

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 414**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2013 PCT/IB2013/002501**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14033546**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2013 E 13832378 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2890779**

54 Título: **Métodos para la producción de células que tienen un fenotipo de hepatocitos primarios humanos y composiciones**

30 Prioridad:

**31.08.2012 US 201261696059 P**  
**06.02.2013 US 201361761588 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.01.2018**

73 Titular/es:

**THE GOVERNORS OF THE UNIVERSITY OF ALBERTA (100.0%)**  
**2J2.01 McKenzie Center**  
**Edmonton, AB T6G 2B7, CA**

72 Inventor/es:

**TYRRELL, LORNE, D.;**  
**STEENBERGEN, HENDRIKJE, GEESJE y**  
**JOYCE, MICHAEL A.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 651 414 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

Métodos para la producción de células que tienen un fenotipo de hepatocitos primarios humanos y composiciones

5 **Introducción**

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus pequeño, con envoltura, de ARN de cadena positiva de la familia de Flaviviridae que provoca la hepatitis aguda y crónica. Puede provocar cirrosis, carcinoma hepatocelular y esteatosis en los individuos afectados. El genoma de 9,6 kb de VHC consiste en un único marco de lectura abierto, que codifica una poliproteína de 3000 aminoácidos que se escinde co- y post-traduccionalmente. Varios estudios han informado de factores humanos que apoyan la infección por VHC (Li et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 16410-16415; Reiss et al. (2011) *Cell Host Microbe* 9: 32-45). Un número significativo de estos factores desempeñan un papel en la organización de la vesícula, o en genes relacionados con la membrana y los lípidos. Por otro lado, también se sabe que proteínas de VHC inducen cambios transcripcionales en las células infectadas (Blais et al. (2010) *J Proteoma Res* 9: 912-923; Blais et al. (2010) *J Biol Chem* 285: 25602-25612; Joyce et al. (2009) *PLoS pathogens* 5: e1000291; Singaravelu et al. (2010) *Proteoma Sci* 8:5; Walters et al. (2006) *Virology Journal* 3:37; Walters et al. (2006) *PLoS pathogens* 2: e59), por ejemplo mediante la formación de la banda membranosa, la modulación de vías de la inmunidad innata y la inducción de vías de síntesis de lípidos. El documento WO 99/67362 describe el uso de un medio de cultivo particular para la replicación *in vitro* del virus de la hepatitis C en hepatocitos primarios de mamífero.

Los sistemas de replicación subgenómicos de longitud completa y los modelos de infección por JFH-1 han proporcionado conocimiento en la traducción de VHC y la replicación, la entrada y la salida de ARN. La mayoría de estos modelos se basan en células de Huh-7 o derivadas de Huh-7. El uso de células Huh-7 (o derivadas de ellas) tiene muchas ventajas para el estudio *in vitro* del VHC. Están fácilmente disponibles, se dividen rápidamente y, por tanto, permiten experimentos a gran escala. Sin embargo, estos sistemas no representan necesariamente con precisión los acontecimientos que se producen durante una infección por VHC natural *in vivo*, puesto que los hepatocitos normalmente no se dividen y están totalmente diferenciados. Se han hecho esfuerzos para evitar esto, mediante la detención del crecimiento de las células mediante la adición de sulfóxido de dimetilo al 1-2 % (DMSO, un disolvente aprótico polar) al medio de cultivo celular (Sainz et al. (2006) *J Virol* 80:10253-10257), dando como resultado la inducción de la expresión de genes específicos de hepatocitos.

Los hepatocitos primarios humanos recién aislados son lógicamente un modelo *in vitro* más representativo para estudiar la infectividad del VHC. Sin embargo, la cantidad de virus producido en estas células es baja (normalmente menos de  $10^3$  copias de ARN/ml) y para experimentos a largo plazo (más de unos pocos días) estas células tienen que ser co-cultivadas con otros tipos celulares (Banauudha et al. (2010) *Hepatology*, 51: 1922-1932; Ploss et al. *Proc. Natl. Acad. Sciences* 2010 vol. 107 n.º 7 3141-3145). Los hepatocitos primarios, por tanto, no son adecuados para la producción de virus a gran escala.

Los títulos víricos de VHC se han conseguido en células Huh-7 o células derivadas de Huh-7 de aproximadamente  $10^6$  a  $10^7$  copias de ARN por ml (aproximadamente 1 virus por célula). Sin embargo, estos títulos víricos son generalmente demasiado bajos para proporcionar la producción a escala comercial de partículas víricas. Adicionalmente, la infección en células Huh7.5 solo ha sido posible con una variante atípica de VHC, JFH-1.

Existe una necesidad en el campo de un sistema de cultivo que pueda servir como modelo *in vitro* de hepatocitos primarios humanos.

**Sumario**

La presente invención proporciona un método de producción de un cultivo celular que comprende células que tienen un fenotipo de hepatocitos primarios humanos, comprendiendo el método: cultivar una estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) en un medio de cultivo que comprende suero humano durante más de 11 días en el que dicho cultivo induce la diferenciación de la estirpe celular hHCC en una célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano. La invención también proporciona un cultivo celular que comprende: células que tienen un fenotipo de un hepatocito primario humano, en el que las células son como se han definido en las reivindicaciones, y un cultivo celular que comprende células de un cultivo celular infectadas víricamente como se define en las reivindicaciones.

La presente divulgación a continuación en el presente documento también establece ("proporciona") un número de otros métodos y composiciones como se analizan a continuación en el presente documento. Sin embargo, la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación proporciona métodos y composiciones relacionadas con cultivos *in vitro* de estirpes celulares de hepatocitos humanos que presentan un fenotipo de hepatocito primario humano. Dichas estirpes celulares son susceptibles a la infección por un virus hepatótrofo, tal como el VHC o el VHB, y soportan tanto la replicación vírica como altos niveles de producción de partículas víricas. Dichos cultivos *in vitro* encuentran un uso

en la producción y el estudio de virus hepatótrofos, así como en métodos de cribado (por ejemplo, para fármacos antivíricos, evaluación del metabolismo del fármaco) y el estudio de hepatocitos primarios humanos.

5 La presente divulgación proporciona métodos de producción de un cultivo celular que comprende células que tienen un fenotipo de hepatocito primario humano, método que comprende cultivar una estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) en un medio de cultivo que comprende suero humano durante más de 11 días, en el que dicho cultivo induce la diferenciación de la estirpe celular de hHCC en una célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende suero humano aproximadamente del 1 % al 20 %, opcionalmente suero humano de aproximadamente el 2 % al 10 %. En algunas 10 realizaciones, la estirpe celular de hHCC es una estirpe celular Huh-7 o derivada de Huh-7. En algunas realizaciones, el cultivo se realiza sin subcultivo después de 10 días de cultivo en el medio de cultivo que comprende suero humano. La presente divulgación proporciona adicionalmente cultivos celulares que comprenden células producidas por dichos métodos de cultivo.

15 La presente divulgación proporciona cultivos celulares que comprenden células que tienen un fenotipo de un hepatocito primario humano, en los que las células son la progenie diferenciada de una estirpe celular de hHCC; y un medio de cultivo que comprende suero humano. En algunas realizaciones, el cultivo celular se ha mantenido de forma continua durante al menos 7 días, al menos 8 días, al menos 10 días, al menos 11 días, al menos 12 días, al menos 13 días, al menos 14 días, al menos 15 días, al menos 16 días, al menos 17, al menos 18 días, al menos 19 20 días, al menos 20 días o al menos 21 días o más. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende suero humano de aproximadamente el 1 % al 20 %, opcionalmente suero humano de aproximadamente el 2 % al 10 %. En algunas realizaciones, la estirpe celular de hHCC es una estirpe celular Huh-7 o derivada de Huh-7.

25 La presente divulgación proporciona métodos para evaluar de un efecto de un agente candidato en una célula que tiene un fenotipo de un hepatocito primario humano que comprende poner en contacto un cultivo de células diferenciadas de la presente divulgación con un agente candidato; y el ensayo de la presencia o la ausencia de un efecto del agente candidato sobre un fenotipo de la célula que tiene un fenotipo de un hepatocito primario humano. En algunas realizaciones, el ensayo es para determinar un efecto del agente candidato sobre el metabolismo de lípidos por la célula que tiene un fenotipo de un hepatocito primario humano. En otras realizaciones, el ensayo es 30 para determinar un efecto del agente candidato sobre la secreción de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) y/o lipoproteína de alta densidad (HDL) por la célula que tiene un fenotipo de un hepatocito primario humano.

35 La presente divulgación proporciona métodos para evaluar del metabolismo de un agente por una célula que tiene un fenotipo de un hepatocito primario humano que comprende poner en contacto un cultivo de células diferenciadas de la presente divulgación con un agente; y el ensayo de la presencia o la ausencia de un metabolito del agente y/o el agente. En algunas realizaciones, el agente es un fármaco.

40 La presente descripción proporciona métodos para evaluar la toxicidad de un agente en una célula que tiene un fenotipo de un hepatocito primario humano comprende poner en contacto un cultivo de células diferenciadas de la presente descripción con un agente; y el ensayo de la presencia o la ausencia de un cambio en un fenotipo de la célula que es indicativo de toxicidad del agente para la célula. En algunas realizaciones, el fenotipo sometido a ensayo es un aumento de las transaminasas en medio de cultivo y/o someter a ensayo para determinar un marcador de muerte celular. 45

50 La presente divulgación proporciona métodos de producción de partículas víricas que comprenden incubar un cultivo celular que comprende una estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) en un medio de cultivo que comprende suero humano durante más de 11 días, en los que dicha incubación induce la diferenciación de la estirpe celular de hHCC en una célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano; la introducción de un genoma de un virus hepatótrofo en al menos una de la estirpe celular de hHCC o la célula que tiene el fenotipo de hepatocito primario humano; y mantener el cultivo celular en condiciones adecuadas para la producción de partículas víricas. En algunas realizaciones, el genoma vírico se introduce mediante la adición de partículas víricas infecciosas al medio de cultivo. En algunas realizaciones, las partículas víricas infecciosas se añaden en el día 1 de dicho cultivo. En algunas realizaciones, el genoma vírico se introduce en la estirpe celular de hHCC antes de dicha incubación. En 55 algunas realizaciones de estos métodos, el método comprende aislar partículas víricas del medio de cultivo.

60 La presente divulgación proporciona cultivos de células infectadas víricamente que comprenden células producidas por un método que comprende incubar un cultivo celular que comprende una estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) en un medio de cultivo que comprende suero humano durante más de 11 días, en el que dicho cultivo induce la diferenciación de la estirpe celular de hHCC en una célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano; y la introducción de un genoma de un virus hepatótrofo en al menos una de la estirpe celular de hHCC o la célula que tiene el fenotipo de hepatocito primario humano.

65 La presente divulgación proporciona métodos para detectar un agente candidato para la actividad antivírica que comprenden incubar un cultivo celular que comprende una estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) en un medio de cultivo que comprende suero humano durante más de 11 días, en el que dicha incubación

induce la diferenciación de la estirpe celular de hHCC en una célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano; la introducción de un genoma de un virus hepatótrofo en al menos una de la estirpe celular de hHCC o la célula que tiene el fenotipo de hepatocito primario humano; poner en contacto el cultivo celular con un agente candidato antivírico; mantener el cultivo celular en condiciones adecuadas para la replicación vírica; y detectar la presencia o ausencia de un efecto del agente candidato sobre la replicación vírica; en los que una disminución en la producción de partículas víricas en presencia del agente candidato en comparación con la ausencia del agente candidato indica que el agente candidato tiene actividad antivírica. En algunas realizaciones, el genoma vírico se introduce mediante la adición de partículas víricas infecciosas al medio de cultivo. En algunas realizaciones, las partículas víricas infecciosas se añaden en el día 1 de dicho cultivo. En algunas realizaciones, el genoma vírico se introduce en la estirpe celular de hHCC antes de dicha incubación.

La presente divulgación proporciona métodos para detectar una muestra que se sospecha que contiene un anticuerpo para la actividad antivírica que comprende: incubar un cultivo celular que comprende una estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) en un medio de cultivo que comprende suero humano durante más de 11 días, en los que dicha incubación induce la diferenciación de la estirpe celular de hHCC en una célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano; introducir un genoma de un virus hepatótrofo en al menos una de la estirpe celular de hHCC o la célula que tiene el fenotipo de hepatocito primario humano; poner en contacto el cultivo celular con una muestra que se sospecha que contiene un anticuerpo; mantener el cultivo celular en condiciones adecuadas para la replicación vírica; y detectar la presencia o ausencia de un efecto de la muestra tras la replicación vírica; en los que una disminución en la producción de partículas víricas en presencia de la muestra en comparación con la ausencia de la muestra indica que la muestra contiene un anticuerpo que tiene actividad antivírica. En algunas realizaciones, el genoma vírico se introduce mediante la adición de partículas víricas infecciosas al medio de cultivo. En algunas realizaciones, las partículas víricas infecciosas se añaden en el día 1 de dicho cultivo. En algunas realizaciones, el genoma vírico se introduce en la estirpe celular de hHCC antes dicha incubación.

La presente divulgación proporciona métodos para seleccionar un agente candidato para el tratamiento de una enfermedad mediada por lipoproteínas, comprendiendo el método: incubar un cultivo celular que comprende una estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) en un medio de cultivo que comprende suero humano durante al menos 3 días, al menos 5 días, y, en algunas realizaciones, al menos 14 días, en el que dicha incubación induce la diferenciación de la estirpe celular de hHCC en una célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano; poner en contacto el cultivo celular con el agente candidato; y someter a ensayo el cultivo celular para determinar la presencia o ausencia de un efecto del agente candidato sobre los niveles de lipoproteínas secretadas por la estirpe celular de hHCC diferenciada en comparación con una muestra de control; en el que un efecto del agente candidato sobre los niveles de lipoproteínas secretadas por la estirpe celular de hHCC diferenciada indica que el agente candidato puede utilizarse para el tratamiento de la enfermedad mediada por lipoproteínas. En ciertas realizaciones, el cultivo celular se somete a ensayo para determinar la presencia o ausencia de un efecto del agente candidato sobre los niveles de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) y/o lipoproteína de alta densidad (HDL) en el medio de cultivo, en comparación con una muestra de control. En realizaciones específicas, el método es para el cribado de un agente candidato para el tratamiento de la aterosclerosis, en el que una disminución de VLDL o LDL o un aumento de HDL indica que el agente candidato puede utilizarse para la prevención o el tratamiento de la aterosclerosis.

La presente divulgación proporciona métodos para producir una célula de hepatocito cultivada infectada con un microorganismo hepatótrofo (por ejemplo, virus), comprendiendo el método poner en contacto una célula de hepatocito cultivada con un microorganismo hepatótrofo infeccioso en un medio de cultivo que comprende suero pobre en lipoproteínas de unión a receptor de LDL, en el que el contacto es durante un tiempo suficiente para proporcionar la infección de la célula de hepatocito cultivada con el microorganismo hepatótrofo. En algunas realizaciones, las células cultivadas son hepatocitos primarios o una estirpe celular de hepatocitos inmortalizada. En algunas realizaciones, las células cultivadas son células hHCC diferenciadas. En algunas realizaciones, el suero pobre en lipoproteínas de unión al receptor de LDL es suero humano pobre en lipoproteínas de unión al receptor de LDL o suero bovino fetal pobre en lipoproteínas de unión al receptor de LDL. En algunas realizaciones, el microorganismo hepatótrofo infeccioso es un virus hepatótrofo. En algunas realizaciones, el virus hepatótrofo es el virus de la hepatitis C o el virus de la hepatitis B. En algunas realizaciones, el virus hepatótrofo es un aislado clínico.

Estas y otras características serán evidentes para el experto en la materia tras revisar la presente memoria descriptiva.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra un ejemplo de una línea temporal de condiciones de cultivo. Las figuras 2A-2B ilustran las diferencias en el aspecto y el crecimiento de las células en medio de cultivo que contiene suero bovino fetal (FBS) frente a suero humano (HS, por sus siglas en inglés). La figura 2A es un conjunto de fotografías que muestran células cultivadas en medio complementado con FBS (panel izquierdo) y HS (panel central) en comparación con hepatocitos primarios humanos en cultivo (panel derecho). La figura 2B es un gráfico que muestra el número de células para cultivos celulares mantenidos en medios que contenían FBS (círculos cerrados) frente a medios que contenían HS (círculos abiertos).

La figura 3A es un conjunto de gráficos que muestran la expresión de los marcadores de diferenciación de hepatocitos, receptor de LDL, albúmina y Alfa 1-antitripsina, en células mantenidas en FBS o en HS durante 7 o 21 días, así como células Huh7.5 que se mantuvieron en medio de hepatocitos primarios (PHM, por sus siglas en inglés) y hepatocitos primarios humanos en cultivo (hep. prim.). También se incluye la expresión de claudina-1 y ocludina, dos proteínas de punto de unión estrecho que se expresan altamente en el hígado.

La figura 3B es un conjunto de gráficos que muestra que los reguladores clave del metabolismo de lípidos (Receptor X del hígado alfa (LXR $\alpha$ ), receptor alfa y gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ ), se expresan todos altamente en las células que se cultivan en el HS. Las proteínas del citoesqueleto vimentina y E-caderina también aumentan en células cultivadas en suero humano.

La figura 4 es un gráfico que muestra el efecto sobre los marcadores de diferenciación anteriormente mencionados en células cultivadas en presencia de DMSO al 2 % o suero bovino adulto (ABS) al 2 %, en comparación con FBS y hepatocitos primarios cultivados (hep. prim.). Tanto ABS como DMSO inducen la inhibición del contacto/detención del crecimiento, pero no inducen el aumento de la expresión de marcadores de diferenciación.

La figura 5A es un conjunto de fotografías que ilustran que las gotitas de lípidos celulares aumentan en células cultivadas en HS (paneles de la derecha) en comparación con FBS.

La figura 5B es un gráfico que muestra la cuantificación de fluorescencia Bodipy de células mantenidas en FBS o HS (n > 4).

Las figuras 6A-6E son un conjunto de gráficos que muestran los resultados de la infección de células con la cepa de VHC JFH-1 ("JFH") donde las células se cultivan en FBS o HS.

Figura 6A: títulos víricos de células que se cultivaron en FBS, tras la infección con el virus JFH producido a partir de células cultivadas en suero humano o suero bovino fetal (JFH-HS, círculos; JFH-FBS, cuadrados). Figura 6B: títulos víricos de células cultivadas en diferentes condiciones (FBS, círculos abiertos, HS, círculos cerrados) que se infectaron con el mismo virus (JFH-HS). La figura 6C muestra la diferencia de 1000 veces en los títulos víricos entre la producción de JFH-FBS en células cultivadas en FBS en comparación con JFH-HS en células cultivadas en HS. Figura 6D: producción a largo plazo de títulos víricos altos en células cultivadas en suero humano con infección en el momento de la transferencia de células desde medio que contenía FBS hasta medio que contenía HS (círculos abiertos) o a los 14 días después de la transferencia desde medio que contenía FBS hasta medio que contenía HS (círculos cerrados). Figura 6E: ilustra títulos víricos de células cultivadas en medio de hepatocitos primarios con HS al 2 % (PHM, HS al 2 %) o DMEM con HS al 2 % (DMEM, HS al 2 %).

La figura 7 es un gráfico que muestra los resultados de la infección de un modelo de ratón SCID/Alb-uPA quimérico con suero de paciente infectado con VHC (círculos), virus JFH producido por electroporación de células Huh7.5 seguida de cultivo en medio que contenía HS (JFH-HS, cuadrados) o el virus VHCcc cultivado en tejido (triángulos).

La figura 8 es un conjunto de gráficos que muestran los efectos de cultivos que contenían suero humano sobre el VHC. Panel A: densidad vírica de virus producidos a partir de células cultivadas en FBS (círculos) o suero humano (cuadrados) como se determina por centrifugación en gradiente de sacarosa; Panel B: cuantificación de la distribución de la densidad vírica de los virus producidos a partir de células cultivadas en FBS o suero humano (HS); y Panel C: asociación a apolipoproteína B de diferentes variantes víricas. JFH FBS: JFH-1 producido a partir de células cultivadas en FBS; JFH HS: JFH-1 producido a partir de células cultivadas en HS; sueros de pacientes.

La figura 9 es un conjunto de gráficos que muestran el efecto de la adición de lipoproteínas que contienen ApoB a células diferenciadas. Panel izquierdo: Efecto de la adición de VLDL humana a células diferenciadas sobre la producción vírica; Panel derecho: Efecto de la adición de LDL humana a células diferenciadas sobre la producción vírica.

La figura 10 es un gráfico que muestra la infección de células mantenidas en suero humano con suero positivo para VHC de diferentes pacientes (paciente 1: círculos, paciente 2: cuadrados, ambos de genotipo 1a).

La figura 11, paneles A y B son gráficos que muestran los perfiles de lipoproteínas a base de triacilglicéridos de sangre humana (A) y medio a partir de células Huh7.5 cultivadas en suero humano (HS) para diversos periodos de tiempo (B). La separación de lipoproteínas se realizó usando un cromatógrafo de líquidos de proteína rápida de exclusión por tamaño (FPLC).

La figura 12 es un gráfico que muestra un perfil de lipoproteínas a base de colesterol de medio tomado de células Huh7.5 cultivadas en suero humano (HS) para diversos periodos de tiempo. La separación de lipoproteínas se realizó usando un cromatógrafo de líquidos de proteína rápida de exclusión por tamaño (FPLC).

La figura 13 es un gráfico que muestra la producción de VHB después de la infección de células Huh7.5 cultivadas en suero humano (HS).

La figura 14 es un gráfico que muestra la expresión de NTCP en células Huh7.5 cultivadas en FBS o en suero humano para diferentes periodos de tiempo.

La figura 15 es un conjunto de gráficos que muestran una comparación de la producción vírica de VHC en diferentes medios de cultivo (FBS, HS y FBS y HS tratados con heparina (HepHS y HepFBS). Panel A: títulos víricos en células cultivadas en HS (cuadrados) o FBS (círculos). Panel B: títulos víricos en células cultivadas en HepFBS o HepHS. Panel C: ampliación de los primeros 8 días del Panel B.

La figura 16 es un gráfico que muestra la purificación de VHC usando una columna de heparina. El VHC se detectó por cuantificación de la proteína del núcleo de VHC en cada fracción.

La figura 17 es una imagen que muestra la infección de células cultivadas en FBS, o en HepHS durante 2 días, con virus que se purificó usando una columna de heparina.

La figura 18 proporciona gráficos que muestran la infección de células Huh7.5 cultivadas en HS con genotipo 1a de VHC atenuado de ratón (Panel A) o con sobrenadante de las células en el punto temporal indicado por el asterisco (\*) en el Panel A (Panel B). Las células del panel B se diferenciaron en HS, se colocaron en HepHS durante 2 días y después se infectaron.

5 Las figuras 19 y 20 muestran un análisis de expresión génica de genes del metabolismo de Fase I en células Huh7.5 cultivadas en HS.

Las figuras 21 y 22 muestran un análisis de expresión génica de genes del metabolismo de Fase II en células Huh7.5 cultivadas en HS.

## 10 Descripción detallada de realizaciones

Antes de describir adicionalmente la presente invención, ha de entenderse que la presente invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que las mismas pueden, por supuesto, variar. Ha de entenderse también que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares  
15 solamente y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

20 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o interviniente en ese intervalo establecido, se incluye dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también se incluyen dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o los dos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos también están incluidos en la invención.

25 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entendido comúnmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque también pueden utilizarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento desvelan y describen los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

30 Debe observarse que como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "y" y "el" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de dichas células y la referencia a "el virus" incluye la referencia a uno o más virus y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia y así sucesivamente.

40 Las publicaciones analizadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de prioridad de la presente solicitud. Nada en el presente documento ha de interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder dicha publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas de forma independiente.

45 Se exponen ejemplos con el fin de proporcionar a los expertos habituales en la materia una divulgación y una descripción completas de cómo realizar y usar la presente invención, y no tienen por objeto limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni tienen por objeto representar que los experimentos a continuación sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la atmosférica o es cercana a la atmosférica.

50 Se aprecia que ciertas características de la invención, que son, mayor claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier sub-combinación adecuada. Todas las combinaciones de las realizaciones pertenecientes a la invención son abarcadas específicamente por la presente invención y se desvelan en el presente documento como si todas y cada una de las combinaciones se desvelara individual y explícitamente, en la medida en que dichas combinaciones abarquen materia objeto que, por ejemplo, sean compuestos que sean compuestos estables (es decir, compuestos que puedan hacerse, aislarse, caracterizarse y someterse a ensayo para determinar su actividad biológica). Además, todas las subcombinaciones de las diversas realizaciones y elementos de las mismas (por ejemplo, elementos de los grupos químicos enumerados en las realizaciones que describen dichas variables) también son abarcadas específicamente por la presente invención y se desvelan en el presente documento como si cada una de dichas subcombinaciones se desvelara individual y explícitamente en el presente documento.

## DEFINICIONES

- Una célula o cultivo celular se describe como "indiferenciada" cuando una célula o una proporción sustancial de células y su progenie en una población celular, presentan características morfológicas de células parentales no diferenciadas, distinguiéndolas de células diferenciadas que tienen un fenotipo deseado diferente de la célula parental indiferenciada, por ejemplo, un fenotipo de un hepatocito primario como se describe en el presente documento. Se entiende que las colonias de células indiferenciadas dentro de la población con frecuencia estarán rodeadas por células vecinas que están diferenciadas.
- Un "ambiente de crecimiento" es un ambiente en el que las células de interés proliferarán, se diferenciarán y/o madurarán in vitro. Las características del ambiente incluyen el medio en el que se cultivan las células, los factores de crecimiento o factores inductores de la diferenciación que puedan estar presentes y una estructura de soporte (tal como un sustrato en una superficie sólida) si está presente.
- Un "marcador fenotípico" se refiere a una característica observable de una célula que es un indicador de un tipo celular. Los marcadores fenotípicos incluyen biomarcadores, características morfológicas y funciones fisiológicas de una célula.
- Un "biomarcador" como se usa en el presente documento generalmente se refiere a una biomolécula orgánica (por ejemplo, un polipéptido), que está presente diferencialmente en células de diferente estado fenotípico (por ejemplo, una célula de hHCC indiferenciada en comparación con un hepatocito primario) o que es similar en una primera célula a la de una segunda célula que tiene un estado fenotípico conocido (por ejemplo, una célula de hHCC diferenciada en comparación con un hepatocito primario). Un biomarcador está presente diferencialmente entre diferentes estados fenotípicos si la media o la mediana del nivel del biomarcador en un primer estado fenotípico con respecto a un segundo estado fenotípico se calcula para representar diferencias estadísticamente significativas. Los ensayos más comunes para la significación estadística incluyen, entre otros, ensayo t, ANOVA, Kruskal-Wallis, Wilcoxon, Mann-Whitney y razón de posibilidades. Los biomarcadores, solos o en combinación, proporcionan medidas de la probabilidad relativa de que una célula pertenezca a un estado fenotípico de interés.
- En la evaluación de biomarcadores fenotípicos en células individuales o poblaciones de células, a menos que se indique lo contrario, se dice que la célula es "positiva" para un biomarcador si la célula presenta un nivel detectable del biomarcador significativamente por encima de un nivel de control de fondo o negativo. A menos que se indique lo contrario, se dice que una célula es "negativo" para un biomarcador si la expresión del biomarcador no está significativamente por encima de un nivel de fondo o de control.
- Una célula se denomina "genéticamente alterada" o "genéticamente modificada" cuando se ha transferido un polinucleótido dentro la célula mediante cualquier medio adecuado de manipulación artificial, o cuando la célula es una progenie de la célula originalmente genéticamente alterada que ha heredado el polinucleótido. La alteración genética se dice que es "heredable" si la progenie de la célula alterada tiene la misma alteración.
- Por "virus adaptado al cultivo tisular" se entiende un virus que se ha cultivado anteriormente en un cultivo celular in vitro con el fin de ser seleccionado para la replicación mejorada en una estirpe celular in vitro, la infectividad de una estirpe celular in vitro o ambas con respecto al virus parental antes del cultivo.
- Como se usa en el presente documento, una "mutación adaptativa" en el contexto de un virus adaptado se refiere a un cambio genético que aumenta la capacidad de un virus para replicarse, infectar, o tanto replicarse como infectar, una célula diana en comparación con un virus competente para la replicación que no tiene la mutación adaptativa.
- Por "virus genéticamente modificado" se entiende un virus producido a partir de un genoma vírico modificado genéticamente con respecto a un virus de origen natural.
- Por "virus seudotipado" se entiende un virus que tiene al menos una proteína vírica (por ejemplo, una proteína de cubierta) que es de un origen diferente (por ejemplo, un virus diferente) que el genoma vírico contenido en el virus.
- "Cultivo de células primarias" se refiere a un cultivo in vitro de células obtenidas directamente de un tejido (por ejemplo, del hígado) y que no están inmortalizadas (por ejemplo, no son de un tejido canceroso o no han sido transformadas a través del cultivo para convertirse en inmortalizadas).
- Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína", usados indistintamente en el presente documento, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos bioquímicamente modificados o derivatizados. El término incluye proteínas de fusión, incluyendo, pero no limitadas a, proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias líder heterólogas y homólogas, con o sin restos de metionina N-terminal; proteínas marcadas inmunológicamente; y similares. "NH<sub>2</sub>" se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino terminal de un polipéptido y "COOH" se refiere al grupo carboxilo libre presente en el extremo carboxilo terminal de un polipéptido.

"Sustitución de aminoácidos conservadora" se refiere a una sustitución de un resto de aminoácido por otro que comparte propiedades químicas y físicas de la cadena lateral de aminoácido (por ejemplo, carga, tamaño, hidrofobia/hidrofilia). Las "sustituciones conservadoras" tienen por objeto incluir la sustitución dentro de los siguientes grupos de restos de aminoácidos: gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr.

5 Puede extraerse orientación para dichas sustituciones de las alineaciones de secuencias de aminoácidos de polipéptidos.

El término "polinucleótido" como se usa en el presente documento se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Este término incluye ADN y ARN mono y bicatenarios. También incluye tipos conocidos de modificaciones, por ejemplo, modificaciones de origen natural tales como la metilación. Cuando el polinucleótido es de origen no natural, el polinucleótido puede incluir la sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellos con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo proteínas (incluyendo por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.), así como formas sin modificar del polinucleótido.

"Células hospedadoras recombinantes", "células hospedadoras", "células", "estirpes celulares", "cultivos celulares" y otras expresiones de este tipo que denotan microorganismos o estirpes celulares eucariotas superiores cultivadas como entidades unicelulares, se refieren a células que pueden usarse o se han usado como receptores para un vector recombinante u otro ADN de transferencia, e incluyen la progenie de la célula original que se ha transfectado.

25 Se entiende que la progenie de una célula parental individual puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total al progenitor original, debido a la mutación natural, accidental o deliberada.

"Replicón" se refiere a cualquier elemento genético, por ejemplo, un plásmido, un cromosoma, un virus, un cósmido, etc., que se comporta como una unidad autónoma de replicación de polinucleótidos dentro de una célula, es decir, susceptible de replicación bajo su propio control.

Un "vector" se refiere a un replicón en el que un polinucleótido seleccionado puede insertarse con el fin de provocar la replicación y/o expresión del polinucleótido seleccionado.

"Unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos de este modo están en una relación que les permite actuar de la manera prevista. Una secuencia de control, tal como un promotor, "unido operativamente" a una secuencia codificante se une de manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con la secuencia de control.

"Transformación", como se usa en el presente documento, se refiere a la introducción de un polinucleótido exógeno en una célula hospedadora, independientemente del método utilizado para la inserción, por ejemplo, la transducción, la transfección o la electroporación. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido o, como alternativa, puede integrarse en el genoma del hospedador.

"Aislado" se refiere a una entidad de interés que se encuentra en un ambiente diferente de aquel en el que puede producirse el compuesto de forma natural. "Aislado" tiene por objeto incluir compuestos que están dentro de muestras que están sustancialmente enriquecidas para el compuesto de interés y/o en las que se purifica parcial o sustancialmente el compuesto de interés.

Por "purificado" se refiere a un compuesto de interés (por ejemplo, un polipéptido) que se ha separado de componentes que lo acompañan en la naturaleza. "Purificado" también puede usarse para referirse a un compuesto de interés separado de componentes que pueden acompañarlo durante la fabricación (por ejemplo, en la síntesis química). En algunas realizaciones, un compuesto es sustancialmente puro cuando está al menos del 50 % al 60 %, en peso, libre de moléculas orgánicas a las que está asociado de forma natural o a las que está asociado durante la fabricación. En algunas realizaciones, la preparación es al menos el 75 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %, en peso, del compuesto de interés. Puede obtenerse un compuesto sustancialmente puro, por ejemplo, por extracción a partir de una fuente natural (por ejemplo, bacterias), por síntesis química de un compuesto o mediante una combinación de purificación y modificación química. Un compuesto sustancialmente puro también puede obtenerse, por ejemplo, enriqueciendo una muestra que contiene el compuesto. Un compuesto sustancialmente puro también puede obtenerse por la producción por síntesis recombinante o química. La pureza puede medirse por cualquier método apropiado, por ejemplo, cromatografía, espectroscopia de masas, análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento, etc.

Como se usa en el presente documento, los términos "determinación", "evaluación", "ensayo", "medición" y "cribado" se refieren a determinaciones cuantitativas, semicuantitativas y cualitativas y, como tal, el término "determinar" se

usa en el presente documento indistintamente con "someter a ensayo", "medir" y similares. Cuando se pretende una determinación cuantitativa, se usa la frase "determinar una cantidad" de un analito y similares. Cuando se pretende una determinación ya sea cuantitativa y semicuantitativa, se usa la frase "determinar un nivel" de un analito o "detectar" un analito.

5

## **MÉTODOS DE CULTIVO CELULAR DE HEPATOCITOS IN VITRO Y COMPOSICIONES**

La presente divulgación proporciona métodos de cultivo de una estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) en condiciones suficientes para diferenciar la estirpe celular hHCC en una célula que tiene un fenotipo de un hepatocito primario humano. Se describen ejemplos de células, medios de cultivo y métodos de cultivo en más detalle a continuación.

10

### **Células para su uso en los métodos de cultivo**

Las células adecuadas para el uso de los métodos de la presente divulgación para producir una célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano incluyen estirpes celulares de carcinoma hepatocelular humano (hHCC). Una "estirpe celular de hHCC" (también denominada una estirpe celular de hepatoma humano) se refiere a una estirpe celular inmortalizada, y a la progenie de la misma, donde la estirpe celular inmortalizada es de origen de hepatocitos humanos (por ejemplo, una estirpe celular obtenida por cultivo de una célula de hígado humano cancerosa de origen natural, por ejemplo, carcinomas hepatocelulares o hepatoblastomas). Las estirpes celulares hHCC incluyen, pero no se limitan necesariamente a, células Huh 7 (JCRB0403), una estirpe celular derivada de Huh-7 ("células derivadas de Huh-7", por ejemplo, Huh7.5; ATCC PTA-8561; US 7.455.969), Huh-6 (JCRB0401) HepG2 (ATCC N.º HB-8065); células derivadas de HepG2 (por ejemplo, C3A (ATCC N.º CRL-10741); y células HepaRG™ (disponibles de Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.). Por "célula derivada" se refiere a una célula que es una subpoblación (o "subestirpe") de una célula madre referenciada, que se ha aislado por la selección de un fenotipo deseado (por ejemplo, el apoyo mejorado de la replicación vírica de un virus (por ejemplo, un virus adaptado a cultivo tisular (por ejemplo, VHC)) con respecto a la célula parental). En un ejemplo, la célula hHCC es una célula Huh-7 o una célula derivada de Huh-7 (por ejemplo, Huh7.5).

15

20

25

30

Pueden usarse células adecuadas para su uso en los métodos de la presente divulgación sin la necesidad de modificación genética recombinante, por ejemplo, transfección con una construcción, por ejemplo, para facilitar el aumento de la producción del título vírico o para facilitar la diferenciación a un fenotipo de un hepatocito primario humano.

### **Medios de cultivo**

35

Los medios de cultivo para el mantenimiento y la propagación de células hHCC, incluyendo las células hHCC infectadas por virus, pueden ser cualquier medio de cultivo adecuado que contenga suero no humano, por ejemplo, suero fetal bovino (FBS), también denominado suero de ternera fetal (FCS), o suero sintético (por ejemplo, NuSerum®). En general, pueden seleccionarse medios de cultivo para el mantenimiento y la propagación de estirpes celulares hHCC de manera que sean compatibles con la estirpe celular.

40

Medios de cultivo para su uso en los métodos de la presente descripción para inducir la diferenciación de las células hHCC tener un fenotipo de un hepatocito primario humano puede seleccionarse para que sea más compatible con la estirpe celular de partida usado, pero con sustitución de suero humano (HS) para el suero no humano (por ejemplo, en lugar de suero fetal bovino (FBS)).

45

En general, el medio de cultivo comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, nutrientes traza, tampones y, opcionalmente, antibióticos. La fuente de carbono puede ser diversos alcoholes de azúcar, polioles, azúcares aldólicos o ceto azúcares, incluyendo pero no limitados a arabinosa, celobiosa, fructosa, glucosa, glicerol, inositol, lactosa, maltosa, manitol, manosa, ramnosa, rafinosa, sorbitol, sorbosa, sacarosa, trehalosa, piruvato, succinato o metilamina u otros sustratos que pueden determinarse por un experto en la materia.

50

El medio puede contener un poliol o azúcar aldólico. En una realización más específica, el medio comprende manitol, inositol, sorbosa, glicerol, sorbitol, lactosa y arabinosa como fuente de carbono a una concentración de aproximadamente 0,1 hHCC a aproximadamente el 20,0 % en peso. Puede añadirse la totalidad de la fuente o fuentes de carbono al medio antes del comienzo del cultivo o pueden añadirse etapa a etapa o de forma continua durante el cultivo. El medio de cultivo puede comprender también una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas adecuadas, y, según sea apropiado, diversos nutrientes traza apropiadas, factores de crecimiento y similares.

55

60

Los ejemplos de fuentes de carbono adicionales adecuadas incluyen, pero no se limitan a: otros hidratos de carbono, tales como glucosa, fructosa, manitol, almidón o hidrolizado de almidón, hidrolizado de celulosa y melaza; ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido málico, ácido cítrico y ácido fumárico; y alcoholes, tales como glicerol, inositol, manitol y sorbitol.

65

Los ejemplos de fuentes de nitrógeno adecuadas incluyen, pero no se limitan a: amoníaco, incluyendo el amoniaco

gas y el amoníaco acuoso; sales de amonio de ácidos inorgánicos u orgánicos, tales como cloruro de amonio, nitrato de amonio, fosfato de amonio, sulfato de amonio y acetato de amonio; urea; sales de nitrato o de nitrito y otros materiales que contienen nitrógeno, incluyendo aminoácidos como preparaciones ya sea puras o en bruto, extracto de carne, peptona, harina de pescado, hidrolizado de pescado, licor de maíz fermentado, hidrolizado de caseína, hidrolizado de torta de soja, extracto de levadura, levadura seca, destilado de etanol-levadura, harina de soja, harina de semilla de algodón y similares.

Los ejemplos de sales inorgánicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a: sales de potasio, calcio, sodio, magnesio, manganeso, hierro, cobalto, cinc, cobre, molibdeno, tungsteno y otros elementos traza y ácido fosfórico.

Los ejemplos de nutrientes traza, factores de crecimiento y similares apropiados incluyen, pero no se limitan a: coenzima A, ácido pantoténico, piridoxina-HCl, biotina, tiamina, riboflavina, mononucleótido de flavina, dinucleótido de adenina flavina, ácido DL-6,8-tióctico, ácido fólico, vitamina B12, otras vitaminas, aminoácidos, tales como la cisteína y la hidroxiprolina, bases tales como adenina, uracilo, uridina, guanina, timina y citosina, tiosulfato de sodio ácido p- o r-aminobenzoico, niacinamida, nitriloacetato y similares, ya sea como compuestos químicos puros o parcialmente purificados o tal cual están presentes en los materiales naturales. En algunas realizaciones, el medio de cultivo contiene uridina y/o citidina en concentraciones de menos de 50 µM – 200 µM cada uno.

Los ejemplos de antibióticos que se utilizan en cultivos celulares incluyen, pero no se limitan a, penicilina, neomicina, tetraciclina, gentamicina, kanamicina, estreptomycin y mezclas de los mismos.

Los ejemplos de medios de cultivo adecuados incluyen, pero no se limitan a, DMEM, DMEM/F-12, medios Leibovitz L15, RPMI 1640 y medio de hepatocitos primarios (denominado en el presente documento PHM por sus siglas en inglés). La idoneidad de medios de cultivo adicionales puede evaluarse fácilmente, y los métodos de la presente invención no se limitan al tipo específico de medio de cultivo celular utilizado en el cultivo, a condición de que los métodos de cultivo sean adecuados para apoyar el crecimiento de la estirpe celular de hHCC y adecuada para la adición de suero humano. El medio de cultivo puede proporcionarse de manera que no contenga suero no humano añadido (por ejemplo, suero bovino fetal no añadido).

En general, el suero humano utilizado en los métodos y composiciones de la presente divulgación se obtiene de un sujeto humano por métodos convencionales. "Suero humano" contempla el uso de suero de un individuo, así como suero agrupado de varios individuos. "Suero humano" abarca suero humano completo, así como subfracciones del mismo. Cuando las hHCC diferenciadas han de utilizarse en la producción de partículas víricas en altos niveles, la subfracción de suero humano contiene lipoproteínas de baja densidad (LDL) humanas o está complementado con LDL humana. El suero humano puede usarse recién preparado o después del almacenamiento (por ejemplo, a -20 grados Celsius). El suero humano puede inactivarse por calor antes de su uso.

El suero humano puede obtenerse de un sujeto humano sano, por ejemplo, un sujeto humano que no tenga ninguna infección detectable por un patógeno (por ejemplo, un patógeno que se ha de cultivar en las células) y/o está sin tratar con respecto al patógeno (por ejemplo, no hay anticuerpos anti-patógeno presentes en el suero humano). El uso de suero humano obtenido de un sujeto sano puede ser de particular interés cuando el cultivo de células hHCC diferenciadas que tienen un fenotipo de un hepatocito primario humano se ha de utilizar en métodos que implican la infección de las células con un agente patógeno y/o la propagación de un patógeno en las células (por ejemplo, con VHC).

Puede haber presente suero humano en el medio de cultivo en cualquier concentración adecuada para el cultivo de una estirpe celular de hHCC y su diferenciación para tener un fenotipo de un hepatocito primario humano. Por ejemplo, el suero humano puede estar presente en una concentración de al menos el 1 % (v/v), al menos el 2 % (v/v), al menos el 5 % (v/v), al menos el 8 % (v/v), al menos el 10 % (v/v) o más y puede tener de aproximadamente el 1 % (v/v) al 20 % (v/v) o de aproximadamente el 2 % (v/v) al 10 % (v/v).

### **Métodos de cultivo para promover la diferenciación de las células de hHCC**

En general, el método de cultivo de la presente divulgación implica el cultivo de una estirpe celular de hHCC en un medio de cultivo que comprende suero humano en condiciones suficientes para proporcionar la inducción de la diferenciación de la hHCC en una célula que tiene un fenotipo de un hepatocito primario humano. La figura 1 proporciona un ejemplo de un método de cultivo de la presente divulgación.

Como se ha señalado anteriormente, antes del cultivo en HS, las células hHCC pueden cultivarse en cualquier medio de cultivo adecuado, que normalmente contiene suero no humano o un sustituto de suero no humano (por ejemplo, NuSerum®). Pueden subcultivarse cultivos de células de hHCC en medio que contiene FBS (por ejemplo, por tratamiento con tripsina) según sea necesario, por ejemplo, cada 3-4 días. Ya sea que se mantengan en medio que contiene FBS o durante el cultivo en medio que contiene HS, las células generalmente se cultivan en condiciones de incubación adecuadas para la estirpe celular de hHCC, por ejemplo, 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %.

La transferencia de células de hHCC cultivadas en FBS al medio que contiene HS puede conseguirse mediante la disociación de monocapas de hHCC cultivadas en FBS, y la resuspensión y siembra en placas de células de hHCC en medio que contiene HS. Los cultivos de monocapas de células de hHCC cultivadas en FBS pueden disociarse usando cualquier método adecuado, por ejemplo, mediante tratamiento con tripsina). Cuando se usa una enzima tal como tripsina para facilitar la disociación de la monocapa, la enzima puede inactivarse (por ejemplo, con medio de cultivo que contiene suero, por ejemplo, FBS o HS). Las células disociadas después se centrifugan y los sedimentos celulares se resuspenden en medio de cultivo que contiene HS. Después, las células se siembran en placas de cultivo tisular a una densidad adecuada, por ejemplo, de aproximadamente el 30 % al 50 %. Esto puede conseguirse mediante, por ejemplo, la siembra en placas de 3-5 ml de una suspensión de  $10^6$  células/ml sobre una placa de 75 cm<sup>2</sup>.

Después de que se inicia el cultivo en medio que contiene HS, las células no necesitan ser subcultivadas durante el resto de la vida del cultivo celular. El medio de cultivo celular se cambia por lo general cada 3 a 4 días o cada 2 a 4 días.

Opcionalmente, a los aproximadamente de 2 a 7 días, aproximadamente de 2 a 7 días, aproximadamente de 2 a 5 días, aproximadamente de 2 a 4 días o aproximadamente de 2 a 3 días después de la siembra en placa en medio que contiene HS (por ejemplo, cuando las células cultivadas en medio que contiene HS están en confluencia o cerca de ella), los cultivos celulares pueden subcultivarse ("split"), por ejemplo, usando técnicas convencionales de disociación monocapa (por ejemplo, mediante el tratamiento con tripsina seguido de la inactivación con tripsina), centrifugación, resuspensión en medio de cultivo que contiene HS y cultivo en placas de tejidos sobre placas de cultivo tisular. En general en esta etapa, si se consiguen los mejores resultados de este subcultivo opcional si se diluyen las células a no más de aproximadamente 1:2 (es decir, una dilución de no más de aproximadamente el 50 %) antes de la resiembra en placas. Aunque los métodos de la presente divulgación proporcionan que las células cultivadas en HS puedan dividirse de esta manera durante un máximo de aproximadamente 1 semana después de la transición a medio de cultivo que contiene HS (de nuevo, obteniéndose los mejores resultados si las células no se dividen más de 1:2), la tripsinización después de aproximadamente 10 días de cultivo en suero humano y la resiembra en placa no proporcionaron los mejores resultados y se asociaron a la muerte del cultivo celular. El impacto adverso de la tripsinización después de aproximadamente 10 días puede reducirse mediante la siembra de las células en placas recubiertas con colágeno.

Sin quedar restringido a la teoría, a aproximadamente 7 días de cultivo en medio que contiene HS, las células parecen entrar en la detención del crecimiento, en el que la división puntual de las células se ralentiza y se detiene en general en comparación con el crecimiento en medio que contiene FBS. (Figura 1) El método de cultivo por tanto puede tomar en cuenta esta observación y evitar el subcultivo de las células después del inicio de la detención del crecimiento durante el cultivo en medio que contenía HS de, por ejemplo, no subcultivando después de aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días o aproximadamente 10 días de cultivo en medio que contiene HS.

Como se expone en el ejemplo de un método de la presente divulgación en la figura 1 y sin quedar restringido a la teoría, después de la detención del crecimiento aparente de las células a aproximadamente 7 días de cultivo en medio que contiene HS, las células hHCC comienzan a mostrar pruebas de diferenciación hacia el fenotipo de un hepatocito primario humano. Aproximadamente a los 14 días, 15 días, 16 días, 17 días o 18 días o más del cultivo en medio que contiene HS, el cultivo contiene células que han completado la diferenciación en el fenotipo de un hepatocito primario humano. En general, dichos cultivos de células diferenciadas contienen al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % o más células diferenciadas.

Las condiciones de cultivo adecuadas para la inducción del fenotipo de un hepatocito primario humano en una hHCC generalmente implican el cultivo de la hHCC en un medio de cultivo adecuado que contenga suero humano (HS) (por ejemplo, al menos HS al 2 % vol/vol.) durante un periodo de al menos 7 días, por lo general más de 11 días, por lo general al menos 14 días, al menos 15 días, al menos 16 días, al menos 17 días, al menos 18 días, al menos 19 días, al menos 20 días o al menos 21 días o más.

En general, el cultivo de células de hHCC en medio de cultivo que contiene HS puede realizarse sin subcultivar las células más de una vez o sin subcultivar en los primeros 7 días o en los primeros 10 días de cultivo en medio que contiene HS. "Subcultivo" se refiere a dividir ("separar") la población de células cultivadas con el fin de reducir la densidad celular en el cultivo.

Las células de hHCC diferenciadas en el fenotipo de un hepatocito primario humano pueden mantenerse en cultivo durante al menos 1 mes o al menos 2 meses o más. Dichos cultivos a largo plazo pueden mantenerse sin subcultivar.

Un ejemplo de un método de la presente divulgación se describe esquemáticamente en la figura 1. Por ejemplo, las células de hHCC pueden mantenerse en medio de cultivo que contiene FBS, con el subcultivo (por ejemplo, por tripsinización) cada 3-4 días. Las células de hHCC se subcultivan y se transfieren a medio de cultivo que contiene HS. El día 2-4 después de la transferencia a medio que contiene HS, las células se subcultivan opcionalmente, con

dilución a no más de 1:2. El día 7 después de la transferencia a medio que contiene HS, las células de hHCC comienzan a mostrar signos de la detención del crecimiento, por ejemplo, la detención de la división celular (es decir, el número de células en la población no aumenta significativamente), las células no se agregan (por ejemplo, las células no se apilan una encima de la otra) y pueden mantenerse a largo plazo sin la necesidad de subcultivo). Después de este punto las células no se subcultivan y el medio se cambia a medio fresco que contiene HS cada 3-4 días. A aproximadamente los días 14-18 después de la transferencia a medio que contiene HS, las células de hHCC parecen haber completado la diferenciación en células que tienen el fenotipo de un hepatocito primario humano. Estas células se mantienen en cultivo, con cambios de medio a medio que contiene HS fresco, durante al menos 1 mes, 2 meses o más.

**Composiciones que comprenden células de hHCC diferenciadas**

La presente divulgación proporciona poblaciones celulares que comprenden una célula de hHCC diferenciada que tiene un fenotipo de un hepatocito primario humano. En aras de la brevedad, las células diferenciadas a partir de células hHCC y que tienen un fenotipo de un hepatocito primario humano también pueden denominarse en el presente documento "células de hHCC diferenciadas". Por "fenotipo de un hepatocito primario humano" se entiende una célula que se caracteriza de acuerdo a si expresa un marcador fenotípico (por ejemplo, biomarcadores, funciones fisiológicas de la célula y características morfológicas) característico de un hepatocito primario humano. La aparición y el número de marcadores fenotípicos (por ejemplo, 2 o más, 3 o más, 4 o más o todos los biomarcadores y/o características morfológicas y/o características fisiológicas, tales como se describen a continuación) dependen de la etapa de diferenciación de una célula de hHCC hacia una hHCC completamente diferenciada que tenga un fenotipo de un hepatocito primario humano.

Los marcadores fenotípicos de un fenotipo de un hepatocito primario humano como se proporciona a continuación generalmente comienzan a aparecer en hHCC después del cultivo en medio que contiene HS al menos 7 días. Hay presentes marcadores fenotípicos adicionales, así como niveles de expresión aumentados de un biomarcador fenotípico, con el cultivo continuado de la hHCC en medio que contiene HS (por ejemplo, durante al menos 8 días, al menos 9 días, al menos 10 días, al menos 11 días, al menos 12 días, al menos 13 días o al menos 14 días o más) a medida que avanza la hHCC para convertirse en una hHCC completamente diferenciada.

Los biomarcadores fenotípicos característicos de un hepatocito primario humano incluyen la expresión de 2, 3, 4 o todos los biomarcadores albúmina, Alfa 1-antitripsina y LxRα/NR1H3, así como la expresión de claudina-1 y ocludina, que se asocian a la formación de uniones estrechas. Un fenotipo de un hepatocito primario humano puede definirse por ser positivo para la expresión de al menos albúmina y alfa 1-antitripsina, donde la expresión de cada uno de estos biomarcadores en un nivel por encima de un nivel de control negativo es indicativa de un fenotipo de un hepatocito primario humano (por ejemplo, por encima de un nivel de expresión de albúmina y alfa 1-antitripsina cuando la hHCC se cultiva en ausencia de suero humano, con o sin DMSO, como se analiza a continuación). Los biomarcadores fenotípicos adicionales característicos de un hepatocito primario humano incluyen LxRα/NR1H3, claudina-1 y ocludina. La hHCC diferenciada puede describirse como que es positiva para la expresión de al menos 1, 2 o las 3 de LxRα/NR1H3, claudina-1 y ocludina por encima de un nivel de control negativo (por ejemplo, por encima de un nivel de expresión de la hHCC cultivada en ausencia de suero humano, con o sin DMSO, como se analiza a continuación).

Pueden describirse hHCC diferenciadas que tienen una característica de un hepatocito primario humano en términos de la expresión diferencial de uno o más biomarcadores fenotípicos con respecto a la expresada por un control negativo, por ejemplo, la hHCC cultivada en ausencia de suero humano (por ejemplo, en presencia de un suero no humano tal como FBS o suero bovino adulto (ABS), pudiendo ser el cultivo con o sin DMSO). De este modo, por ejemplo, se considera que un nivel de expresión de un biomarcador fenotípico en células de hHCC cultivadas en suero no humano (por ejemplo, FBS o ABS, con o sin DMSO) es negativo para la expresión de marcadores fenotípicos de un hepatocito primario humano de albúmina, alfa 1-antitripsina, LxRα/NR1H3, ocludina y claudina-1 a un nivel característico de un hepatocito primario humano.

Pueden describirse células de hHCC diferenciadas que tienen un fenotipo característico de un hepatocito primario humano como que presentan una expresión diferencial de 1, 2, 3, 4 o más de albúmina, alfa 1-antitripsina, LxRα/NR1H3, claudina-1 y ocludina, donde la expresión nivel del biomarcador en la hHCC diferenciada es significativamente mayor que el nivel de expresión del biomarcador de la hHCC cultivada en ausencia de suero humano y puede ser al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces o mayor en hHCC diferenciada en comparación con la hHCC cultivada en ausencia de suero humano.

Los marcadores fenotípicos de un fenotipo de un hepatocito primario humano incluyen características morfológicas. Las características morfológicas de los hepatocitos primarios humanos incluyen el aspecto granular, la forma poligonal (por ejemplo, en forma cúbica) de las células, la formación de uniones estrechas y el pavimento como organización de la población celular, siendo la multinucleación también con frecuencia una característica típica de un hepatocito humano primario.

Un marcador fenotípico de un fenotipo de un hepatocito primario humano incluye características fisiológicas celulares, por ejemplo, actividades celulares asociados a un hepatocito primario humano. Las características fisiológicas de un fenotipo de hepatocito primario humano incluyen la secreción de albúmina, así como la captación y utilización de lípidos de las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

5 Puede describirse una hHCC totalmente diferenciada que tiene un fenotipo de un hepatocito primario humano mediante cualquier combinación adecuada de los marcadores fenotípicos descritos en el presente documento, donde la combinación es suficiente para distinguir un hepatocito primario humano de las células que no son un hepatocito primario humano. En general, la hHCC completamente diferenciada que tiene un fenotipo de un hepatocito primario puede identificarse por ser positiva para la expresión de alfa 1-antitripsina y albúmina y por la forma celular poligonal (por ejemplo, en forma cúbica). En hHCC completamente diferenciada, la albúmina y la alfa 1-antitripsina pueden expresarse cada una en un nivel que no sea significativamente menor y que puede ser aproximadamente el mismo o mayor que, un nivel de expresión de albúmina y alfa 1-antitripsina en un hepatocito primario humano cultivado en las mismas condiciones.

15 Una hHCC completamente diferenciada que tiene un fenotipo de un hepatocito primario humano también puede caracterizarse opcionalmente mediante la expresión de una o ambas proteínas de unión estrecha claudina-1 y ocludina. Por ejemplo, una hHCC completamente diferenciada que tiene un fenotipo de un hepatocito primario humano puede expresar cada una de claudina-1 y ocludina a un nivel que no sea significativamente menor y puede ser aproximadamente el mismo o mayor que, el de un hepatocito primario humano cultivadas en las mismas condiciones. Una hHCC totalmente diferenciada que tiene un fenotipo de un hepatocito primario humano también puede estar caracterizada por la característica morfológica de la presencia de uniones estrechas y/o por la función fisiológica de la capacidad de absorción y utilización de los lípidos de LDL.

25 Pueden detectarse marcadores de un fenotipo de hepatocitos primarios humanos usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, pueden detectarse marcadores usando cualquier técnica inmunológica adecuada, tal como inmunocitoquímica de flujo para marcadores de superficie celular o inmunohistoquímica (por ejemplo, de células fijadas o secciones de tejido) para marcadores intracelulares o de superficie celular. Por ejemplo, la expresión de un antígeno de superficie celular puede detectarse mediante la unión de un anticuerpo específico para el antígeno en un ensayo de inmunocitoquímica o de citometría de flujo convencional, opcionalmente después de la fijación de las células, y, opcionalmente, usando un anticuerpo secundario marcado u otro conjugado para amplificar el marcaje.

30 La expresión de marcadores de productos génicos también puede detectarse a nivel del ARNm por análisis por transferencia Northern, análisis de hibridación por transferencia puntual o mediante reacción en cadena de la polimerasa iniciada por transcriptasa inversa (RT-PCR) usando cebadores específicos de secuencia en métodos de amplificación convencionales. Los datos de secuencia para marcadores particulares pueden obtenerse de bases de datos públicas tales como GenBank.

40 La presente divulgación puede proporcionar una población de células de cultivo que comprende células de hHCC tanto indiferenciadas como diferenciadas de manera que una proporción de células en la población tiene las características de un hepatocito primario humano. Por ejemplo, dichos cultivos celulares pueden incluir aquellos en los que al menos aproximadamente el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 98 % o más de las células en la población son células de hHCC diferenciadas, por ejemplo, que son positivas para uno, dos, tres o más de cualquiera de los marcadores fenotípicos y/o marcadores morfológicos característicos de un hepatocito primario humano como se han descrito anteriormente. También puede ser deseable reducir al mínimo la proporción de células de hHCC indiferenciadas en una población celular. En ciertas realizaciones, las poblaciones de células de hHCC diferenciadas tienen menos del 15 %, menos del 10 % o menos del 5 % de células hHCC indiferenciadas.

50 Los métodos de la presente solicitud pueden proporcionar grandes poblaciones de células de hHCC diferenciadas que tienen un fenotipo de un hepatocito primario humano. Pueden producirse poblaciones de al menos  $10^8$ ,  $10^{10}$  o  $10^{12}$  células que tienen un fenotipo de un hepatocito primario humano.

55 Las composiciones de la presente divulgación incluyen poblaciones celulares cultivadas que comprenden células que tienen un fenotipo de un hepatocito primario humano, en las que las células son la progenie diferenciada de una estirpe celular de hHCC; y un medio de cultivo que comprende suero humano. En algunas realizaciones, el cultivo celular se ha mantenido de forma continua durante al menos 7 días, al menos 8 días, al menos 9 días, al menos 10 días, al menos 11 días, al menos 12 días, al menos 13 días, al menos 14 días, al menos 15 días, al menos 16 días, al menos 17 días, al menos 18 días, al menos 19 días, al menos 20 días o al menos 21 días o más. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende suero humano de aproximadamente el 1 % al 20 %, opcionalmente de aproximadamente el 2 % al 10 % de suero humano. En algunas realizaciones, la estirpe celular de hHCC es una estirpe celular Huh-7 o derivada de Huh-7. En algunas realizaciones las células cultivadas se adhieren sobre un soporte sólido (por ejemplo, un pocillo de una placa de cultivo, una perla y similares), en el que el soporte sólido comprende opcionalmente uno o más componentes de la matriz extracelular, por ejemplo, colágeno (por ejemplo, colágeno de tipo I), para facilitar la adherencia de las células cultivadas al soporte sólido.

65

Las composiciones de la presente divulgación incluyen poblaciones celulares cultivadas que comprenden células de hHCC diferenciadas que se han mantenido en cultivo durante al menos 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas u 8 semanas o más.

5 Las células diferenciadas a partir de estirpes celulares de hHCC presentan un fenotipo de un hepatocito primario humano, pero, debido a que derivan de una estirpe celular de hHCC, también pueden caracterizarse como que son progenie diferenciada de la célula o estirpe celular de origen. En consecuencia, la hHCC diferenciada tendrá el mismo genoma que las células de las que deriva. Esto significa que, por encima de cualquier cambio de cariotipo, el ADN cromosómico será más del 90 % idéntico entre la estirpe celular original parental de hHCC y las células de hHCC diferenciadas producidas a partir de y que tiene el fenotipo de un hepatocito primario humano. Todavía se considera que las células de hHCC diferenciadas que han sido sometidas a cambios genéticos normalmente asociados al cultivo de la estirpe celular de hHCC parental con métodos de cultivo convencionales, o que han sido tratadas por métodos recombinantes para introducir un transgén o una inactivación en un gen endógeno, tienen el mismo genoma que la estirpe de la que derivan, puesto que se conservan todos los elementos genéticos no manipulados de forma recombinante. Las células de hHCC diferenciadas y sus células de hHCC parentales pueden identificarse como que tienen el mismo genoma mediante técnicas de identificación genética convencional.

Esta característica puede ser una característica valiosa de las células de hHCC diferenciadas de la presente divulgación. Por ejemplo, el uso de la misma estirpe celular de hHCC para generar células de hHCC diferenciadas pueden reducir la variación entre las poblaciones de células de hHCC diferenciadas generadas en momentos diferentes.

Ciertas realizaciones de las composiciones de la divulgación incluyen células de origen (tales como una estirpe celular de hHCC indiferenciada o una población intermedia) en combinación con células diferenciadas que tienen características de los hepatocitos primarios humanos. Las dos poblaciones pueden estar o bien en el mismo recipiente (por ejemplo, en cocultivo), en recipientes separados en la misma instalación o en dos lugares diferentes. Las células indiferenciadas y diferenciadas pueden estar presentes de forma simultánea o en un momento diferente, tal como cuando se provoca que un cultivo de células indiferenciadas se diferencien en su totalidad en hHCC diferenciada.

#### **MÉTODOS Y COMPOSICIONES QUE USAN MEDIO DE CULTIVO QUE CONTIENE SUERO POBRE EN LIPOPROTEÍNAS DE UNIÓN AL RECEPTOR DE LDL**

La presente divulgación también proporciona métodos y composiciones para su uso en la infección de células cultivadas con un microorganismo hepatótrofo (por ejemplo, virus hepatótrofo, parásito hepatótrofo (por ejemplo, malaria) y similares). En general, el método implica la exposición de las células cultivadas a un microorganismo hepatótrofo en presencia de medio de cultivo que contiene suero pobre en lipoproteínas de unión al receptor de LDL, incluyendo LDL y VLDL, para facilitar la infección de las células cultivadas por el microorganismo hepatótrofo tal como un virus de la hepatitis, por ejemplo, el virus de la hepatitis A, B, C, D o E (VHA, VHB, VHC, VHD, VHE) y similares, citomegalovirus (CMV). Cuando el microorganismo hepatótrofo es un virus de la hepatitis, el virus puede estar en cualquier genotipo (por ejemplo, VHC genotipo 1 (por ejemplo, el genotipo 1a, 1b, 1c), 2, 3, 4, 5, 6 y 7) y puede ser un virus de origen natural (por ejemplo, un virus obtenido a partir de un primate infectado, por ejemplo, un aislado clínico obtenido de un ser humano infectado), un virus adaptado al cultivo tisular, un virus modificado genéticamente, un virus quimérico o un virus seudotipado.

Las células para su uso en los métodos que utilizan suero pobre en lipoproteínas de unión al receptor de LDL pueden ser cualquier célula de hepatocitos adecuada, tal como hepatocitos primarios, una estirpe celular de hepatocitos inmortalizada (por ejemplo, una célula de hHCC) y células de hHCC diferenciadas de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento para presentar un fenotipo de un hepatocito primario humano). El presente método encuentra un uso particular en proporcionar la infección de las células de hepatocitos cultivadas (por ejemplo, hepatocitos primarios o estirpes celulares de hepatocitos inmortalizadas, incluyendo células de hHCC diferenciadas para presentar un fenotipo de un hepatocito primario humano) con un aislado clínico de un virus de hepatitis, por ejemplo, un aislado clínico del VHC.

El suero pobre en lipoproteínas de unión al receptor de LDL para su uso en el medio de cultivo en estos métodos de la presente divulgación puede prepararse por cualquier método adecuado disponible en la técnica. El suero para su uso en los métodos puede ser de origen humano, bovino (por ejemplo, bovino fetal) o de cualquier otra fuente adecuada. En un ejemplo, el suero pobre en lipoproteínas de unión al receptor de LDL se prepara poniendo en contacto el suero con un agente de unión para las lipoproteínas que se unen al receptor de LDL, por ejemplo, el receptor de LDL humana (por ejemplo, un anticuerpo de lipoproteína de unión al receptor anti-LDL (por ejemplo, un anticuerpo policlonal o monoclonal, un anticuerpo anti-VLDL, un anticuerpo anti-LDL, un anticuerpo anti-apolipoproteína B) o heparina) durante un periodo de tiempo suficiente para proporcionar la unión al agente de unión, seguido de la recuperación de componentes del suero que no se unen al agente de unión para su uso en el medio de cultivo. Por "suero pobre en lipoproteínas de unión al receptor de LDL" se entiende un suero que está empobrecido en lipoproteínas de unión al receptor de LDL con respecto al suero antes del tratamiento ("suero sin tratar") y abarca el suero que está empobrecido en las lipoproteínas de unión del receptor de LDL en al menos el

20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o más con respecto al suero antes del empobrecimiento. En una realización, el suero pobre en lipoproteínas de unión al receptor de LDL no está sustancialmente empobrecido en HDL (que no se une significativamente al receptor de LDL) con respecto al suero antes del tratamiento.

5 En una realización, suero pobre en lipoproteínas de unión al receptor de LDL se prepara poniendo en contacto el suero con heparina como agente de unión, donde el contacto es durante un periodo de tiempo suficiente para proporcionar la unión de los componentes de unión a heparina en el suero (por ejemplo, LDL, VDL) a la heparina, seguida de la recuperación de componentes del suero que no están unidos por la heparina para su uso en el medio de cultivo.

10 El suero para su uso en los presentes métodos incluye suero pobre en al menos el 25 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o más de las lipoproteínas en comparación con el suero antes del empobrecimiento, el suero pobre en al menos el 25 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % de las lipoproteínas de unión a heparina en comparación con el suero antes del empobrecimiento, y/o suero pobre en al menos el 25 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o más de ApoB en comparación con el suero antes del empobrecimiento.

15 Los métodos de la presente divulgación que usan suero pobre en lipoproteínas (por ejemplo, suero tratado con heparina) implican infectar células (por ejemplo, una célula de hHCC, hepatocitos primarios humanos u otras células susceptibles a la infección por un microorganismo hepatótrofo) con un microorganismo hepatótrofo, donde las células se cultivan en medio que contiene suero pobre en lipoproteínas. Después de la infección, las células pueden trasladarse a cualquier medio de cultivo adecuado (por ejemplo, medio que contiene HS para células de hHCC cuando se desea diferenciación o el mantenimiento de células de hHCC diferenciadas).

## 25 USOS

Los métodos y composiciones de la presente divulgación pueden usarse en diversas formas tales como, pero no limitas a, producción de partículas víricas (por ejemplo, como en la producción de vacunas víricas), estudio de la función de los hepatocitos y métodos de cribado. Se describen a continuación ejemplos de usos con más detalle.

### Producción de partículas víricas

35 Los métodos y composiciones de la presente divulgación pueden utilizarse en la producción de partículas víricas, en particular partículas víricas de un virus hepatótrofo tal como un virus de la hepatitis, por ejemplo, el virus de la hepatitis A, B, C, D o E (VHA, VHB, VHC, VHD, VHE) y similares, citomegalovirus (CMV). El virus puede estar en cualquier genotipo (por ejemplo, VHC de genotipo 1 (por ejemplo, el genotipo 1a, 1b, 1c), 2, 3, 4, 5, 6 y 7) y puede ser un virus de origen natural (por ejemplo, un virus obtenido a partir de un primate infectado, por ejemplo, un ser humano infectado, con frecuencia denominado un "aislado clínico"), un virus adaptado al cultivo tisular, un virus modificado genéticamente o un virus seudotipado.

45 Las células de hHCC diferenciadas, productoras de partículas víricas, de la presente divulgación pueden conseguirse usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede introducirse un genoma vírico en las células por infección, electroporación, transfección y similares. En algunas realizaciones, las células de hHCC y/o la célula de hHCC diferenciada no se modifican por técnicas recombinantes con el fin de proporcionar un genoma vírico genómicamente integrado. En algunas realizaciones, las células de hHCC y/o las células de hHCC diferenciadas no se modifican genéticamente para incluir un genoma vírico genómicamente integrado unido operativamente a un promotor que no es nativo al genoma vírico.

50 Pueden introducirse genomas víricos en células de hHCC antes de la diferenciación en medio que contiene HS, en el momento de la transición desde el medio que contiene FBS al medio que contiene HS, durante la diferenciación mediante el cultivo en un medio que contiene HS (por ejemplo, a los 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días después de la transición al medio que contiene HS) o después de la detención del crecimiento y/o diferenciación a un fenotipo de un hepatocito primario humano (por ejemplo, a los 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 días o más después de la transición al medio que contiene HS).

60 Cuando se han de introducir genomas víricos por infección, la infección puede realizarse en medio de cultivo que contiene suero pobre en lipoproteínas (por ejemplo, tratado con heparina) (por ejemplo, suero humano, suero bovino fetal) como se ha descrito anteriormente. Opcionalmente, tras la infección las células pueden trasladarse a medio que contiene HS, por ejemplo, para proporcionar para la diferenciación de las células de hHCC y/o para facilitar la viabilidad celular. En una realización, las células de hHCC indiferenciadas o diferenciadas se cultivan en medio que contiene suero pobre en lipoproteínas durante un periodo de tiempo para permitir la infección de las partículas víricas añadidas a las células. Después del periodo de infección, el medio de cultivo se reemplaza con medio que contiene HS y las células se cultivan durante un periodo de tiempo para proporcionar la diferenciación de las células de hHCC, continuar la diferenciación de las células de hHCC y/o proporcionar el mantenimiento de las células de hHCC diferenciadas y proporcionar la producción de partículas víricas.

La presente divulgación proporciona cultivos de células de hHCC diferenciadas que comprenden al menos  $10^5$ , al menos  $10^6$ , al menos  $10^7$ , al menos  $10^8$ , o al menos  $10^9$  o más partículas víricas por mililitro de medio de cultivo. La presente divulgación proporciona además dichos cultivos productores de partículas víricas que pueden mantenerse durante al menos 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas u 8 semanas o más.

Las partículas víricas producidas a partir de células de hHCC cultivadas en HS presentan características estructurales que distinguen las mismas de partículas víricas producidas en células de hHCC cultivadas en suero no humano (por ejemplo, en FBS). Por ejemplo, cuando se producen en células de hHCC diferenciadas cultivadas en HS, las partículas víricas tienen una menor densidad media que cuando se producen a partir de células de hHCC cultivadas en FBS. Por ejemplo, cuando las partículas de VHC se producen en células de hHCC cultivadas en FBS, aproximadamente el 75 % de las partículas víricas tienen una densidad mayor de aproximadamente 1,16g/ml. Por el contrario, cuando las partículas de VHC se producen en células de hHCC cultivadas en HS, las partículas de VHC tienen una densidad media más baja, teniendo solo un 25 % de las partículas de VHC de la población una densidad mayor de 1,16 g/ml. Además, las partículas de VHC producidas a partir de células de hHCC cultivadas en HS se asocian a ApoB, por lo general estando al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 % o al menos aproximadamente el 90 % o más de las partículas de VHC en la población de partículas víricas producidas, asociadas a ApoB.

Las partículas víricas producidas a partir de las células de hHCC diferenciadas pueden utilizarse en diversas maneras. Por ejemplo, las partículas víricas producidas a partir de las células de hHCC diferenciadas pueden aislarse del medio de cultivo celular y formularse de manera que sean adecuadas para la administración como una vacuna. Las partículas víricas pueden usarse en ambientes de investigación, por ejemplo, para la infección de modelos animales, tales como un modelo de ratón quimérico humano. Las poblaciones de células de hHCC diferenciadas también proporcionan una herramienta de investigación para su uso en el estudio de los virus, especialmente los virus hepatótrofos.

### **Ensayos**

Las hHCC diferenciadas de la presente divulgación encuentran un uso en diversos ensayos. Por ejemplo, las hHCC diferenciadas pueden servir como un modelo de hepatocitos humanos y, por tanto, un modelo de la función y la enfermedad hepáticas (por ejemplo, la carcinogénesis, la esteatosis (hígado graso)). Otros usos incluyen los estudios del metabolismo y la secreción de las lipoproteínas, y estudios metabólicos, tanto de intermedios biológicos como de compuestos xenobióticos (por ejemplo, la oxidación por el citocromo P450).

Los ensayos que usan las hHCC diferenciadas de la presente divulgación pueden implicar, por ejemplo, evaluar el efecto de un agente sobre las células que tienen un fenotipo de un hepatocito primario humano, por ejemplo, para evaluar el efecto de un agente sobre la función de los hepatocitos humanos (por ejemplo, para evaluar la toxicidad en el hígado de un agente); para evaluar el metabolismo de un agente por un hepatocito humano; estudiar los mecanismos implicados en la función de los hepatocitos; y similares. Las células de hHCC diferenciadas pueden utilizarse para el cribado de agentes (tales como disolventes, fármacos de moléculas pequeñas, péptidos, polinucleótidos) y/o condiciones ambientales (tales como condiciones de cultivo o manipulación) que afectan a las características de las células que tienen un fenotipo de un hepatocito primario humano.

Evaluación de la actividad de un agente (por ejemplo, un agente candidato) generalmente implica poner en contacto una célula de hHCC diferenciada con el agente, ya sea solo o en combinación con otros agentes (por ejemplo, fármacos que tienen una actividad conocida). Después de la incubación durante una cantidad de tiempo suficiente, se realiza un ensayo apropiado para detectar el efecto, si lo hay, del agente candidato sobre las células de hHCC diferenciadas (por ejemplo, mediante la evaluación de un cambio en la morfología celular, la función celular, el cambio en un marcador de un fenotipo de un hepatocito primario humano). La presencia o ausencia de un efecto del agente sobre el fenotipo se detecta y se analiza, por ejemplo, mediante la comparación con un control (por ejemplo, por comparación con el fenotipo en ausencia del agente y/o por comparación con el fenotipo en presencia de un agente que tiene un efecto conocido sobre una célula hepática).

Por ejemplo, cuando el ensayo es evaluar el efecto de un agente candidato sobre el metabolismo de las lipoproteínas, el ensayo puede implicar el cribado de un cambio en un marcador fenotípico, por ejemplo, un cambio morfológico (por ejemplo, la presencia o ausencia de un cambio en la organización de los lípidos en la célula de hHCC diferenciada (por ejemplo, como se indica por la presencia o ausencia de gotitas de lípidos y/o un cambio en el patrón de dichas gotitas de lípidos)) o un cambio en un biomarcador, tal como una lipoproteína o lípido (por ejemplo, un cambio en un nivel de una lipoproteína o un lípido), en presencia del agente candidato en comparación con la ausencia del agente candidato. Un cambio en el marcador fenotípico en presencia del agente candidato en comparación con la ausencia del agente indica que el agente candidato tiene un efecto sobre el metabolismo de las lipoproteínas.

En un aspecto, en el presente documento se proporciona un método para evaluar el efecto de un agente candidato

sobre la secreción de lipoproteínas de cualquiera de las células de hHCC diferenciadas proporcionados en el presente documento. Como se analiza en los Ejemplos a continuación, la estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) cultivada en un medio de cultivo que comprende suero humano durante al menos 3-5 días o más secreta lipoproteína (por ejemplo, VLDL, LDL, HDL). A los 14 días o más de cultivo en medio de cultivo que  
 5 comprende suero humano, las células de hHCC secretan lipoproteínas a niveles que se parecen mucho a los secretados por los hepatocitos primarios humanos en cultivo, y también se parecen mucho a los niveles de lipoproteínas que se encuentran en el suero humano. Por tanto, el perfil de lipoproteínas secretadas de las células de hHCC cultivadas en suero humano es similar al perfil de lipoproteínas secretadas por los hepatocitos primarios humanos y al perfil de lipoproteínas encontrado en el suero humano. Como tal, un cambio en los niveles de  
 10 secreción de lipoproteínas en presencia de un agente candidato en comparación con la ausencia del agente indica que el agente candidato tiene un efecto sobre la secreción de lipoproteínas.

En ciertas realizaciones, el método incluye las etapas de incubar un cultivo celular que comprende una estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) en medio que contiene HS durante más de 14 días. La estirpe  
 15 celular de hHCC puede cultivarse en cualquier medio que contenga HS descrito en el presente documento durante 3 días o más. En ciertas realizaciones, la estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) se cultiva en el medio que contiene HS durante 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 o más días antes del contacto con el agente candidato.

Después de cultivar la estirpe celular de hHCC durante un periodo de tiempo seleccionado (por ejemplo, para proporcionar un perfil de lipoproteínas secretadas deseado), la estirpe celular se pone en contacto con el agente candidato. Los agentes candidatos incluyen, pero no se limitan a, moléculas sintéticas, de origen natural o producidas de forma recombinante (por ejemplo, molécula pequeña, fármacos; polinucleótidos; polipéptidos; péptidos; anticuerpos, factores endógenos presentes en las células eucariotas o procariotas (por ejemplo, polipéptidos, extractos vegetales y similares)); etc.). Los agentes candidatos incluyen agentes de numerosas clases químicas, aunque normalmente son moléculas orgánicas, preferentemente compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 2.500 Dalton. Los agentes candidatos incluyen biomoléculas tales como, pero no limitadas a: anticuerpos, péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales, inhibidores de ácido nucleico o combinaciones de los mismos.  
 20  
 25  
 30

El método puede implicar la administración de cantidades variables del agente candidato (desde nada de agente a una cantidad de agente que se aproxime a un límite superior de la cantidad que puede administrarse dentro de los límites de toxicidad para las células cultivadas) y puede incluir la administración del agente en diferentes formulaciones. Los agentes pueden administrarse solos o pueden combinarse en combinaciones de dos o más, por ejemplo, cuando se ha de evaluar el efecto de una terapia de combinación de fármacos candidatos.  
 35

Después de la incubación durante una cantidad de tiempo suficiente con el agente candidato, se realiza un ensayo apropiado para detectar el efecto, si lo hay, del agente candidato sobre las células de hHCC diferenciadas para secretar lipoproteínas. En ciertas realizaciones, el método incluye la etapa de evaluar el nivel de lipoproteínas (por ejemplo, VLDL, LDL, y/o HDL) en el medio que contiene HS. Los niveles de lipoproteínas que son secretadas por las células de hHCC pueden evaluarse por cualquier método adecuado. Por ejemplo, los niveles de lipoproteínas secretadas pueden evaluarse mediante el ensayo del medio recogido de las células de hHCC cultivadas para obtener un perfil de lipoproteínas (una medida de los niveles del colesterol HDL, LDL y/o VLDL de los triglicéridos).  
 40 Los perfiles de lipoproteínas pueden obtenerse, por ejemplo, usando ultracentrifugación o por técnicas de cromatografía líquida. Véase, por ejemplo, Brousseau et al. (1993) *Clinical Chemistry* 39 (6):960-964. En ciertas realizaciones, el perfil de lipoproteínas se obtiene mediante el aislamiento de los medios utilizados para cultivar las células de hHCC y separando las lipoproteínas del medio, usando la cromatografía líquida de proteína rápida de exclusión por tamaño. El contenido de lípidos (por ejemplo, de colesterol o de triglicéridos) puede medirse posteriormente por cualquier método de cribado de lípidos adecuado, incluyendo los métodos de cribado de lípidos basados en la fluorescencia. Véase, por ejemplo, Yang et al. (2012) *Chem Phys Lipids* 165 (2):133-41.  
 45  
 50

La presencia o ausencia de un efecto del agente candidato sobre la secreción de lipoproteínas se determina por comparación con una muestra de control (por ejemplo, un perfil de lipoproteínas de control obtenido a partir de medios de células de hHCC no en contacto con el agente). En dichas realizaciones, una diferencia en los niveles de lipoproteínas en presencia de un agente candidato en comparación con la muestra de control indica que el agente candidato tiene un efecto sobre la secreción de lipoproteínas. Cualquier muestra adecuada puede servir como una muestra de control para la comparación con los niveles de lipoproteínas obtenidos a partir de la estirpe celular de hHCC en contacto con el agente candidato. En realizaciones específicas, la muestra de control es un perfil de lipoproteínas obtenido de una estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) cultivada en el medio que contiene HS en las mismas condiciones que la muestra que se somete a ensayo y en ausencia del agente candidato. En otras realizaciones, se hace una comparación a un perfil de lipoproteínas de una muestra en contacto con un agente que tiene un efecto conocido sobre la secreción de lipoproteínas de los hepatocitos.  
 55  
 60

65

Dichos métodos pueden ser útiles, por ejemplo, en el cribado de agentes terapéuticos para su uso en el tratamiento de enfermedades y afecciones mediadas por lipoproteínas, incluyendo, pero no limitadas a, dislipidemia, hipolipidemia, hiperlipidemia, hipolipoproteinemia, hiperlipoproteinemia, Enfermedad de Tangier, hiperalfalipoproteinemia, hipoalfalipoproteinemia, arteriopatía coronaria (AC), enfermedad cerebrovascular (ECV),  
 5 aterosclerosis, trombosis e ictus. En realizaciones específicas, el método es para la prevención o el tratamiento de la aterosclerosis. En dichas realizaciones, una disminución de VLDL o LDL o un aumento de HDL en el medio de cultivo, en comparación con la muestra de control es indicativa de que el agente candidato puede utilizarse para la prevención o el tratamiento de la aterosclerosis.

10 Cuando los ensayos son para evaluar el metabolismo de un fármaco, el método implica generalmente poner en contacto un cultivo de células de hHCC diferenciadas que tienen un fenotipo de un hepatocito primario humano con un fármaco durante un periodo de tiempo suficiente para la producción de metabolitos del fármaco (si los hay) y el ensayo de metabolitos del fármaco (por ejemplo, en el sobrenadante del cultivo). Pueden detectarse metabolitos de fármacos usando métodos disponibles en la técnica. El metabolito puede someterse a un análisis adicional, por  
 15 ejemplo, para identificar la estructura del metabolito.

Cuando el ensayo es para evaluar la toxicidad de un agente en hepatocitos humanos, el método implica generalmente poner en contacto un cultivo de células de hHCC diferenciadas que tienen un fenotipo de un hepatocito primario humano con un agente y detectar un cambio en un marcador fenotípico (por ejemplo, un cambio  
 20 morfológico y/o un cambio en un biomarcador indicativo de la toxicidad, por ejemplo, un cambio en un nivel de transaminasa). El cribado de un cambio en presencia del agente en comparación con la ausencia del agente (por ejemplo, un aumento de las transaminasas en el medio celular en presencia del agente y/o un aumento en un marcador fenotípico de muerte celular (por ejemplo, un marcador fenotípico de muerte celular apoptótica, muerte celular necrótica (por ejemplo, TUNEL, caspasa)) es un indicador de la toxicidad del agente para las células de  
 25 hHCC diferenciadas).

Cuando las hHCC diferenciadas se cultivan con un microorganismo hepatótrofo (por ejemplo, un virus hepatótrofo tal como VHC, VHB), los ensayos pueden implicar el estudio de la entrada, la replicación, y, en el contexto de los virus, la producción de partículas víricas. Los ensayos también pueden proporcionar el cribado de agentes patógenos anti-  
 30 hepatótrofos, por ejemplo, agentes antivíricos.

Por ejemplo, cuando el ensayo es para detectar agentes antivíricos, el ensayo generalmente puede implicar la incubación de las células de hHCC diferenciadas en presencia de un genoma vírico con el agente candidato al menos un ensayo, y el cribado de la presencia o la ausencia de un efecto sobre el virus. Esto puede realizarse  
 35 mediante, por ejemplo, el ensayo de replicación vírica. El ensayo de replicación vírica puede realizarse mediante, por ejemplo, la evaluación de los niveles de partículas víricas (por ejemplo, los títulos víricos), el cribado de ácido nucleico vírico y similares. Por ejemplo, cuando las células de hHCC diferenciadas están infectadas con el VHC, los niveles de VHC pueden evaluarse mediante la medición de los títulos víricos, la medición del ARN de VHC cuantitativamente, la medición de partículas víricas de VHC (por ejemplo, mediante el cribado de las proteínas del  
 40 núcleo, por ejemplo, por inmunoensayo), por microscopía y similares. La inhibición de la replicación vírica para la producción de virus puede deberse, por ejemplo, a la inhibición de la replicación vírica a nivel del ácido nucleico, la inhibición de la producción de partículas víricas y/o la inhibición o la entrada vírica en las células. Una disminución en la replicación vírica en presencia del agente candidato en comparación con la ausencia del agente candidato indica que el agente candidato tiene actividad antivírica.

45 Pueden adaptarse métodos de cribado para agentes antivíricos para detectar la actividad antivírica de un anticuerpo, por ejemplo, para someter a ensayo anticuerpos que neutralizan virus mediante, por ejemplo, la inhibición de la infectividad vírica de una hHCC diferenciada. Dichos anticuerpos pueden ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. En una realización, los anticuerpos que se detectarán están presentes en una muestra biológica obtenida de un  
 50 sujeto expuesto a un virus (por ejemplo, VHC) o a quien se le ha administrado una vacuna (por ejemplo, una vacuna candidata). La muestra biológica puede ser, por ejemplo, sangre o una fracción de la misma, por ejemplo, sospechosa de contener anticuerpos antivíricos. En una realización, las células de hHCC diferenciadas están infectadas con un aislado vírico clínico. El ensayo puede incluir la comparación de la replicación vírica en presencia del anticuerpo o la muestra que se sospecha que contiene el anticuerpo, donde una disminución en la replicación  
 55 vírica en presencia del anticuerpo o la muestra es un indicador de la actividad antivírica. Cuando la muestra biológica es de un sujeto después de la inmunización, la actividad antivírica de la muestra después de la inmunización puede compararse con la actividad antivírica de una muestra biológica antes de la inmunización (por ejemplo, del mismo sujeto).

60 Puede detectarse cualquiera de diversos agentes candidatos. "Agentes candidatos" tiene por objeto incluir moléculas sintéticas, de origen natural o producidas de forma recombinante (por ejemplo, molécula pequeña; fármacos; polinucleótidos; polipéptidos; péptidos; anticuerpos, factores endógenos presentes en las células eucariotas o procarionas (por ejemplo, polipéptidos, extractos vegetales y similares)); etc.). Los agentes candidatos abarcan numerosas clases químicas, aunque normalmente son moléculas orgánicas, preferentemente compuestos orgánicos  
 65 pequeños que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 2.500 Dalton. Los agentes candidatos también pueden incluir biomoléculas tales como, pero no limitadas a: anticuerpos, péptidos, sacáridos,

ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

5 Pueden obtenerse agentes candidatos de una amplia diversidad de fuentes, incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, hay numerosos métodos disponibles para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Hay disponibles bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales, o se producen fácilmente. Pueden producirse bibliotecas de anticuerpos por métodos disponibles en la técnica. Adicionalmente, las bibliotecas naturales o producidas mediante síntesis y los compuestos se modifican fácilmente a través de la química convencional, medios físicos y bioquímicos y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Pueden someterse agentes farmacológicos conocidos a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc., para producir análogos estructurales.

15 El método de ensayo puede implicar la administración de cantidades variables del agente candidato (desde nada de agente a una cantidad de agente que se aproxima a un límite superior de la cantidad que puede administrarse dentro de ciertos límites de toxicidad para las células cultivadas) y puede incluir la administración del agente en diferentes formulaciones. Los agentes pueden administrarse solos o pueden combinarse en combinaciones de dos o más, por ejemplo, cuando se ha de evaluar el efecto de una terapia de combinación de fármacos candidato.

20 Se apreciará que el ensayo puede realizarse en diversos formatos y que el orden para poner en contacto las células de hHCC diferenciadas con el virus y el agente candidato puede variar. Por ejemplo, las células de hHCC diferenciadas pueden estar infectadas con virus antes de ponerlas en contacto con el agente candidato; como alternativa, las células de hHCC diferenciadas pueden ponerse en contacto con el agente candidato antes de la exposición a partículas víricas infecciosas.

25 El agente (por ejemplo, agente candidato, fármaco y/o microorganismo (por ejemplo, virus)) puede añadirse al medio de cultivo en el momento de la transición de las células de hHCC al medio que contiene HS, durante la diferenciación de las células de hHCC o después de la diferenciación las células de hHCC en un fenotipo de un hepatocito primario humano.

### 30 KITS

Los kits de la presente divulgación pueden incluir células de hHCC, células de hHCC diferenciadas que tienen un fenotipo de un hepatocito primario humano o ambas. El kit puede incluir opcionalmente componentes del medio de cultivo, por ejemplo, medios de cultivo (por ejemplo, sin suero o que contiene suero humano), suero humano para su uso en el cultivo y similares). Por ejemplo, el kit puede incluir medio de hepatocitos primarios (tal como se describe en detalle en los Ejemplos a continuación), con o sin suero humano. Los diversos componentes del kit pueden estar presentes en recipientes separados o ciertos componentes compatibles pueden ser precombinarse en un solo recipiente, según se desee.

40 Los kits pueden incluir instrucciones para el uso de los componentes del kit para poner en práctica un método de la presente divulgación. Las instrucciones generalmente se registran en un medio de grabación adecuado, tal como papel, plástico, almacenamiento electrónico, medio y similares. Por ejemplo, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un prospecto, en el etiquetado del recipiente del kit o componentes del mismo (por ejemplo, asociado al envase), etc. En otras realizaciones, las instrucciones están presentes en forma de un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento legible por ordenador adecuado, por ejemplo, una memoria en disco compacto de solo lectura (CD-ROM), un disco versátil digital (DVD), disquete, etc. En otros ejemplos, las instrucciones proporcionadas no contienen muchos o todos los detalles del ensayo, sino más bien proporcionan orientación en cuanto a una fuente remota para obtener instrucciones detalladas, por ejemplo, a través de Internet.

### Ejemplos

55 Los siguientes ejemplos se exponen con el fin de proporcionar a los expertos habituales en la materia una exposición y descripción completa de cómo realizar y usar la presente invención, y no tienen por objeto limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni tienen por objeto representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados Celsius y la presión es la atmosférica o cercana a la atmosférica.

### MATERIALES Y MÉTODOS

65 Los siguientes métodos y materiales se utilizan en los Ejemplos a continuación.  
Condiciones de cultivo convencionales (para la proliferación celular antes del cultivo en suero humano). Las células

Huh-7 (JCRB403) están disponibles en la Colección Japonesa de Recursos de Investigación - Banco de Células (banco de células JCRB). Las células Huh7.5 fueron un regalo amable del Dr. C. Rice. Se mantuvieron ambas estirpes celulares (antes del cultivo en suero humano) de acuerdo con los protocolos descritos. En resumen, las células Huh7.5 o Huh-7 se mantuvieron en medio de cultivo que contenía DMEM/suero de bovino fetal al 10 % (FBS)/penicilina/estreptomicina con tripsinización y la división cada 3 a 4 días. Después de aproximadamente 20-30 pases, se descartaron las células y se descongeló un nuevo vial.

Puesto que el uso de suero humano da como resultado la detención del crecimiento de las células, los cultivos celulares se mantuvieron normalmente en medios que contenían FBS (DMEM/FBS al 10 %/penicilina/estreptomicina, como se ha descrito anteriormente).

Infección de células con virus JFH-1. El virus JFH-1 (JFH) se obtuvo del Dr. T. Wakita. Dos días antes de la infección, las células se volvieron a sembrar a una densidad del 30 %. Después de la infección durante 4 horas, las células se lavaron y se cultivaron en medio que contenía cualquiera de FBS o HS según sea apropiado.

Infección de ratones quiméricos. Se infectaron ratones SCID/uPA quiméricos trasplantados con hepatocitos humanos (véase, por ejemplo, el documento WO 01/67854) como se ha descrito anteriormente (Steenbergen et al. (2010) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G844-854; Mercer et al. (agosto de 2001) *Nat Med* 7 (8): 927-33). La infección se realizó usando 100 ml de sobrenadante de cultivo tisular a partir de células infectadas por el JFH o suero de pacientes infectados por el VHC. Se determinaron los títulos de VHC y la albúmina humana (hAlb) en el suero en los ratones quiméricos de modelo de ratón por PCR cuantitativa y ELISA, respectivamente.

Visualización y cuantificación de gotitas de lípidos por inmunofluorescencia. Se cultivaron células en cubreobjetos y se cultivaron o bien en FBS o HS. Las células se tiñeron con Bodipy 493/503 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor con el fin de visualizar las gotitas de lípidos. La cantidad de tinción de lípidos neutros se visualizó usando un microscopio de fluorescencia. Las imágenes de la tinción Bodipy 493/503 en diferentes condiciones de cultivo celular se tomaron usando ajustes del microscopio y de exposición idénticos. La cantidad de fluorescencia se cuantificó usando el software ImageJ (National Institutes of Health). Los datos se recogieron en 3 experimentos independientes, con 4-8 campos microscópicos medidos por condición. El fondo y la autofluorescencia fueron insignificantes.

La distribución y la forma de las gotitas de lípidos se examinaron en muestras teñidas por separado con la configuración de microscopía idéntica, pero con la exposición optimizada para cada condición individual.

Centrifugación por gradiente/densidad de sacarosa. Se realizó un análisis de ultracentrifugación en gradiente-densidad de sacarosa como se ha descrito anteriormente (Zhong et al. (2005) *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:9294-9299). Los sobrenadantes de las células infectadas con el VHC se centrifugaron a 300 g durante 5 min para eliminar restos celulares en 1 ml de tampón TNE (Tris HCl 50 mM, pH 8; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM) que contenía inhibidores de la proteasa (RocheApplied Ciencia, Indianápolis), se cargaron en un gradiente de sacarosa al 20-60 % (volumen total de 12,5 ml) y se centrifugaron a 120.000 g durante 16 horas a 4 °C en un rotor SW41Ti (Beckman). Las fracciones de 0,5 ml cada una se recogieron de la parte superior del gradiente y el título en cada fracción se determinó por RT-PCR cuantitativa como se describe a continuación. La densidad de cada fracción se determinó mediante la determinación del peso de un volumen conocido.

Inmunoprecipitación de partículas que contienen ApoB. Se realizaron experimentos de inmunoprecipitación esencialmente como se ha descrito anteriormente (Steenbergen et al. (2010) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G844-854). Se incubaron suero o muestras de sobrenadante de cultivo celular (50 ml) con títulos de al menos  $10^5$  copias de ARN/ml durante la noche con 7,5  $\mu$ l de anticuerpo anti ApoB (Chemicon AB742, apolipoproteína B de cabra anti humana; reacciona de forma cruzada con ApoB humana, de ratón y bovino), a 4 °C mientras giraba. Se añadió suspensión de Proteína G (20 ml, GE healthcare, Proteína Sefarosa 4 Flujo Rápido) a cada muestra y se incubaron durante un mínimo de 1 hora en un rotador. Los complejos de proteína G se precipitaron a 14000 g en una microcentrífuga. Los sedimentos se lavaron una vez con PBS y el ARN vírico se aisló directamente de los sedimentos (QiaAmp kit de ARN vírico, Qiagen) y se analizó por RT-PCR cuantitativa. Las muestras que contenían altas cantidades de inmunoglobulinas (como el suero del paciente) fueron pre-aclararon con perlas de proteína G, antes de la inmunoprecipitación, para asegurar la inmunoprecipitación cuantitativa de los complejos de ApoB. Para asegurar que las perlas de proteína G no se unieran a los complejos de VHC o al VHC directamente, se incubó suero de ratón que contenía VHC con perlas de Proteína G Sepharose en ausencia de anticuerpos anti-ApoB. Los títulos de VHC en el precipitado de estas muestras fueron insignificantes.

RT-PCR cuantitativa de marcadores de hepatocitos. Se aisló ARN de células usando Trizol, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se produjo ADNc a partir del ARN usando el kit de transcripción inversa Quantitect (Qiagen). Los conjuntos de cebadores-sondas específicos de genes fueron diseñados por Applied Biosystems. Se utilizó un sistema de PCR rápido en tiempo real de Applied Biosystems 7900HT para la cuantificación de los productos génicos. La expresión génica se calcula con respecto a HPRT de acuerdo con Pfaffl (Pfaffl MW. *Nucleic Acids Res*. 29: e45, 2001).

Cultivos de hepatocitos primarios: Se adquirieron hepatocitos primarios humanos congelados de Invitrogen o se

aislaron en el laboratorio como se ha descrito anteriormente (Mercer et al, 2001 *Nat Med* 7 927-933.). Las células aisladas se trataron anteriormente con HypoThermosol HTS-Purge (BioLife Solutions), se resuspendieron en CryoStor CS10 (BioLife Solutions) y se enfriaron en un congelador de velocidad controlada, a razón de 1 °C por minuto hasta -40 °C. Las células se almacenaron en nitrógeno líquido. Las células se descongelaron y se resuspendieron en medio de hepatocitos primarios precalentado (DMEM, 1,2 µg/ml de insulina, hemisuccinato de hidrocortisona 11 µM, Hepes 15 mM, penicilina/estreptomina, glucosa 200 mmol, suero humano al 2 %) y se sembraron en placas recubiertas con colágeno de tipo I (6 placas de pocillos Millicoat, Millipore a una densidad de 1 millón de células por pocillo. Después de 12-18 horas se renovó el medio de cultivo tisular para eliminar las células no unidas. Las células se utilizaron a los 3 días después de la siembras en placas.

Análisis por FPLC de las lipoproteínas secretadas: Se usó cromatografía líquida de proteína rápida de exclusión por tamaño (FPLC) para las partículas de lipoproteínas separadas secretadas por las células Huh7.5 cultivadas en medios. En este sistema, las partículas de tamaño más grande eluyeron primero de la columna (VLDL), seguidas de LDL y las partículas de HDL. Después de la separación, se determinó el contenido de triacilglicerol (TG, también denominado triglicérido) o colesterol en línea.

Para preparar las muestras, las células se lavaron exhaustivamente con OptiMEM sin suero (Cibco/Invitrogen) para eliminar las lipoproteínas presentes en los medios que contienen suero. Se recogió el último lavado y sirvió como medición basal. Las células se colocaron después en OptiMEM libre de suero durante la noche. Al día siguiente, se recogió el medio y los restos celulares se eliminaron por centrifugación (300 g, 10 minutos). Después, el medio se concentró usando una unidad de filtro centrífugo (Amicon Ultra-100, Millipore). Se inyectó medio concentrado (65 µl) en un instrumento de HPLC Agilent 1200 equipado con una columna Superose 6 FPLC 10/300. Se realizaron ensayos en línea para el colesterol total y el TG (reactivos Colesterol Infinity y triglicéridos, Thermo Scientific) a 37 °C usando una reacción de posterior a la columna. Los productos de reacción se controlaron en tiempo real a 500 nm y se analizaron usando software Agilent ChemStation. Todas las lipoproteínas contienen tanto TG como colesterol. Sin embargo, VLDL, es rica en TG y tiene poco colesterol, mientras que HDL es rica en colesterol y tiene poco TG. Por tanto, los perfiles de colesterol son más adecuados para detectar diferencias en los niveles de HDL secretados, mientras que los perfiles de TG son más adecuados para analizar los niveles de VLDL.

### 30 EJEMPLO 1: CRECIMIENTO Y APARICIÓN DE CÉLULAS HUH7.5 CULTIVADAS EN SUERO HUMANO

La figura 1 proporciona un diagrama de flujo que muestra un ejemplo de las etapas utilizadas en el cultivo de las células en el suero humano (HS) para proporcionar células diferenciadas. Las células Huh7.5 mantenidas anteriormente en medio de cultivo que contenía FBS se trataron con tripsina para facilitar la disociación de las monocapas. La tripsina se inactivó con DMEM/FBS al 10 %. Las células se centrifugaron a 300 g y los sedimentos celulares se resuspendieron en DMEM/HS al 2 %/penicilina/estreptomina y se sembraron a una densidad del 30-50 %. En la confluencia (normalmente después de 2 días de incubación), las células se trataron con tripsina una vez más y, después, en placas a una densidad del 50 %. Desde este punto en adelante, las células se cultivaron sin más fraccionamiento y se dejaron formar capas confluentes de células sin dividir. Opcionalmente, las células cultivadas en suero humano pueden dividirse durante un máximo de aproximadamente 1 semana, siempre que no se dividan más de 1:2. Sin embargo, la tripsinización repetida después de 10 días de cultivo en suero humano dio como resultado la pérdida de viabilidad de los cultivos celulares, con la muerte del 80-90 % o más de las células.

Las células Huh7.5 cultivadas en medios complementados con suero humano (HS), en lugar de suero bovino fetal (FBS), se sometieron a una serie de cambios morfológicos y se mantuvieron como capas confluentes durante más de dos meses, sin la necesidad adicional de división. Las células cultivadas en HS se organizaron en una estructura similar al pavimento, formaron monocapas empaquetados estrechamente que se unieron muy fuertemente. Después de aproximadamente una semana, la división celular se ralentizó en las células cultivadas en medios que contenían HS, y, finalmente, se sometió a la inhibición por contacto y se convirtió en el crecimiento detenido. De forma similar, a los hepatocitos primarios en cultivo (panel derecho), las células cultivadas en HS fueron mono-o binucleadas y tenían un aspecto granular (figura 2A, panel central) en comparación con las células cultivadas en FBS (figura 2A, panel izquierdo). Después de aproximadamente 14-18 días en HS el tamaño de la célula aumentó significativamente.

Para examinar el efecto aparente de la detención del crecimiento del cultivo en HS, se contó el número de células en un lapso de tiempo de tres semanas después de la siembra inicial en placas de células cultivadas en HS y células cultivadas en FBS. Como se muestra en la figura 2B, el crecimiento de las células cultivadas en medio que contenía HS se redujo significativamente en comparación con el crecimiento en medio que contenía FBS.

Con cambios regulares de medios, las células cultivadas en medio que contenía HS pudieron mantenerse sin división y se volvieron a cultivar en placa durante al menos 2 meses.

**EJEMPLO 2: EL CULTIVO DE CÉLULAS HUH7.5 EN HS PROMUEVE LA DIFERENCIACIÓN A UN FENOTIPO SIMILAR A UN HEPATOCITO PRIMARIO**

Para evaluar adicionalmente el efecto de cultivar células en medio que contenía HS y para evaluar si estas células experimentaron una diferenciación a una célula similar a hepatocitos primarios, se sometió a ensayo el nivel de expresión de marcador de diferenciación de hepatocitos a los 7 días y 21 días después de la transferencia de células Huh7.5 en medio complementado con HS. Después de 7 días se observaron pocos cambios en los marcadores de hepatocitos. (figura 3A) Sin embargo, después de 21 días, la expresión de los marcadores de diferenciación hepática la albúmina y la alfa 1-antitripsina aumentaron aproximadamente 4 veces en células cultivadas en suero humano en comparación con FBS. El nivel de expresión de estas proteínas es similar al nivel de expresión de los hepatocitos primarios humanos en cultivo. El cultivo de las células Huh7.5 en medio de hepatocitos primarios (MHP) no tuvo un efecto adicional significativo en la expresión de la albúmina o alfa 1-antitripsina. Los cambios en el receptor de LDL (LDL-R) sin embargo fueron significativos en las células cultivadas en HS, cuando se cultivaron las células Huh7.5 hepatocito en un medio de hepatocito primario (PHM), la expresión de LDLR aumentó.

La expresión de claudina-1 y ocludina, los componentes de unión estrecha, también aumentó en células cultivadas en suero humano después de 21 días y fue comparable a la expresión en hepatocitos primarios humanos en cultivo (figura 3A). Hay altos niveles de uniones estrechas están presentes en el tejido hepático. Adicionalmente, a través de la inmovilización de las células, estas proteínas se conocen también como supresores de tumores potentes, e indican la transición de un estado tumorigénico a un estado más diferenciado de las células. Claudina-1 y ocludina también funcionan como receptores de entrada para el VHC.

La expresión de los principales reguladores del metabolismo lipídico aumentó en las células que se cultivaron en HS, en comparación con las células cultivadas en FBS (figura 3B). El LXR $\alpha$  (Liver X Receptor alfa) se expresa en gran medida en el hígado y controla los programas transcripcionales implicados en la homeostasis de los lípidos y la inflamación. Los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) son reguladores clave de la diferenciación y el metabolismo. PPAR $\alpha$  es un regulador importante del metabolismo lipídico en el hígado. La activación de PPAR $\alpha$  promueve la captación y utilización de ácidos grasos por la regulación positiva de genes implicados en el transporte de ácidos grasos y la oxidación de ácidos grasos. PPAR $\gamma$  regula la captación y el almacenamiento de ácidos grasos, así como el metabolismo de la glucosa. Las proteínas del citoesqueleto vimentina y E-caderina también aumentan en las células cultivadas en suero humano. Vimentina, es esencial para mantener la forma de los orgánulos y mantenerlos en su lugar, también controla el transporte de lipoproteínas de baja densidad dentro de la célula. E-caderina desempeña un papel importante en la adhesión célula a célula y, por tanto, es, al igual que las proteínas de unión estrecha, indicativa de un estado no proliferativo/no tumorigénico de la célula.

**EJEMPLO 3: EXAMEN DE OTRAS CONDICIONES DE CULTIVO**

Con el fin de comparar los efectos del cultivo de células Huh-7 o derivadas de Huh-7 en el suero humano, se examinaron otras condiciones de cultivo.

Se ha informado que el DMSO, (sulfóxido de dimetilo) induce la detención del crecimiento en células Huh-7 o células derivadas de Huh-7 y otras células de hepatoma. (Sainz et al. (2006) *J Virol.* 80:10.253-10.257). Con el fin de evaluar el efecto del DMSO, se examinó el nivel de expresión de genes específicos de hepatocitos en células Huh7.5 cultivadas durante 3 semanas en presencia de DMSO al 1 % o el 2 % en DMEM (DMEM, FBS a 10 %, DMSO al 1 % o el 2 %, penicilina/estreptomina). Además, las células Huh7.5 se cultivaron en suero bovino adulto al 2-10 % (ABS, Invitrogen) en DMEM en lugar de suero bovino fetal (DMEM, ABS al 2 %, penicilina/estreptomina).

Ambas condiciones de cultivo dieron como resultado la detención del crecimiento, aproximadamente a los 7 días. Las células cultivadas en medio que contenía DMSO o ABS experimentaron algunos cambios morfológicos, pero nunca en la medida de las células cultivadas en suero humano. En cualquiera de los cultivos, normalmente no se observó ningún patrón puntiforme en el citoplasma indicativo de un fenotipo de hepatocito primario humano (datos no mostrados).

El estado de diferenciación de las células cultivadas en ABS o DMSO se examinó mediante la evaluación del nivel de expresión de los mismos marcadores de diferenciación de los hepatocitos como se han descrito anteriormente (figura 4). Mientras que el cultivo en DMSO al 2 % dio como resultado un ligero aumento en la expresión de albúmina y el ABS dio como resultado un aumento menor en la expresión de las proteínas de unión estrecha claudina-1 y ocludina, ninguna de las proteínas se expresó a un nivel comparable al de los hepatocitos primarios humanos en cultivo o a un nivel comparable a la expresión en células Huh7.5 cultivadas en suero humano. El nivel de expresión de otros biomarcadores ensayados no aumentó significativamente con respecto al cultivo en medio que contenía FBS.

**EJEMPLO 4: EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL ASPECTO DE LAS GOTITAS DE LÍPIDOS CELULARES**

Se examinó la aparición de gotitas de lípidos celulares tras el cultivo de células Huh7.5 en FBS frente a HS. Como

se muestra en las figuras 5A y 5B, la fluorescencia Bodipy indicativa de lípidos fue mucho más intensa en las células que se cultivaron en HS, en comparación con FBS. Cuando se cuantificó usando el software ImageJ, la intensidad de fluorescencia Bodipy era aproximadamente 4 veces mayor en los cultivos celulares en HS con respecto a las células cultivadas en FBS (figura 5B).

Adicionalmente, la distribución de gotitas de lípidos se ve afectada por las diferentes condiciones de cultivo. En medio de FBS, el tamaño de las gotitas de lípidos en las células es heterogénea. En medio de HS, las gotitas de lípidos en las células son generalmente más pequeñas que en las células cultivadas en FBS y son mucho más uniformes en tamaño.

#### **EJEMPLO 5: PRODUCCIÓN DE TÍTULOS VÍRICOS DE JFH-1**

Se electroporó JFH-1 en células cultivadas en FBS. Las células electroporadas después se mantuvieron en FBS o se transfirieron a medio que contenía HS, inmediatamente después de la electroporación, de acuerdo con el Ejemplo 1. A los 4-6 días después de la electroporación, el virus se cosechó mediante la recolección de sobrenadantes de cultivo.

El virus producido por electroporación de células mantenidas en medio FBS se denomina "JFH-FBS"; el virus producido por electroporación de células que se transfirieron y se mantuvieron en medio HS inmediatamente después de la electroporación, se denomina "JFH-HS".

La figura 6A muestra la infección de células cultivadas en FBS con los dos virus diferentes. Cuando las células mantenidas en FBS se infectaron con JFH-FBS que se aisló 4 días después de la electroporación (como JFH-HS), la infección no se detectó en estas células, debido a que los títulos de ARN de estas poblaciones víricas eran demasiado bajos. Por el contrario, JFH-HS dio como resultado inmediatamente títulos víricos altos en células cultivadas en FBS. Los títulos víricos alcanzaron rápidamente una meseta. Para la comparación, se usó JFH-FBS que se aisló 15 días después de la electroporación (denominado JFH-FBS(15).) Los títulos víricos de JFH-FBS(15) se mantuvieron bajos durante todo el curso de la infección en comparación con JFH-HS.

La figura 6B muestra los títulos víricos de células que se cultivaron en las diferentes condiciones (FBS y HS), pero que se infectaron con el mismo virus (JFH-HS). En particular, durante los primeros 10 a 11 días de cultivo en HS, el beneficio de usar HS para la producción vírica no fue aparente. Sin embargo, después de aproximadamente 11 días los títulos víricos comenzaron a aumentar de manera que aproximadamente 14 días después de la transferencia de las células al medio de HS, la producción vírica aumentó rápidamente en las células mantenidas en HS. Este aumento en la producción vírica no se observó en células cultivadas en FBS. Este tiempo corresponde al tiempo aproximado al que las células cultivadas en HS presentaron un fenotipo diferenciado hacia un fenotipo semejante al de un hepatocito primario humano. Se realizaron infecciones similares en células Huh-7. Las tendencias observadas en células Huh-7 (el aumento en veces fue similar) fueron similares a las observados en las células Huh7.5.

La figura 6C muestra que cuando las células cultivadas en el HS se infectan con JFH-HS, la producción vírica (copias de ARN de VHC por ml) aumenta aproximadamente 1000 veces, en comparación con las condiciones de cultivo tisular convencional usando JFH-FBS en células cultivadas con FBS. El cultivo de las células en medios que contenían HS permitió la producción de títulos víricos continuos cercanos a las  $10^8$  copias de ARN/ml o más durante al menos 45 días, con cambios a medio que contenía HS recién preparado cada 3-4 días (figura 6D). Cuando las células se diferenciaron primero al fenotipo similar a hepatocitos primario (por cultivo en medio que contenía HS durante aproximadamente 14 días) y después se infectaron con JFH-HS, se consiguieron títulos víricos similares (figura 6C).

La figura 6E muestra el efecto del uso de medio de hepatocitos primarios sobre los títulos víricos. Las células que se infectaron, y primero se diferenciaron usando HS, se transfirieron a medio de hepatocitos primarios (DMEM, insulina 1,2 mg/ml, hemisuccinato de hidrocortisona 11  $\mu$ M, HEPES 15 mM, pen/estrep, glucosa 200 mmol, suero humano al 2 %) y se evaluó el efecto sobre la producción vírica. 3 días después de la transferencia, los cambios morfológicos observados como resultado de cultivo en HS se hicieron más distintivos (no mostrados). Adicionalmente, los títulos víricos aumentaron aproximadamente 5 veces en comparación con las mismas células que se mantuvieron en DMEM/HS al 2 %/pen/estrep.

#### **EJEMPLO 6: INFECCIÓN DE RATONES CON JFH-HS Y JFH-FBS**

Se sometió a ensayo la infectividad in vivo tanto de JFH-HS como JFH-FBS en el modelo de ratón quimérico SCID/Alb-uPA. Se usaron soluciones madre de JFH-HS recogidas después de la electroporación para infectar nuevas células y el sobrenadante de estas células infectadas se usó para infectar ratones. La comparación directa con el mismo virus producido en FBS no fue posible, ya que los títulos víricos eran demasiado bajos para esperar una infección detectable. Por tanto, se usó una variante de JFH adaptada a cultivo tisular (VHCcc) a un título similares únicamente con fines de comparación.

Se produjeron soluciones víricas de VHCcc, JFH por electroporación de cultivos celulares en FBS. El virus agrupado se aisló cada 5 días, desde el día 15 hasta el día 30 después de la infección. Este virus agrupado se usó para infectar células cultivadas en FBS. Posteriormente, se utilizó el sobrenadante de las células infectadas para infectar las células frescas. Este procedimiento se repitió durante varios ciclos de infección. El virus resultante está, por tanto, adaptado al cultivo tisular. El suero de un paciente infectado con VHC sirvió como control positivo.

La figura 7 muestra títulos víricos en suero de ratón para hasta 25 días después de la infección. JFHHS provocó una infección rápida de los ratones quiméricos. Los títulos de JFHHS fueron detectables 4 días después de la infección en títulos altos, y solo aumentaron marginalmente adicionalmente en las siguientes 3 semanas. Por el contrario, los títulos víricos de un JFH-FBS adaptado a cultivo tisular aumentaron lentamente durante las primeras 2 semanas y después parecieron alcanzar la misma meseta. Similar a JFHHS, los títulos víricos de un VHC de suero de paciente altamente infeccioso también son detectables a los 4 días.

**EJEMPLO 7: EFECTO DE LAS CÉLULAS CULTIVADAS EN HS SOBRE PARTÍCULAS DE VHC: DENSIDAD VIRAL, ASOCIACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS.**

Con el fin de evaluar si las propiedades biofísicas del virus se vieron afectadas por el cultivo en HS frente a FBS, se evaluaron la densidad vírica y asociación a ApoB del virus.

Como se muestra en la figura 8, Panel A la densidad del virus cultivado en HS se desplaza hacia una menor densidad. En condiciones de cultivo tisular convencional usando FBS, la densidad media de JFH fue de 1,16 g/ml, que está bien en línea con los informes anteriores. Tras el cultivo celular en HS, la densidad total de las partículas víricas se desplaza hacia una menor densidad, con una densidad media de 1,09 g/ml y la aparición adicional de un pico de muy baja densidad. La densidad vírica se determinó en las partículas producidas por las células Huh7.5 y Huh-7 y los resultados fueron similares en ambos tipos de células.

Una representación alternativa se muestra en la figura 8, Panel B. Cuando se produjo en células cultivadas en FBS, aproximadamente el 75 % del virus tuvo una densidad mayor de 1,16 g/ml, mientras que cuando se produjo en células cultivadas en HS, solo aproximadamente el 25 % del virus tuvo una densidad de > 1,16 g/ml.

Se ha notificado anteriormente que el virus producido en cultivos tisulares no se asocia a la ApoB, pero se asocia a la ApoE. En suero humano y en el modelo de ratón de infección por VHC, una porción significativa de VHC se asocia a ApoB (aproximadamente el 60 %). Por tanto, se examinó el efecto de las condiciones de cultivo tisular alteradas sobre la asociación de VHC a ApoB.

En condiciones de cultivo tisular convencional usando FBS, solo aproximadamente el 5 % de JFH se asoció a ApoB. Cuando las células se cultivaron en suero humano, aproximadamente el 90 % del virus se asoció a ApoB (figura 8, Panel C). En comparación, en los sueros de pacientes se ha observado que aproximadamente el 30-80 % del VHC se asocia a ApoB y se ha observado que aproximadamente el 40-70 % del VHC en sueros de ratón quimérico se asocia a ApoB. La asociación a ApoB se determinó en virus producidos por células HuH-7 y Huh7.5 y los resultados fueron similares.

**EJEMPLO 8: EFECTO DE LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD HUMANA (HDL) SOBRE LA PRODUCCIÓN VÍRICA EN CÉLULAS CULTIVADAS EN HS**

Para examinar el efecto de las lipoproteínas sobre la producción vírica, se preparó suero humano deficiente en apolipoproteína B que contenía lipoproteínas (VLDL y LDL). Se preparó HS empobrecido de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) haciendo correr el suero sobre una columna de heparina de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (HiTrap Heparin HP, GE Healthcare). La heparina se une a las lipoproteínas que contienen ApoB, VLDL y LDL, con una alta afinidad, mientras que HDL no se une a la heparina. Por tanto, el suero resultante está empobrecido solo de VLDL y LDL. En resumen, después del equilibrado con tampón de unión, se aplicó el suero a la columna, permitiendo que las lipoproteínas que contenían ApoB se unieran. Las fracciones empobrecidas en ApoB se recogieron y se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20 °C.

Cuando las células se cultivaron en HS empobrecido en lipoproteínas, gran parte del efecto beneficioso del suero humano sobre la producción de títulos víricos altos se perdió, aunque aún se producía la diferenciación de las células Huh7.5 en el fenotipo similar a hepatocito primario. La adición de VLDL humana de nuevo no rescató la producción vírica. Sin embargo, la adición de LDL humana dio como resultado un aumento de 1.000 veces en la producción vírica. Este efecto de la LDL humana era dependiente de la dosis y solo puede conseguirse en células que están (parcialmente) diferenciadas (figura 9).

**EJEMPLO 9: INFECCIÓN DE CÉLULAS CON SUERO DE PACIENTES INFECTADOS CON VHC**

Se sometieron a ensayo células Huh7.5 cultivadas en suero humano para determinar la susceptibilidad a la infección por el suero de pacientes con VHC infectados por VHC genotipo 1a. La infección satisfactoria se consiguió con

títulos víricos de hasta aproximadamente  $10^5$  copias de ARN/ml. (figura 10). Por el contrario, las células Huh7.5 cultivadas en medio que contenía FBS e infectadas con el mismo suero no produjo virus detectable cuando se sometió a ensayo mediante RT-PCR.

5 Los ejemplos anteriores ilustran que el cultivo de células de hHCC, tales como células derivadas de Huh-7, en suero humano da como resultado la diferenciación a un fenotipo de un hepatocito primario. Las células Huh-7 o Huh7.5 cultivadas en medio que contenía suero humano (en lugar de FBS de acuerdo con los protocolos de cultivo tisular convencionales) se inhiben por contacto y muestran un aumento en la expresión de varios marcadores de diferenciación de hepatocitos, incluyendo claudina-1 y ocludina, dos factores que han sido implicados como  
10 receptores de entrada para el VHC. Adicionalmente, las células cultivadas en HS muestran un aumento en las gotitas de lípidos celulares, el orgánulo que se ha implicado como el sitio de la replicación y/o el ensamblaje del VHC.

15 La infección de células de hHCC cultivadas en HS con VHC muestra un aumento de 1.000 veces en la producción vírica en comparación con los métodos de cultivo tisular convencionales usando DMEM complementado con FBS. Poco después de que el medio que contenía FBS de los cultivos celulares de hHCC se reemplazara por medio que contenía HS, se observó un aumento en los títulos víricos de aproximadamente 10-100 veces. Alrededor del momento en el que se consigue la diferenciación de las células hHCC cultivadas en HS a un fenotipo de hepatocito primario (aproximadamente 14 días), la replicación vírica aumenta aproximadamente 1000 veces en comparación  
20 con las células de hHCC mantenidas en medio que contenía FBS. Los resultados se muestran en la figura 9.

25 La LDL humana desempeña un papel en el aumento de los títulos víricos. La eliminación de VLDL y LDL del suero impidió el aumento de los títulos víricos asociados a condiciones de cultivo en HS. La adición selectiva de LDL humana, pero no de VLDL humana, rescató los niveles de producción vírica de las condiciones cultivo en HS. El estado de diferenciación de las células de hHCC desempeñó un papel en el efecto beneficioso de la LDL sobre los títulos víricos.

30 Las partículas de VHC producidas a partir de células de hHCC cultivadas en HS difieren estructuralmente del VHC producido a partir de células de hHCC cultivadas en FBS. Las partículas de VHC producidas a partir de células de hHCC cultivadas en HS tienen una densidad inferior y se asocian a ApoB. Las fracciones de VHC de menor densidad se han asociado a una mayor infectividad. Se observó en efecto una infectividad superior en el modelo de ratón quimérico. El virus producido a partir de células cultivadas en HS presentó un curso de tiempo de infección similar al de VHC de suero de pacientes altamente infecciosos, lo que es indicativo de una mayor infectividad en comparación con virus producido a partir de células de hHCC cultivadas en FBS. La menor densidad y la asociación  
35 a ApoB del VHC producido células de hHCC cultivadas en HS se asemejan más al virus que circula en el torrente sanguíneo de los pacientes.

40 Las células cultivadas en HS pueden utilizarse para producir títulos víricos más altos en comparación con el mismo virus producido en células cultivadas en FBS. Como se ha mostrado anteriormente, JFH-1 se produjo a partir de células cultivadas en HS a mucho mayores títulos que en las células cultivadas en FBS sin la necesidad de la modificación genética del virus y/o la adaptación al cultivo tisular antes de seleccionar mutaciones adaptativas. Las células cultivadas en HS transfectadas con JFH-1 y cultivadas durante 13 días produjeron partículas víricas que eran infecciosas para células cultivadas en HS y el virus producido por estas células era altamente infeccioso en ratones quiméricos.

45 **EJEMPLO 10: SECRECIÓN DE LIPOPROTEÍNAS EN CÉLULAS CULTIVADAS EN HS**

50 Las funciones específicas de hepatocitos, tales como la secreción de VLDL, están ausentes en hHCC cultivada en suero complementado con FBS. La secreción de VLDL se produce en hHCC cultivada en suero humano, las células Huh7.5 cultivadas en suero complementado con FBS se cambiaron a medios complementados en suero humano (HS) como se describe en el Ejemplo 1 y se obtuvieron perfiles de lipoproteínas basados en triacilglicérido (figura 11) y colesterol (figura 12) del medio de las células cultivadas en diversos puntos temporales, usando cromatografía de líquidos de proteína rápida de exclusión de tamaño.

55 En línea con las observaciones previas (Ling et al. (2013) *Biochim Biophys Acta* 1831 (2): 387-97; y Meex et al. (2011) *J Lipid Res* 52:152-158), la secreción de VLDL estaba ausente en células Huh7.5 que se cultivaron en suero complementado con FBS (figura 11, panel B y figura 12) y se observó solo un pequeño pico de tamaño de LDL. Después de 5 días de cultivo en suero humano, hubo un pequeño aumento en la secreción de VLDL y se observaron cambios menores en las fracciones de tamaño de LDL y HDL sobre los perfiles de colesterol (figura 12).

60 La secreción de VLDL, sin embargo, estaba presente en células cultivadas en suero humano tras la diferenciación celular (a partir de 14 días), como se indicó por los prominentes picos de VLDL que se muestran en los perfiles de lipoproteínas (figura 11, panel B y figura 12). Adicionalmente, tras la diferenciación de las células, los picos de LDL aumentaron ambos en tamaño (el área bajo la curva es más grande) y había presentes partículas de LDL más grandes (los picos de LDL se desplazaron a la izquierda (las partículas más grandes eluyen primero)). El día 30 de cultivo en HS, el perfil de lipoproteína del medio de las células cultivadas en HS se parecía mucho a las lipoproteínas  
65

secretadas por los hepatocitos primarios humanos en cultivo (Ling et al. (2013) *Biochim Biophys Acta* 1831 (2): 387-97) y al perfil de lipoproteínas de suero sanguíneo humano (figura 11, Panel A, Steenberg et al. (2010) 299: G844-854). También se observó un aumento en el pico de HDL en los perfiles de lipoproteínas basados en colesterol (figura 12). Tomados en conjunto, estos datos muestran que la secreción de lipoproteínas puede restablecerse en células cultivadas en HS que secretan lipoproteínas y presentan un perfil de lipoproteínas secretadas similar al encontrado en el suero humano y producido por los hepatocitos primarios humanos.

#### **EJEMPLO 11: INFECCIÓN DE CÉLULAS CON VHB**

Se examinó la susceptibilidad de las células de hHCC a la infección con el virus de la hepatitis B (VHB). También se controló el nivel de expresión de un receptor de entrada VHB putativo, el polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio (NTCP, SLC10A1).

Se cultivaron células Huh7.5 como se ha descrito anteriormente en medio que contiene suero humano (HS) durante 21 días para producir células diferenciadas. Después de este periodo, las células se infectaron con el VHB durante 24 horas o 48 horas. La infección se logró ya sea añadiendo 50-100 µl de suero VHB positivo de un paciente infectado con el cultivo celular, a una multiplicidad de infección (MOI) de 15-30 virus por célula (o superior), o mediante la adición de 10 µl de una muestra concentrada 50X de sobrenadante de células de células HepAD38 cultivadas, una estirpe celular que está modificada genéticamente para expresar partículas de VHB. Para las células HepAD38 se usó una MOI de aproximadamente 1000 virus por célula.

Las células se lavaron exhaustivamente tras de la infección para eliminar los virus no incorporados. Se secreción vírica en el medio se controló mediante la determinación de la cantidad de genomas víricos en el medio, en diferentes días después de la infección, usando PCR cuantitativa.

Como se muestra en la figura 13, las células cultivadas en HS se infectaron satisfactoriamente con dos aislados clínicos diferentes de VHB (círculos abiertos y los círculos cerrados), así como con el virus producido por las células HepAD38 (triángulos abiertos). Después de aproximadamente 4 días tras la infección, se detectaron títulos víricos que superaron los títulos víricos en el lavado (donde el lavado fue el día 1 o día 2 tras la infección (día 0)). Los títulos víricos alcanzaron un máximo a aproximadamente 5-14 días. Después de 15 días tras la infección los títulos víricos disminuyeron, coincidiendo con la disminución de los niveles de receptor de entrada.

#### **EJEMPLO 12: EXPRESIÓN DE UN RECEPTOR DE ENTRADA DE VHB EN CÉLULAS CULTIVADAS EN HS**

Se ha notificado que el polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio (NTCP) es un receptor de entrada para el VHB en células humanas (Yan et al. (2012) *eLife* 1:e00049). Se evaluó la expresión de NTCP al nivel del ARNm en células Huh7.5 cultivadas en HS como se ha descrito anteriormente para diferentes longitudes de tiempo (0-35 días). Las células Huh7.5 cultivadas en FBS y aisladas al mismo número de pases sirvieron como control. Al final de cada periodo de cultivo, los lisados celulares se prepararon en TRIZOL® (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles relativos de ARNm de NTCP se determinaron en comparación con HPRT usando PCR cuantitativa.

Como se muestra en la figura 14, las células cultivadas en HS presentaron niveles aumentados de NTCP poco después de la transferencia al medio que contiene suero humano. Se observó el nivel más alto de expresión de NTCP 25 días después de la transferencia a HS, mostrando un aumento de 60 veces en comparación con FBS. Aproximadamente el día 28, los niveles de NTCP comenzaron a caer.

Debido a que el NTCP tiene una función como un intercambiador de bilis, estos datos indican que la secreción de bilis, una función específica del hígado, aumenta o se restablece en células cultivadas en HS. Además, en vista de los niveles de expresión de NTCP, estos datos indican que tiempos de diferenciación más cortos de hHCC en medio que contiene HS (por ejemplo, 10-14 días) son suficientes para proporcionar la infección por VHB.

#### **EJEMPLO 13: EL USO DE SUERO TRATADO CON HEPARINA EN EL MEDIO DE CULTIVO TISULAR POTENCIA LA INFECCIÓN Y AUMENTA LOS TÍTULOS VÍRICOS.**

Se eliminaron las lipoproteínas del suero mediante la elución del suero sobre una columna de heparina (de acuerdo con las instrucciones del fabricante; columna HiTrap Heparin, GE Healthcare). La heparina se une a la Apolipoproteína B (ApoB) con una alta afinidad. Se aplicó suero (FBS o HS) a las columnas y se recogió lo que eluyó. Las fracciones que eluyeron están esencialmente libres de lipoproteínas que contienen ApoB, tales como LDL y VLDL.

Se infectaron células Huh7.5 inicialmente cultivadas en FBS con la misma cantidad de virus (virus producidos en HS, por tanto, virus asociados a ApoB) y después se mantuvieron adicionalmente en FBS, HS, FBS tratado con heparina (HepFBS) o HS tratado con heparina (HepHS) durante hasta 28 días. La viabilidad celular no se vio afectada por el cultivo en HepFBS o HepHS. Los títulos víricos se controlaron durante los 28 días.

La figura 15, Panel A muestra los títulos víricos en células cultivadas en HS o en FBS. Como era de esperar, los títulos víricos en HS (cuadrados) superaron en gran medida los títulos víricos en FBS (círculos). La figura 15, panel B muestra los títulos víricos en células cultivadas en HepFBS o HepHS. En los primeros 10-15 días los títulos víricos en HepHS y HepFBS superaron los títulos en FBS. Sin embargo, con el tiempo, HepHS, HepFBS y FBS dieron como resultado títulos similares. La figura 15, Panel C es una ampliación de los primeros 8 días del Panel B y muestra que el cultivo en HS, HepFBS y HepHS da como resultado títulos que se han potenciado de manera similar con respecto a las células cultivadas en FBS durante este periodo.

Estos datos indican que los títulos víricos potenciados con respecto a los conseguidos usando FBS sin tratar pueden conseguirse mediante el cultivo celular con el uso de suero pobre en lipoproteínas (por ejemplo, por tratamiento con heparina) en el momento de la infección vírica. Sorprendentemente, los títulos víricos potenciados pueden conseguirse usando suero humano tratado con heparina o suero bovino fetal tratado con heparina.

**EJEMPLO 14: TASAS DE INFECCIÓN AUMENTADAS DE VIRUS ASOCIADO A LIPOPROTEÍNA, PURIFICADO (VIRUS PRODUCIDO EN HS)**

El virus producido en suero humano se asocia a Apolipoproteína B humana (ApoB). Esta propiedad se aprovechó para purificar virus a partir de sueros de un paciente infectado con VHC usando la alta afinidad de unión de la ApoB a la heparina. El virus producido en células cultivadas en HS se concentró usando un filtro de 300 kDa en un aparato de flujo tangencial Centrimate 500S a 60 ml. Esto se cargó en columnas de heparina HiTrap (fracciones de ejecución 1-10 [sin VHC presente, como se detecta por ELISA de la proteína del núcleo vírica]). La columna se lavó con 120 ml de tampón de lavado (NaCl 0,1 M NaPO<sub>4</sub> 20 mM tampón de pH 7,4 – fabricado mediante técnicas convencionales) (fracciones 11-17). Después, la columna se eluyó con NaCl 0,2 M, NaPO<sub>4</sub> 20 mM tampón de pH 7,4 (fracciones 18-27), con NaCl 0,4 M, NaPO<sub>4</sub> 20 mM tampón de pH 7,4 (fracciones 28-34) y finalmente con NaCl 1 M, 20 mM NaPO<sub>4</sub> tampón de pH 7,4 (fracciones 35-38). La proteína del núcleo del VHC se cuantificó en cada fracción usando ELISA. Como se muestra en la figura 16, había presentes dos picos (fracciones reunidas 28-30 y 35-37).

El virus purificado de cada fracción se diluyó 100 veces y se sometió a ensayo la infectividad del virus a las 4 horas de la infección de las células cultivadas ya sea en FBS o en HS pobre en heparina (HepHS). Se usó la misma cantidad de virus purificado para ambas condiciones. Las tasas de infección se determinaron mediante tinción para VHC NS5a, 2 días tras la infección como se ha descrito anteriormente (Lindenbach et al, 2005 *Science* Vol. 309 págs. 623-626) Las células infectadas desarrollarán a un color marrón oscuro (gris oscuro en escala de grises).

Las fracciones 35-37 fueron relativamente poco infecciosas (con una infectividad similar a la de virus sin purificar en FBS) y las tasas de infección no se vieron afectados por la eliminación de las lipoproteínas (no se muestran). Los virus de las fracciones 28-30 infectadas las células satisfactoriamente. Como se muestra en el ejemplo proporcionado en la figura 17, pueden conseguirse tasas de infección mucho más altas en suero empobrecido de las lipoproteínas de unión a heparina.

**EJEMPLO 15: INFECCIÓN DE CÉLULAS HUH7.5 CON AISLADOS CLÍNICOS DE VHC (GENOTIPO 1A)**

Se sometió a ensayo la susceptibilidad de las células Huh7.5 cultivadas en HS a la infección por aislados clínicos de VHC. Se desarrolló un protocolo de infección para facilitar la entrada del VHC asociado a lipoproteína, el uso de células que secretan lipoproteínas podría dar como resultado una infección satisfactoria con aislados clínicos de VHC.

Con el fin de evitar la presencia de anticuerpos humanos en suero obtenido directamente de los pacientes, se hicieron pases de los aislados clínicos de VHC primero en ratones SCID/Alb-uPA trasplantados con células de hígado humano ("ratones quiméricos") (documento US 6.509.514; Mercer et al. (2001) *Nat. Med.* 7: 927-33). Aunque los seres humanos pueden generar anticuerpos neutralizantes, los ratones quiméricos no lo hacen. Por tanto, el suero positivo para VHC de ratones quiméricos infectados con VHC está libre de anticuerpos neutralizantes del VHC.

Los ratones quiméricos se infectaron con un aislado clínico de genotipo 1a de VHC. Se recogieron muestras de sangre en diferentes puntos temporales y se evaluó la cantidad de virus en el suero mediante RT-PCR cuantitativa. Se usó una muestra de suero de ratón positivo para VHC (ratón A578) con un título vírico de 10<sup>7</sup> copias de ARN/ml para infectar células cultivadas.

Las células se cultivaron en suero humano que contenía medio para un máximo de 10-21 días para diferenciar células. 2 días antes de la infección las células se colocaron en HepHS como se ha descrito anteriormente. Después, las células se infectaron con los sueros de ratón positivos para VHC, a 1 a 3 genomas víricos por célula. Simultáneamente, se infectaron células cultivadas en medios que contienen suero normal (HS) con la misma cantidad de virus. Las células se infectaron durante 24 horas; a partir de entonces se reemplazó el medio con suero que contenía suero humano normal (HS). Los títulos víricos se controlaron usando RT PCR cuantitativa. Las muestras con los títulos víricos más altos se usaron después para inocular directamente células frescas, usando el

mismo protocolo de infección celular.

Como se muestra en la figura 18, las células que se cultivaron en el suero humano normal no se pudieron infectar de forma detectable con suero de ratón positivo para VHC A578 (círculos cerrados, A578). Sin embargo, cuando las células se cultivaron en suero pobre en lipoproteínas durante la etapa de la infección, se obtuvieron títulos víricos de hasta  $10^5$  copias de ARN/ml (HepHS A578; círculos abiertos). El día 15 se usaron muestras (marcadas con un asterisco) de HepHS A578 para infectar nuevas células, usando el mismo protocolo de infección. Después de 7 días los títulos víricos fueron de aproximadamente  $10^4$  copias de ARN por ml, y después de 14 días los títulos víricos se acercaron a  $10^7$  copias de ARN por ml.

#### 10 **EJEMPLO 16: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE FÁRMACOS**

Como se ha ilustrado anteriormente, el cultivo de células de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) (por ejemplo, células Huh-7 o Huh7.5) en medio que contiene suero humano (HS), en lugar del medio que contienen suero fetal bovino (FBS) convencional, induce a estas células a diferenciarse. Como se ha mostrado adicionalmente anteriormente, el cultivo de células hHCC en suero humano reestablece la secreción de albúmina y VLDL, lo que indica que estas células se han vuelto más similares a los hepatocitos. En este caso las células diferenciadas se sometieron a ensayo para evaluar si estas células podrían servir como un modelo de hepatocitos primarios humanos con respecto al metabolismo de fármacos.

Se realizó un estudio de micromatrices de todo el genoma que compara las células cultivadas durante varios tiempos en medio que contenía HS con las células cultivadas en medio que contenía FBS. Las células se cultivaron como antes en medio que contenía HS durante 8, 15 o 23 días, y se recogieron pocillos por duplicado usando Trizol (Invitrogen). Las células en medio FBS se recogieron en confluencia. Se extrajo el ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se sintetizó ADNc usando cebadores aleatorios y transcriptasa inversa de MMLV. Después, se realizaron matrices de Affymetrix Human PrimeView y los datos se analizaron usando el método de análisis multimatrices robusto (RMA, del inglés *Robust MultiArray Analysis method*).

El metabolismo de fármacos se divide en tres fases. En la Fase I, enzimas tales como las oxidasas del citocromo P450 introducen grupos reactivos o polares en los xenobióticos (tales como los fármacos de molécula pequeña). Después, estos compuestos modificados se conjugan con compuestos polares en P, que son catalizados por enzimas transferasa tales como glutatión S-transferasas. En la Fase III, los xenobióticos conjugados pueden procesarse adicionalmente, antes de ser reconocidos por transportadores de salida y ser bombeados fuera de las células. El presente análisis se centró en los genes del metabolismo de Fase I y de Fase II y los transportadores que se prevé que participan en el metabolismo de fármacos en estudios anteriores. (Jennen et al. (2010) *Drug Discovery Today* 15:851-858). Las familias generales de genes eran citocromos (16 genes), alcohol deshidrogenasas (8 genes), aldehído deshidrogenasas (18 genes), metil transferasas (8 genes), glutatión transferasas (13 genes), sulfottransferasas (11 genes), glucuronosiltransferasas UDP (11 genes) y transportadores ABC (26 genes). Los resultados se muestran en las figuras 19-22.

Sorprendentemente, se regularon positivamente varios genes de fase I incluyendo varios citocromos y flavina monooxigenasas y aldo-ceto reductasas (figuras 19-20). Además, se regularon positivamente las glucuronosiltransferasas y algunos otros genes de Fase II (figuras 20-21). Muchos de los otros genes en las diversas familias no se regularon positivamente, lo que era de esperar puesto que no se añadió ningún fármaco a las células.

SULTE1, una sulfottransferasa que prefiere estrógeno implicada en el metabolismo de fármacos se reguló positivamente 23 veces, y una enzima de la Fase II, BAAT, una acil transferasa de ácido biliar, se reguló positivamente 13 veces. Muchos de los ARNm que se regulan positivamente en estos estudios parecen codificar enzimas implicadas en el metabolismo del ácido biliar, lo que es coherente tanto con las células hepáticas diferenciadas como con el aumento de la función de desintoxicación. Esto indica que las células cultivadas en HS reflejan mejor los hepatocitos primarios. Dichas células diferenciadas pueden proporcionar un modelo más coherente que los hepatocitos primarios, puesto que los hepatocitos primarios normalmente se aíslan de tejido defectuoso (puesto que los mejores hígados se destinan en general a los trasplante).

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de producción de un cultivo celular que comprende células que tienen un fenotipo de hepatocito primario humano, comprendiendo el método:
- 5 cultivar durante más de 11 días una estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) en un medio de cultivo que comprende suero humano en donde dicho cultivo induce la diferenciación de la estirpe celular de hHCC en una célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo comprende de aproximadamente el 1 % al 20 %, preferentemente de aproximadamente el 2 % al 10 %, de suero humano.
- 15 3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la estirpe celular de hHCC es una estirpe celular Huh-7 o derivada de Huh-7.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho cultivo es sin subcultivar después de 10 días de cultivo en el medio de cultivo que comprende suero humano.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el cribado de un agente candidato para una actividad antivírica, en donde el método incluye la etapa de introducir un genoma de un virus hepatótrofo en al menos una de la estirpe celular de hHCC o la célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano; poner en contacto el cultivo celular con un agente antivírico candidato; mantener el cultivo celular en condiciones adecuadas para la replicación vírica; y
- 25 detectar la presencia o la ausencia de un efecto del agente candidato sobre la replicación vírica; en donde una disminución en la producción de partículas víricas en presencia del agente candidato en comparación con la ausencia del agente candidato indica que el agente candidato tiene actividad antivírica.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el cribado de una muestra sospechosa de contener un anticuerpo para la actividad antivírica, en donde el método incluye la etapa de introducir un genoma de un virus hepatótrofo en al menos una de la estirpe celular de hHCC o la célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano; poner en contacto el cultivo celular con una muestra sospechosa de contener un anticuerpo; mantener el cultivo celular en condiciones adecuadas para la replicación vírica; y
- 35 detectar la presencia o la ausencia de un efecto de la muestra sobre la replicación vírica; en donde una disminución en la producción de partículas víricas en presencia de la muestra en comparación con la ausencia de la muestra indica que la muestra contiene un anticuerpo que tiene actividad antivírica.
- 40 7. El método de las reivindicaciones 5 o 6, en el que dicha introducción es mediante la adición de partículas víricas infecciosas al medio de cultivo.
8. El método de la reivindicación 7, en el que las partículas víricas infecciosas se añaden el día 1 de dicho cultivo.
- 45 9. El método de las reivindicaciones 5 o 6, en el que el genoma vírico se introduce en la estirpe celular de hHCC antes de la inducción de la diferenciación de la estirpe celular de HCC.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que incluye adicionalmente la producción de partículas víricas mediante la introducción de un genoma de un virus hepatótrofo en al menos una de la estirpe celular de hHCC o la célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano; y
- 50 mantener el cultivo celular en condiciones adecuadas para la producción de partículas víricas.
11. El método de la reivindicación 10, en el que el genoma vírico se introduce en la estirpe celular de hHCC antes de la inducción de la diferenciación de la estirpe celular de HCC.
- 55 12. El método de las reivindicaciones 10 u 11, en donde el método comprende aislar partículas víricas del medio de cultivo.
13. Un cultivo celular que comprende:
- 60 células que tienen un fenotipo de un hepatocito primario humano, en donde las células son la progenie diferenciada de una estirpe celular de hHCC; y un medio de cultivo que comprende suero humano.
- 65 14. Un cultivo celular que comprende:
- células que tienen un fenotipo de un hepatocito primario humano, en donde las células son la progenie

diferenciada de una estirpe celular de hHCC y en donde dicho cultivo celular se ha producido mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

5 15. Un cultivo celular que comprende:

células de un cultivo celular infectado víricamente cuyas células se producen mediante un método que comprende:

10 incubar durante más de 11 días un cultivo celular que comprende una estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) en un medio de cultivo que comprende suero humano, en donde dicho cultivo induce la diferenciación de la estirpe celular de hHCC en una célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano; e

15 introducir un genoma de un virus hepatótrofo en al menos una de la estirpe celular de hHCC o la célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano.

16. Un método para el cribado de un agente candidato para el tratamiento de una enfermedad mediada por lipoproteínas, comprendiendo el método:

20 incubar durante al menos 11 días un cultivo celular que comprende una estirpe celular de carcinoma hepatocelular humano (hHCC) en un medio de cultivo que comprende suero humano, en donde dicha incubación induce la diferenciación de la estirpe celular de hHCC en una célula que tiene un fenotipo de hepatocito primario humano;

poner en contacto el cultivo celular con el agente candidato; y

25 someter a ensayo el cultivo celular para determinar la presencia o la ausencia de un efecto del agente candidato sobre los niveles de lipoproteínas secretadas por la estirpe celular de hHCC diferenciada en comparación con una muestra de control;

30 en donde un efecto del agente candidato sobre los niveles de lipoproteínas secretadas por la estirpe celular de hHCC diferenciada indica que el agente candidato puede usarse para el tratamiento de la enfermedad mediada por lipoproteínas.

17. El método de la reivindicación 16, en el que el cultivo celular se sometió a ensayo para determinar la presencia o la ausencia de un efecto del agente candidato sobre los niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y/o de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el medio de cultivo en comparación con una muestra de control.

35 18. Un método que comprende poner en contacto el cultivo celular de la reivindicación 13 con un agente candidato y

(i) someter a ensayo para determinar la presencia o la ausencia de un efecto del agente candidato sobre un fenotipo de la célula que tiene un fenotipo de un hepatocito primario humano;

40 (ii) someter a ensayo para determinar la presencia o la ausencia de un metabolito del agente y/o el agente; o

(iii) someter a ensayo para determinar la presencia o la ausencia de un cambio en un fenotipo de la célula que es indicativo de toxicidad del agente para la célula.

Figura 1

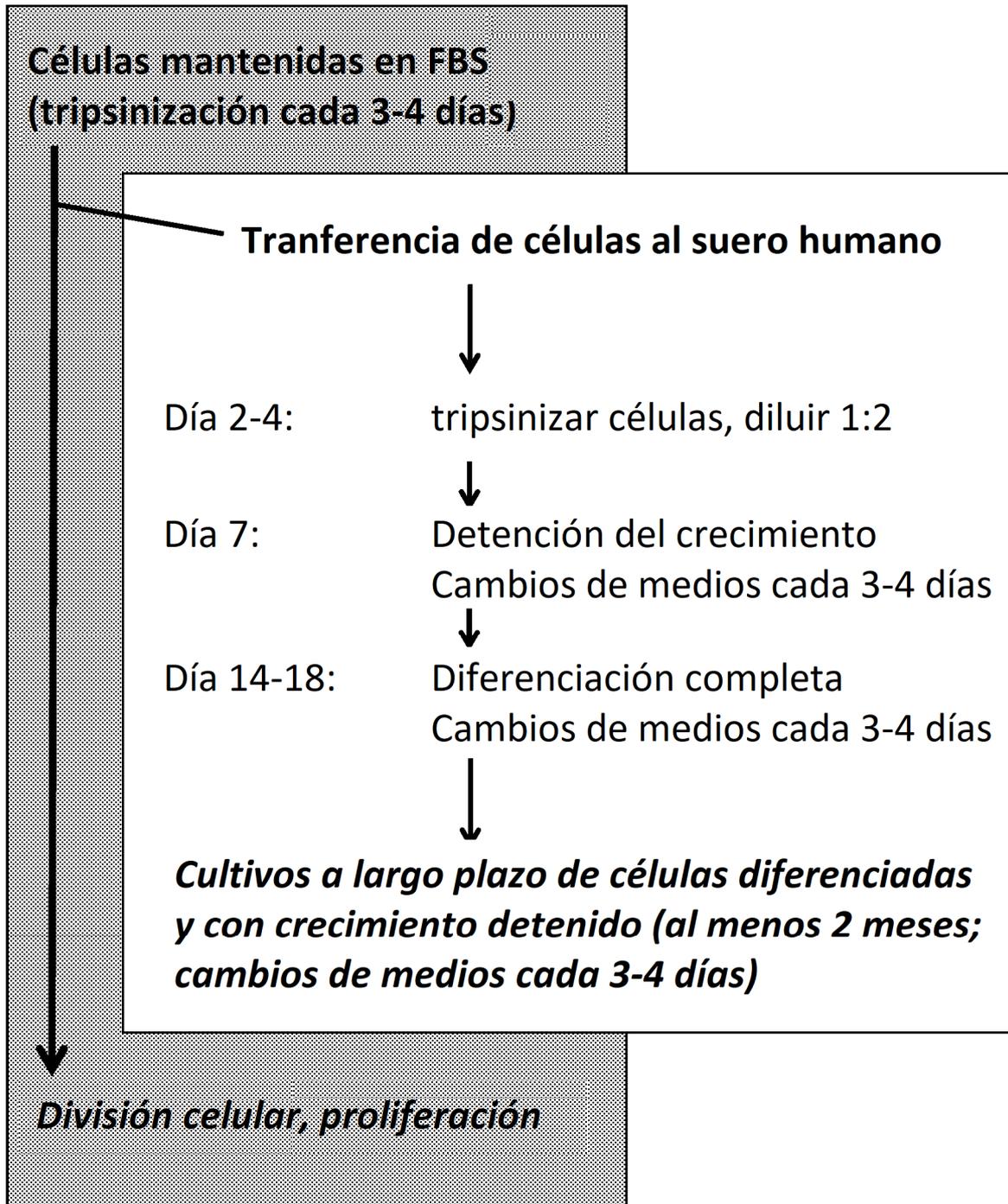
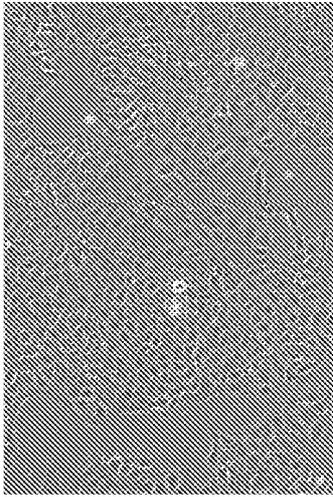
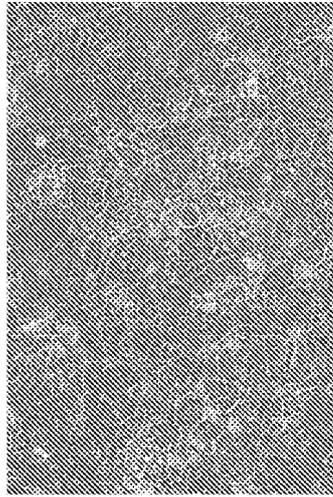


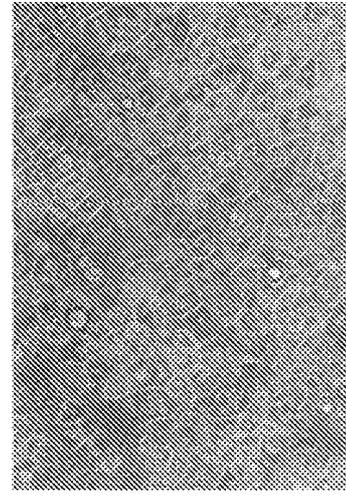
Figura 2A



Células Huh7.5 cultivadas en medio que contiene FBS



Células Huh7.5 mantenidas en medio que contiene HS durante 21 días



Hepatocitos primarios humanos cultivados sobre placas recubiertas de colágeno

Figura 2B

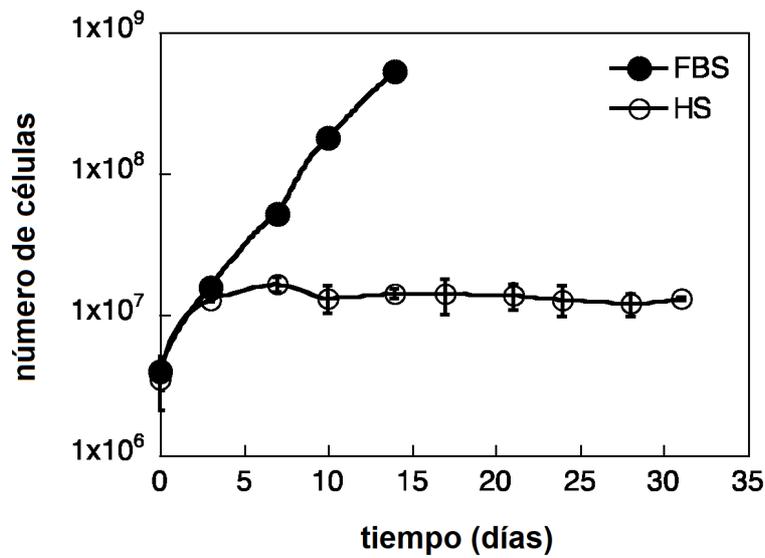


Figura 3A

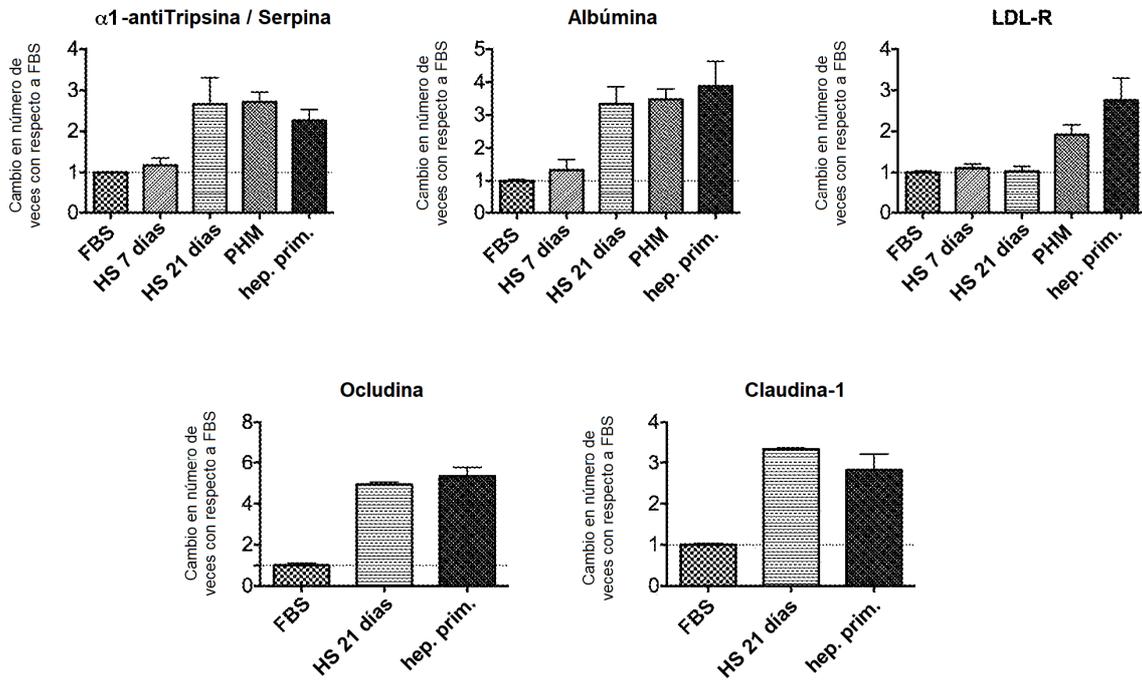


Figura 3B

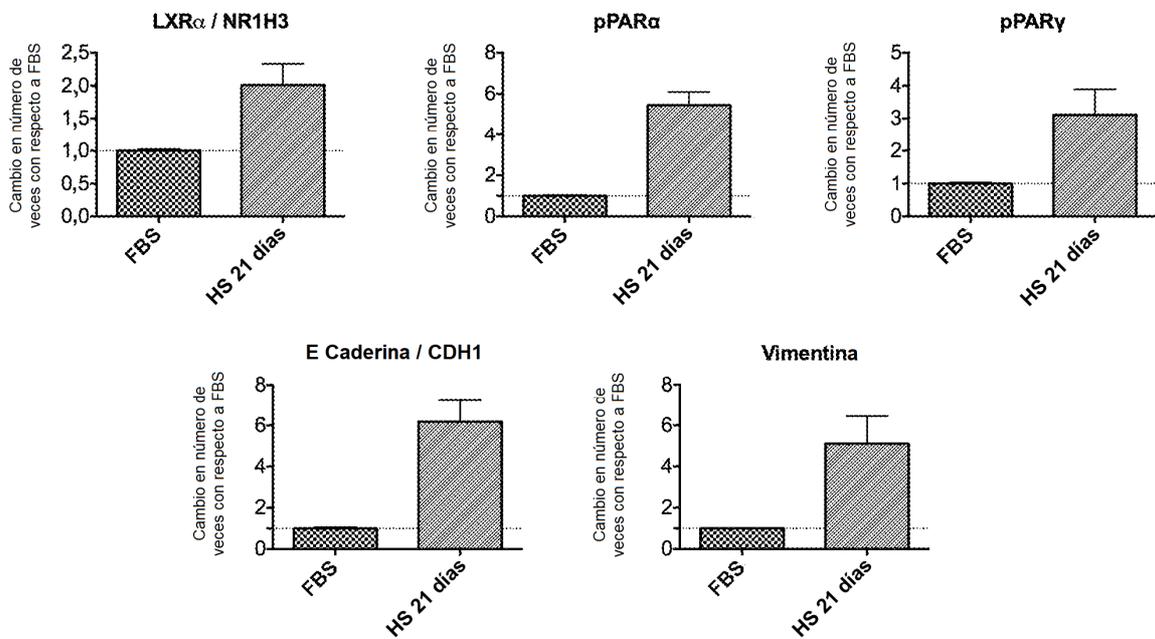


Figura 4

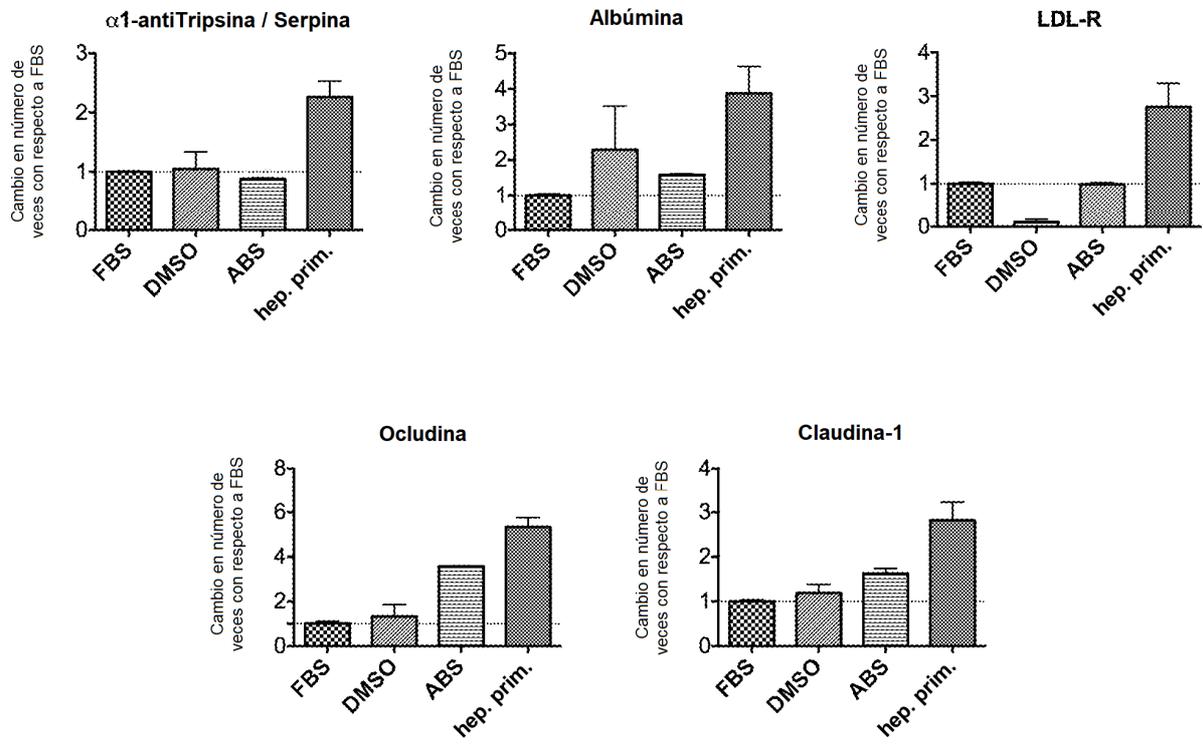


Figura 5A

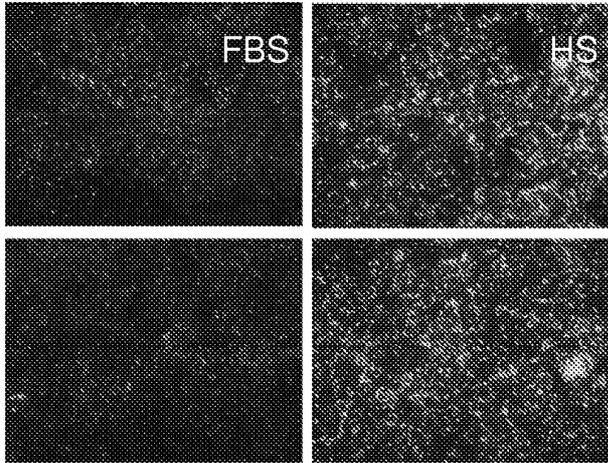


Figura 5B

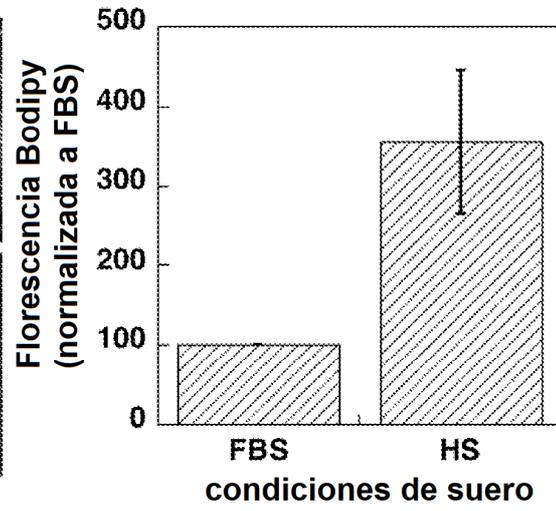


Figura 6A

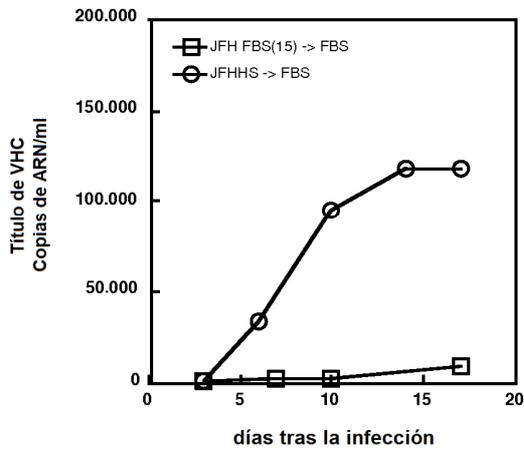


Figura 6B

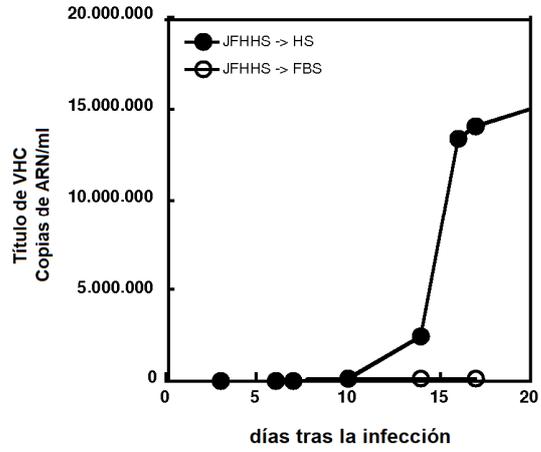


Figura 6C

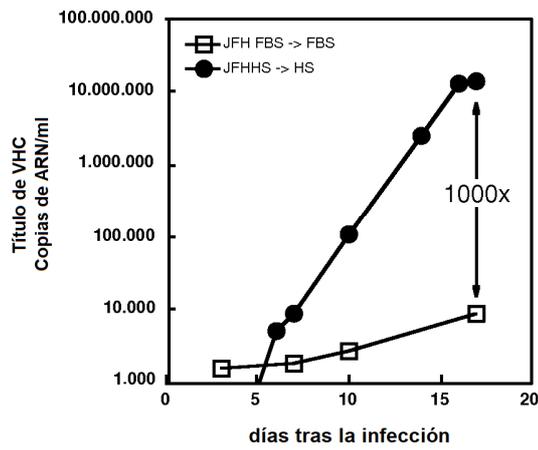


Figura 6

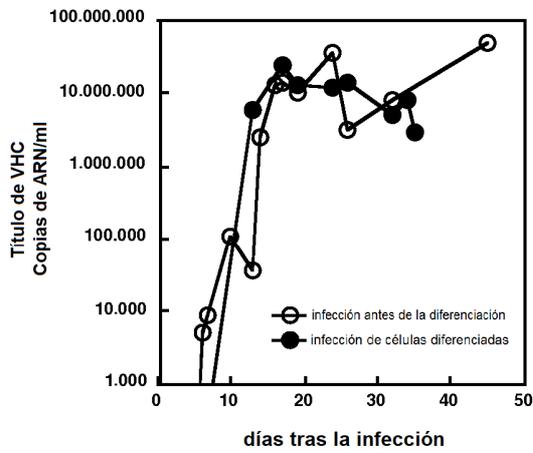


Figura 6E

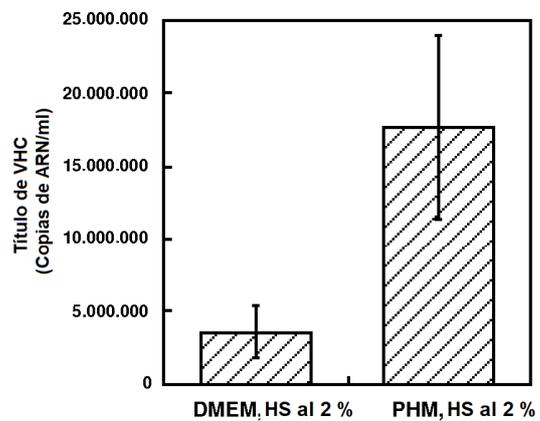


Figura 7

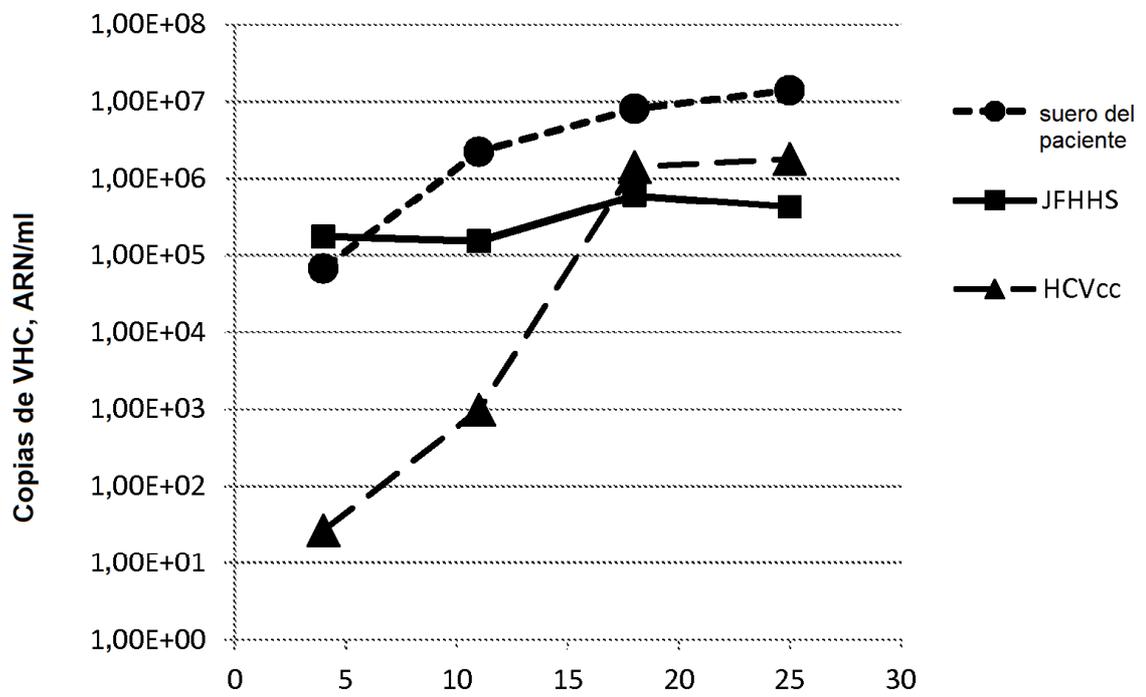


Figura 8

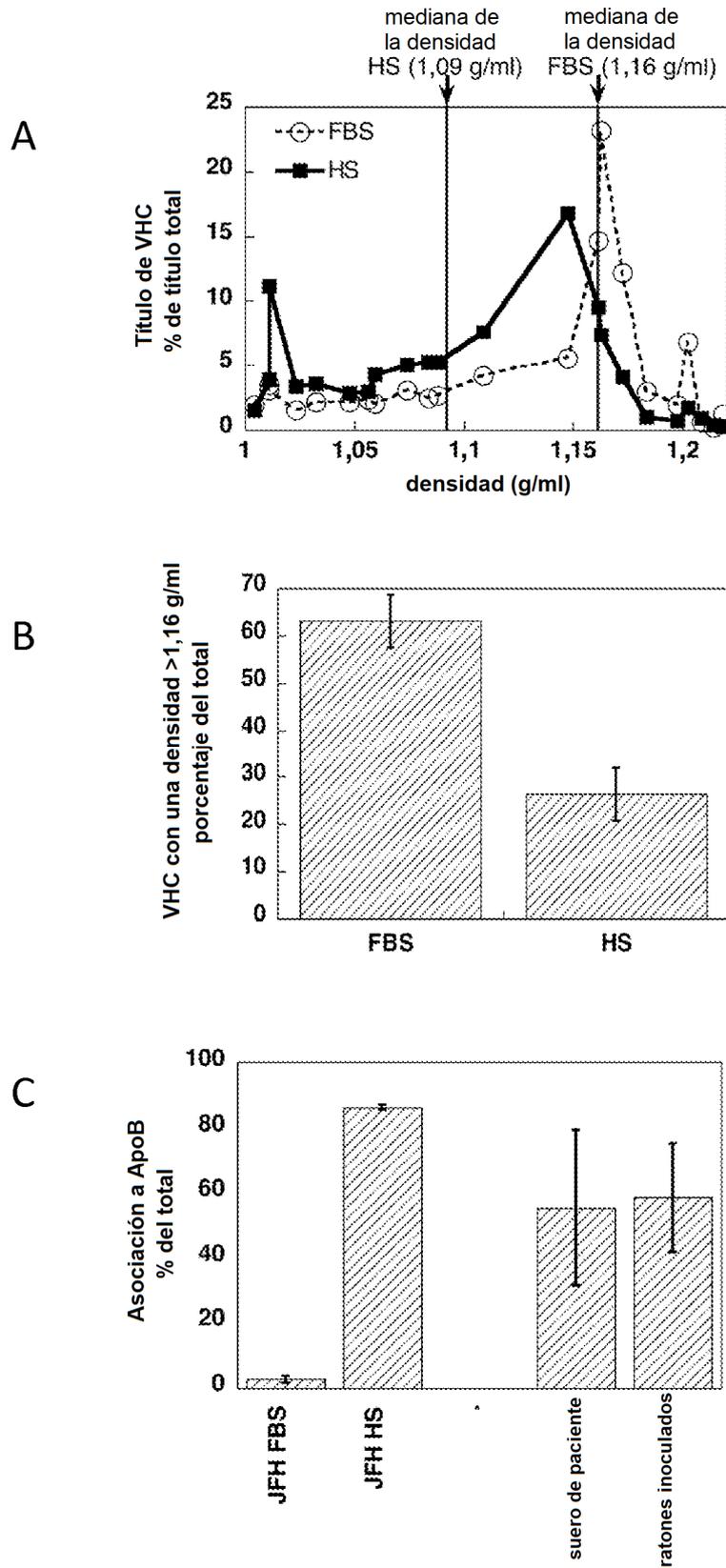


Figura 9

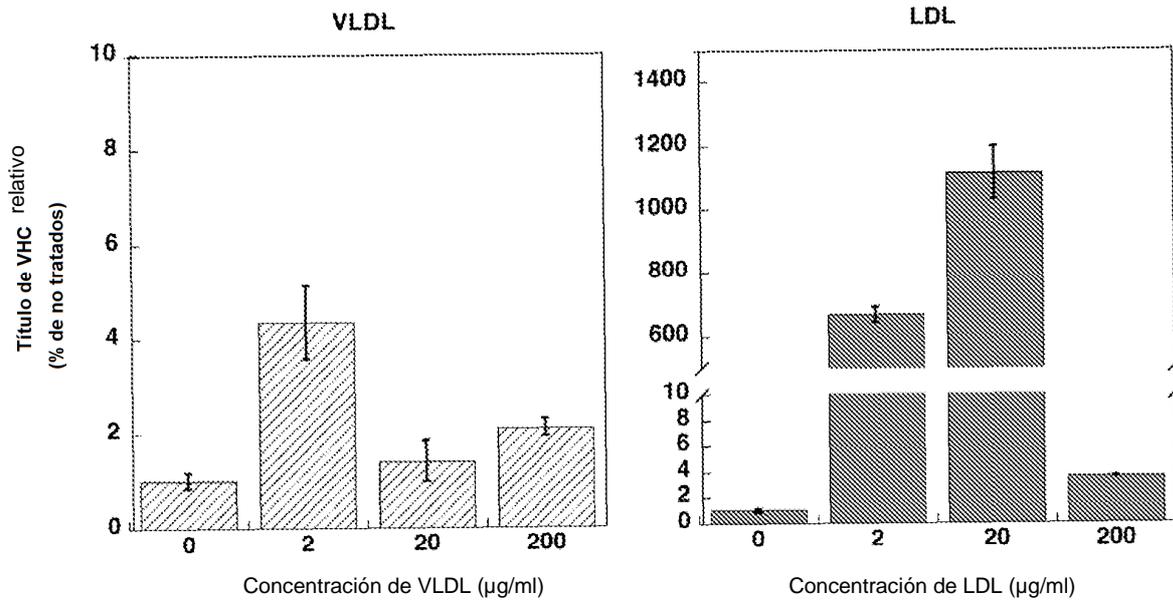


Figura 10

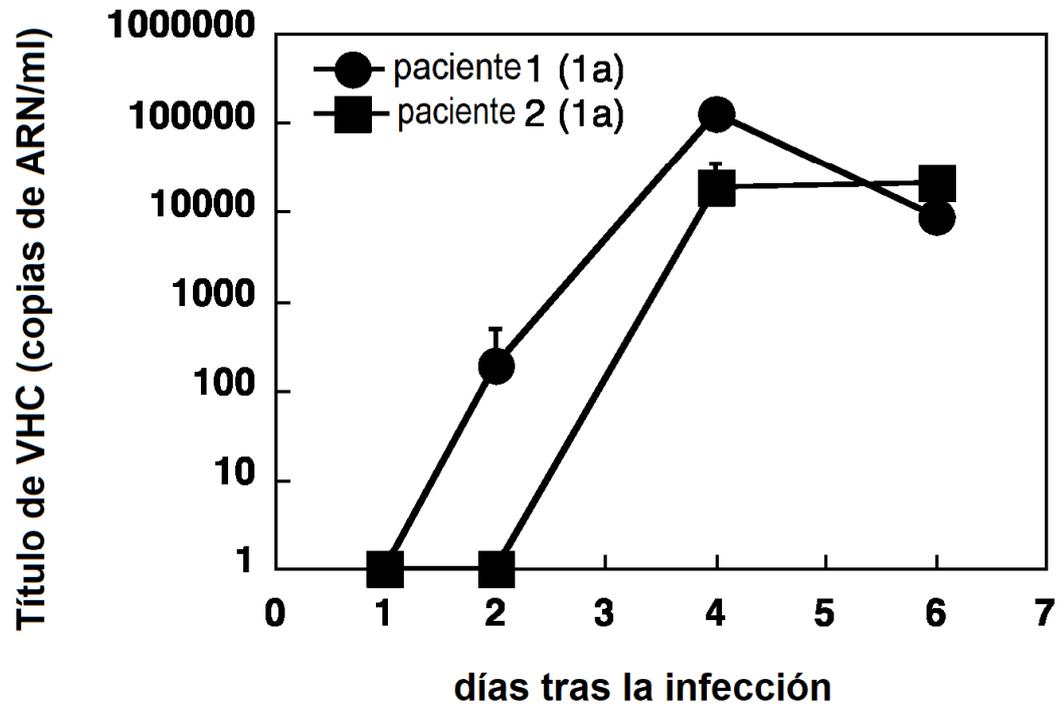


Figura 11

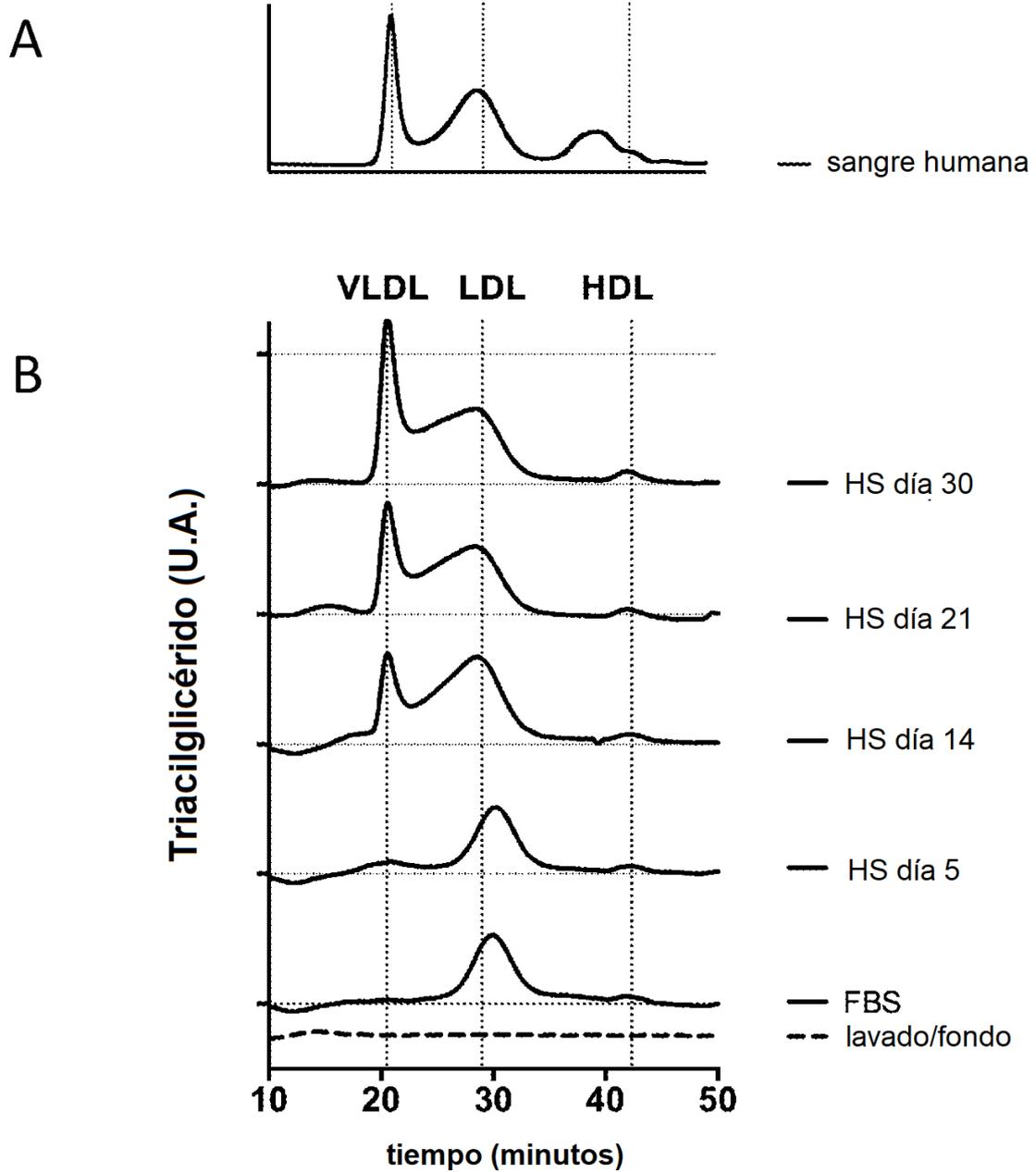


Figura 12

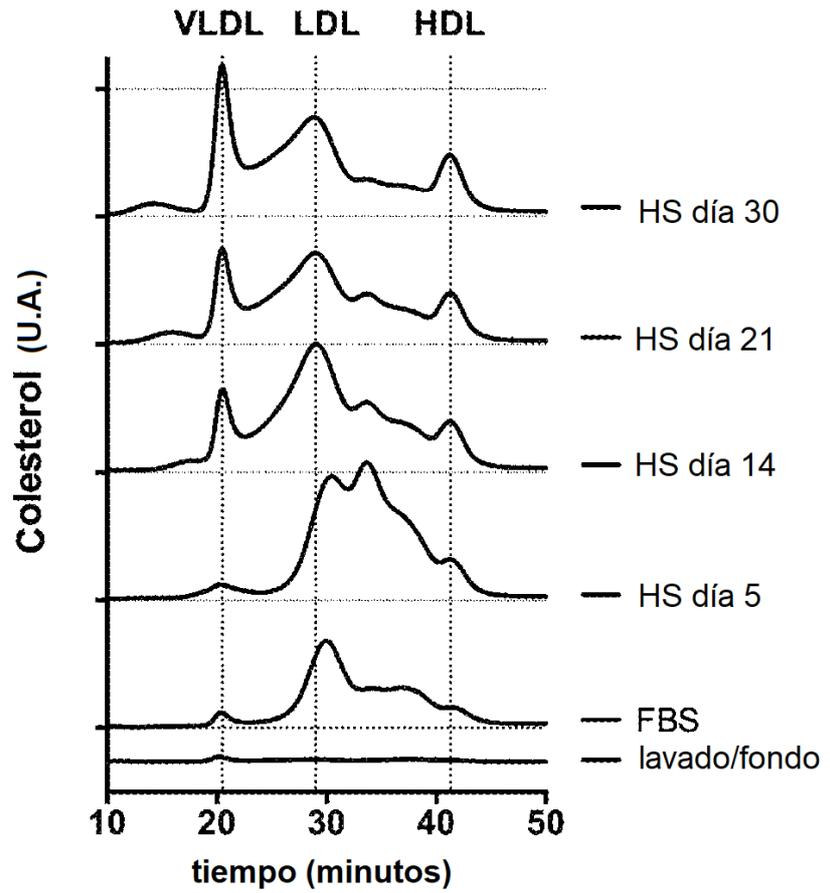


Figura 13

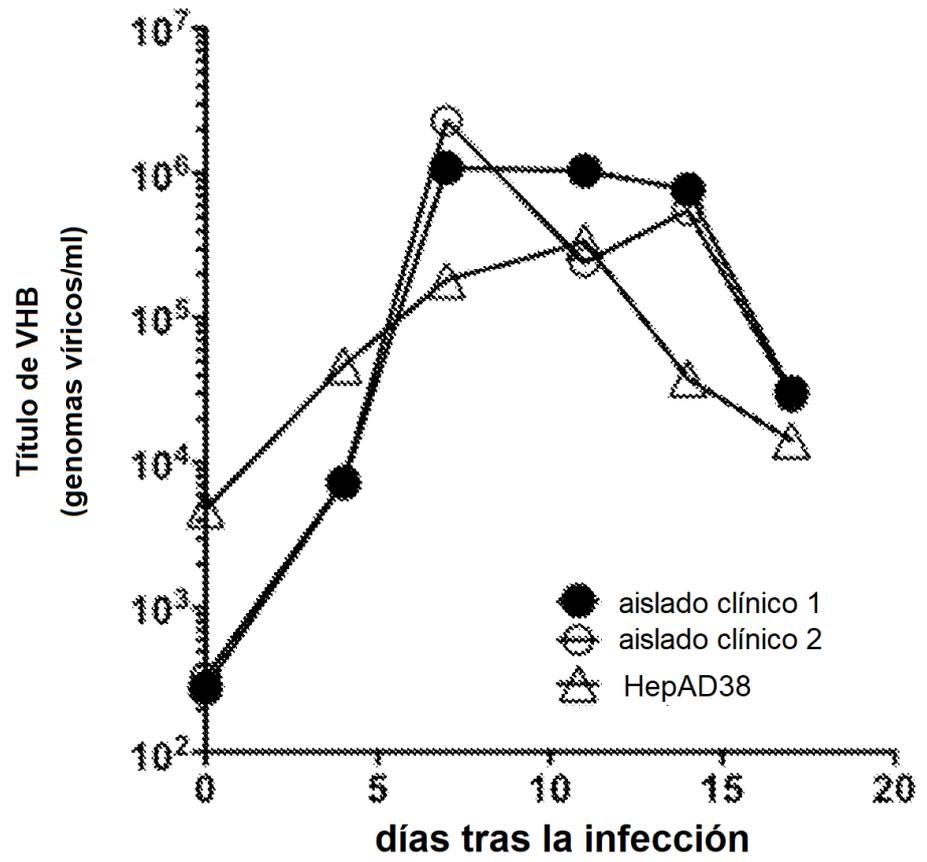


Figura 14

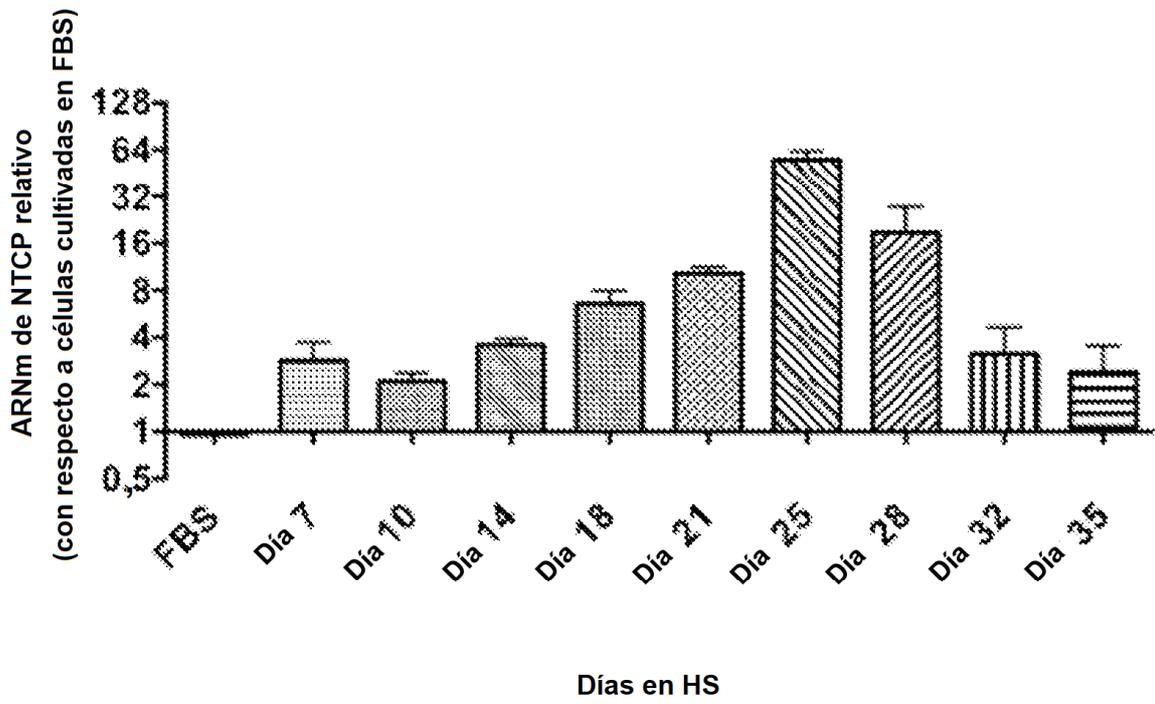


Figura 15

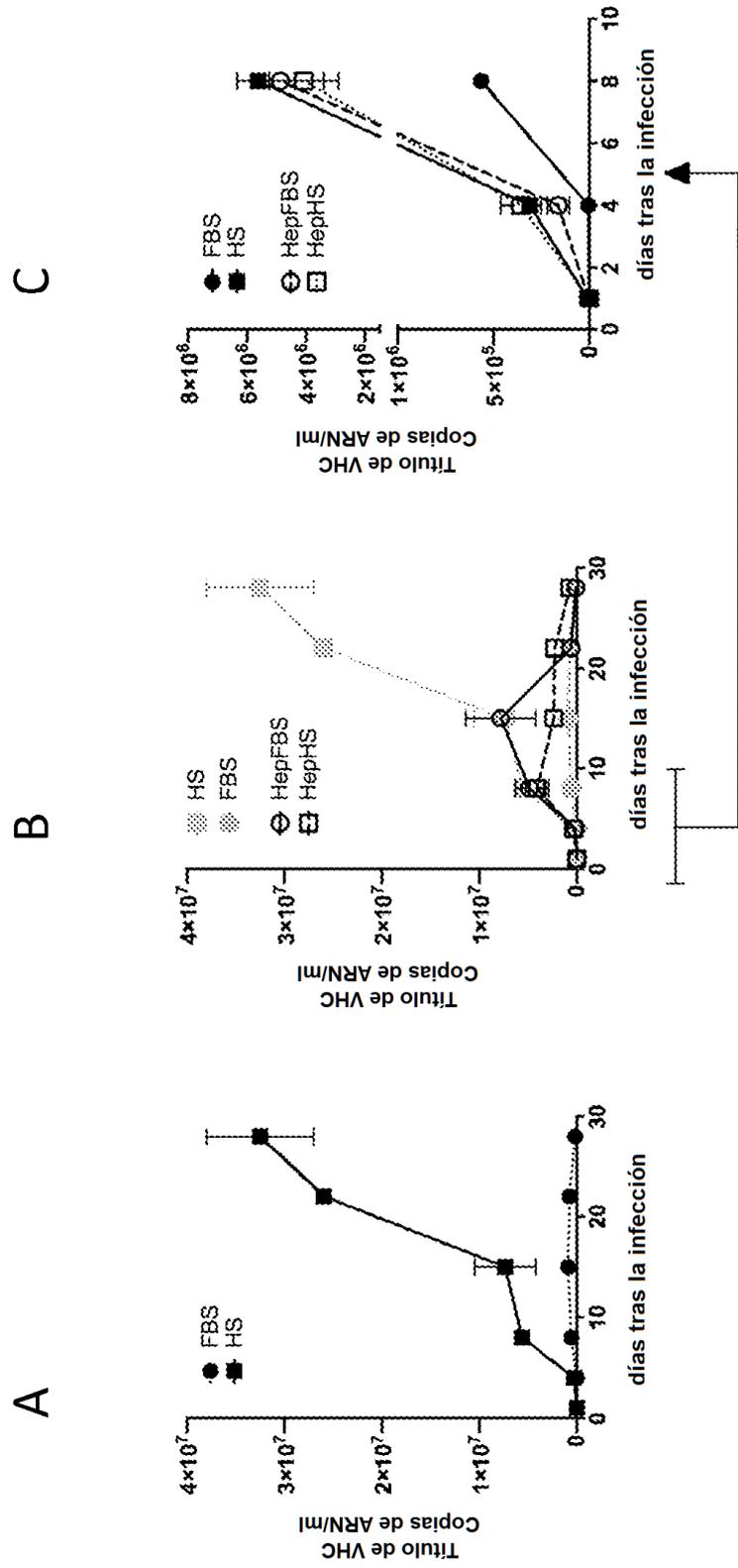


Figura 16

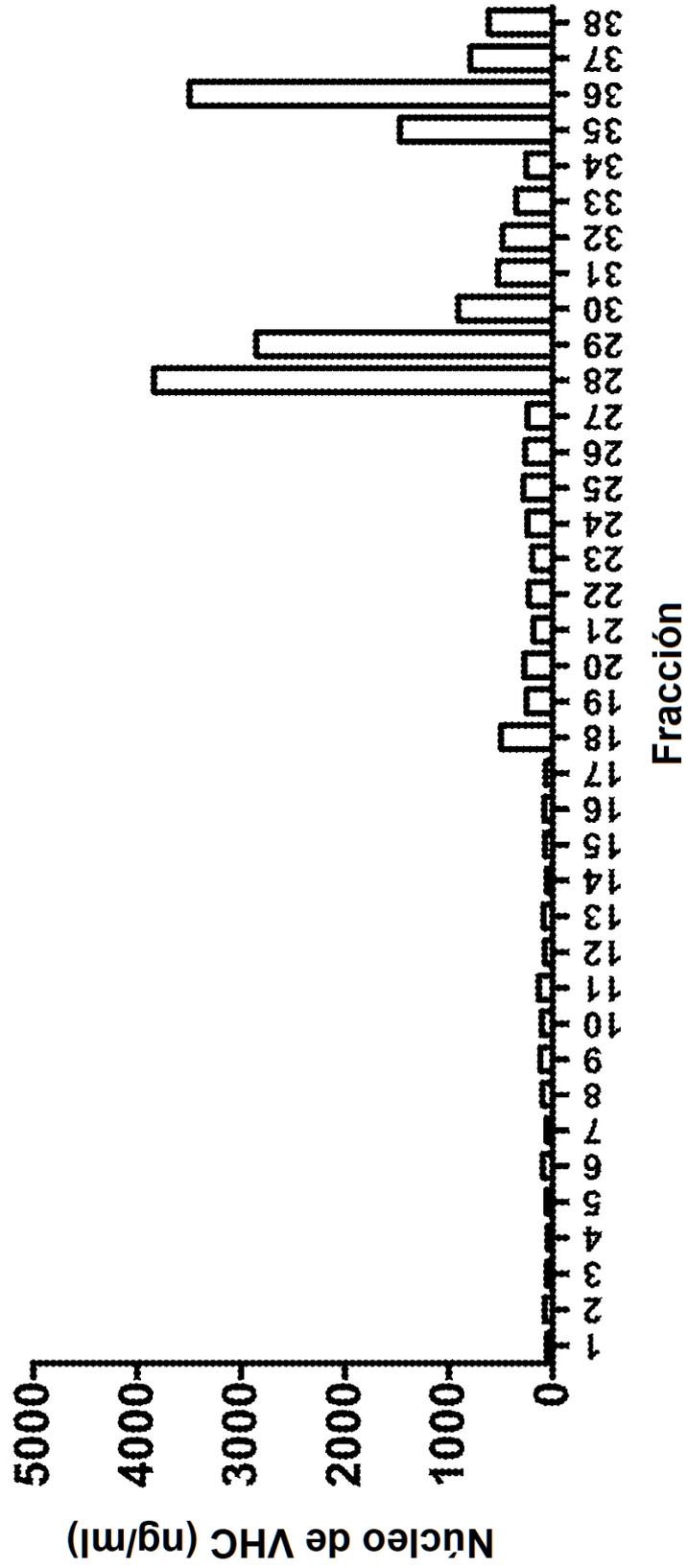


Figura 17

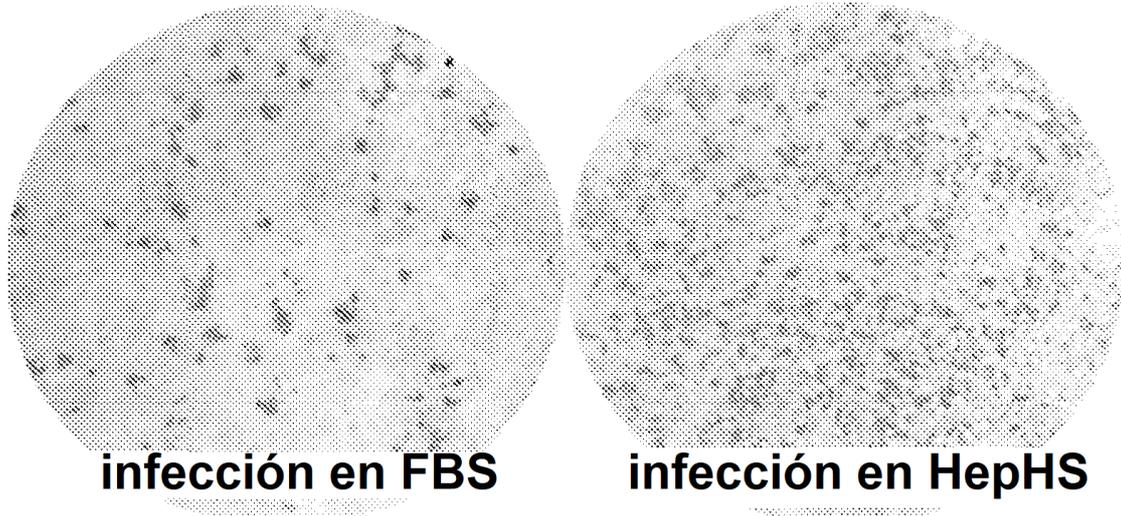


Figura 18

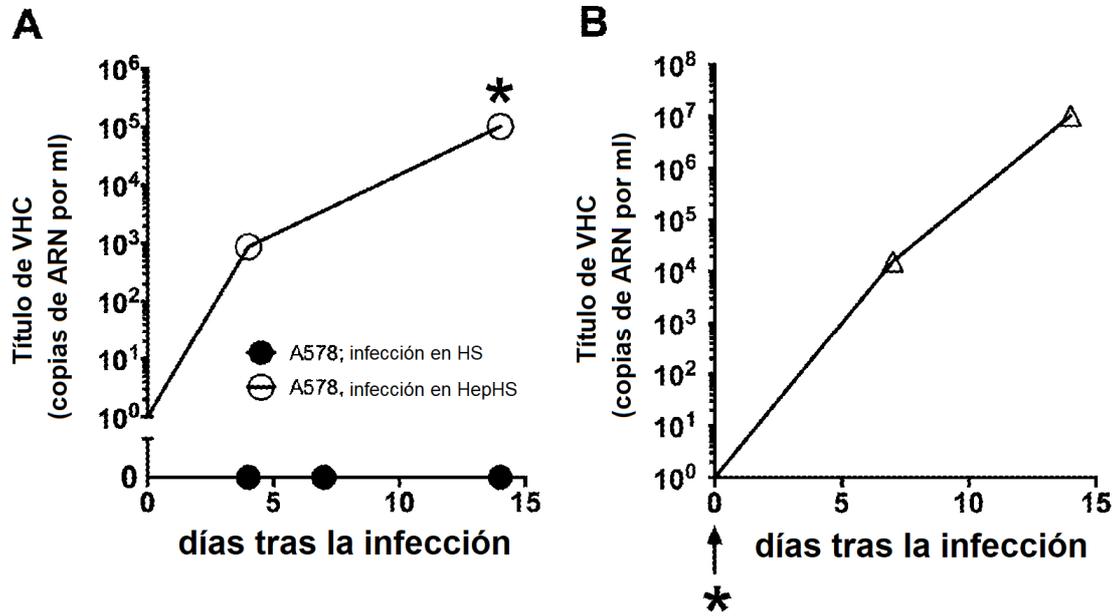


Figura 19

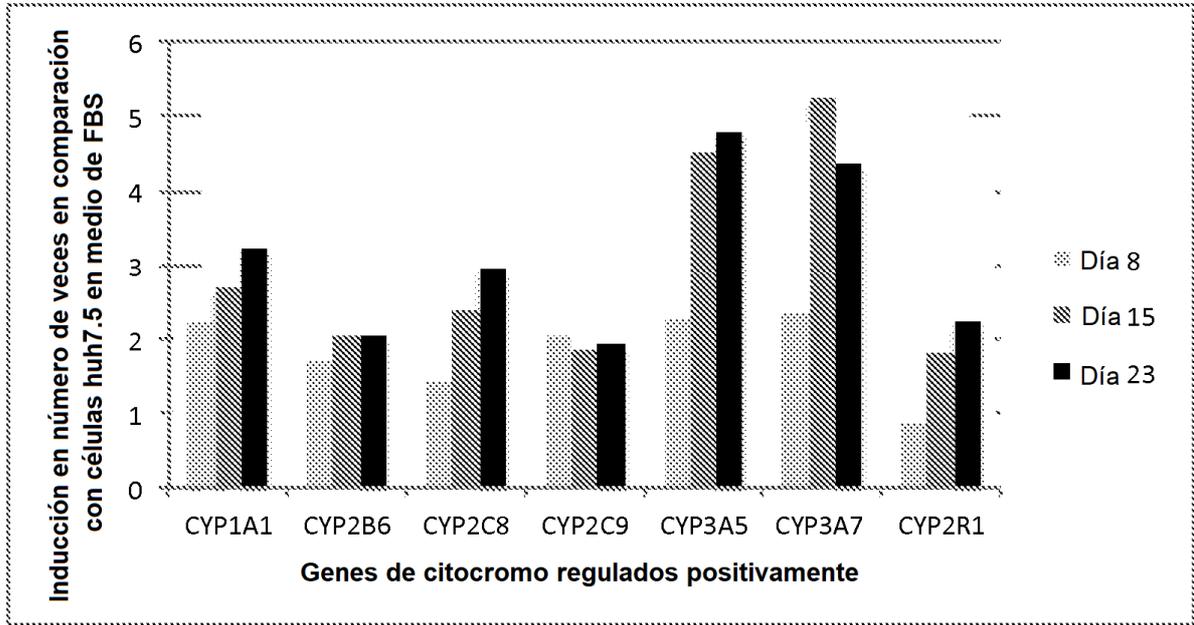


Figura 20

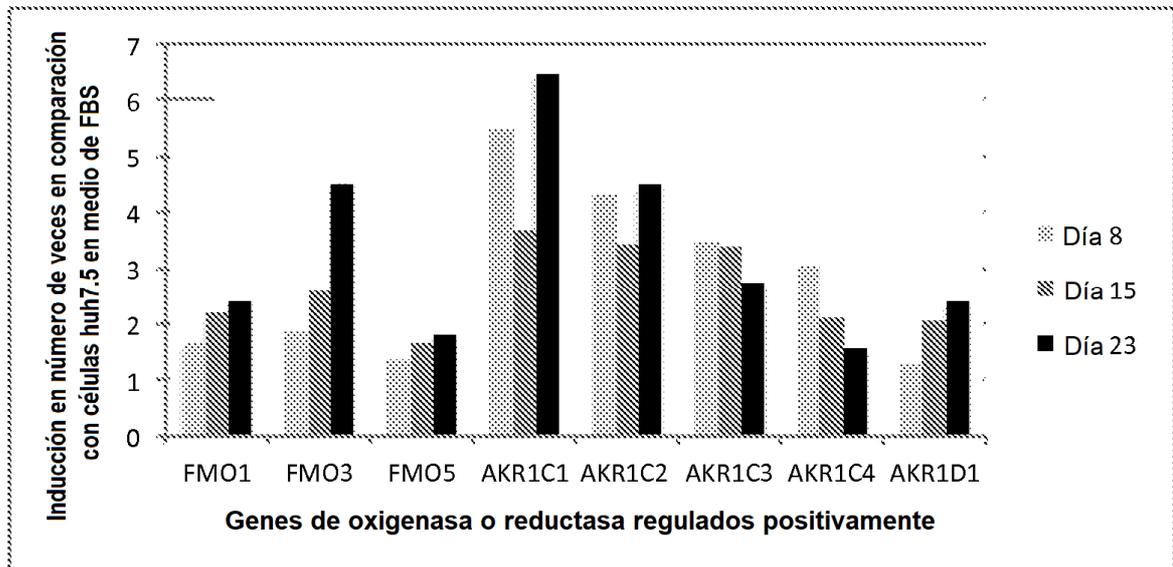


Figura 21

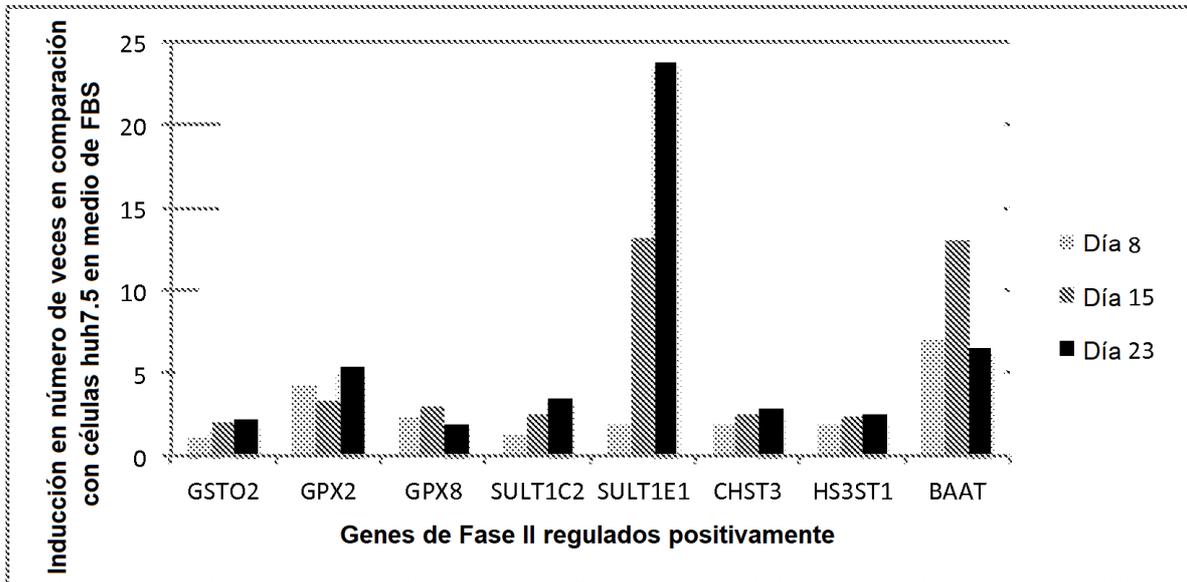


Figura 22

