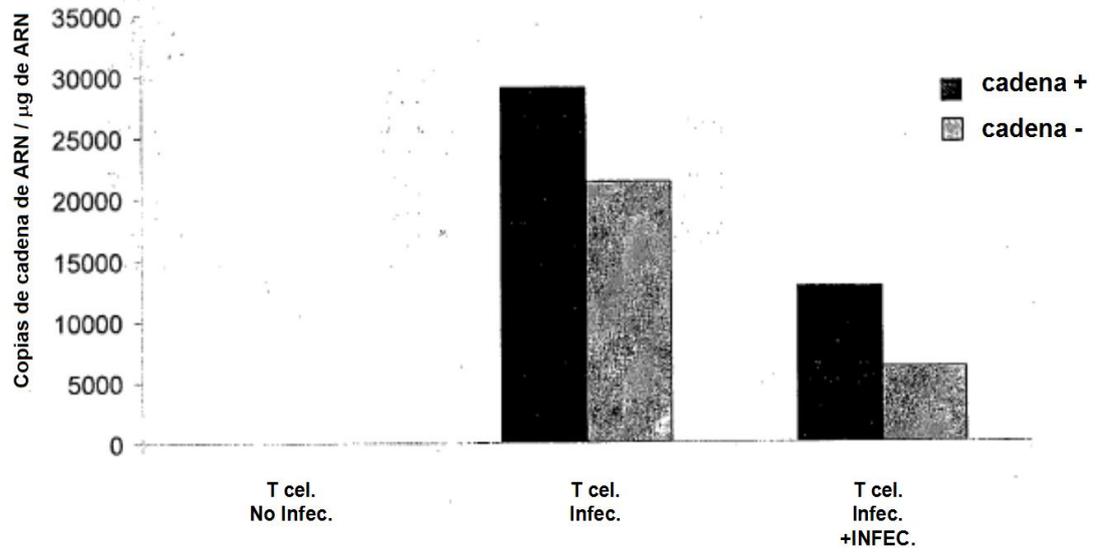


Figura 8

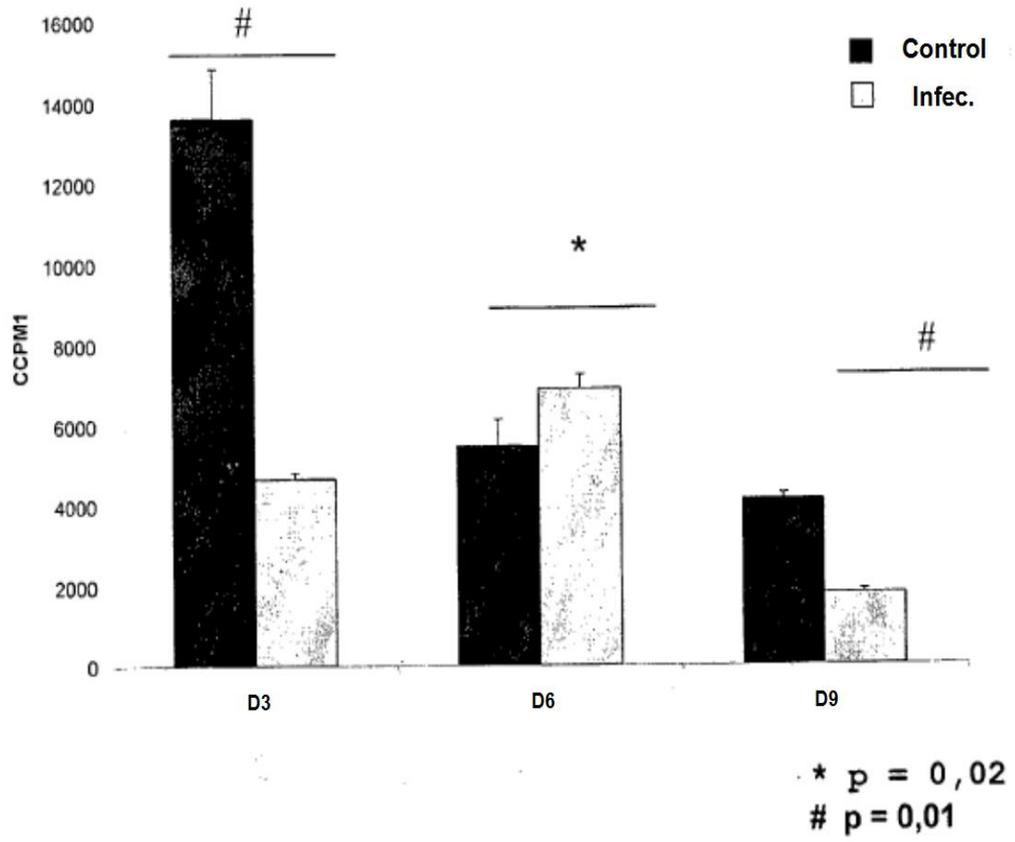


Figura 9

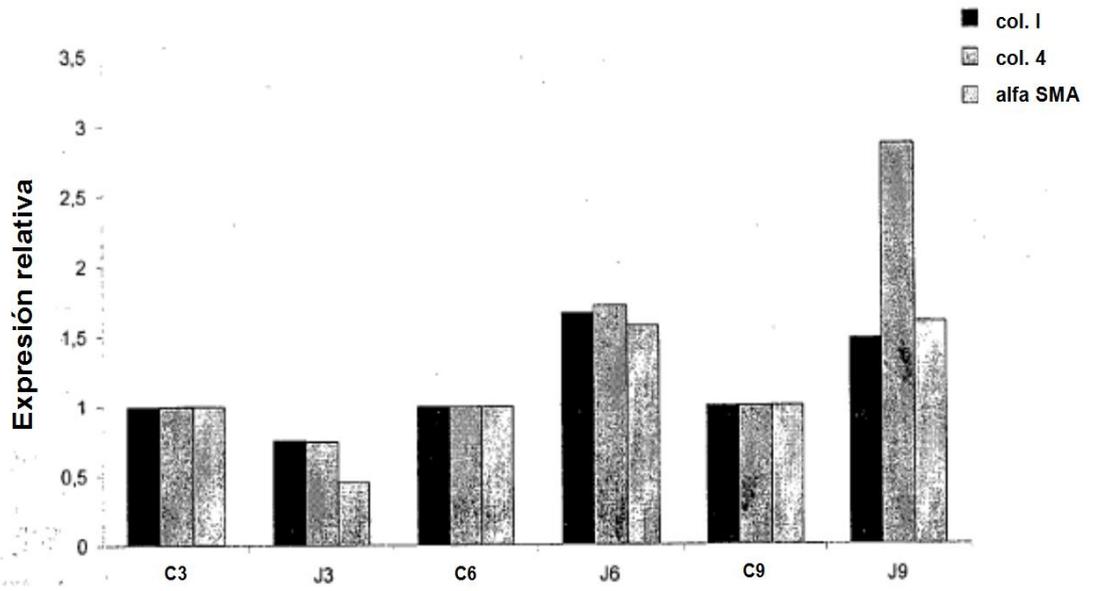


Figura 10

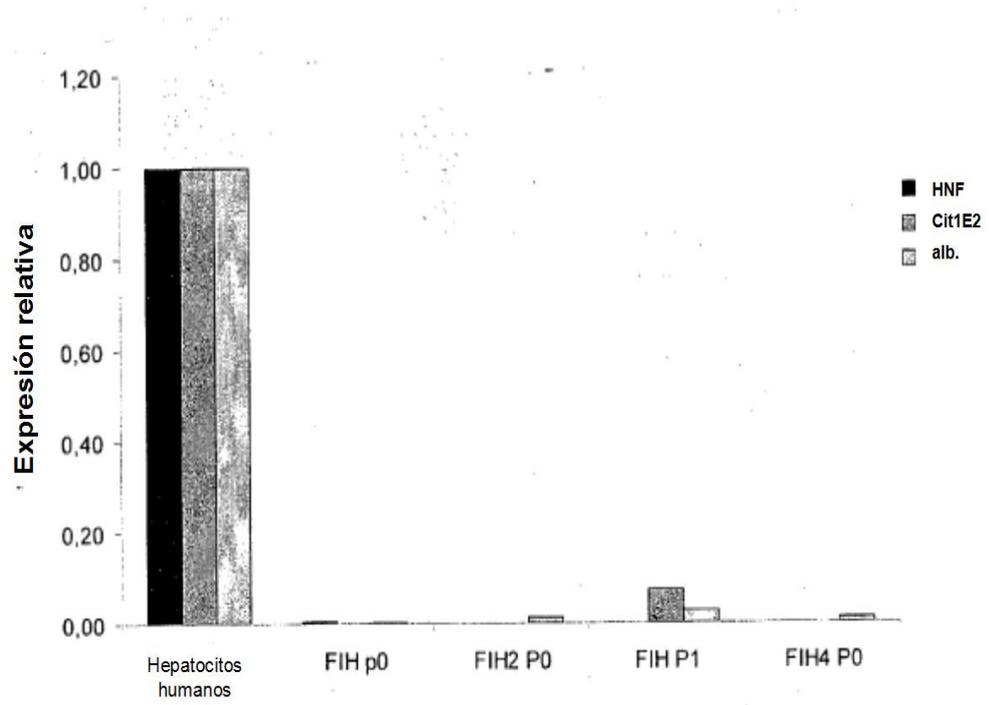


Figura 11

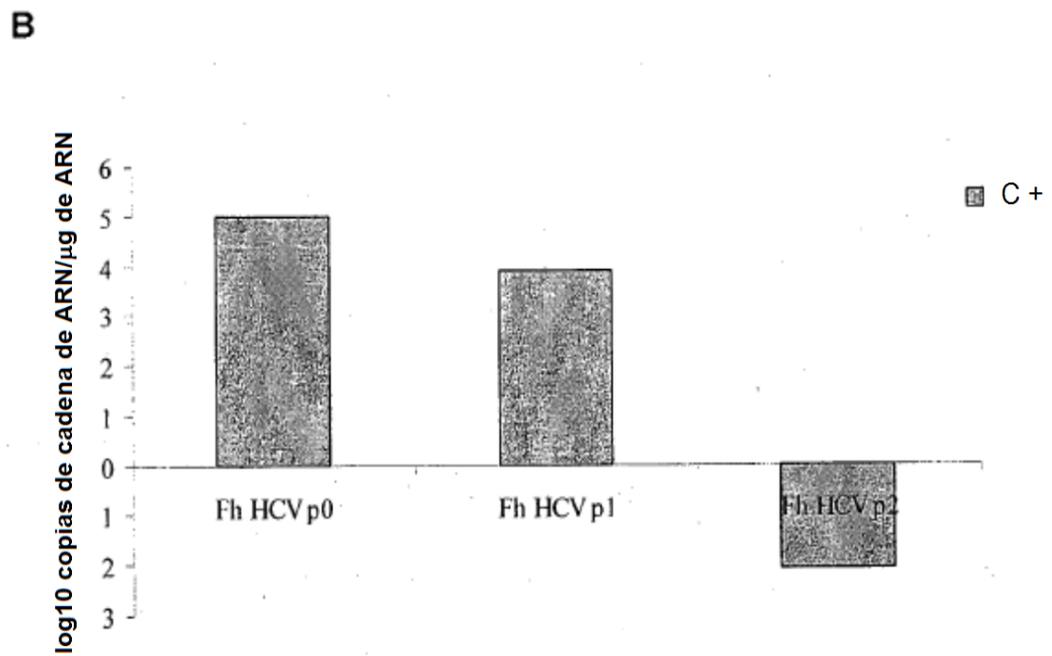
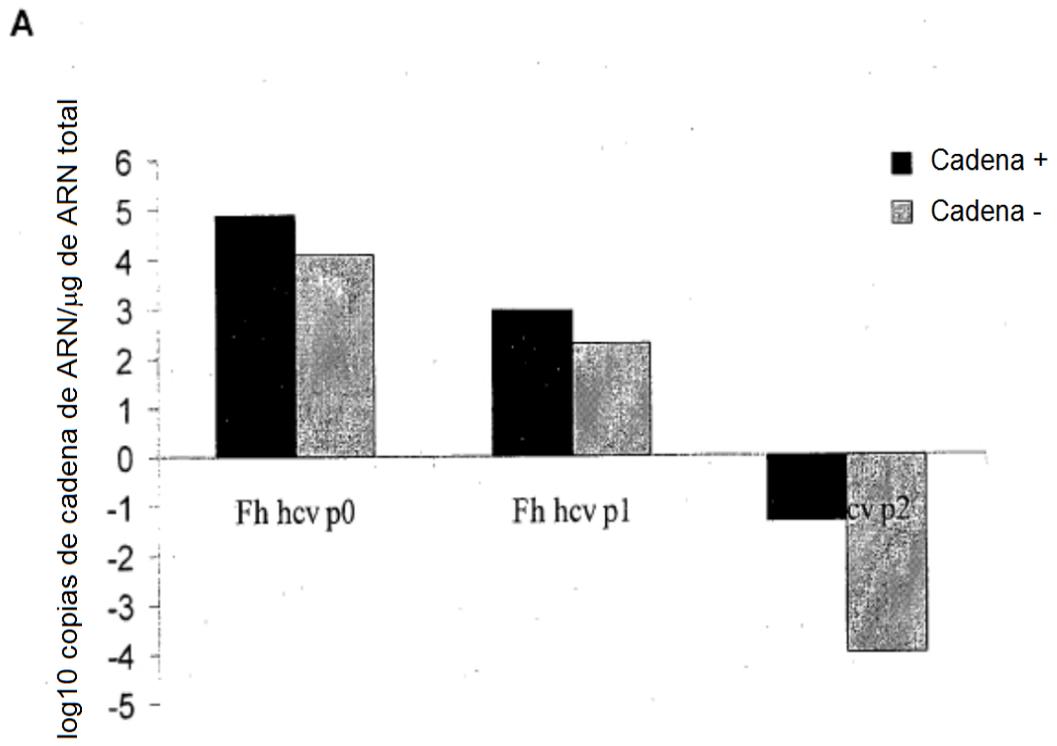


Figura 12