



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 304 070**

⑫ Número de solicitud: 200400965

⑬ Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **21.04.2004**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2008**

Fecha de la concesión: **22.06.2009**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **07.07.2009**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
07.07.2009

⑲ Titular/es: **Universidad Autónoma de Madrid
c/ Einstein, nº 3
28049 Madrid, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

⑳ Inventor/es: **Valdivieso Ámate, Fernando;
Burgos Muñoz, Javier Santos;
Ramírez Moreno, Carlos y
Sastre Merlin, Isabel**

㉑ Agente: **Arias Sanz, Juan**

㉒ Título: **Método para identificar compuestos terapéuticamente útiles para el tratamiento y/o prevención de infecciones y enfermedades causadas por herpesvirus humanos.**

㉓ Resumen:

Método para identificar compuestos terapéuticamente útiles para el tratamiento y/o prevención de infecciones y enfermedades causadas por herpesvirus humanos.

Se ha descubierto una ruta de transmisión vertical madre-hijo de herpesvirus humanos que permite desarrollar un modelo animal útil para identificar compuestos potencialmente útiles en el tratamiento y/o prevención de infecciones y enfermedades causadas por herpesvirus humanos. El método para identificar tales compuestos comprende infectar experimentalmente una hembra de un animal no humano con herpesvirus humanos, antes o después de la administración del compuesto a ensayar, cruzarla con un macho de la misma especie y analizar la presencia de herpesvirus humanos en la progenie y/o determinar el efecto de dicho compuesto sobre la progenie o la madre. Alternativamente, en lugar de a la madre, se pueden administrar los compuestos a ensayar a los descendientes portadores de herpesvirus humanos y analizar el efecto ejercido sobre tales animales.

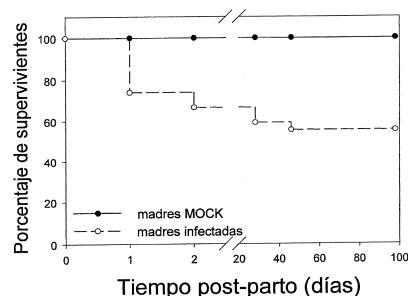


FIGURA 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método para identificar compuestos terapéuticamente útiles para el tratamiento y/o prevención de infecciones y enfermedades causadas por herpesvirus humanos.

Campo de la invención

La invención se relaciona con un método para la identificación de compuestos potencialmente útiles para la prevención y/o el tratamiento de infecciones y enfermedades causadas por herpesvirus humanos que comprende el empleo de un modelo animal desarrollado a partir de la transmisión vertical de herpesvirus humanos en dicho modelo animal.

Antecedentes de la invención

Los herpesvirus son miembros de la familia *Herpesviridae*. Estos virus son grandes, tienen un genoma DNA de doble cadena (dsDNA) de aproximadamente 80-250 kilobases (kb) y se encuentran en un amplio rango de sistemas hospedadores. Se han aislado unos 100 herpesvirus aproximadamente en distintas especies animales incluida la especie humana.

Hasta la fecha, se han descrito 8 herpesvirus humanos: virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), virus herpes simplex tipo 2 (HSV-2), virus de la varicella zoster (VZV), citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano 6 (HHV-6), herpesvirus humano 7 (HHV-7), virus de Epstein-Barr (EBV) y herpesvirus de Kaposi (HHV-8). Estos herpesvirus humanos se agrupan, a su vez, en varias sub-familias. Los miembros de la sub-familia de los alfa-herpesvirus humanos (HSV-1, HSV-2 y VZV) son neurotrofos mientras que los miembros de la sub-familia de los gamma-herpesvirus humanos (EBV y HHV-8) son linfotrofos. CMV, HHV-6 y HHV-7 pertenecen a la sub-familia de los beta-herpesvirus humanos. Cada uno de dichos herpesvirus humanos está relacionado con una enfermedad humana, por ejemplo, el herpes labial y genital (HSV-1 y HSV-2), varicela (VZV), mononucleosis infecciosa y carcinoma de nasofaringe (EBV), neumonía y retinitis (CMV), exantema súbito (HHV-6 y HHV-7) y sarcoma de Kaposi (HHV-8).

Tras la infección primaria, habitualmente en edad pediátrica, los herpesvirus establecen latencia en las células hospedadoras específicas del individuo infectado y permanecen en él durante el resto de su vida pudiendo originar, en ocasiones, infecciones secundarias. Las infecciones primarias con herpesvirus a menudo difieren en sus manifestaciones clínicas de las infecciones secundarias o recurrentes. Tanto las infecciones primarias como recurrentes de herpesvirus pueden llegar a infectar el sistema nervioso central (SNC) y causar una enfermedad en cualquier momento. De hecho, el HSV-1, un virus neurotrofo que infecta aproximadamente al 90% de la población adulta mundial, es el virus más común que infecta tejido nervioso de neonatos, niños y adultos asociado con diversas enfermedades neurológicas y alteraciones neuropatológicas tales como encefalitis humana severa, enfermedad de Alzheimer, demencia del boxeador, demencia asociada al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y parálisis cerebral. Tras la infección primaria, mediante transporte inverso axonal, el HSV-1 llega al SNC y establece un estado latente. Posteriormente, el virus puede reactivarse en respuesta a distintos estímulos y mediante un transporte anterógrado llega al área de infección primaria, causando lesiones mucocutáneas recurrentes.

Aunque algunas manifestaciones clínicas causadas por los herpesvirus humanos no son malignas, existen patologías que potencialmente comprometen la vida del individuo, tales como la encefalitis y las infecciones generalizadas de neonatos. De hecho, la encefalitis causada por HSV-1 y VZV ha sido ampliamente descrita y tiene una incidencia anual de, aproximadamente, 1 a 4 casos por millón de personas. La ausencia de tratamiento adecuado puede resultar en un desenlace fatal o puede dejar graves secuelas. Por otra parte, la encefalitis neonatal causada por herpesvirus humanos es una enfermedad devastadora que normalmente sucede como consecuencia de la transmisión perinatal del HSV-2. En pacientes inmunocompetentes de más de 3 meses, meningitis, meningoencefalitis y mielitis se han asociado, a menudo, con el HSV-2.

El tratamiento de las infecciones causadas por herpesvirus humanos se realiza típicamente con agentes antivirales, tales como aciclovir, cidofovir, famciclovir, ganciclovir, penciclovir, valaciclovir o foscarnet, siendo el aciclovir el fármaco de elección en la profilaxis y tratamiento de infecciones sistémicas de herpesvirus humanos. No obstante, estos fármacos, en general, tienen una biodisponibilidad relativamente baja y son potencialmente tóxicos.

Aunque se dispone de fármacos antivirales para la profilaxis y tratamiento de las infecciones y enfermedades causadas por herpesvirus humanos, sigue existiendo la necesidad de encontrar nuevos compuestos útiles para el tratamiento y/o prevención de las infecciones causadas por dichos virus. En este sentido, modelos animales susceptibles de ser utilizados en investigaciones relacionadas con herpesvirus humanos constituirían una valiosa herramienta para evaluar compuestos potencialmente útiles en el tratamiento y/o prevención de las infecciones y enfermedades causadas por herpesvirus humanos.

Compendio de la invención

Ahora se ha encontrado una nueva ruta de transmisión de herpesvirus humanos que permite desarrollar un modelo animal útil para identificar compuestos potencialmente terapéuticos, en particular, compuestos potencialmente útiles en el tratamiento y/o prevención de infecciones y enfermedades causadas por herpesvirus humanos. En particular, en base a la nueva, ruta de transmisión vertical madre-hijo de herpesvirus se ha desarrollado un modelo animal útil para

ensayar compuestos con el fin de identificar compuestos potencialmente profilácticos o terapéuticos. Este modelo, que comprende infectar experimentalmente una hembra de un animal no-humano con herpesvirus humanos, antes o después de la administración del compuesto a ensayar, cruzarla con un macho de la misma especie y analizar la presencia de herpesvirus humanos en la progenie y/o determinar el efecto de dicho compuesto sobre la progenie o la madre (hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano). Alternativamente, en lugar de a la madre, se pueden administrar los compuestos a ensayar a los descendientes portadores de herpesvirus humanos y analizar el efecto ejercido sobre tales animales.

Un método como el proporcionado por esta invención permite (i) identificar compuestos potencialmente útiles para evitar la transmisión vertical del virus de la madre a la progenie, que podrían ser utilizados como vacunas o como agentes antivirales, así como (ii) evaluar compuestos potencialmente útiles para el tratamiento o prevención de infecciones y enfermedades causadas por herpesvirus humanos y/o para el tratamiento de los síntomas clínicos asociados con tales enfermedades, que podrían ser utilizados, por ejemplo, como agentes antivirales, neuroprotectores, anti-neurodegenerativos, etc.

El modelo animal desarrollado en esta invención, basado en el descubrimiento de la transmisión vertical madre-hijo de herpesvirus humanos, permite replicar de forma consistente y reproducible la infección causada por herpesvirus humanos, en particular, el neurotropismo que presentan algunos herpesvirus humanos, por lo que puede ser utilizado para ensayar compuestos potencialmente terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de infecciones y enfermedades causadas por herpesvirus humanos.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un método para identificar un compuesto potencialmente terapéutico que comprende infectar experimentalmente una hembra de un animal no-humano con herpesvirus humanos, antes o después de la administración del compuesto a ensayar, cruzarla con un macho de su misma especie y analizar la presencia de herpesvirus humanos en la progenie y/o determinar su efecto sobre la progenie y/o la madre.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método alternativo para identificar un compuesto potencialmente terapéutico que comprende infectar experimentalmente una hembra de un animal no-humano con herpesvirus humanos, cruzarla con un macho de su misma especie, seleccionar los descendientes portadores de herpesvirus humanos, administrar el compuesto a ensayar a dichos descendientes y determinar el efecto producido por el compuesto a ensayar sobre dichos descendientes portadores de herpesvirus humanos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para producir un animal no-humano portador de herpesvirus humanos que comprende infectar una hembra de un animal no-humano con un herpesvirus humano, cruzarla con un macho de su misma especie y seleccionar los descendientes portadores de herpesvirus humanos, los cuales constituyen un aspecto adicional de esta invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una gráfica Kaplan-Meier que muestra el porcentaje de ratones descendientes (de neonatos a adultos) de madres infectadas con HSV-1 que sobrevivieron al post-parto y su comparación con los descendientes de madres MOCK.

La Figura 2 es un diagrama de barras que muestra los resultados, en función del sexo, de la mortalidad de los neonatos (días 1 ó 2 post-parto) procedentes de madres infectadas con HSV-1.

La Figura 3 es un diagrama de barras que muestra las cargas virales en la médula espinal, encéfalo y placenta de los embriones (día anterior al parto) de madres infectadas con HSV-1 y los porcentajes de los embriones infectados.

La Figura 4 es un diagrama de barras que muestra las cargas virales en la sangre y encéfalo de los neonatos de madres infectadas con HSV-1 y los porcentajes de los embriones infectados.

La Figura 5 es un diagrama de barras que muestra las cargas virales en cerebro, médula espinal, sangre, gónadas y ganglios trigéminos de adultos de 14 semanas, machos y hembras, procedentes de madres infectadas.

La Figura 6 es un diagrama de barras que muestra la viremia de las hembras pre-parto, neonatos, madres post-parto y la suma de los neonatos y madres tras el nacimiento.

La Figura 7 es un diagrama de barras que ilustra el efecto del aciclovir en las madres (Figura 7A), en particular, las cargas virales en sangre, cerebro y ganglios trigéminos, así como el efecto del aciclovir en los hijos (Figura 7B), en particular, las cargas virales en sangre, cerebro y médula espinal.

Descripción detallada de la invención

Para facilitar la comprensión de la invención objeto de esta solicitud de patente, a continuación se expone el significado de algunos términos y expresiones utilizados en el contexto de la invención.

La expresión “hembra de un animal no-humano” se refiere a una hembra de cualquier especie de animal no-humano susceptible de ser infectada por un herpesvirus humano, por ejemplo, una hembra de un mamífero no-humano, tal como un roedor, un primate, un suido, etc., preferentemente, un roedor, por ejemplo, un ratón, una rata, una cobaya, etc.; en una realización concreta, la hembra de animal no-humano utilizado es una hembra de ratón.

El término “herpesvirus humano” incluye cualquier herpesvirus humano, por ejemplo, HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV, HHV-6, HHV-7 o HHV-8, así como sus mezclas; la presente invención puede realizarse infectando experimentalmente con un herpesvirus humano o con una mezcla de dos o más herpesvirus humanos diferentes.

El término “compuesto potencialmente terapéutico” se refiere a un compuesto capaz de ejercer un efecto sobre la hembra de animal no-humano infectada experimentalmente con un herpesvirus humano o sobre su progenie (descendencia), tal como un efecto sobre la carga viral, por ejemplo, impedir la transmisión vertical madre-hijo de herpesvirus humanos y/o reducir o eliminar la carga de herpesvirus humanos en dicha hembra infectada experimentalmente o en su progenie o en generaciones sucesivas, o sus consecuencias sobre, por ejemplo, su viabilidad, su comportamiento conductual, sus posibles modificaciones en órganos de interés, sus posibles alteraciones citogenéticas y neuropatológicas.

Dicho compuesto puede ser un compuesto de cualquier naturaleza, por ejemplo, un compuesto químico, biológico, microbiológico, etc., aislado o mezclado con uno o más compuestos diferentes, e incluye compuestos de composición y estructura conocida o desconocida, productos farmacéuticos con alguna aplicación terapéutica conocida, productos biológicos, productos microbiológicos, etc., por ejemplo, compuestos químicos orgánicos o inorgánicos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, extractos, etc.

La determinación de la carga viral puede realizarse por cualquier método convencional, tal como cualquiera de los métodos definidos en relación con la etapa d) del método de la invención (véase más adelante). A modo ilustrativo, para que un compuesto sea considerado “potencialmente terapéutico” dicho compuesto tiene que (i) impedir la transmisión vertical madre-hijo de herpesvirus humanos, lo que puede evaluarse fácilmente determinando la presencia o ausencia de herpesvirus humanos en la progenie de una hembra infectada experimentalmente con herpesvirus humanos, (ii) reducir la carga viral de la hembra infectada experimentalmente o en un descendiente de su progenie portador de herpesvirus humanos en, al menos, un 5% respecto a la carga viral de la madre o su descendiente inmediatamente anterior a la administración del compuesto a ensayar, por ejemplo, al menos, un 10%, o al menos, un 20%, o al menos un 30%, o al menos, un 40%, o al menos, un 50% o al menos, un 60% o al menos, un 70%, o al menos un 80%, o al menos, un 90%, o al menos, un 95% respecto a la carga viral de la madre o su descendiente inmediatamente anterior a la administración del compuesto a ensayar; y/o (iii) revertir, reducir o minimizar las consecuencias de herpesvirus humanos en la hembra infectada experimentalmente o en su progenie o en generaciones sucesivas, por ejemplo, sobre su viabilidad, su comportamiento conductual, sus posibles modificaciones en órganos de interés, sus posibles alteraciones citogenéticas y neuropatológicas.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los herpesvirus humanos pueden ser transmitidos verticalmente de madres a hijos. Por tanto, analizando la progenie de una madre infectada experimentalmente con herpesvirus humanos a la que se le ha administrado antes o después de dicha infección experimental un compuesto potencialmente terapéutico, o la propia madre, es posible evaluar la posible utilidad terapéutica de dicho compuesto en la prevención y/o el tratamiento de infecciones y enfermedades causadas por herpesvirus humanos. Asimismo, administrando un compuesto potencialmente terapéutico a los descendientes de una madre infectada experimentalmente con herpesvirus humanos a la que no se le ha administrado previamente dicho compuesto a ensayar es posible evaluar la posible utilidad terapéutica del compuesto ensayado en la prevención y/o el tratamiento de infecciones y enfermedades causadas por herpesvirus humanos y sus consecuencias.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un método para identificar un compuesto potencialmente terapéutico, en adelante, método de la invención, que comprende las etapas de:

- a) infectar una hembra de un animal no-humano con un herpesvirus humano;
- b) administrar a dicha hembra de animal no-humano el compuesto potencialmente terapéutico a ensayar;
- c) cruzar dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano con un macho de un animal no-humano perteneciente a la misma especie que dicha hembra, y
- d) analizar la presencia de herpesvirus humanos en la progenie de dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano y/o determinar el efecto de dicho compuesto potencialmente terapéutico sobre dicha progenie o sobre dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano,

en el que las etapas a) y b) se realizan en cualquier orden.

En una realización particular, el método de la invención comprende la realización de la etapa a) [infección experimental de la hembra de animal no-humano con un herpesvirus humano] antes que la etapa b) [administración a la hembra de animal no-humano el compuesto potencialmente terapéutico a ensayar]. Esta realización particular del método de la invención se denomina, en adelante, Método A.

En otra realización particular, el método de la invención comprende la realización de la etapa b) [administración a la hembra de animal no-humano el compuesto potencialmente terapéutico a ensayar] antes que la etapa a) [infección experimental de la hembra de animal no- humano con un herpesvirus humano]. Esta realización particular del método de la invención se denomina, en adelante, Método B.

El Método A comienza con la infección experimental de la hembra del animal no- humano con un herpesvirus humano [etapa a)]. Dicha infección puede realizarse utilizando cualquiera de las rutas de infección por herpesvirus humanos conocidas, por ejemplo, la ruta olfatoria, neural o hematógena. En una realización particular, la infección se realiza siguiendo la ruta hematógena, administrando herpesvirus humano a la hembra mediante inyección intraperitoneal (i.p.) y/o intravenosa (i.v.) (por ejemplo, por punción en la vena de la cola), ventajosamente, mediante inyección i.p. o bien mediante 2 inyecciones (i.p. + i.v.). La infección por la ruta olfatoria se puede realizar mediante administraciones intranasales, mientras que la infección por la ruta neural se puede realizar por diferentes métodos, por ejemplo, provocando heridas bilaterales por abrasión con una cuchilla en el hocico del ratón y aplicando soluciones con virus, lo que mimetiza a las fiebres frías que se dan en humanos. La carga de herpesvirus humano a administrar a la hembra a infectar experimentalmente puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, dicha carga viral está comprendida entre 1 y 10^6 unidades formadoras de placa (ufp). A pesar de la especificidad viral y al limitado rango de huéspedes de los herpesvirus humanos que podrían impedir la infección efectiva de especies que no constituyen los huéspedes naturales de dichos virus, se obtienen buenas tasas de infección cuando se infectan animales no-humanos con herpesvirus humanos según la metodología descrita en la presente invención.

A continuación, se administra el compuesto potencialmente terapéutico a ensayar a la hembra de animal no-humano infectada con herpesvirus humano [etapa b)]. Dicho compuesto se administra a la hembra previamente infectada por cualquier vía de administración apropiada (por ejemplo, oral, subcutánea, parenteral, por ejemplo, i.v. o i.p., etc.), en una forma de administración adecuada a la vía de administración elegida, y en una dosificación adecuada; a modo ilustrativo, dicho compuesto potencialmente terapéutico puede administrarse en forma de una sola dosis o etapa o en varias dosis o etapas a lo largo del tiempo o mediante una suministración continua del compuesto a ensayar.

Seguidamente, la hembra infectada con herpesvirus humano, a la que se le ha administrado el compuesto a ensayar, se cruza [etapa c)], por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, con un macho de un animal no-humano perteneciente a la misma especie que dicha hembra. El macho con el que se cruza la hembra infectada experimentalmente puede estar, o no, libre de herpesvirus humanos; en principio, este hecho parece ser irrelevante ya que daría igual para la transmisión que el padre fuera infectado o MOCK (es decir, libre de herpesvirus humanos), siempre que esto no afectara a la capacidad de embarazar a las hembras, hecho que parece no darse; no obstante, en una realización particular, se utilizan machos MOCK en el diseño experimental. Finalmente, se analiza la presencia de herpesvirus humanos en la progenie de dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano y/o se determina el efecto de dicho compuesto potencialmente terapéutico sobre dicha progenie o sobre dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano [etapa d)].

En una realización particular se analiza la presencia de herpesvirus humanos en la progenie de la hembra infectada experimentalmente. Dicho análisis puede realizarse por cualquier método apropiado que permita detectar la presencia de herpesvirus humanos en la muestra ensayada. Tales métodos incluyen métodos serológicos (inmunológicos), genéticos, etc., y el empleo de sistemas de detección de marcadores moleculares apropiados basados, por ejemplo, en fluorescencia, luminiscencia, reacciones colorimétricas, etc. A modo ilustrativo, pueden citarse ensayos de ELISA, western-blot para detectar proteínas virales, métodos basados en el empleo de virus bioluminiscentes, métodos basados en la detección inmunocitológica e inmunohistológica de herpesvirus humanos, ensayos de plaqueo sobre monocapas de células, métodos de identificación de DNA viral basados, por ejemplo, en el empleo de sondas de oligonucleótidos marcadas con grupos marcadores detectables, o bien en la realización de reacciones enzimáticas específicas tales como reacciones de restricción o reacciones de amplificación, basadas, por ejemplo, en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), etc. En una realización particular, la eventual presencia de herpesvirus humanos en la progenie se realiza en una muestra procedente de los animales de la progenie mediante PCR cuantitativa a tiempo real según un protocolo previamente definido [Burgos JS, Ramírez C, Sastre I, Bullido MJ and Valdivieso F. (2003). ApoE4 is more efficient than E3 in brain access by herpes simplex virus type 1. *NeuroReport* 14(14); 1825-1827; Burgos JS, Ramírez C, Sastre I, Bullido MJ and Valdivieso F. (2002). Involvement of apolipoprotein E in the hematogenous route of herpes simplex virus type 1 to the central nervous system. *Journal of Virology*. 76(23); 12394-12398; Burgos JS, Ramírez C, Tenorio R, Sastre I and Bullido MJ. (2002). Influence of reagents formulation on real-time PCR parameters. *Molecular and Cellular Probes*. 16; 257-260].

En otra realización particular se determina el efecto del compuesto ensayado sobre la progenie de la hembra infectada experimentalmente o sobre dicha hembra. De este modo se puede determinar la presencia de herpesvirus humanos tanto en la progenie como en la madre, así como los cambios patológicos asociados con la presencia de virus en la progenie y/o en la madre. El efecto del compuesto ensayado sobre dicha progenie o sobre su madre se puede determinar mediante diferentes técnicas experimentales convencionales basadas, por ejemplo, en análisis de imagen (por ejemplo, resonancia magnética nuclear, bioluminiscencia, tomografía computerizada, tomografía por emisión de positrones o PET, fluorescencia, etc.), técnicas histopatológicas, detección de marcadores virales y de neurodegeneración, tanto a nivel genómico como proteómico, etc.

A modo ilustrativo, el efecto del compuesto ensayado sobre la hembra experimentalmente infectada con herpesvirus humanos o sobre su descendencia se puede determinar mediante la realización de, al menos, un análisis o estudio

seleccionado entre (1) análisis de viabilidad de las hembras progenitoras y de la progenie, (2) análisis de comportamiento de las hembras progenitoras y de la progenie, (3) estudios de imagen de las hembras progenitoras y de la progenie, (4) análisis citogenéticos de la progenie, y (5) estudios neuropatológicos.

5 (1) *Análisis de viabilidad de las hembras progenitoras y descendencia*: Mediante este análisis se determinan los índices de supervivencia tanto en la progenie como en la hembra progenitora y se evalúa si el compuesto ensayado modifica los porcentajes de viabilidad en los animales a los que se les ha administrado respecto a los controles.

10 (2) *Análisis de comportamiento de las hembras progenitoras y descendencia*: El estudio completo de enfermedades en modelos animales incluye un análisis conductual del animal. Este estudio sirve para comprobar el efecto de la infección viral sobre el funcionamiento del cerebro tanto en la descendencia como en la hembra progenitora. En una realización particular, el modelo animal es un modelo murino, en cuyo caso, el análisis conductual de dicho modelo murino para una enfermedad se puede subdividir en tres fases experimentales: (i) fase de evaluación de su estado de salud y de sus reflejos neurológicos; (ii) fase de análisis de su capacidad motriz y sensorial; y (iii) fase
15 específica del modelo con tests específicos y validados para la neuropatología concreta. En general, en la primera fase [(i)] se comprueba el peso de los animales, el estado del pelaje, la reacción al manejo por parte del experimentador, los reflejos auditivos, los reflejos visuales, la capacidad olfatoria y los comportamientos sociales. La segunda fase [(ii)] supone una batería de ensayos para comprobar que el estado del animal es apropiado a la hora de realizar los tests específicos posteriores. Este grupo de ensayos incluye el estudio de la capacidad auditiva, la capacidad visual,
20 las funciones motoras o la coordinación de movimientos, entre otros. En la tercera fase [(iii)] se realizan los tests específicos de la patología a estudio, incluyendo los previamente descritos en la bibliografía, con la característica fundamental de que estén estandarizados, se puedan validar y sean reproducibles. A modo ilustrativo, en los modelos animales para la enfermedad de Alzheimer, el test más utilizado para comprobar la memoria de ratón es el tanque de Morris. En este test se analiza la capacidad del ratón, para recordar la situación de una plataforma sumergida en un baño, usando exclusivamente una serie de pistas visuales que se encuentran fuera del tanque. Para los modelos
25 animales de la enfermedad de Parkinson, se estudia la capacidad de aprendizaje en el *Rotarod*. En este test se puede analizar el aprendizaje motor de un ratón. El ratón debe adaptarse al movimiento acelerado de un cilindro, donde se evalúa la coordinación motora y el aprendizaje del mismo.

30 (3) *Estudios de imagen en las hembras progenitoras y descendencia*: Con el objetivo de estudiar las modificaciones tanto a nivel cerebral como de otros órganos de interés, se pueden aplicar las técnicas de imagen de pequeños animales, las cuales son no invasivas y permiten realizar los diferentes estudios sin necesidad de sacrificio del animal. Entre las técnicas más utilizadas para este propósito se encuentran la resonancia magnética nuclear (RMN), la tomografía por emisión de positrones (PET), la tomografía computerizada (TAC), los rayos X de alta resolución, y métodos de emisión
35 de señales bioluminiscentes basadas en reacciones enzimáticas (BLI) y en métodos de implantación de construcciones genéticas con proteína verde fluorescente (EGFP). Las diferentes técnicas de análisis de imagen se pueden utilizar para detectar los cambios morfológicos y patológicos *in vivo*, así como para el seguimiento del herpesvirus humano en las hembras progenitoras y en la progenie.

40 (4) *Análisis citogenéticos en la progenie*: Con este fin se pueden estudiar las aberraciones cromosómicas, cambios estructurales genéticos y variación del número de copias en la progenie de las madres infectadas experimentalmente, estudiando las consecuencias genéticas de ese hecho. Para ello, se realizan mapas citogenéticos de los descendientes, así como estrategias de búsqueda de modificaciones estructurales por hibridación *in situ* fluorescente [FISH, del inglés, “fluorescent *in situ* hybridization”]. Las variaciones cromosómicas estructurales a estudiar pueden ser: delec-
45 ciones, duplicaciones, inversiones y/o translocaciones. Las variaciones cromosómicas numéricas a estudiar incluyen: poliploidías, haploidías y/o aneuploidías. Asimismo, si se desea, se puede estudiar la posible transmisión de dichas variaciones cromosómicas.

50 (5) *Estudios neuropatológicos en las hembras progenitoras y en la descendencia*: Mediante técnicas histopatológicas se puede determinar las regiones del cerebro que presenten signos de degeneración en las hembras progenitoras y en su descendencia. Además, y mediante técnicas inmunohistoquímicas, se pueden estudiar algunos marcadores neuronales de neurodegeneración tales como α -sinucleína, APP (del inglés, proteína precursora del amiloide), ApoE (Apolipoproteína E), el estado de fosforilación de tau, etc. Estos antígenos de interés pueden ser detectados junto con marcadores de tipos neuronales específicos, tales como la tirosin hidroxilasa, que marca neuronas dopaminérgicas, o
55 la acetil colintransferasa, marcador de neuronas colinérgicas, con la intención de determinar la pérdida de poblaciones neuronales específicas. En este caso se analizarían los marcadores proteicos implicados en procesos neurodegenerativos en diferentes condiciones de infección, comparándolas con variaciones en las proteínas endógenas. Asimismo, como complemento a los estudios inmunohistoquímicos, se pueden analizar los mRNA de los genes celulares y virales implicados en la neuroinvasión y neurodegeneración mediante análisis cuantitativo con RT-PCR de los mensajeros correspondientes, así como la variabilidad cuantitativa de los niveles de proteína totales de extractos crudos mediante
60 la técnica de western-blot.

Los resultados obtenidos en los Ejemplos 1 a 3 que acompañan a esta descripción, ponen de manifiesto: (i) la transmisión vertical madre-hijo de herpesvirus humanos así como la localización del virus fundamentalmente en la
65 sangre y en el cerebro de los descendientes; (ii) la administración de aciclovir a las madres disminuye los niveles de mortalidad observados en la descendencia de los animales sin tratar; (iii) los niveles de cargas virales en los diferentes órganos analizados, tanto en las madres como en los hijos, disminuyen al ser tratadas las madres con aciclovir; y, (iv) la administración por vía oral de aciclovir es más eficiente que la administración por vía subcutánea.

Por tanto, la invención demuestra la existencia de transmisión vertical de herpesvirus humanos de madres infectadas experimentalmente a hijos. Aunque los inventores no desean estar vinculados a ninguna hipótesis, se cree que esta transmisión madre-hijo transcurre, mayoritariamente, mediante la ruta hematógica ya que la mayor carga viral en el neonato se encuentra en la sangre, que comparte con la madre. Según esta hipótesis, la madre estaría suministrando el virus al hijo durante toda la gestación a través de la sangre. Por tanto, la presencia de herpesvirus humano en la progenie sería indicativa de que el compuesto ensayado en la madre no es capaz de eliminar el herpesvirus en la madre y, por tanto, aparece en su descendencia. Por el contrario, la ausencia de herpesvirus humano en la progenie sería indicativa de que el compuesto ensayado en la madre es capaz de eliminar el herpesvirus en la madre o de impedir la transmisión vertical madre-hijo, y, por tanto, puede actuar como un agente antiviral.

El Método A, que comprende la administración del compuesto a ensayar a la madre previamente infectada, permite identificar compuestos potencialmente útiles porque ejercen algún efecto sobre la madre o sobre la progenie, como consecuencia de la presencia de herpesvirus humanos, a nivel de supervivencia, conducta, modificaciones en órganos de interés y/o neuropatologías o como agentes antivirales (la ausencia o reducción en la carga viral de la madre infectada experimentalmente es ilustrativa de que el compuesto administrado es potencialmente útil como agente antiviral).

El Método B comienza con la administración del compuesto potencialmente terapéutico a ensayar a la hembra de animal no-humano [etapa b)] y, a continuación, se infecta experimentalmente dicha hembra pretratada con un herpesvirus humanos [etapa a)]. Estas etapas se llevan a cabo de forma similar a como se realizan las etapas a) y b) definidas en relación con el Método A. Las etapas c) y d) del Método B son las mismas que las del Método A y se realizan de la misma manera.

El Método B, que comprende la administración del compuesto a ensayar a la hembra antes de que sea infectada experimentalmente, permite identificar compuestos potencialmente terapéuticos útiles como vacunas o como agentes capaces de impedir la transmisión madre-hijo del virus. Para identificar los compuestos potencialmente útiles como vacunas, las hembras diana de la infección experimental tienen que ser hembras que no presenten signos de infección por herpesvirus humanos, ventajosamente, hembras que estén libres de tales virus (MOCK), por ese motivo, tales hembras se analizan previamente mediante cualquier método convencional que permita detectar la presencia de herpesvirus humanos y determinar si han estado o no en contacto con tales virus, por ejemplo, mediante cualquiera de los métodos previamente mencionados. La ausencia de herpesvirus humanos en la progenie de la hembra infectada experimentalmente es ilustrativa de que el compuesto potencialmente terapéutico administrado a la madre es potencialmente útil como vacuna o como agente capaz de impedir la transmisión vertical madre-hijo del virus. Asimismo, dicho Método B permite identificar compuestos que ejercen algún efecto sobre la madre o sobre la progenie a nivel de supervivencia, conducta, modificaciones en órganos de interés y/o neuropatologías como consecuencia de la presencia de herpesvirus humanos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método alternativo para identificar un compuesto potencialmente terapéutico, en adelante Método C, que comprende las etapas de:

- i) infectar una hembra de un animal no-humano con un herpesvirus humano;
- ii) cruzar dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano con un macho de un animal no-humano perteneciente a la misma especie que dicha hembra;
- iii) analizar la presencia de herpesvirus humanos en la progenie de dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano y seleccionar aquellos descendientes portadores de herpesvirus humanos;
- iv) administrar a dichos descendientes portadores de herpesvirus humanos el compuesto potencialmente terapéutico a ensayar; y
- v) determinar el efecto de dicho compuesto potencialmente terapéutico ensayado sobre dichos descendientes portadores de herpesvirus humanos.

El Método C comienza con la infección experimental de la hembra del animal no-humano con un herpesvirus humano [etapa i)]. Dicha infección experimental se realiza de forma similar a como se realiza en la etapa a) del Método A. Seguidamente, la hembra infectada con herpesvirus humano se cruza [etapa ii)] con un macho de un animal no-humano perteneciente a la misma especie que dicha hembra de forma similar a como se realiza en la etapa c) del Método A. A continuación, se analiza la presencia de herpesvirus humanos en la progenie de la hembra de animal no-humano infectada con herpesvirus humano y se seleccionan aquellos descendientes portadores de herpesvirus humanos [etapa iii)]. La presencia de herpesvirus humano en la progenie de la hembra infectada experimentalmente se analiza por cualquier método apropiado de forma similar a lo indicado en relación con la etapa d) del Método A. Seguidamente, a los descendientes portadores de herpesvirus humanos se les administra el compuesto potencialmente terapéutico a ensayar en forma de una sola dosis o etapa o en varias dosis o etapas a lo largo del tiempo o mediante una administración continua del compuesto a ensayar de forma similar a como se ha indicado en relación con la etapa b) del Método A y, finalmente, se determina el efecto de dicho compuesto potencialmente terapéutico ensayado sobre dichos descendientes portadores de herpesvirus humanos. Dicho efecto puede constituir en la reducción total o parcial de la carga viral del animal portador de herpesvirus humanos, en cuyo caso, dicho compuesto potencialmente terapéutico

es un compuesto potencialmente útil como agente antiviral, o en un efecto relacionado con las consecuencias de la presencia de herpesvirus humanos en dicho animal a nivel de supervivencia, conducta, modificaciones en órganos de interés y/o neuropatologías, para lo cual se puede realizar, al menos, un análisis o estudio, sobre dichos descendientes portadores de herpesvirus humanos, seleccionado entre (1) análisis de viabilidad, (2) análisis de comportamiento, (3) estudios de imagen, (4) análisis citogenéticos, y (5) estudios neuropatológicos.

Dado que los herpesvirus humanos están relacionados con distintas enfermedades humanas, por ejemplo, herpes labial o genital, varicela, mononucleosis infecciosa, carcinoma de nasofaringe, neumonía, retinitis, exantema súbita, sarcoma de Kaposi, infecciones del SNC, enfermedades neurológicas y alteraciones neuropatológicas tales como encefalitis, enfermedad de Alzheimer, demencia del boxeador, demencia asociada al HIV, parálisis cerebral, meningitis, meningoencefalitis y mielitis, dicho compuesto potencialmente terapéutico puede ser utilizado para el tratamiento o profilaxis de tales patologías en la medida en que estas sean causadas por herpesvirus humano. Por tanto, en una realización particular, el compuesto potencialmente terapéutico susceptible de ser identificado mediante cualquiera de los Métodos A, B y C previamente definidos, es una vacuna, un agente antiviral, un agente neuroprotector o un agente anti-neurodegenerativo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para producir un animal no- humano portador de herpesvirus humanos que comprende las etapas de:

- a) infectar una hembra de un animal no-humano con un herpesvirus humano;
- b) cruzar dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano con un macho de un animal no-humano perteneciente a la misma especie que dicha hembra, y
- c) seleccionar los descendientes portadores de herpesvirus humanos.

Dicho método comienza con la infección experimental de la hembra del animal no- humano con un herpesvirus humano [etapa a)], que se realiza de forma similar a como se realiza en la etapa a) del Método A; a continuación, la hembra infectada con herpesvirus humano se cruza [etapa b)] con un macho de un animal no-humano perteneciente a la misma especie que dicha hembra de forma similar a como se realiza en la etapa c) del Método A; y, finalmente, se analiza la presencia de herpesvirus humanos en la progenie de la hembra de animal no-humano infectada con herpesvirus humano y se seleccionan aquellos descendientes portadores de herpesvirus humanos [etapa c)]. La presencia de herpesvirus humano en la progenie de la hembra infectada experimentalmente se analiza por cualquier método apropiado de forma similar a lo indicado en relación con la etapa d) del Método A.

Los descendientes portadores de herpesvirus humanos así obtenidos constituyen un aspecto adicional de la presente invención. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un animal no-humano portador de herpesvirus humanos obtenido según el método previamente descrito. El animal no-humano portador de herpesvirus humanos proporcionado por esta invención se caracteriza por ser un descendiente de una hembra de un animal no-humano infectada con un herpesvirus humano. Adicionalmente, dicho animal no-humano tiene la característica de que dichos herpesvirus humanos están localizados mayoritariamente en el sistema nervioso central (SNC) y/o en la sangre, por ejemplo, en el cerebro, médula espinal y/o sangre. Como se pone de manifiesto en el Ejemplo 1 y en la Figura 5, en los adultos de 14 semanas hijos de madres infectadas se observó, de nuevo, que los órganos diana para la infección del HSV-1 por transmisión vertical son el SNC y la sangre, corroborando resultados previos. Además, tanto en machos como en hembras, los ganglios trigéminos presentaron altos niveles de virus. Una de las mayores diferencias entre sexos fue la colonización de las gónadas, siendo el HSV-1 indetectable en testículos. En una realización particular, el animal no-humano portador de herpesvirus humanos proporcionado por esta invención es un roedor, un primate o un suido, por ejemplo, un ratón, una rata, una cobaya, un mono o un cerdo, bien de sexo masculino o femenino. Estos animales pueden utilizarse, además de como modelos animales para la experimentación y búsqueda de compuestos potencialmente terapéuticos como progenitores para nuevos descendientes portadores de herpesvirus humanos.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método alternativo para producir un animal no-humano portador de herpesvirus humanos que comprende las etapas de:

- a) cruzar un primer animal no-humano portador de herpesvirus humanos descendiente de una hembra de un animal no-humano infectada con un herpesvirus humano con un segundo animal no-humano perteneciente a la misma especie que dicho primer animal pero de sexo diferente, y
- b) seleccionar los descendientes portadores de herpesvirus humanos.

Dicho método comprende cruzar un primer animal no-humano portador de herpesvirus humanos, proporcionado por esta invención, descendiente de una hembra de un animal no-humano infectada con un herpesvirus humano con un segundo animal no-humano perteneciente a la misma especie pero de sexo diferente. Este segundo animal puede ser un animal MOCK o, alternativamente, un animal no-humano portador de herpesvirus humanos, proporcionado por esta invención, descendiente de una hembra de un animal no-humano infectada con un herpesvirus humano. El cruce de dichos animales se realiza de forma convencional, tal como se ha mencionado previamente. A continuación, se analiza la presencia de herpesvirus humanos en la descendencia y se seleccionan los descendientes portadores de herpesvirus

humanos, los cuales pueden ser utilizados como modelos animales o con fines reproductivos para engendrar nuevos animales no-humanos portadores de herpesvirus humanos.

Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

Ejemplo 1

Transmisión vertical madre-hijo de herpesvirus humanos

Todos los animales incluidos en el proceso experimental fueron hembras de la especie de ratón de 14 semanas de edad del linaje C57B1/6. Se usaron 16 ratones adultos (hembras) como progenitores, 21 embriones, 77 neonatos y 13 adultos hijos. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las líneas maestras de las Guías de Animales (Procedimientos Científicos, Acta 1986), siendo supervisados por el personal del Animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Todos los animales pasaron un periodo de cuarentena y fueron tratados con precauciones estrictas contra la contaminación durante la inoculación y la disección.

Los animales fueron infectados intraperitonealmente con una dosis de 10^6 unidades formadoras de placa (ufp) de virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) de la cepa KOS (cedida por el Dr. L. Carrasco, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid). Tras 37 días post-infección, momento en el que ya está establecida la infección latente (se considera latencia a partir del día 28 post-infección), las hembras fueron cruzadas con ratones macho y se analizó la mortalidad de la descendencia entre los días 1 y 100 post-parto. Se realizó una comparación mediante una gráfica Kaplan-Meier entre la descendencia de madres infectadas y la descendencia de madres MOCK. Los resultados se muestran en la Figura 1 e ilustran una disminución en la supervivencia de la descendencia de madres infectadas. Adicionalmente, se analizó la mortalidad dependiente de género en la transmisión vertical de HSV-1 en neonatos a los días 1 ó 2 post-parto observándose que los machos tienen un mayor porcentaje de mortalidad (45%) en neonatos que las hembras (15%) tal como se muestra en la Figura 2.

Por otra parte, el día anterior al nacimiento se extrajeron los embriones y sus órganos se diseccionaron y congelaron. Posteriormente, se extrajo y cuantificó el DNA de HSV-1 en los distintos órganos analizados (encéfalo, médula espinal, placenta) mediante PCR cuantitativa a tiempo real (expresado como ufp equivalentes) y se normalizaron con respecto al gen de la actina de ratón (expresado como ng). El DNA se extrajo utilizando métodos convencionales (NucleoSpin®, Cat. K3053-2, ClonTech, USA). La contaminación cruzada de muestras y los falsos positivos de PCR fueron cuidadosamente prevenidos por frecuente cambio de guantes, uso exclusivo de pipetas y separación estricta de los tres principales pasos de la PCR. La PCR cuantitativa fue realizada usando el termociclador LightCycler (Roche Diagnostics Ltd, Lewes, UK), cuya mezcla de reacción contenía $1 \mu\text{M}$ de iniciadores y 2 mM de MgCl_2 . Los iniciadores de β -actina (SEQ. ID. NO: 1 y SEQ. ID. NO: 2) fueron usados como control positivo de la reacción de PCR (para obtener un amplicón o producto de amplificación de 379 pares de bases [pb]). Además, se utilizaron iniciadores específicos para amplificar un fragmento de 120 pb de la secuencia del gen de la DNA polimerasa (pol) viral [SEQ. ID. NO: 3 y SEQ. ID. NO: 4] así como iniciadores específicos para amplificar un fragmento de 110 pb de de bases de la secuencia del gen de la timidina kinasa (TK) viral [SEQ. ID. NO: 5 y SEQ. ID. NO: 6]. Las condiciones de la PCR fueron de un ciclo de 95°C durante 1 minuto, seguido de 45 ciclos a 95°C durante 30 segundos; 55°C (para β -actina y TK) ó 60°C (para pol) durante 30 segundos; y 72°C durante 40 segundos. El intervalo de concentración de virus usado para optimizar la curva estándar de la PCR cuantitativa a tiempo real fue expresado como ufp. Para calibrar el gen de la β -actina se utilizaron nanogramos (ng) como unidad de este gen endógeno. La identidad de los productos amplificados se comprobó por análisis de las curvas de desnaturalización, electroforesis en gel y análisis de restricción. Los fragmentos de los genes analizados fueron sometidos a un análisis de restricción con la endonucleasa Ava1 para la polimerasa (pol) viral (produciendo 2 fragmentos de 23 y 97 pb) y para la TK viral (produciendo 2 fragmentos de 35 y 75 pb) y con la enzima Nla1V para la β -actina (produciendo 2 fragmentos de 220 y 159 pb). Los resultados de la detección del DNA viral en embriones se representan en la Figura 3 mientras que las cargas virales en los neonatos se muestran en la Figura 4.

Los resultados de la carga viral en los adultos descendientes de madres infectadas separados por sexos se muestran la Figura 5. Los resultados corresponden a 5 machos y a 8 hembras. Como se puede observar en dicha Figura 5, en los adultos de 14 semanas hijos de madres infectadas se observó, de nuevo, que los órganos diana para la infección del HSV-1 por transmisión vertical son el SNC y la sangre, corroborando resultados previos. Además, tanto en machos como en hembras, los ganglios trigéminos presentaron altos niveles de virus. Una de las mayores diferencias entre sexos fue la colonización de las gónadas, siendo el HSV-1 indetectable en testículos.

El modelo murino descrito previamente fue utilizado para evaluar la eficacia de la transmisión vertical hematogena del HSV-1 de la madre a la descendencia. La viremia en hembras pre-parto, neonatos (1 o 2 días después del nacimiento) y en las madres post-parto así como la suma de estas dos últimas categorías se representa en la Figura 6. El gráfico indica que la transmisión es dependiente de la viremia y es útil para analizar vacunas y antivirales mediante una vía de administración hematogena.

Ejemplo 2

Efecto de un agente antiviral sobre la transmisión vertical madre-hijo de herpesvirus humanos

El Ejemplo 1 pone de manifiesto la existencia de la transmisión vertical madre-hijo del HSV-1. Esos resultados indican que el HSV-1 se encuentra tanto en la sangre como en el cerebro de los descendientes a día 1 post-parto, así como en el SNC de los embriones a día 1 antes del parto. Este grupo de resultados implica que la interrupción de la transmisión vertical del HSV-1 podría presentar unas potenciales propiedades terapéuticas (vacunales, antivirales o neuroprotectoras) sobre los descendientes, fruto de la eliminación del HSV-1 en el SNC de la progenie. Basándose en dicha hipótesis, los inventores decidieron evaluar el papel antiviral del producto antiherpético clásico de elección, el aciclovir, el cual se ha demostrado que no es teratogénico ni embriotóxico en conejos, ratas o ratones. Para ello, y tras establecer una infección latente en hembras adultas, se procedió al tratamiento con aciclovir, cruce y análisis de las madres y de la progenie.

Material y métodos

Todos los animales incluidos en el proceso experimental fueron hembras de la especie de ratón de 14 semanas de edad del linaje C57B1/6. Se usaron entre dos y tres ratones adultos por grupo de análisis, y entre 13 y 25 neonatos, dependiendo de la disponibilidad de animales. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las líneas maestras de las Guías de Animales (Procedimientos Científicos, Acta 1986), siendo supervisados por el personal del Animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Todos los animales pasaron un periodo de cuarentena y fueron tratados con precauciones estrictas contra la contaminación durante la inoculación y la disección. Los animales fueron infectados intraperitonealmente con una dosis de 10^6 ufp de virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) de la cepa KOS (cedida por el Dr. L. Carrasco, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid). Tras 37 días postinfección, momento en el que ya está establecida la infección latente, se separaron los ratones en tres cubetas diferentes correspondientes a los grupos control (sin tratamiento), aciclovir oral y aciclovir subcutáneo (cuya administración es más lenta) y se comenzó el tratamiento con aciclovir desde cinco días antes del cruce hasta el parto, cruzando a los animales a día 42 post-infección. Al primer grupo de ratones no se les dio tratamiento alguno. Al grupo de aciclovir oral se les administró 100 μ l de una dilución de 2,5 mg/ml de la droga durante tres veces al día con intervalos de, al menos, 8 horas de diferencia (ya que la vida media plasmática del aciclovir después de la administración es de 2,9 h). A otro grupo de animales se les inyectó 100 μ l aciclovir subcutáneo a una dilución de 2,5 mg/ml tres veces al día (cada 8 horas) coincidiendo con el grupo anterior. De esta manera, la concentración de antiviral administrada por dosis y ratón fue de 0,25 mg (10 mg/kg por ratón, lejos del límite de toxicidad que se ha cifrado por encima de 80 mg/kg), con una dosis diaria total de 0,75 mg/día. El proceso de administración del aciclovir finalizó el día del parto, momento en el que se realizó la eutanasia de las madres y de las respectivas progenies para su posterior análisis.

Los órganos diseccionados en los animales adultos fueron los siguientes; sangre, ovarios, glándula adrenal, médula espinal, cerebro, cerebelo y ganglios trigéminos. El cerebro total fue separado en tres regiones groseras: mesencéfalo, ventrículos y corteza cerebral. En los neonatos, los órganos diseccionados fueron sangre, médula espinal y encéfalo. El DNA fue extraído usando métodos convencionales (NucleoSpin®, Cat. K3053-2, ClonTech, USA). La carga viral de los distintos órganos fue analizada mediante PCR cuantitativa. La contaminación cruzada de muestras y los falsos positivos de PCR fueron cuidadosamente prevenidos por frecuente cambio de guantes, uso exclusivo de pipetas y separación estricta de los tres principales pasos de la PCR. La PCR cuantitativa fue realizada usando el termociclador LightCycler (Roche Diagnostics Ltd, Lewes, UK), cuya mezcla de reacción contenía 1 μ M de iniciadores y 2 mM de MgCl₂. Los iniciadores de β -actina (SEQ. ID. NO:1 y SEQ. ID. NO: 2) fueron usados como control positivo de la reacción de PCR (obteniendo un producto de 379 pb). Además se utilizaron primeros específicos de la secuencia del gen de la polimerasa viral (pol) para la detección del virus (SEQ. ID. NO: 3 y SEQ. ID. NO: 4) (amplicón de 120 pb). Las condiciones de PCR fueron de un ciclo de 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 55°C (para la β -actina) ó 60°C (para la polimerasa viral) durante 30 segundos, y un último ciclo de 72°C durante 40 segundos. El rango de concentración de virus usado para optimizar la curva estándar de la PCR cuantitativa fue expresado como unidades formadoras de placa (ufp). Para la calibración del gen de la β -actina se utilizó nanogramos como unidad de este gen endógeno. La identidad de los productos amplificados se comprobó por análisis de las curvas de desnaturalización, por electroforesis en gel y análisis de restricción.

Resultados y discusión

Tras el parto y el sacrificio se procedió al análisis de los índices de supervivencia de la progenie, así como de las cargas virales de las madres y de los neonatos. Los animales adultos permanecieron asintomáticos durante todo el proceso experimental, sin sufrir mortalidad alguna. Por el contrario, las descendencias de los diferentes grupos de animales presentaron mortalidades variables. Así, los neonatos procedentes del grupo control presentaron una mortalidad del 7,1% (1 *exitus* de 14 animales), mientras que el grupo correspondiente a la administración de aciclovir subcutáneo presentó un índice de mortalidad del 4,0% (1 de 25); por último, no se observó mortalidad alguna en el grupo correspondiente a la administración oral del fármaco (ninguno de 17 animales). El número de hembras y machos no fue significativamente diferente entre los tres grupos de descendientes (ratio de 1:1,66).

En relación con los niveles de virus en los distintos órganos, y como se puede observar en la Figura 7, la administración de aciclovir a una dosis diaria de 0,75 mg por las dos vías de administración evaluadas produjo una significativa

disminución de las cargas virales, tanto en las madres como en la progenie. La eficiencia de la utilización de la administración de aciclovir por vía subcutánea fue siempre inferior a la vía oral, tanto en las madres (Figura 7A) como en los hijos (Figura 7B). No obstante, la eliminación del virus en los animales con aciclovir subcutáneo fue significativa, observándose niveles considerablemente menores de virus en todos los órganos analizados de la madre y, de forma específica, en el SNC de la progenie. La administración oral de aciclovir fue todavía más efectiva en la eliminación del virus en las madres, y por extensión, en los descendientes. Así, los niveles de virus en la sangre y en los ganglios trigéminos de las madres fueron prácticamente indetectables, mientras que en el cerebro de las tratadas oralmente, la disminución del nivel de virus fue de un 96%. En relación con los descendientes, la administración de aciclovir oral a las madres provocó una eliminación casi total de los niveles virales en todos los órganos analizados.

Conclusiones

Las conclusiones que se desprenden del ensayo realizado son fundamentalmente las siguientes: (i) se confirma el fenómeno de la transmisión vertical en un nuevo experimento, observando de nuevo que el virus se localiza fundamentalmente en la sangre y en el cerebro de los animales descendientes; (ii) se demuestra que el tratamiento de las madres con aciclovir disminuye los niveles de mortalidad observados en la descendencia de los animales sin tratar; (iii) se observa que los niveles de cargas virales en los diferentes órganos analizados, tanto en las madres como en los hijos, disminuyen al ser tratadas las madres con aciclovir; y (iv), por último, se observa que la administración de aciclovir oral es considerablemente más eficiente que la administración subcutánea de este fármaco antiviral.

Las perspectivas que se desprenden de este ensayo indican que, no sólo el aciclovir sino también otros agentes antivirales, vacunas o neuroprotectores, podrían prevenir la transmisión vertical del HSV-1 y sus consiguientes efectos en el SNC.

Ejemplo 3

Efecto de la forma de administración de un agente antiviral sobre la transmisión vertical madre-hijo de herpesvirus humanos

Como los resultados observados en los Ejemplos 1 y 2 indican que la administración oral del aciclovir es más eficiente que la inyección subcutánea, se ha realizado un experimento de administración de aciclovir en la bebida. Para este experimento se han utilizado 14 ratones (5 controles y 9 tratados con aciclovir) en los que se utilizó aciclovir *ad libitum* en la bebida a 2 dosis determinadas (4 animales con 250 mg/ml y 5 con 500 mg/ml). En los experimentos anteriores, tanto oral como subcutáneo, se administraron 0,25 mg de aciclovir por toma (100 µl de una dilución de 2,5 mg/ml), 3 veces al día. Suponiendo que un ratón bebe aproximadamente unos 3 ml diarios, se utilizaron 2 diluciones de trabajo (250 mg/ml para que la dosis diaria final fuera de 0,75 mg, y 500 mg/ml para que la dosis diaria final fuera de 1,50 mg). La administración del aciclovir comenzó el día que aparece el tapón vaginal, momento en el que se cambia de cubeta al ratón a una nueva con aciclovir. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la supervivencia de los animales tratados con aciclovir que ingieren aciclovir (dosis superior) con el agua de bebida es más elevada.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un compuesto potencialmente terapéutico que comprende las etapas de:

- a) infectar una hembra de un animal no-humano con un herpesvirus humano;
- b) administrar a dicha hembra de animal no-humano el compuesto potencialmente terapéutico a ensayar;
- c) cruzar dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano con un macho de un animal no-humano perteneciente a la misma especie que dicha hembra, y
- d) analizar la presencia de herpesvirus humanos en la progenie de dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano y/o determinar el efecto de dicho compuesto potencialmente terapéutico sobre dicha progenie o sobre dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano,

en el que las etapas a) y b) se realizan en cualquier orden.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa a) se realiza antes que la etapa b).

3. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa b) se realiza antes que la etapa a).

4. Un método para identificar un compuesto potencialmente terapéutico que comprende las etapas de:

- i) infectar una hembra de un animal no-humano con un herpesvirus humano;
- ii) cruzar dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano con un macho de un animal no-humano perteneciente a la misma especie que dicha hembra;
- iii) analizar la presencia de herpesvirus humanos en la progenie de dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano y seleccionar aquellos descendientes portadores de herpesvirus humanos;
- iv) administrar a dichos descendientes portadores de herpesvirus humanos el compuesto potencialmente terapéutico a ensayar; y
- v) determinar el efecto de dicho compuesto potencialmente terapéutico ensayado sobre dichos descendientes portadores de herpesvirus humanos.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho animal no-humano es un mamífero no-humano.

6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho mamífero no-humano se selecciona entre un roedor, un primate y un suido.

7. Método según la reivindicación 6, en el que dicho roedor se selecciona entre un ratón, una rata y una cobaya.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho herpesvirus humano se selecciona entre virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), virus herpes simplex tipo 2 (HSV-2), virus de la varicella zoster (VZV), citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano 6 (HHV-6), herpesvirus humano 7 (HHV-7), virus de Epstein-Barr (EBV) y herpesvirus de Kaposi (HHV-8), y sus mezclas.

9. Método según la reivindicación 1, en el que la determinación del efecto del compuesto ensayado sobre dicha progenie o sobre dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano comprende la realización de, al menos, un análisis o estudio seleccionado entre (1) análisis de viabilidad, (2) análisis de comportamiento, (3) estudios de imagen, (4) análisis citogenéticos y (5) estudios neuropatológicos.

10. Método según la reivindicación 4, en el que la determinación del efecto del compuesto ensayado sobre dichos descendientes portadores de herpesvirus humanos comprende la realización de, al menos, un análisis o estudio seleccionado entre (1) análisis de viabilidad, (2) análisis de comportamiento, (3) estudios de imagen, (4) análisis citogenéticos y (5) estudios neuropatológicos.

11. Un método para obtener un animal no-humano portador de herpesvirus humanos que comprende las etapas de:

- a) infectar una hembra de un animal no-humano con un herpesvirus humano;
- b) cruzar dicha hembra de animal no-humano infectada con un herpesvirus humano con un macho de un animal no-humano perteneciente a la misma especie que dicha hembra, y

ES 2 304 070 B1

c) seleccionar los descendientes portadores de herpesvirus humanos.

12. Un animal no-humano portador de herpesvirus humanos obtenido según el método de la reivindicación 11.

5 13. Un animal no-humano portador de herpesvirus humanos **caracterizado** porque es un descendiente de una hembra de un animal no-humano infectada con un herpesvirus humano.

14. Animal no-humano según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, en el que dichos herpesvirus humanos están localizados mayoritariamente en el cerebro, en la médula espinal y/o en la sangre.

10 15. Un método para producir un animal no-humano portador de herpesvirus humanos que comprende las etapas de:

15 a) cruzar un primer animal no-humano portador de herpesvirus humanos según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 con un segundo animal no-humano perteneciente a la misma especie que dicho primer animal pero de sexo diferente, y

b) seleccionar los descendientes portadores de herpesvirus humanos.

20 16. Método según la reivindicación 15, en el que dicho segundo animal se selecciona entre un animal MOCK y un animal no-humano portador de herpesvirus humanos.

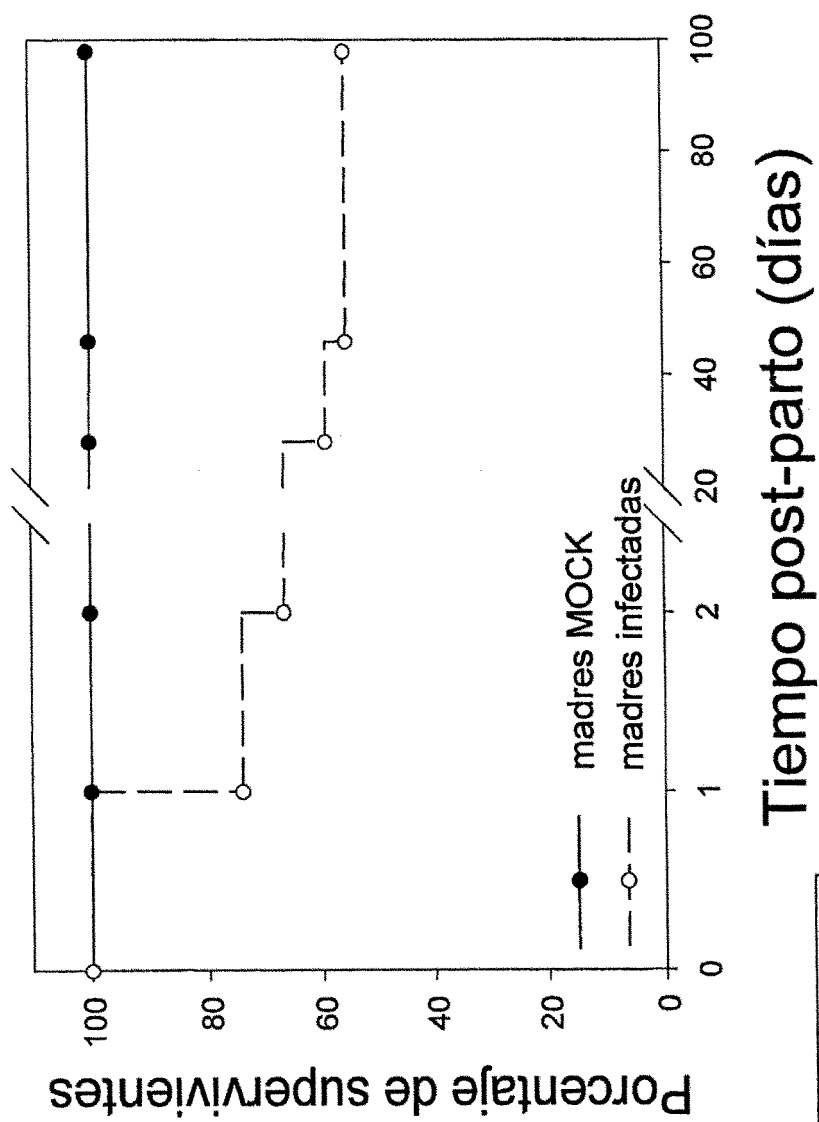


FIGURA 1

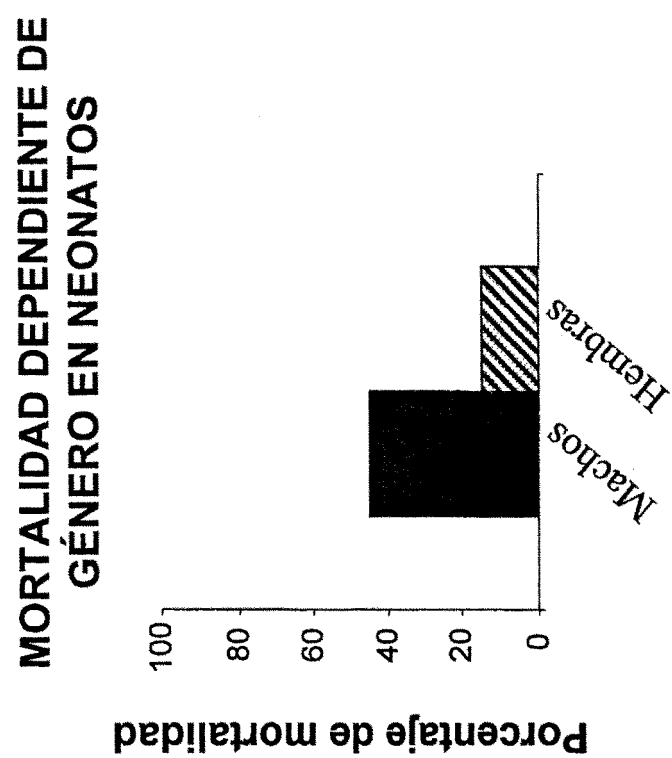


FIGURA 2

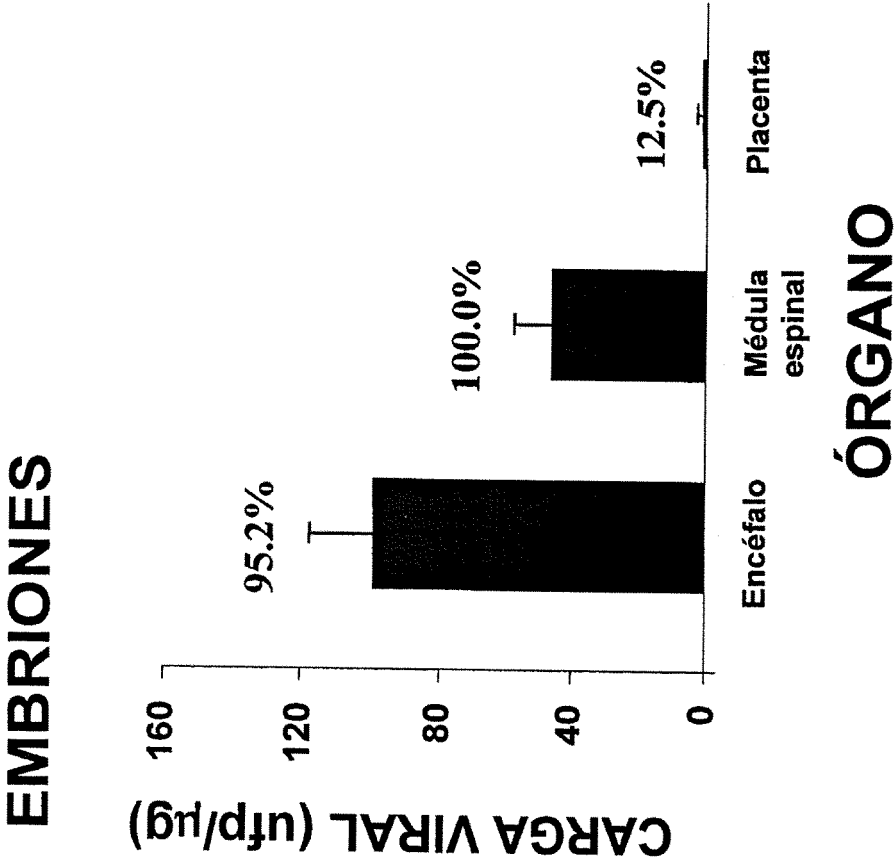


FIGURA 3

NEONATOS

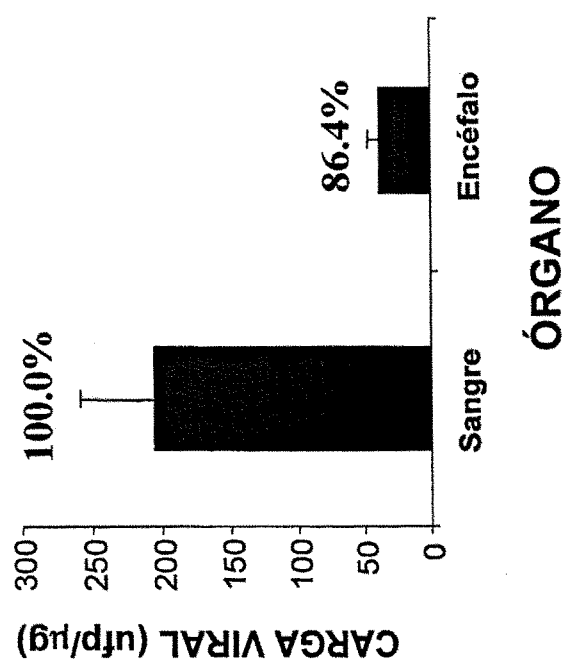


FIGURA 4

CARGA VIRAL EN ADULTOS DESCENDIENTES DE MADRES INFECTADAS

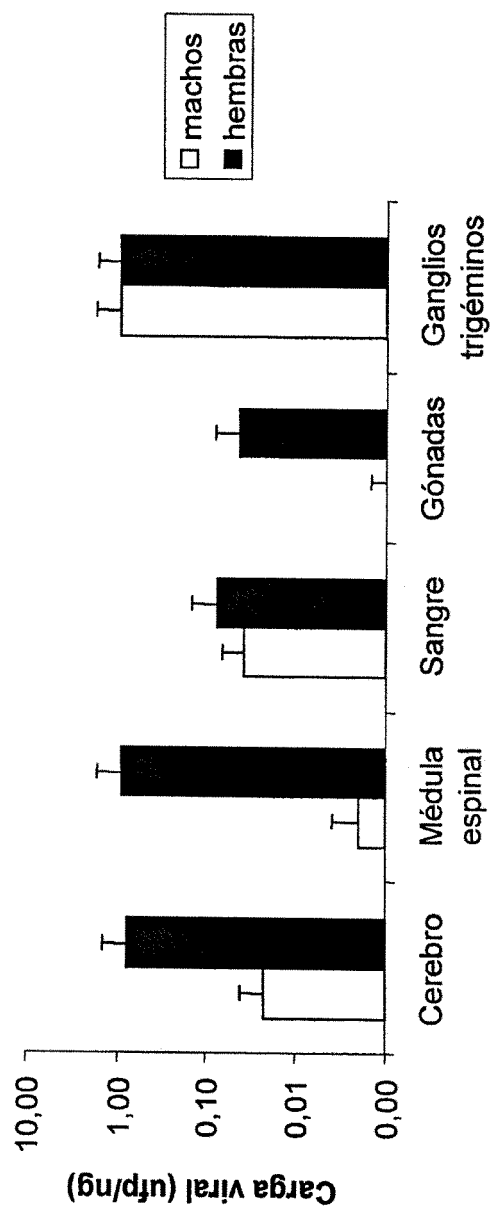
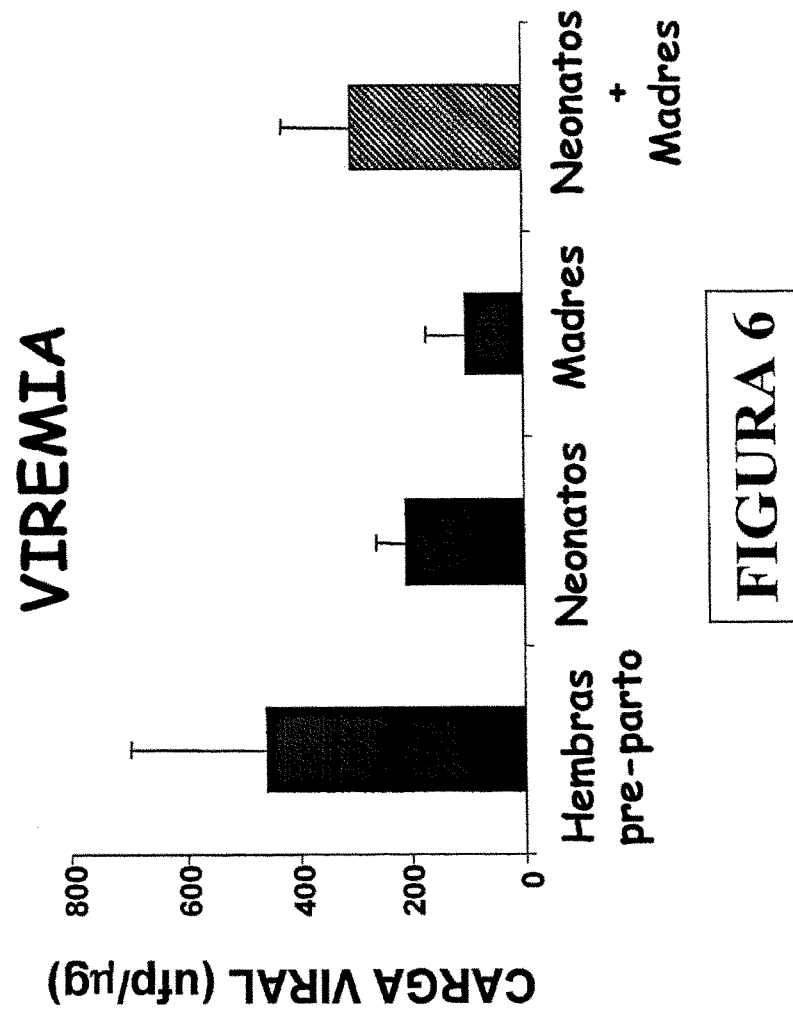
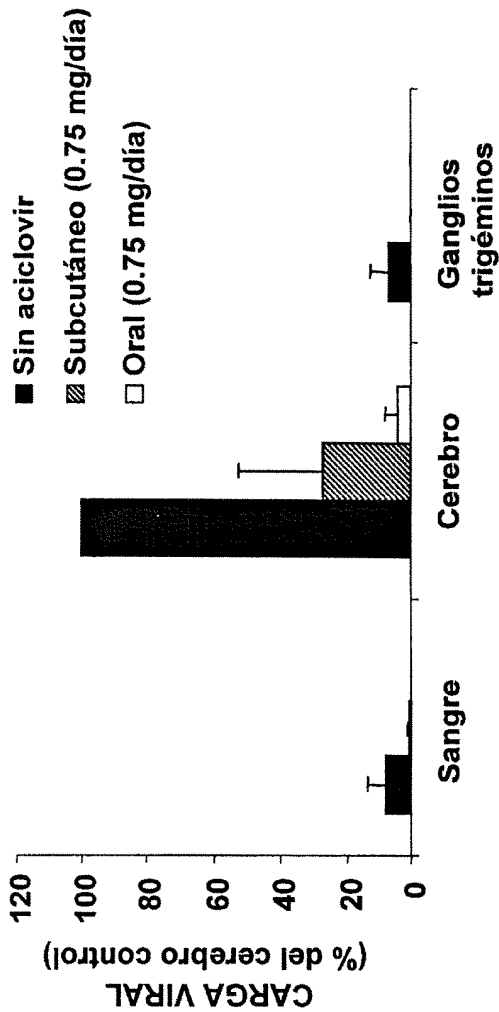


FIGURA 5



EFFECTO DEL ACICLOVIR EN LAS MADRES



EFFECTO DEL ACICLOVIR EN LOS HIJOS

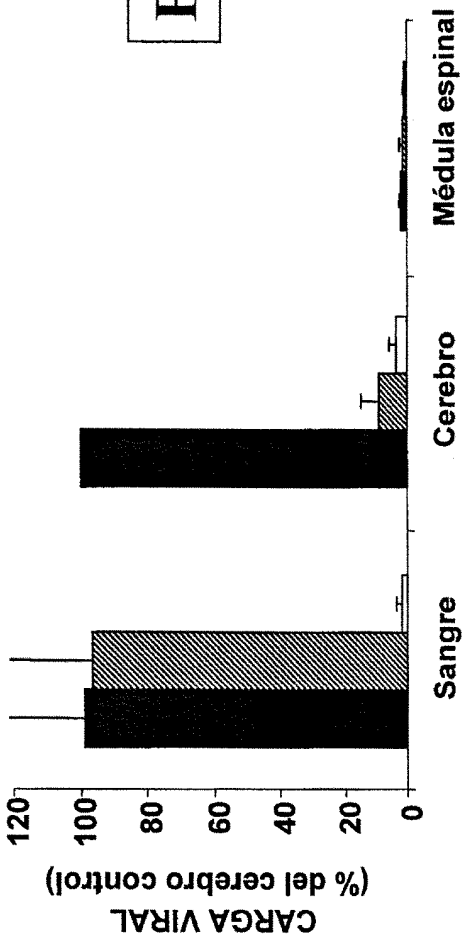


FIGURA 7

ES 2 304 070 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

5 <120> MÉTODO PARA IDENTIFICAR COMPUESTOS TERAPÉUTICAMENTE ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE INFECCIONES Y ENFERMEDADES CAUSADAS POR HERPESVIRUS HUMANOS

10 <160> 6

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1

<211> 30

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

25 <223> Iniciador diseñado para amplificar, en combinación con SEQ ID NO: 2, un fragmento de 379 pb del gen de la β -actina (control positivo de la PCR)

<400> 1

30 aaccctaagg ccaaccgtga aaagatgacc 30

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

40 <223> Iniciador diseñado para amplificar, en combinación con SEQ ID NO: 1, un fragmento de 379 pb del gen de la β -actina (control positivo de la PCR)

<400> 2

45 ccaggaggga agaggatgcg gc 22

<210> 3

<211> 20

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

55 <223> Iniciador diseñado para amplificar, en combinación con SE4 ID NO: 4, un fragmento de 120 pb del gen de la DNA polimerasa (pol) de HSV-1

<400> 3

60 ggtgaacgtc ttttcgact 20

<210> 4

65 <211> 20

<212> ADN

ES 2 304 070 B1

	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
5	<223> Iniciador diseñado para amplificar, en combinación con SEQ ID NO: 3, un fragmento de 120 pb del gen de la DNA polimerasa (pol) de HSV-1	
	<400> 4	
10	gtgttggtgcc gcggtctcac	20
	<210> 5	
	<211> 19	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
20	<223> Iniciador diseñado para amplificar, en combinación con SEQ ID NO: 6, un fragmento de 110 pb del gen de la timidina kinasa (TK) de HSV-1	
	<400> 5	
25	ataccgacga tctgcacct	19
	<210> 6	
30	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220> ADN sintético	
	<223> Iniciador diseñado para amplificar, en combinación con SEQ ID NO: 5, un fragmento de 110 pb del gen de la timidina kinasa (TK) de HSV-1	
40	<400> 6	
	ttattgccgt gcgg	14
45		
50		
55		
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 304 070

⑫ Nº de solicitud: 200400965

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 21.04.2004

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **G01N 33/50** (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KURATA T. et al. "Vertical transmisssion of type 2 Herpes Simplex Virus infection in immuno suppressed hamsters". Japanese Journal of Experimental Medicine. 1978. Vol. 48, nº 5, páginas 437-443.	1-14
X	BRAVO FJ. et al. " An animal model of neonatal cytomegalovirus infection". Antiviral research. Sep 2003. Vol 60, nº1: páginas 41-49.	1-14
X	BOURNE N. et al. "Preconception Immunization with a Cytomegalovirus (CMV) Glycoprotein Vaccine improves pregnancy outcome in a guinea pig model of congenitla infection". Journal of infectious diseases. 2001. Vol 183, páginas 59-64.	1-14
X	JENNINGS R. et al. "Evaluation of a novel, anti-herpes simplex virus compound, acyclovir elaidate (P-4010), in the female guinea pig model of genital herpes". Antimicrobial agents and chemotherapy. Enero 1999. Vol 43, nº 1, páginas 53-61.	1-14
X	TANG J. et al. "building a mouse model hallmarking the congenital human cytomegalovirus infection in central nervous system". 2002. Arch. Virol. Vol. 147, páginas 1189-1195.	1-14
A	SCHLESS MR. et al. "Quantitative-competitive PCR monitoring of viral load following experimental guinea pig cytomegalovirus infection". Journal of Virological Methods. Marzo 2003. Vol 108, nº 1, páginas 103-110.	1-14
A	MEYOHAS MARIE-CAROLINE et al. "Study of mother-to-child Epstein-Barr virus transmission by means of nested PCRs ". Journal of Virology. 1996. Vol 70, nº 10, páginas 6816-6819.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
07.08.2008

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/1