

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 877 182**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2016 E 18169550 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.03.2021 EP 3378873**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales anti-claudina 1 para la prevención y el tratamiento del carcinoma hepatocelular**

30 Prioridad:

**19.03.2015 EP 15159872**

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

**16.11.2021**

73 Titular/es:

**INSTITUT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE STRASBOURG (33.3%)**

**1 place de l'Hôpital**

**67091 Strasbourg, FR;**

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%) y**

**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BAUMERT, THOMAS;**

**ROBINET, ERIC y**

**ZEISEL, MIRJAM**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 877 182 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

Anticuerpos monoclonales anti-claudina 1 para la prevención y el tratamiento del carcinoma hepatocelular

5 **Sector de la técnica**

La divulgación técnica detallada que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá de la divulgación de la invención *per se* y puede también proporcionar unos antecedentes técnicos para desarrollos técnicos relacionados. Se apreciará que los antecedentes técnicos adicionales proporcionados no pretenden definir la invención como tal (la cual se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas), sino más bien situarla en un contexto técnico más amplio. En consecuencia, se apreciará que las expresiones "realizaciones", "aspectos", "materia objeto" reflejan detalles específicos de la divulgación, pero en la medida en que se refieren a una parte de los antecedentes técnicos adicionales, no pretenden definir como parte de la materia objeto de la invención que no entra dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15 **Estado de la técnica**

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la segunda causa principal de muerte por cáncer y de más rápido crecimiento en todo el mundo (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer; GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 - página web: [globocan.iarc.fr](http://globocan.iarc.fr)). El CHC representa más de 500.000 nuevos casos al año y un número prácticamente idéntico de muertes debido al mal pronóstico de la enfermedad. La infección crónica por virus de la hepatitis C (VHC) es el factor de riesgo más importante para desarrollar cirrosis hepática y CHC (El-Serag, *N Engl J Med.*, 2011, 365(12): 1118-1127). Se estima que aproximadamente el 3 % de la población mundial está infectada crónicamente por el VHC (Organización Mundial de la Salud). Otros factores de riesgo importantes para el CHC incluyen infección por virus de la hepatitis B (VHB), enfermedad hepática alcohólica y enfermedad del hígado graso no alcohólico. Las causas menos comunes incluyen hemocromatosis hereditaria, deficiencia en alfa 1-antitripsina, hepatitis autoinmune, algunas porfirias, enfermedad de Wilson, exposición a aflatoxinas. La distribución de estos factores de riesgo entre los pacientes con CHC es muy variable, dependiendo de la región geográfica y de la raza o grupo étnico. La mayoría de estos factores de riesgo conducen a la formación y progresión de la cirrosis, que está presente en el 80 a 90 % de los pacientes con CHC. El riesgo acumulado a 5 años para el desarrollo de CHC en pacientes con cirrosis oscila entre el 5 % y el 30 %, dependiendo de la causa, la región o el grupo étnico y el estadio de la cirrosis. En 2011, la enfermedad hepática en estadio terminal y el CHC dieron como resultado 6.342 trasplantes de hígado asociados a unos costes de más de mil millones de dólares estadounidenses por este procedimiento solamente (véase la página web de los NIH: [optn.transplant.hrsa.gov/latest-Data/step2.asp](http://optn.transplant.hrsa.gov/latest-Data/step2.asp)).

Aunque el CHC puede evitarse abordando la causa subyacente en el estadio inicial de la enfermedad, se carece de estrategias para prevenir el CHC en pacientes con cirrosis establecida y fibrosis avanzada, en los que el riesgo de CHC persiste a pesar del tratamiento de la causa subyacente. De hecho, incluso la curación de la infección por VHC no elimina el riesgo de desarrollo de CHC cuando ya está presente la fibrosis avanzada (van der Meer *et al.*, *JAMA*, 2012, 308(24): 2584-2593). Actualmente, las opciones de tratamiento curativo para los pacientes con CHC cirrótico se limitan principalmente al trasplante de hígado, una solución poco práctica, invasiva y que requiere una gran cantidad de recursos. Dada la recidiva tumoral extremadamente frecuente tras el tratamiento quirúrgico y la ausencia de estrategias eficaces de tratamiento médico, la prevención del desarrollo del CHC en pacientes con fibrosis hepática avanzada se considera la estrategia más eficaz para repercutir sustancialmente en la supervivencia de los pacientes (Hoshida *et al.*, *J Hepatol.*, 2014, 61(1S): S79-S90; Hoshida *et al.*, *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12(9):1129-1159).

A tenor de la creciente carga económica de los pacientes con cirrosis y CHC asociado, se necesitan por lo tanto urgentemente estrategias novedosas para prevenir y tratar el CHC en pacientes con enfermedad hepática avanzada.

**Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a sistemas y estrategias para la prevención y/o tratamiento del carcinoma hepatocelular (CHC) independientemente de la etiología. En particular, la presente invención se dirige al uso de anticuerpos anti-claudina-1 para prevenir y/o tratar el carcinoma hepatocelular, incluyendo el carcinoma hepatocelular que no está asociado a la infección por VHC y al carcinoma hepatocelular que se ha desarrollado, o que es susceptible de desarrollarse, después de que se haya curado la infección por VHC. Analizando la señalización celular inducida por el virus y una firma de 186 genes en hígado que predice el riesgo de CHC en pacientes cirróticos de diversas etiologías, los presentes Solicitantes han mostrado que un anticuerpo monoclonal anti-claudina 1, que habían desarrollado previamente y mostrado que curaba la infección crónica por VHC sin efectos adversos detectables (documentos EP 08 305 597 y WO 2010/034812), interfiere con la señalización celular hepática y revierte una firma de riesgo de CHC derivada del paciente en un sistema modelo basado en células hepáticas. Se descubrió que la modulación de la señalización y la reprogramación transcripcional eran independientes de la actividad antiviral del anticuerpo, lo que indica que el anticuerpo monoclonal anti-claudina 1 actúa directamente sobre las vías oncogénicas. De hecho, realizando estudios mecanísticos, los Solicitantes han

demostrado que el anticuerpo afecta a la vía de señalización EGFR-MAPK y a la expresión de genes de respuesta inflamatoria, que se han sugerido como impulsores de la hepatocarcinogénesis. En comparación con los agentes antivirales y otros compuestos candidatos para la quimioprotección del CHC, el anticuerpo monoclonal anti-claudina 1 fue el más potente para revertir la firma de alto riesgo de CHC.

5 Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-claudina 1, o un fragmento biológicamente activo del mismo, para su uso en la prevención o tratamiento de un carcinoma hepatocelular no asociado al VHC en un sujeto, es decir, en un sujeto que nunca ha estado infectado por el VHC o en un sujeto que se ha curado de la infección por el VHC.

10 En ciertas realizaciones, el carcinoma hepatocelular no asociado al VHC está asociado a la infección por el virus de la hepatitis B (VHB), alcoholismo, enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), hemocromatosis hereditaria, deficiencia de alfa 1 antitripsina, porfiria cutánea tardía, enfermedad de Wilson, tirosinemia, enfermedades de almacenamiento de glucógeno, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria o exposición a aflatoxinas. En otras realizaciones, el carcinoma hepatocelular no asociado al VHC es un carcinoma hepatocelular de origen desconocido.

15 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-claudina 1 es un anticuerpo policlonal. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-claudina 1 es un anticuerpo monoclonal.

20 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-claudina 1 es un anticuerpo monoclonal secretado por una línea celular de hibridoma codepositada por el INSERM y GENOVAC en el DSMZ el 29 de julio de 2008 con un número de acceso seleccionado del grupo que consiste en DSM ACC2931, DSM ACC2932, DSM ACC2933, DSM ACC2934, DSM ACC2935, DSM ACC2936, DSM ACC2937 y DSM ACC2938. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-claudina 1 comprende las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de un anticuerpo monoclonal secretado por una línea celular de hibridoma codepositada por el INSERM y GENOVAC en el DSMZ el 29 de julio de 2008 con un número de acceso seleccionado del grupo que consiste en DSM ACC2931, DSM ACC2932, DSM ACC2933, DSM ACC2934, DSM ACC2935, DSM ACC2936, DSM ACC2937 y DSM ACC2938.

25 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-claudina 1 está humanizado, desimmunizado o es quimérico.

30 Un fragmento biológicamente activo de un anticuerpo anti-claudina 1 es un fragmento que conserva la propiedad biológica del anticuerpo para interferir con la señalización celular hepáticas y revertir una firma de riesgo de HCC derivada del paciente.

35 De forma más general, la presente invención abarca el uso de cualquier molécula que comprenda un anticuerpo anti-claudina-1, o un fragmento biológicamente activo del mismo, incluyendo anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos desimmunizados y moléculas derivadas de anticuerpos que comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo monoclonal anti-claudina-1 secretado por una línea celular de hibridoma, incluyendo moléculas tales como fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fd, anticuerpos Sc (anticuerpos monocatenarios), diacuerpos, cadenas individuales ligeras de anticuerpos individuales, cadenas pesadas de anticuerpos individuales, fusiones quiméricas entre cadenas de anticuerpos y otras moléculas, y conjugados de anticuerpos, tales como anticuerpos conjugados con un agente de diagnóstico (resto detectable) o con un agente terapéutico, siempre que estas moléculas relacionadas con los anticuerpos conserven la propiedad biológica para interferir con la señalización celular hepática y/o revertir una firma de riesgo de CHC derivada del paciente y/o prevenir o tratar el carcinoma hepatocelular no asociado al VHC.

40 En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un método para prevenir el carcinoma hepatocelular en un sujeto que padece una enfermedad hepática no asociada al VHC, comprendiendo dicho método una etapa de administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-claudina 1 o un fragmento biológicamente activo del mismo. Como se ha indicado anteriormente, el sujeto que padece enfermedad hepática nunca ha estado infectado por el VHC o se ha curado de la infección por el VHC.

55 En ciertas realizaciones, la causa subyacente de la enfermedad hepática no asociada al VHC se selecciona del grupo que consiste en la infección por virus de la hepatitis B (VHB), alcoholismo, enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), hemocromatosis hereditaria, deficiencia de alfa 1 antitripsina, porfiria cutánea tardía, enfermedad de Wilson, tirosinemia, enfermedades de almacenamiento de glucógeno, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria y exposición a aflatoxinas. En otras realizaciones, la enfermedad hepática no asociada al VHC es de origen desconocido.

60 En otro aspecto relacionado, la presente invención proporciona un método de tratamiento del carcinoma hepatocelular no asociado al VHC en un sujeto, comprendiendo dicho método una etapa de administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-claudina 1 o un fragmento biológicamente activo del mismo. Como se ha indicado anteriormente, el sujeto que padece carcinoma hepatocelular nunca ha estado infectado por el VHC o se ha curado de la infección por el VHC.

65

En ciertas realizaciones, el carcinoma hepatocelular no asociado al VHC está asociado a la infección por el virus de la hepatitis B (VHB), alcoholismo, enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), hemocromatosis hereditaria, deficiencia de alfa 1 antitripsina, porfiria cutánea tardía, enfermedad de Wilson, tirosinemia, enfermedades de almacenamiento de glucógeno, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria o exposición a aflatoxinas. En otras realizaciones, el carcinoma hepatocelular no asociado al VHC es un carcinoma hepatocelular de origen desconocido.

Los anticuerpos anti-claudina 1 y fragmentos biológicamente activos de los mismos que pueden usarse en la práctica del método de prevención de la presente invención y en el método de tratamiento de la presente invención son como se ha descrito anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-claudina 1, o un fragmento biológicamente activo del mismo, y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en la prevención o tratamiento de un carcinoma hepatocelular no asociado al VHC en un sujeto, es decir, un sujeto que nunca ha estado infectado por el VHC o en un sujeto que se ha curado de la infección por el VHC.

En ciertas realizaciones, el carcinoma hepatocelular no asociado al VHC está asociado a la infección por el virus de la hepatitis B, alcoholismo, enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), hemocromatosis hereditaria, deficiencia de alfa 1 antitripsina, porfiria cutánea tardía, enfermedad de Wilson, tirosinemia, enfermedades de almacenamiento de glucógeno, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria o exposición a aflatoxinas. En otras realizaciones, el carcinoma hepatocelular no asociado al VHC es un carcinoma hepatocelular de origen desconocido.

Los anticuerpos anti-claudina 1 y fragmentos biológicamente activos de los mismos que pueden estar presentes en una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención son como se ha descrito anteriormente.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende además un agente terapéuticos adicional. El agente terapéutico adicional puede seleccionarse del grupo que consiste en agentes antivirales, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, antibióticos, antioxidantes, agentes antisépticos, agentes anticancerosos y combinaciones de los mismos.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-claudina 1, o un fragmento biológicamente activo del mismo, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento del carcinoma hepatocelular no asociado al VHC en un sujeto.

Este y otros objetivos, ventajas y características de la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia que hayan leído la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferentes.

#### Descripción de las figuras

**Figura 1. La firma de 186 genes del CHC inducido por infección persistente del VHC se revierte tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1 en células Huh7.5.1<sup>diff</sup>.** A. Las células Huh7.5.1 se diferenciaron en células Huh7.5.1<sup>diff</sup> tipo hepatocitos, infectadas de forma persistente usando Jc1 de VHC y sometidas a un tratamiento con erlotinib o mAb específico de CLDN1 o sin tratamiento en el día 7 posterior a la infección, y luego sometidas a un análisis transcriptómico. B. Inmunodetección de la proteína E2 del VHC (día 7 de la infección). Dapi de tinción de los núcleos en azul. Barra de escala 50  $\mu$ m. C. GSEA muestra la reversión de los genes de alto y bajo riesgo de CHC tras el tratamiento con erlotinib y mAb específico de CLDN1. En comparación con erlotinib, mAb de CLDN1 mostró una mayor eficacia en la reversión del perfil de alto riesgo de CHC.

**Figura 2. El mAb específico de CLDN1 revierte los genes de alto riesgo de CHC de forma más potente que los antivirales de acción directa u otros compuestos candidatos a la quimioprevención del CHC, independientemente de la carga viral.** A. Las células Huh7.5.1<sup>diff</sup> fueron infectadas por Jc1 de VHC. En el día 7 posterior a la infección, las células se trataron con compuestos diferentes. El ARN celular total se aisló y sometió al análisis NanoString. El tratamiento de las células Huh7.5.1<sup>diff</sup> infectadas por Jc1 de VHC con AAD (1 nM DCV + 1  $\mu$ M SOF), interferón alfa-2a (10 UI/ml), erlotinib (0,1  $\mu$ M), y pioglitazona (1  $\mu$ M), revierte parcialmente los genes de alto riesgo de CHC como muestra el GSEA. El tratamiento de control con metformina (Met, 3  $\mu$ M) no tuvo ningún efecto. El tratamiento con mAb específico de CLDN1 (1, 10 y 100  $\mu$ g/ml) revierte de forma potente los genes de alto riesgo de CHC. Los mapas de calor muestran la importancia de la inducción o supresión de la firma génica de alto/bajo riesgo de CHC. B. La reversión de la firma génica por el mAb específico de CLDN1 es independiente de la carga viral. Se analizaron las expresiones del ARN del VHC relativas (normalizadas con respecto a *GAPDH*). Carga del VHC en un modelo basado en células, media  $\pm$  DT,  $n = 3$ . FC - Múltiplo de cambio, DCV - Daclatasvir, SOF - Sofosbuvir.

**Figura 3. El mAb específico de CLDN1 afecta a la señalización y expresión de EGFR/MAPK en las células hepáticas humanas.** A, B. Las células Huh7.5.1 fueron infectadas por Jc1 de VHC y cosechadas para los análisis proteómicos. La infección por Jc1-E2<sup>FLAG</sup> de VHC da como resultado un aumento de la fosforilación de

EGFR. **A.** La fosforilación del receptor tirosina quinasa (RTK) se evaluó en los lisados celulares usando el kit de matriz fosfo-RTK humano (R&D Systems). **B.** Cuantificación de las intensidades de membrana de transferencia puntual de las proteínas fosforiladas usando el software Image J. Media  $\pm$  EEM de las densidades de membrana de transferencia puntual integrada,  $n = 3$ . **C-E.** Expresión de ARNm de *EGFR* y *EGF* (en relación con el ARNm de *GAPDH*) en células Huh7.5.1<sup>dif</sup> no infectadas (Ctrl) e infectadas por Jc1 de VHC (**C**;  $n = 9$ ); células no infectadas (Ctrl) y células HepG2-NTCP infectadas por el VHB (**D**;  $n = 12$ ); células Huh7.5.1<sup>dif</sup> incubadas en ausencia (Ctrl) o presencia de etanol 40 mM (**E**;  $n = 6$ ). Se muestra el porcentaje promedio  $\pm$  EEM. \* Prueba U de Mann-Whitney (valor  $p < 0,01$ ). **F.** El mAb específico de CLDN1 afecta a la señalización de la célula huésped inducida por VHC. Detección de la fosforilación de quinasas en células Huh7.5.1 infectadas crónicamente por Jc1 de VHC tratadas con mAbs de control o específicos de CLDN1 (100  $\mu$ g/ml; 24 horas) usando matrices de fosfoquinasas humanas. La p-Erk1/2 resaltada por los cuadrados negros en **F** se cuantificó usando el software Image J (NIH). Los resultados se muestran como media  $\pm$  EEM de las densidades de membrana de transferencia puntual integrada de 2 experimentos independientes realizados por duplicado. **G.** Inversión de la expresión de la vía de señal de EGFR-MAPK mediante el tratamiento con mAb específico de CLDN1. Las células Huh7.5.1<sup>dif</sup> fueron infectadas por Jc1 de VHC. El ARN total se aisló y sometió al análisis NanoString. Los gráficos representan las puntuaciones de enriquecimiento de GSEA de la señalización del EGFR en un cáncer recuperada de la base de datos de firmas oncogénicas (EGFR\_UP.V1\_UP).

**Figura 4. Las vías de señalización de EGFR y MAPK se suprimen tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1 de las células Huh7.5.1<sup>dif</sup> infectadas por Jc1 de VHC.** En dos experimentos independientes, las células Huh7.5.1<sup>dif</sup> fueron infectadas por Jc1 de VHC y tratadas con mAbs como se ha descrito anteriormente. El ARN celular total se aisló y sometió al análisis NanoString. Los genes expresados se seleccionaron de manera diferencial. Los valores de expresión de la intensidad se normalizaron y transformaron en logaritmos; los genes expresados de manera diferencial tienen valores  $p$  TDF  $< 0,05$  y un múltiplo de cambio de  $\pm 1,9$ . Se usó Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, página web: qiagen.com/ingenuity) para la generación del análisis de redes. Los genes expresados de manera diferencial pertenecientes a las vías de señalización **A.** EGFR y **B.** MAPK se suprimen tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1. Los nodos rellenos con genes en negrita representan genes expresados de manera diferencial pertenecientes a la vía de señalización de EGFR o MAPK, un rectángulo redondeado significando que están regulados al alza y los círculos significando que están regulados a la baja tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1. Los cuadrados representan las dianas previstas; los genes en negrita y con contorno negro pertenecen a la vía de señalización de EGFR o MAPK. Las líneas continuas y discontinuas indican las interacciones directas e indirectas, respectivamente.

**Figura 5. El tratamiento con mAb específico de CLDN1 modula la vía de señalización inflamatoria NF- $\kappa$ B en las células Huh7.5.1<sup>dif</sup> infectadas por Jc1 de VHC.** En dos experimentos independientes, las células Huh7.5.1<sup>dif</sup> fueron infectadas por Jc1 de VHC y tratadas con mAbs como se ha descrito anteriormente. El ARN celular total se aisló y sometió al análisis NanoString. Los genes expresados se seleccionaron de manera diferencial. Las redes se generaron mediante el uso de Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, página web: qiagen.com/ingenuity). La vía de señalización de NF- $\kappa$ B se modula tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1. Los nodos rellenos con genes en negrita representan genes expresados de manera diferencial pertenecientes a la vía de señalización de NF- $\kappa$ B, un rectángulo redondeado significando que están regulados al alza y los círculos significando que están regulados a la baja tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1. Los cuadrados representan las dianas previstas; los genes en negrita y con contorno negro pertenecen a la vía de señalización de NF- $\kappa$ B. Las líneas continuas y discontinuas indican las interacciones directas e indirectas, respectivamente.

**Figura 6. El tratamiento de células Huh7.5.1<sup>dif</sup> infectadas por Jc1 de VHC con mAb específico de CLDN1 suprime los genes inducidos por enfermedad hepática.** En dos experimentos independientes, las células Huh7.5.1<sup>dif</sup> fueron infectadas por Jc1 de VHC y tratadas con mAbs como se ha descrito anteriormente. El ARN celular total se aisló y sometió al análisis NanoString. Los genes expresados se seleccionaron de manera diferencial. Se usó Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, página web: qiagen.com/ingenuity) para la generación del análisis de redes. Los genes inducidos por enfermedad hepática extraídos por el software IPA basado en Ingenuity Knowledge Base se muestran suprimidos tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1. Los nodos rellenos con genes expresados de manera diferencial, un rectángulo redondeado significando que están regulados al alza y los círculos significando que están regulados a la baja tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1. Los cuadrados representan las dianas previstas. Las líneas continuas y discontinuas indican las interacciones directas e indirectas, respectivamente. Los genes con contorno negro participan en las enfermedades hepáticas curadas en la Base de Conocimiento de IPA.

**Figura 7. La firma de 32 genes de riesgo de CHC de pan-etología derivada del paciente se revierte tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1 en células HepG2-NTCP infectadas por el VHB.** **A.** Las células HepG2-NTCP fueron infectadas por el VHB derivado del suero y tratadas con mAb específico de CLDN1 humano o con Ab de control durante 7 días. **B.** La infección por VHB se confirmó mediante la cuantificación de la expresión del ARN pregenómico (pg) del VHB relativa por qRT-PCR (media  $\pm$  DT;  $n=3$ ). **C.** Mapa de calor que muestra la supresión/inducción de la expresión de los genes de alto y bajo riesgo de CHC, respectivamente, tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1 humano. La expresión de la firma de riesgo de CHC se evaluó

usando la tecnología de RT-PCR de alto rendimiento de Biomark HD. En la barra de escala, blanco indica el enriquecimiento de la supresión, negro indica el enriquecimiento de la inducción.

**Figura 8. La firma de 32 genes de riesgo de CHC con pan-etilogía derivada del paciente se revierte tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1 en células hepáticas tratadas con etanol.** A. Las células Huh7.5.1 se diferenciaron en células Huh7.5.1<sup>diff</sup> tipo hepatocitos, se expusieron crónicamente a etanol (40 mM) y se trataron con mAb específico de CLDN1 humano o Ab de control durante los 10 días de exposición. B. Mapa de calor que muestra la supresión/inducción de la expresión de los genes de alto y bajo riesgo de CHC, respectivamente, tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1 humano. La firma de riesgo de CHC se evaluó usando la tecnología de RT-PCR de alto rendimiento de Biomark HD. En la barra de escala, blanco indica el enriquecimiento de la supresión, negro indica el enriquecimiento de la inducción.

**Figura 9. Un cambio metabólico tipo Warburg asociado a un mayor riesgo de cáncer se revierte tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1 humano en células Huh7.5.1<sup>diff</sup> infectadas por el VHC.** A. Un análisis de metabolitos polares se realizó en células Huh7.5.1<sup>diff</sup> infectadas de manera continua por VHC. Diez días después de la infección por VHC, los metabolitos se extrajeron y analizaron adicionalmente por espectrometría de masas. B. Flujo de lactato de las células hepáticas. Valores negativos: acumulación fuera de las células. C. Mapa de calor y agrupación jerárquica que muestra los 15 principales metabolitos detectados.

**Figura 10. El tratamiento con mAb específico de CLDN1 revierte los reguladores de la transición epitelial a mesenquimal (TEM) en las células hepáticas infectadas por el virus.** A. Las células Huh7.5.1<sup>diff</sup> se infectaron de forma continua usando Jc1 de VHC y trataron con un mAb específico de CLDN1 o con un tratamiento con Ab de control durante 3 días tras 7 días de infección. B. Expresión relativa de Snail1 (*SNAI1*), Snail2 (*SNAI2*), y ZEB1 (*ZEB1*) tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1 o con mAb de control. C. Mapa de calor que muestra la expresión de los genes implicados en la TEM. El tratamiento con mAb específico de CLDN1 revirtió el patrón de expresión génica normalmente observado en la TEM. Los genes mostrados pertenecen a la firma de 186 genes de riesgo de CHC. En la barra de escala, blanco indica el enriquecimiento de la supresión, negro indica el enriquecimiento de la inducción. Los resultados representan un experimento realizado por triplicado. PE: Puntuación de enriquecimiento.

**Figura 11. Prevención y tratamiento de la enfermedad hepática mediante un mAb específico de CLDN1 en un modelo de ratón DEN para la enfermedad hepática y CHC.** A. *Enfoque usado.* Los ratones C3H/He (n=10) recibieron una única inyección de DEN (D en el gráfico). Dieciocho semanas después de la inyección de DEN y antes del tratamiento con el anticuerpo, se sacrificaron dos ratones para los análisis de referencia (⊕). Desde la semana 18 hasta la semana 23, los 8 ratones restantes fueron sometidos a un tratamiento con Ab mIgG3 específico de CLDN1 de ratón (Y) (n=4; grupo de tratamiento) o no tratados (n=4; grupo de control). Una semana después del último tratamiento con anticuerpos, los hígados se recolectaron para los análisis posteriores al tratamiento (⊕). El tejido hepático se fijó y tiñó con hematoxilina/eosina (B, C, E) o tricromo de Masson (D). B. *Enfermedad hepática en el valor inicial antes del tratamiento con anticuerpos.* Dieciocho semanas después de la inyección de DEN y antes del tratamiento con el anticuerpo, se sacrificaron dos ratones. Los hígados de los ratones se recolectaron, fijaron y tiñeron con hematoxilina/eosina. Las flechas muestran áreas focales de esteatosis en el hígado de todos los ratones. Ampliación x200. C, D y E. *Enfermedad hepática tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1.* C. Los hígados se recolectaron después del tratamiento en la semana 23 y se tiñeron con hematoxilina/eosina. Las flechas muestran áreas de esteatosis exclusivamente en los ratones de control pero no en los ratones tratados con anti-CLDN1. Ampliación x200. D. La tinción tricrómica de Masson de los hígados de dos de los cuatro ratones por grupo, confirma la presencia de esteatosis (flechas) en los ratones control mientras que la esteatosis no es detectable o apenas lo es en los ratones tratados con mAb específico de CLDN1. Se muestran dos aumentos (x50 y x200). E. Tinción con hematoxilina/eosina de un tumor hepático en un ratón del grupo de control en dos aumentos diferentes (x50 y x200). No se detectaron tumores en los ratones tratados con el anticuerpo específico de CLDN1. Las imágenes son representativas de todo el hígado. Los números de identificación de los ratones se indican en cada portaobjetos (D-E). Barras de tamaño: 200 μm para el aumento x50 y 50 μm para el aumento x200.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

A lo largo de la memoria descriptiva, se emplean varios términos que se definen en los párrafos siguientes.

Como se usa en el presente documento, el término **"sujeto"** se refiere a un ser humano u otro mamífero (p. ej., primate, perro, gato, cabra, caballo, cerdo, ratón, rata, conejo y similares), que puede desarrollar carcinoma hepatocelular, pero que puede o no padecer la enfermedad. Los sujetos no humanos pueden ser animales transgénicos o modificados de otro modo. En muchas realizaciones de la presente invención, el sujeto es un ser humano. En dichas realizaciones, el sujeto es a menudo referido como un **"individuo"**. El término "individuo" no denota una edad particular, y por tanto abarca recién nacidos, niños, adolescentes y adultos. El término **"paciente"** se refiere más específicamente a un individuo que padece una enfermedad. En la práctica de la presente invención,

un paciente será generalmente diagnosticado con una enfermedad hepática.

El término "**tratamiento**" se usa en el presente documento para caracterizar un método o proceso que está dirigido a (1) retrasar o prevenir la aparición de una enfermedad o afección (p. ej., carcinoma hepatocelular); (2) ralentizar o detener la progresión, agravamiento, o deterioro de los síntomas de la enfermedad o afección (p. ej., enfermedad hepática); (3) producir una mejora de los síntomas de la enfermedad o afección; o (4) curar la enfermedad o afección. Un tratamiento puede administrarse antes de la aparición de la enfermedad o afección, para una acción profiláctica o preventiva. Como alternativa o adicionalmente, un tratamiento puede administrarse después del inicio de la enfermedad o afección, para una acción terapéutica.

Los términos "**carcinoma hepatocelular**" y "**CHC**" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Se refieren al tipo más habitual de cáncer de hígado, también llamado hepatoma maligno. Como se usa en el presente documento, las expresiones "**carcinoma hepatocelular asociado al VHC**" y "**enfermedad hepática asociada al VHC**" se refieren al carcinoma hepatocelular y a la enfermedad hepática, respectivamente, que son secundarias a la infección por virus de la hepatitis C (VHC). Como se usa en el presente documento, la expresión "**carcinoma hepatocelular no asociado al VHC**" se refiere al carcinoma hepatocelular que se desarrolla, o que es susceptible de desarrollarse, en un paciente que nunca ha estado infectado por el VHC. "Carcinoma hepatocelular no asociado al VHC" también incluye el carcinoma hepatocelular que se desarrolla, o que es susceptible de desarrollarse, en un paciente que se ha curado de la infección por el VHC. De manera análoga, la expresión "**enfermedad hepática no asociada al VHC**" se refiere a una enfermedad hepática que se ha desarrollado en un paciente que nunca ha estado infectado por el VHC o en un paciente que se ha curado de la infección por el VHC. Los ejemplos de carcinoma hepatocelular/enfermedad hepática no asociada al VHC incluyen carcinoma hepatocelular/enfermedad hepática secundaria a la infección por virus de la hepatitis B (VHB), enfermedad de hígado alcohólico, enfermedad de hígado graso no alcohólico, hemocromatosis hereditaria, deficiencia en alfa 1-antitripsina, hepatitis autoinmune, algunas porfirias, enfermedad de Wilson, exposición a aflatoxinas, diabetes tipo 2, obesidad, etc..., así como carcinoma hepatocelular/enfermedad hepática de origen desconocido.

Una "**composición farmacéutica**" se define en el presente documento como que comprende una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo anti-claudina 1 (o un fragmento biológicamente activo del mismo), y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**cantidad eficaz**" se refiere a cualquier cantidad de un compuesto, agente, anticuerpo, o composición que es suficiente para cumplir su fin(es) previsto(s), p. ej., una respuesta biológica o médica deseada en una célula, tejido, sistema o sujeto. Por ejemplo, en determinadas realizaciones de la presente invención, el(los) fin(es) puede(n) ser: prevenir la aparición del carcinoma hepatocelular, ralentizar, aliviar o detener la progresión, agravamiento o deterioro de los síntomas de la enfermedad hepática o carcinoma hepatocelular; producir una mejora de los síntomas de la enfermedad, o curar el carcinoma hepatocelular.

La expresión "**vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable**" se refiere a un medio transportador que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del principio activo o de los principios activos y que no es excesivamente tóxico para el hospedador a la concentración a la que se administra. La expresión incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W. Martin, 18ª Ed., 1990, Mack Publishing Co.: Easton, PA, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).

La expresión "**claudina-1 humana o CLDN1 humana**" se refiere a una proteína que tiene la secuencia mostrada en el número de acceso del NCBI NP\_066924, o cualquier variante de origen natural que se encuentra comúnmente en poblaciones humanas permisivas al VHC. La expresión "**dominio extracelular**" o "**ectodominio**" de claudina-1 se refiere a la región de la secuencia de claudina-1 que se extiende en el espacio extracelular (es decir, el espacio fuera de una célula).

El término "**anticuerpo**", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier inmunoglobulina (es decir, una molécula de inmunoglobulina intacta, una porción activa de una molécula de inmunoglobulina, etc.) que se une a un epítipo específico. El término abarca anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales. Todos los derivados y fragmentos de los mismos, que mantienen la capacidad de unión específica, también están incluidos en el término. El término también incluye cualquier proteína que tenga un dominio de unión, que es homólogo o en gran medida homólogo a un dominio de unión de inmunoglobulina. Estas proteínas pueden derivar de fuentes naturales, o producirse parcial o enteramente de forma sintética.

La expresión "**unión específica**", cuando se usa en referencia a un anticuerpo, se refiere a un anticuerpo que se une a un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una afinidad de al menos  $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que la afinidad para unirse a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína).

El término "**aislado**", como se usa en el presente documento en referencia a una proteína o polipéptido, significa una proteína o polipéptido, que en virtud de su origen o manipulación se separa de al menos algunos de los componentes con los que está naturalmente asociado o con los que está asociado cuando se obtiene inicialmente. Por "aislado", se entiende como alternativa o adicionalmente que la proteína o polipéptido de interés se produce o sintetiza de la mano del hombre.

Los términos "**proteína**", "**polipéptido**" y "**péptido**" se usan en el presente documento de manera intercambiable, y se refieren a secuencias de aminoácidos de una diversidad de longitudes, ya sea en sus formas neutras (no cargadas) o como sales, y no modificadas o modificadas por glicosilación, oxidación de cadenas laterales o fosforilación. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos es una proteína nativa de longitud completa. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos es un fragmento más pequeño de la proteína de longitud completa. En otras realizaciones más, la secuencia de aminoácidos se modifica mediante sustituyentes adicionales unidos a las cadenas laterales de aminoácidos, tales como unidades glicosílicas, lípidos o iones inorgánicos tales como fosfatos, así como modificaciones relacionadas con las conversiones químicas de las cadenas tales como oxidación de grupos sulfhidrilo. Por tanto, el término "proteína" (o sus términos equivalentes) pretende incluir la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa de longitud completa, o un fragmento de la misma, sujeta a aquellas modificaciones que no cambien significativamente sus propiedades específicas. En particular, el término "proteína" abarca isoformas de proteínas, es decir, las variantes que están codificadas por el mismo gen, pero que difieren en su pl o PM, o ambos. Dichas isoformas pueden diferir en su secuencia de aminoácidos (p. ej., como resultado de una variación alélica, corte y empalme alternativo o proteólisis limitada) o, como alternativa, pueden surgir de una modificación postraduccional diferencial (p. ej., glucosilación, acilación, fosforilación).

El término "**análogo**", como se usa en el presente documento en referencia a una proteína, se refiere a un polipéptido que posee una función similar o idéntica a la proteína pero no necesariamente comprende una secuencia de aminoácidos que sea similar o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína o una estructura que es similar o idéntica a la de la proteína. Preferentemente, en el contexto de la presente invención, un análogo de proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 30 %, más preferentemente, al menos un 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína.

El término "**fragmento**" o el término "**porción**", como se usa en el presente documento en referencia a una proteína, se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos de aminoácidos consecutivos (preferentemente, al menos aproximadamente: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250 o más restos de aminoácidos) de la secuencia de aminoácidos de una proteína. El fragmento de una proteína puede o no poseer una actividad funcional de la proteína.

La expresión "**biológicamente activo**", como se usa en el presente documento para caracterizar una variante, análogo o fragmento de proteína, se refiere a una molécula que comparte suficiente identidad de secuencia de aminoácidos u homología con la proteína para mostrar propiedades similares o idénticas a la proteína. Por ejemplo, en muchas realizaciones de la presente invención, un fragmento biológicamente activo de un anticuerpo anti-claudina 1 es un fragmento que conserva la capacidad del anticuerpo para interferir con la señalización celular hepática y revertir una firma de riesgo de CHC derivada del paciente.

El término "**homólogo**" (u "**homología**"), como se usa en el presente documento, es sinónimo del término "identidad" y se refiere a la similitud de secuencia entre dos moléculas de polipéptido o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas está ocupada por la misma base o el mismo resto de aminoácido, las moléculas respectivas son entonces homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias corresponde al número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias divididas por el número de posiciones comparadas y multiplicadas por 100. Generalmente, se hace una comparación cuando se alinean dos secuencias para proporcionar la máxima homología. Las secuencias de aminoácidos homólogas comparten secuencias de aminoácidos idénticas o similares. Los restos similares son sustituciones conservativas o "mutaciones puntuales permisibles" de, restos de aminoácidos correspondientes en una secuencia de referencia. Las "sustituciones conservativas" de un resto en una secuencia de referencia son sustituciones que son física o funcionalmente similares al resto de referencia correspondiente, p. ej., que tienen un tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas similares, incluyendo la capacidad para formar enlaces covalentes o de hidrógeno o similares. Las sustituciones conservativas particularmente preferentes son aquellas que satisfacen los criterios definidos para una "mutación puntual aceptada" como se describe por Dayhoff *et al.* ("Atlas of Protein Sequence and Structure", 1978, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, DC, Supl. 3, 22: 354-352).

El término "**marcado**", y las expresiones "**marcado con un agente detectable**" y "**marcado con un resto detectable**" se usan en el presente documento de manera intercambiable. Estos términos y expresiones se usan para especificar que una entidad (p. ej., un anticuerpo) puede visualizarse, por ejemplo, después de unirse a otra entidad (p. ej., un antígeno). Preferentemente, un agente o resto detectable se selecciona de manera que genere una señal que pueda medirse y cuya intensidad esté relacionada con la cantidad de entidad unida. Los métodos para marcar proteínas y polipéptidos, incluidos los anticuerpos, son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos marcados pueden prepararse mediante la incorporación, o conjugación con un marcador, que es directa o

indirectamente detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos o cualquier otro medio adecuado. Los agentes detectables adecuados incluyen, pero sin limitación, diversos ligandos, radionúclidos, colorantes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, micropartículas, enzimas, marcadores colorimétricos, marcadores magnéticos y haptenos.

Los términos "**aproximadamente**" y "**alrededor de**", como se usan en el presente documento con referencia a un número, generalmente incluyen números que pertenecen a un intervalo del 10 % en cualquier dirección del número (mayor o menor que el número) a menos que se indique otra cosa o de otro modo sea evidente a partir del contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100 % de un valor posible).

### **Descripción detallada de determinadas realizaciones preferentes**

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere al uso de anticuerpos anti-claudina 1 para la prevención y/o tratamiento del carcinoma hepatocelular, en particular para la prevención y/o tratamiento del carcinoma hepatocelular que no está asociado al VHC.

#### **I - Anticuerpos anti-claudina-1**

Los presentes Solicitantes han desarrollado previamente anticuerpos monoclonales dirigidos contra claudina-1 humana y demostraron que estos anticuerpos monoclonales curan la infección por VHC *in vivo* sin efectos adversos detectables (documentos EP 08 305 597 y WO 2010/034812). Actualmente han demostrado que estos anticuerpos monoclonales interfieren en la señalización celular hepática y revierten una firma de riesgo de CHC derivada del paciente en un sistema modelo basado en células hepáticas, y que la modulación de la señalización y la reprogramación transcripcional es independiente de la actividad antiviral del anticuerpo.

La claudina 1 humana (CLDN1) es una proteína de unión estrecha que se expresa en varios tejidos. En los hepatocitos, desempeña un papel importante en la formación de la barrera que separa la sangre y la bilis (Zona *et al.*, *Viruses*, 2014, 6(2): 875-892). Se ha mostrado que la CLDN1 desempeña un doble papel en la enfermedad hepática asociada al VHC: es un factor esencial del huésped para la infección por VHC que sirve como factor de entrada celular viral necesario para la iniciación, diseminación y mantenimiento de la infección (Evans *et al.*, *Nature*, 2007, 446(7137): 801-805; Mailly *et al.*, "Clearance of persistent hepatitis C virus infection using a claudin-1-targeting monoclonal antibody", *Nat Biotech*, 2015, en iress). Por otra parte, se ha notificado que la CLDN1 está implicada en la carcinogénesis a través de la modulación de la señalización celular (Suh *et al.*, *Oncogene*, 2013, 32(41): 4873-4882) o a través de la inducción de la expresión de metaloproteinasas de matriz (Oku *et al.*, *Cancer Res*, 2006, 66(10): 5251-5257). Es más, se ha mostrado que la expresión de CLDN1 aumenta en el CHC en comparación con el tejido hepático no enfermo (Stebbing *et al.*, *Oncogene*, 2013, 32(41): 4871-4872).

Los anticuerpos anti-claudina 1 que pueden usarse en la práctica de la presente invención incluyen cualquier anticuerpo que se haya cultivado contra claudina 1 y que pueda mostrar que interfiere con la señalización celular hepática y revertir una firma de riesgo de CHC derivada del paciente, por ejemplo, en un sistema modelo basado en células hepáticas. El documento WO 2015/014657 se refiere a anticuerpos anti-claudina 1 para su uso en el tratamiento del cáncer colorrectal. El documento WO 2015/014657 usa los anticuerpos anti-claudinal producidos por hibridomas capaces de inhibir la formación de colonias para todas las líneas celulares, excepto para la línea celular negativa a claudina, indicando que este efecto es específico de la unión a claudina 1

Los ejemplos de anticuerpos anti-claudina 1 que pueden usarse en la práctica de la presente invención incluyen, en particular, los anticuerpos policlonales y monoclonales anti-CLDN1 que fueron desarrollados por los presentes Solicitantes (véase los documentos EP 08 305 597 y WO 2010/034812, Fofana *et al.*, *Gastroenterology*, 2010, 139(3): 953-64, 964.e1-4). Como se describe en estos documentos, se han producido ocho anticuerpos monoclonales mediante inmunización genética y se ha mostrado que inhiben eficazmente la infección por VHC al dirigirse al dominio extracelular de claudina-1. Usando un sistema modelo infeccioso de VHC y hepatocitos humanos primarios, se ha demostrado que estos anticuerpos monoclonales anti-CLDN1 inhiben eficazmente la infección por VHC de todos los genotipos principales, así como las cuasiespecies de VHC altamente variables en pacientes individuales. Es más, estos anticuerpos bloquearon eficazmente la entrada de variantes de escape de VHC altamente infecciosas que eran resistentes a los anticuerpos neutralizantes en seis pacientes con reinfección por VHC durante un trasplante de hígado. Los anticuerpos monoclonales anti-claudina 1 se denominan OM-4A4-D4, OM-7C8-A8, OM-6D9-A6, OM-7D4-C1, OM-6E1-B5, OM-3E5-B6, OM-8A9-A3 y OM-7D3-B3. Por tanto, los anticuerpos anti-claudina 1 adecuados son anticuerpos monoclonales secretados por una cualquiera de las líneas celulares de hibridoma depositadas por el INSERM (uno de los Solicitantes) y GENOVAC en el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania) el 29 de julio de 2008, con los números de acceso DSM ACC2931, DSM ACC2932, DSM ACC2933, DSM ACC2934, DSM ACC2935, DSM ACC2936, DSM ACC2937, y DSM ACC2938 (descrito en los documentos EP 08 305 597 y WO 2010/034812).

Otros ejemplos de anticuerpos anti-claudina 1 adecuados incluyen los divulgados en la patente europea N.º EP 1 167 389, la patente de EE.UU. N.º 6.627.439, en la solicitud de patente internacional publicada con el N.º WO

201/132307 y en las solicitudes de patente internacional publicadas con el N.º WO 2015/014659 y el N.º WO 2015/014357, y en Yamashita *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2015, 353(1): 112-118.

5 Los anticuerpos anti-claudina 1 adecuados para su uso en la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales.

10 En lugar de usar los hibridomas descritos anteriormente como fuente de los anticuerpos, los anticuerpos anti-claudina 1 pueden prepararse mediante cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-claudina 1 puede prepararse mediante métodos de ADN recombinante. Estos métodos generalmente implican el aislamiento de los genes que codifican el anticuerpo deseado, la transferencia de los genes a un vector adecuado y la expresión en masa en un sistema de cultivo celular. Los genes o el ADN que codifican el anticuerpo monoclonal deseado pueden aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (p. ej., mediante el uso de sondas de oligonucleótido que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos murinos). Las líneas celulares de hibridoma pueden servir como fuente preferente de dicho ADN. Las células huésped adecuadas para la producción recombinante de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, células huésped de mamíferos adecuadas, tales como CHO, HeLa o CV1. Los plásmidos de expresión adecuados incluyen, sin limitación, pcDNA3.1 Zeo, pIND (SP1), pREP8 (todos disponibles en el mercado de Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), y similares. Los genes de anticuerpos pueden expresarse a través de vectores virales o retrovirales, que incluyen vectores basados en MLV, vectores basados en virus vaccinia y similares. Las células pueden cultivarse usando métodos convencionales, en medios de cultivo adecuados tales como, por ejemplo, medio DMEM y RPMI-1640. Los anticuerpos anti-claudina 1 pueden expresarse como anticuerpos de cadena única. El aislamiento y la purificación de anticuerpos producidos de forma recombinante se pueden realizar por métodos convencionales. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-claudina 1 puede recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares mediante purificación de proteína A, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, tal como columna de proteína A, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de lectina, o cualquier combinación adecuada de estos métodos. La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) también se puede emplear para la purificación.

20 30 Como alternativa, un anticuerpo anti-claudina 1 para su uso de acuerdo con la presente invención puede obtenerse a partir de fuentes comerciales.

35 En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-claudina 1 se usa en su forma nativa. En otras realizaciones, se trunca (p. ej., a través de escisión enzimática u otro método adecuado) para proporcionar fragmentos o porciones de inmunoglobulina, en particular, fragmentos o porciones que son biológicamente activos. Fragmentos o porciones biológicamente activos de un anticuerpo anti-claudina 1 incluyen fragmentos o porciones que conservan la capacidad del anticuerpo para interferir con la señalización celular hepática y revertir una firma de riesgo de CHC derivada del paciente, por ejemplo, en un sistema modelo basado en células hepáticas tal como el sistema de firma de 186 genes en hígado usado por los presentes Solicitantes (véanse los Ejemplos a continuación), y/o la capacidad de prevenir el carcinoma hepatocelular y/o tratar el carcinoma hepatocelular.

40 Un fragmento o porción biológicamente activo de un anticuerpo anti-claudina 1 puede ser un fragmento o porción Fab, un fragmento o porción F(ab')<sub>2</sub>, un dominio variable, o una o más CDRs (regiones determinantes de la complementariedad) del anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo que comprende las 6 CDRs de un anticuerpo monoclonal anti-claudina 1. Como alternativa, un fragmento o porción biológicamente activo de un anticuerpo anti-claudina 1 se puede derivar de la porción o extremo terminal carboxilo de la proteína del anticuerpo y puede comprender un fragmento Fc, un fragmento Fd o un fragmento Fv.

45 50 Los fragmentos de anticuerpo anti-claudina 1 de la presente invención pueden producirse por cualquier método adecuado conocido en la técnica, que incluye, aunque no de forma limitativa, escisión enzimática (p. ej., digestión proteolítica de anticuerpos intactos) o mediante técnicas sintéticas o recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv y ScFv (cadena simple Fv), pueden, por ejemplo, expresarse y secretarse a partir de células huésped de mamíferos o de *E. coli*. Los anticuerpos también pueden producirse en una diversidad de formas truncadas usando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de terminación corriente arriba del sitio de terminación natural. Las diversas porciones de estos anticuerpos se pueden unir químicamente mediante técnicas convencionales o se pueden preparar como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética.

55 60 Los anticuerpos anti-claudina 1 (o fragmentos biológicamente activos de los mismos) adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención pueden producirse en una forma modificada, tal como una proteína de fusión (es decir, una molécula o porción de inmunoglobulina unida a una entidad polipeptídica). Preferentemente, la proteína de fusión conserva la propiedad biológica del anticuerpo. Una entidad polipeptídica a fusionar con un anticuerpo anti-claudina 1, o un fragmento biológicamente activo del mismo, puede seleccionarse para conferir cualquiera de una serie de propiedades ventajosas a la proteína de fusión resultante. Por ejemplo, la entidad polipeptídica puede seleccionarse para proporcionar una expresión incrementada de la proteína de fusión recombinante. Como alternativa o adicionalmente, la entidad polipeptídica puede facilitar la purificación de la proteína de fusión, por

ejemplo, actuando como un ligando en la purificación por afinidad. Se puede añadir un sitio de escisión proteolítica a la proteína recombinante de modo que la secuencia deseada pueda en última instancia separarse de la entidad polipeptídica después de la purificación. La entidad polipeptídica también puede seleccionarse para conferir una estabilidad mejorada a la proteína de fusión, cuando la estabilidad es un objetivo. Ejemplos de entidades polipeptídicas adecuadas incluyen, por ejemplo, etiquetas de polihistidina, que permiten la fácil purificación de la proteína de fusión resultante en una columna quelante de níquel. La glutatión-S-transferasa (GST), la proteína de unión a la maltosa B, o proteína A son otros ejemplos de entidades polipeptídicas adecuadas.

Un anticuerpo anti-claudina 1 para su uso de acuerdo con la presente invención puede volverse a modificar por ingeniería genética para optimizar la estabilidad, solubilidad, semivida *in vivo*, o la capacidad de enlazar dianas adicionales. Los enfoques de ingeniería genética, así como las modificaciones químicas para lograr cualquiera o todos estos cambios en las propiedades son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se sabe que la adición, eliminación y/o modificación de las regiones constantes de un anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la biodisponibilidad, distribución y semivida de los anticuerpos administrados terapéuticamente. La clase y subclase de anticuerpos, determinada por la Fc o región constante del anticuerpo (que media las funciones efectoras), cuando están presentes, transmite importantes propiedades adicionales.

Se pueden generar proteínas de fusión adicionales a través de las técnicas de barajado de ADN bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458).

Los anticuerpos anti-claudina 1 adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención también pueden "humanizarse": las diferencias de secuencia entre los anticuerpos de roedores y las secuencias humanas pueden minimizarse reemplazando los restos que difieren de los de las secuencias humanas por mutagénesis dirigida al sitio de restos individuales o por injerto de regiones enteras o por síntesis química. Los anticuerpos humanizados también pueden producirse usando métodos recombinantes. En la forma humanizada del anticuerpo, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR se reemplazan con aminoácidos de moléculas de inmunoglobulina humana, mientras que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR permanecen sin cambios. Pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos son permisibles siempre que no modifiquen significativamente la actividad biológica del anticuerpo resultante. Las moléculas de inmunoglobulina de "reemplazo" humanas incluyen moléculas de IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgD o IgE, y fragmentos de las mismas. Como alternativa, los epítomos de células T presentes en los anticuerpos de roedores pueden modificarse por mutación (desinmunización) para generar anticuerpos de roedores no inmunogénicos que pueden aplicarse con fines terapéuticos en seres humanos (véase la página web: [accurobio.com](http://accurobio.com)).

Los anticuerpos anti-claudina 1 (o fragmentos biológicamente activos de los mismos) adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención pueden unirse funcionalmente (p. ej., por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares diferentes. Los métodos para la preparación de dichos anticuerpos modificados (o anticuerpos conjugados) son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, "Affinity Techniques. Enzyme Purification: Parte B", *Methods in Enzymol.*, 1974, Vol. 34, Jakoby y Wilneck (Eds.), Academic Press: Nueva York, NY; y Wilchek y Bayer, *Anal. Biochem.*, 1988, 171: 1-32). Preferentemente, las entidades moleculares están unidas en posiciones en la molécula de anticuerpo que no interfieren con las propiedades de unión del conjugado resultante, p. ej., posiciones que no participan en la unión específica del anticuerpo a su diana.

La molécula de anticuerpo y la entidad molecular pueden estar covalentemente, directamente unidas entre sí. O, como alternativa, la molécula de anticuerpo y la entidad molecular pueden unirse covalentemente entre sí a través de un grupo enlazador. Esto se puede lograr mediante el uso de cualquiera de una amplia diversidad de agentes bifuncionales estables bien conocidos en la técnica, incluidos los enlazadores homofuncionales y heterofuncionales.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-claudina 1 (o un fragmento biológicamente activo del mismo) para su uso de acuerdo con la presente invención se conjuga con un resto terapéutico. Puede ser adecuado cualquiera de una amplia variedad de restos terapéuticos para su uso en la práctica de la presente invención incluyendo, sin limitación, citotoxinas (p. ej., agentes citostáticos o citocidas), agentes terapéuticos, e iones de metales radiactivos (p. ej., emisores alfa y emisores alfa unidos a quelantes macrocíclicos tales como DOTA). Los agentes citotóxicos o citotoxinas incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, timidina quinasa, endonucleasa, RNasa, y puromicina y fragmentos, variantes u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y *cis*-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorrubicina y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina, bleomicina, mitramicina y antramycin), y agentes antimetabólicos (p. ej., vincristina y vinblastina).

Otros restos terapéuticos incluyen proteínas o polipéptidos que posean una actividad biológica deseada. Dichas proteínas incluyen, pero sin limitación, toxinas (p. ej., abrina, ricina A, alfa toxina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina diftérica, saporina, momordina, gelonina, proteína antiviral de la hierba carmín, alfa-sarcina y toxina colérica);  
 5 proteínas tales como factor de necrosis tumoral, interferón alfa, interferón beta, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular; agentes apoptóticos (p. ej., TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) o, modificadores de la respuesta biológica (p. ej., linfoquinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de las colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF) u otros factores de crecimiento).

10 Como alternativa o adicionalmente, un anticuerpo de la presente invención (o un fragmento biológicamente activo del mismo) puede conjugarse con un agente detectable. En la práctica de la presente invención se puede usar cualquiera de una amplia diversidad de agentes detectables, incluyendo, sin limitación, diversos ligandos, radionúclidos (p. ej.,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  y similares), tintes fluorescentes (p. ej., isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftalaldehído y fluorescamina), agentes quimioluminiscentes (p. ej., luciferina, luciferasa y aequorina), micropartículas (tales como, por ejemplo, puntos cuánticos, nanocristales, fósforos y similares), enzimas (tales como, por ejemplo, las usadas en un ELISA, es decir, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores colorimétricos, marcadores magnéticos y biotina, dioxigenina u otros haptenos y proteínas para los cuales están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

15 Otras entidades moleculares que pueden conjugarse con un anticuerpo de la presente invención (o un fragmento biológicamente activo del mismo) incluyen, pero sin limitación, grupos poliméricos hidrófilos lineales o ramificados, grupos de ácidos grasos o grupos de ésteres grasos.

20 Por tanto, en la práctica de la presente invención, los anticuerpos anti-claudina 1 pueden usarse bajo la forma de anticuerpos de longitud completa, variantes o fragmentos biológicamente activos de los mismos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y moléculas derivadas de anticuerpos que comprenden al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo anti-claudina 1, incluyendo moléculas tales como fragmentos Fab, fragmentos F(ab') $_2$ , fragmentos Fd, fragmentos Fabc, anticuerpos Sc (anticuerpos monocatenarios), diacuerpos, cadenas individuales ligeras de anticuerpos individuales, cadenas pesadas de anticuerpos individuales, fusiones quiméricas entre cadenas de anticuerpos y otras moléculas, y conjugados de anticuerpos, tales como anticuerpos conjugados con un agente terapéutico o con un agente detectable. Preferentemente, las moléculas relacionadas con el anticuerpo anti-claudina 1 de acuerdo con la presente invención mostrarán que interfieren con la señalización celular hepática y revierten una firma de riesgo de CHC derivada del paciente (tal como el sistema de firma de 186 genes en hígado usado por los presentes Solicitantes - véanse los Ejemplos).

25 Un experto en la materia entenderá que otros compuestos que se dirigen a claudina-1, pueden usarse en la práctica de la presente invención, incluyendo, aunque no de forma limitativa, pequeñas moléculas y ARNips.

## 40 II - Tratamiento o prevención del carcinoma hepatocelular

### A. Indicaciones

45 Los presentes Solicitantes han mostrado que los anticuerpos anti-claudina 1 son más potentes que los agentes antivirales y otros compuestos candidatos para la quimioprotección del CHC en la reversión de la firma de alto riesgo del CHC. Por lo tanto, los anticuerpos anti-claudina 1 o fragmentos biológicamente activos de los mismos, pueden usarse en métodos profilácticos y terapéuticos para prevenir y/o tratar el carcinoma hepatocelular.

50 Los métodos de tratamiento de la presente invención pueden llevarse a cabo usando un anticuerpo anti-claudina 1, o un fragmento biológicamente activo del mismo, o una composición farmacéutica que comprenda dicho anticuerpo o fragmento (véase más adelante). Estos métodos comprenden generalmente la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-claudina-1, o de un fragmento biológicamente activo del mismo, o de una composición farmacéutica del mismo, a un sujeto que lo necesite. La administración puede realizarse usando cualquiera de los métodos de administración conocidos por un experto en la materia (véase más adelante).

55 En particular, la presente invención proporciona un método para evitar que un paciente que padece una enfermedad hepática desarrolle un carcinoma hepatocelular. La enfermedad o patología hepática puede ser inflamación del hígado, fibrosis hepática y/o cirrosis.

60 En la práctica de la presente invención, la causa subyacente de la enfermedad hepática no es la infección por VHC. Por tanto, la invención proporciona un método para prevenir y/o tratar el carcinoma hepatocelular no asociado al VHC, es decir, para prevenir y/o tratar el carcinoma hepatocelular que se desarrolla, o que es susceptible de desarrollarse, en un paciente que nunca ha estado infectado por el VHC o en un paciente que se ha curado de la infección por el VHC.

5 En ciertas realizaciones de la invención, la causa subyacente de la enfermedad hepática es la infección por VHC. La infección crónica por VHB conduce a la cirrosis del hígado y es, con la infección crónica por VHC, responsable de que el cáncer de hígado sea el más habitual en muchas partes del mundo. A nivel mundial, alrededor de 2.000 millones de personas están infectadas por el VHB. El riesgo de CHC es unas 20 veces mayor en personas infectadas por el VHB y/o el VHC en los países occidentales industrializados, donde la prevalencia de la infección es baja.

10 Como alternativa, la enfermedad hepática puede ser una enfermedad hepática alcohólica, donde la causa subyacente de la enfermedad hepática es el alcoholismo. La ingesta de alcohol ha sido definitivamente reconocida como una causa de enfermedades hepáticas crónicas, incluyendo carcinoma hepatocelular. El alcohol podría estar implicado en el desarrollo del CHC a través de mecanismos tanto directos (genotóxicos) como indirectos. Un mecanismo indirecto incluye el desarrollo de cirrosis, que es probablemente la vía más común de carcinogénesis hepática en los países desarrollados.

15 En otras realizaciones de la presente invención, la causa subyacente de la enfermedad hepática es la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). La EHGNA es el trastorno hepático más común en los países occidentales industrializados. Se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico. Por tanto, la EHGNA tiende a desarrollarse en personas con sobrepeso u obesidad, y/o que tienen diabetes, colesterol alto o triglicéridos altos. En la mayoría de las personas, la EHGNA no causa signos ni síntomas, ni complicaciones. Pero en algunas personas con EHGNA, la grasa que se acumula en el hígado puede provocar inflamación y cicatrización en el hígado que se cree que da lugar a fibrosis y cirrosis. Esta forma más grave de EHGNA se denomina a veces esteatohepatitis no alcohólica. Cabe señalar que se ha demostrado que el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 son factores de riesgo independientes del CHC.

25 Incluso en otras realizaciones, la causa subyacente de la enfermedad hepática es una enfermedad metabólica hereditaria, tal como hemocromatosis hereditaria. Las personas con hemocromatosis hereditaria absorben demasiado hierro de los alimentos. El hierro se deposita en los tejidos de todo el cuerpo, incluyendo el hígado. Si se acumula suficiente hierro en el hígado, puede provocar cirrosis. Otras enfermedades metabólicas hereditarias que son factores de riesgo de carcinoma hepatocelular incluyen, deficiencia de alfa 1 antitripsina, porfiria cutánea tardía, enfermedad de Wilson, tirosinemia y enfermedades del almacenamiento de glucógeno.

30 En otras realizaciones más, la causa subyacente de la enfermedad hepática es la hepatitis autoinmune (también llamada hepatitis lupoides). La hepatitis autoinmune es una enfermedad crónica del hígado que se produce cuando el sistema inmunitario del cuerpo ataca a las células del hígado provocando que el hígado se inflame. Otra enfermedad autoinmune que afecta al hígado y puede provocar cirrosis es la cirrosis biliar primaria o CBP. La CBP es una afección autoinmune, en la que el sistema inmunitario ataca lentamente los conductos biliares en el hígado. Cuando los conductos biliares están dañados, la bilis se acumula en el hígado y con el tiempo daña el tejido. Esto puede conducir a cicatrización, fibrosis y cirrosis.

40 En otras realizaciones, la causa subyacente de la enfermedad hepática es la exposición a aflatoxinas. Las aflatoxinas son venenos producidos por un hongo que crece en los cultivos (tales como cacahuetes, trigo, soja, maíz y arroz) que se almacenan pésimamente. La exposición prolongada a estas sustancias es un riesgo importante de cáncer de hígado. El riesgo aumenta aún más en las personas infectadas por el VHC o el VHB. En los países desarrollados, el contenido de aflatoxinas en los alimentos está regulado mediante ensayos. La contaminación por aflatoxinas es más común en ciertas partes de África y Asia.

50 En otras realizaciones más, la causa subyacente de la enfermedad hepática es desconocida o la enfermedad hepática es provocada por agentes aún por descubrir, incluyendo agentes de origen genético, agentes infecciosos o agentes químicos y/o físicos tóxicos para el hígado.

55 La administración de un anticuerpo anti-claudina 1, o de una composición farmacéutica del mismo, a pacientes que padecen enfermedades hepáticas no asociadas al VHC de acuerdo con la presente invención puede ralentizar, reducir, detener o aliviar la progresión de la enfermedad hepática, en particular la progresión a cirrosis y/o a carcinoma hepatocelular, o revertir la progresión hasta el punto de curar la enfermedad hepática.

60 Como alternativa o adicionalmente, la administración de un anticuerpo anti-claudina 1, o de una composición farmacéutica del mismo, a un paciente que padece una enfermedad hepática no asociada al VHC de acuerdo con la presente invención puede dar como resultado la mejora de al menos uno de los síntomas experimentados por el individuo, incluyendo, aunque no de forma limitativa, disminución del apetito, pérdida de peso, fatiga, dolor abdominal, ictericia, picor, síntomas similares a la gripe, dolor muscular, dolor articular, fiebres leves intermitentes, picor, alteraciones del sueño, náuseas, diarrea, dispepsia, cambios cognitivos, depresión, cefaleas y cambios de humor; síntomas de cirrosis, tales como ascitis, tendencia a moretones y sangrado, dolor de huesos, varices (especialmente en el estómago y esófago), esteatorrea, ictericia y encefalopatía hepática.

65 Como alternativa o adicionalmente, la administración de un anticuerpo anti-claudina 1, o de una composición farmacéutica del mismo, a un paciente que padece una enfermedad hepática no asociada al VHC de acuerdo con la

presente invención puede dar lugar a la prevención del trasplante de hígado.

Los efectos de un tratamiento de acuerdo con la invención pueden controlarse usando cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica para el diagnóstico de la enfermedad hepática que afecta al paciente. Dichos ensayos incluyen, pero sin limitación, pruebas serológicas en sangre, pruebas de función hepática para medir una o más de albúmina, alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), aspartato transaminasa (AST), y gamma glutamil transpeptidasa (GGT), y técnicas de obtención de imágenes hepáticas tales como elastografía por resonancia magnética (ERM), obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM), tomografía computarizada (TC) y ultrasonidos. También puede realizarse una biopsia.

Dichos ensayos también pueden incluir el análisis de la señalización celular hepática, cambios transcripcionales o proteómicos, como se describe en los Ejemplos más adelante, en una muestra biológica obtenida del sujeto que recibe un tratamiento de acuerdo con la presente invención. Las células hepáticas que pueden analizarse incluyen hepatocitos, células de Kupffer, células estrelladas, células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y células inmunitarias que incluyen, aunque no de forma limitativa, linfocitos T, linfocitos B y citofíticos naturales (NK).

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-claudina 1 (o un fragmento biológicamente activo del mismo) o una composición farmacéutica del mismo, se administra solo de acuerdo con un método de prevención o tratamiento de la presente invención. En otras realizaciones, un anticuerpo anti-claudina 1 (o un fragmento biológicamente activo del mismo) o una composición farmacéutica del mismo, se administra en combinación con al menos un agente terapéutico adicional. El anticuerpo anti-claudina 1 (o fragmento biológicamente activo del mismo), o una composición farmacéutica del mismo, puede administrarse antes de la administración del agente terapéutico, de manera simultáneamente con el agente terapéutico, y/o tras la administración del agente terapéutico.

Los agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con un anticuerpo anti-claudina 1 (o fragmento biológicamente activo del mismo), o una composición farmacéutica del mismo, pueden seleccionarse entre una gran variedad de compuestos biológicamente activos que son conocidos en la técnica por tener un efecto beneficioso en el tratamiento de la enfermedad hepática y/o en el tratamiento de la causa subyacente de la enfermedad hepática. Tal como entenderá el experto en la materia, el agente o agentes terapéuticos diferirán en función de la naturaleza de la enfermedad hepática que afecta al paciente.

Por ejemplo, cuando el paciente padece una enfermedad hepática asociada a infección por VHB, el agente o agentes terapéuticos pueden ser interferón pegilado (PEG-IFN) o análogos de nucleósidos o nucleótidos que se usan en la prevención del CHC en pacientes infectados por el VHB. En el caso de la enfermedad hepática alcohólica, el agente o agentes terapéuticos pueden ser corticosteroides y/o antioxidantes tales como S-adenosilmetionina. Cuando el paciente tiene una enfermedad de hígado graso no alcohólico, el agente o agentes terapéuticos pueden ser sensibilizadores a la insulina (tales como metformina y tiazolidinedionas, p. ej., Pioglitazona), ácido ursodesoxicólico y fármacos hipolipemiantes, vitamina E y estatinas. En el caso de la hemocromatosis hereditaria, el agente o agentes terapéuticos pueden ser fármacos de quelación de hierro (tales como cloroquina e hidroxiclороquina). En el caso de la enfermedad hepática por deficiencia de alfa 1 antitripsina, el agente o agentes terapéuticos pueden ser formas inhaladas de alfa 1 antitripsina. Para la porfiria cutánea tardía, el agente o agentes terapéuticos pueden ser fármacos quelantes de hierro (tales como cloroquina e hidroxiclороquina). En el caso de la enfermedad de Wilson, el agente o agentes terapéuticos pueden ser fármacos quelantes de cobre (tales como penicilamina y clorhidrato de trientina) y acetato de zinc, que evitan que el organismo absorba el cobre de los alimentos. En el caso de la hepatitis autoinmune, el agente o agentes terapéuticos pueden ser corticosteroides y/o supresores del sistema inmunitario. Para la cirrosis biliar primaria, el o los agentes terapéuticos pueden ser ácido ursodesoxicólico (que es el principal medicamento para mostrar la progresión de la enfermedad), agentes inmunosupresores, metotrexato, corticoesteroides, ciclosporina y agentes antiprurícticos.

## **B. Administración**

Un anticuerpo anti-claudina 1, o un fragmento biológicamente activo del mismo, (opcionalmente después de la formulación con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados), en una dosificación deseada, puede administrarse a un sujeto que lo necesite por cualquier vía adecuada. Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar anticuerpos, incluyendo comprimidos, cápsulas, soluciones inyectables, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, etc. Los métodos de administración incluyen, pero sin limitación, administración por vía dérmica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intralesional, intravenosa, subcutánea, intranasal, pulmonar, epidural, ocular y oral. Un anticuerpo anti-claudina 1, o un fragmento biológicamente activo del mismo, o una composición farmacéutica del mismo, puede administrarse por cualquier vía conveniente o adecuada, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., oral, mucosa, mucosa rectal e intestinal, etc.). La administración puede ser sistémica o local. La administración parenteral puede dirigirse preferentemente al hígado del paciente, tal como por cateterización a las arterias hepáticas o dentro de un conducto biliar o dentro de la vena porta. Como apreciarán los expertos en la materia, en realizaciones donde un anticuerpo inventivo se administra junto con un agente terapéutico adicional, el anticuerpo y el agente terapéutico pueden administrarse por la misma vía (p. ej., por vía intravenosa) o por vías diferentes (p. ej., por vía intravenosa y por vía oral).

**C. Dosificación**

5 Un anticuerpo anti-claudina 1, o un fragmento biológicamente activo del mismo, (opcionalmente después de la formulación con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados), se administrará en una dosificación tal que la cantidad administrada es eficaz para el fin previsto. La vía de administración, formulación y dosificación administrada dependerán del efecto terapéutico deseado, de la gravedad de la afección a tratar si ya está presente, de la presencia de cualquier infección, de la edad, sexo, peso, y estado de salud general del paciente, así como de la potencia, biodisponibilidad, semivida *in vivo* del anticuerpo o composición usada, del uso (o no) de terapias concomitantes, y de otros factores clínicos. Estos factores se determinan fácilmente por el médico de cabecera durante el trascurso de la terapia. Como alternativa o adicionalmente, la dosificación a administrar puede determinarse a partir de estudios usando modelos animales (p. ej., chimpancés o ratones). El ajuste de la dosis para lograr la máxima eficacia basándose en estos u otros métodos es bien conocido en la técnica y está dentro de las capacidades de los médicos capacitados. A medida que se lleven a cabo estudios usando anticuerpos anti-claudina 1, surgirá información adicional sobre los niveles de dosificación apropiados y la duración del tratamiento.

10 Un tratamiento de acuerdo con la invención puede consistir en una sola dosis o en múltiples dosis. Por tanto, la administración de un anticuerpo anti-claudina 1, o un fragmento biológicamente activo del mismo, (o una composición farmacéutica del mismo) puede ser constante durante un determinado período de tiempo o periódica y a intervalos específicos, p. ej., por hora, diariamente, semanalmente (o en algún otro intervalo de múltiples días), mensualmente, anualmente (p. ej., en forma de liberación con el tiempo). Como alternativa, la administración puede producirse en múltiples tiempos durante un período de tiempo dado, p. ej., dos o más veces a la semana; dos o más veces al mes, y similares. La administración puede ser administración continua durante un período de tiempo, p. ej., administración intravenosa.

25 En general, la cantidad de anticuerpo anti-claudina 1, o un fragmento biológicamente activo del mismo, (o una composición farmacéutica del mismo) administrada estará preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto, por ejemplo, entre aproximadamente 100 ng/kg y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del sujeto; o entre aproximadamente 1 µg/kg y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del sujeto, o entre aproximadamente 100 µg/kg y aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del sujeto.

30 En ciertas realizaciones, la cantidad de anticuerpo anti-claudina 1, o de un fragmento biológicamente activo del mismo, (o de una composición farmacéutica del mismo) administrada será tal que la cantidad no tendría ningún efecto sobre la carga del VHC si se hubiera administrado a un paciente infectado por el VHC.

**III - Composiciones farmacéuticas**

40 Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos anti-claudina-1 (y moléculas relacionadas) pueden administrarse *per se* o como una composición farmacéutica. En consecuencia, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-claudina 1, o un fragmento biológicamente activo del mismo, descrito en el presente documento y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención o tratamiento del carcinoma hepatocelular. En algunas realizaciones, la composición comprende además uno o más agentes biológicamente activos adicionales.

45 Los anticuerpos y composiciones farmacéuticas pueden administrarse en cualquier cantidad y usando cualquier vía de administración eficaz para lograr el efecto profiláctico y/o terapéutico deseado. La formulación farmacéutica óptima puede variarse dependiendo de la vía de administración y dosificación deseada. Dichas formulaciones pueden influenciar el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de eliminación *in vivo* del principio activo administrado.

50 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La expresión "forma farmacéutica unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente discreta de un anticuerpo anti-claudina-1 o un fragmento biológicamente activo del mismo, para el paciente a tratar. Se entenderá, sin embargo, que la dosificación diaria total de las composiciones se decidirá por el médico especialista dentro del alcance del buen criterio médico.

**A. Formulación**

60 Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico por vía parenteral aceptable, por ejemplo, como una solución en 2,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución de cloruro de sodio isotónica. Asimismo, normalmente se emplean aceites no volátiles estériles como solución o medio de suspensión. Para ello, se puede emplear cualquier aceite suave no volátil,

incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. También pueden usarse ácidos grasos, tales como ácido oleico en la preparación de formulaciones inyectables. Los vehículos líquidos estériles son útiles en composiciones en forma líquida estéril para la administración parenteral.

- 5 Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o mediante incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso. Las composiciones farmacéuticas líquidas que son soluciones o suspensiones estériles pueden administrarse por inyección, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. La inyección puede ser mediante un solo bolo o por infusión gradual. Cuando sea necesario o se desee, la composición puede incluir un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

15 Con el fin de prolongar el efecto de un principio activo (aquí un anticuerpo anti-claudina-1, o un fragmento biológicamente activo del mismo), es deseable con frecuencia ralentizar la absorción del ingrediente de inyección subcutánea o intramuscular. La absorción retardada de un principio activo administrado parenteralmente se puede lograr disolviendo o suspendiendo el ingrediente en un vehículo aceitoso. Las formas inyectables de efecto prolongado se preparan formando matrices microencapsuladas del principio activo en polímeros biodegradables, tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la relación de principio activo respecto al polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del ingrediente. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de efecto prolongado también se preparan atrapando el principio activo en liposomas o mediante microemulsiones que son compatibles con tejidos corporales.

25 Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen, pero sin limitación, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas farmacéuticamente aceptables. Además del anticuerpo anti-claudina-1, o del fragmento biológicamente activo del mismo, la forma farmacéutica líquida puede contener diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otro disolvente, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, 30 dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes de suspensión, conservantes, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, agentes espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizadores u osmo-reguladores. Los ejemplos de vehículos líquidos adecuados para administración oral incluyen agua (que contiene potencialmente aditivos como anteriormente, p. ej., derivados de celulosa, tales como solución de carboximetilcelulosa sódica), alcoholes (incluyendo alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos, tales como glicoles) y sus derivados, y aceites (p. ej., aceite de coco fraccionado y aceite de cacahuete). Para las composiciones presurizadas, el vehículo líquido puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propulsor farmacéuticamente aceptable.

40 Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral incluyen, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, pastillas, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, puede mezclarse un anticuerpo anti-claudina-1 o un fragmento biológicamente activo del mismo con al menos un excipiente o vehículo inerte fisiológicamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y uno o más de: (a) cargas y extensores, tales como almidones, lactosa, 45 sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico; (b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y acacia; (c) humectantes tales como glicerol; (d) agentes desintegrantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; (e) agentes retardadores de la solución tales como parafina; aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; (g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita; e (i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos. Otros excipientes adecuados para formulaciones sólidas incluyen agentes modificadores de la superficie, tales como 50 agentes modificadores de la superficie no iónicos y aniónicos. Ejemplos representativos de agentes modificadores de la superficie incluyen, pero sin limitación, poloxámero 188, cloruro de benzalconio, estearato de calcio, alcohol cetostearílico, cera emulsionante de cetomacrogol, ésteres de sorbitán, dióxido de silicio coloidal, fosfatos, dodecilsulfato de sodio, silicato de aluminio y magnesio y trietanolamina. En el caso de cápsulas, comprimidos y 55 píldoras, la forma farmacéutica también puede comprender agentes tamponantes.

60 También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina de relleno blando y duro usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Opcionalmente, 65 estos pueden contener agentes opacificantes y también pueden tener una composición tal que liberan el principio o principios activos única, o preferentemente, en una parte determinada del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones incluidas que pueden utilizarse incluyen sustancias poliméricas y

ceras.

En ciertas realizaciones, puede ser deseable administrar una composición inventiva de manera local a una zona que necesite tratamiento (p. ej., el hígado). Esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante la cirugía (p. ej., trasplante de hígado), aplicación tópica, mediante inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio, o mediante un parche dérmico o stent u otro implante.

Para la administración tópica, la composición se formula, preferentemente, como un gel, una pomada, una loción o una crema que puede incluir vehículos tales como agua, glicerol, alcohol, propilenglicol, alcoholes grasos, triglicéridos, ésteres de ácidos grasos, o aceite mineral. Otros vehículos tópicos incluyen petróleo líquido, palmitato de isopropilo, polietilenglicol, etanol (95 %), monolaureato de polioxietileno (5 %) en agua, o lauril sulfato de sodio (5 %) en agua. Otros materiales tales como antioxidantes, humectantes, estabilizantes de la viscosidad, y agentes similares según sea necesario.

Asimismo, en determinados ejemplos, se espera que las composiciones farmacéuticas se puedan disponer dentro de dispositivos transdérmicos colocados sobre, en, o debajo de la piel. Dichos dispositivos incluyen parches, implantes, e inyecciones que liberan el principio activo mediante mecanismos de liberación pasiva o activa. Las administraciones transdérmicas incluyen toda la administración a través de la superficie del cuerpo y de los revestimientos interiores del paso corporal incluyendo tejidos epiteliales y mucosales. Dichas administraciones pueden llevarse a cabo usando las presentes composiciones en lociones, cremas, espumas, parches, suspensiones, soluciones, y supositorios (rectales y vaginales).

La administración transdérmica puede lograrse mediante el uso de un parche transdérmico que contiene un principio activo (es decir, un anticuerpo anti-claudina-1 o un fragmento biológicamente activo del mismo) y un vehículo que no es tóxico para la piel, y permite la administración del principio para absorción sistémica en el torrente sanguíneo a través de la piel. El vehículo puede adoptar cualquier forma, tal como cremas y pomadas, pastas, geles, y dispositivos oclusivos. Las cremas y pomadas pueden ser un líquido viscoso o emulsiones semisólidas del tipo de aceite en agua o agua en aceite. Pueden ser adecuadas las pastas compuestas por polvos absorbentes dispersos en petróleo o petróleo hidrófilo que contienen el principio activo. Una variedad de dispositivos oclusivos puede usarse para liberar el principio activo en el torrente sanguíneo, tal como una membrana semipermeable que recubre un reservorio que contiene el principio activo con o sin un vehículo, o una matriz que contiene el principio activo.

Las formulaciones de supositorio pueden fabricarse a partir de materiales tradicionales, incluyendo manteca de cacao, con o sin la adición de ceras para alterar el punto de fusión del supositorio, y glicerina. Las bases de supositorio solubles en agua, tales como polietilenglicoles de varios pesos moleculares, también pueden usarse.

Los materiales y métodos para producir varias formulaciones se conocen en la técnica y pueden adaptarse para poner en práctica la invención objeto. Las formulaciones adecuadas para la administración de anticuerpos pueden encontrarse, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W. Martin, 18ª Ed., 1990, Mack Publishing Co.: Easton, PA.

### **B. Agentes biológicamente activos adicionales**

En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-claudina-1, o un fragmento biológicamente activo del mismo, es el único principio activo en una composición farmacéutica de la presente invención. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende además uno o más agentes biológicamente activos. Los ejemplos de agentes biológicamente activos adecuados incluyen, pero sin limitación, agentes terapéuticos tales como agentes antivirales, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores, analgésicos, agentes antimicrobianos, inhibidores de quinasa, inhibidores de la señalización, agentes antibacterianos, antibióticos, antioxidantes, agentes antisépticos y combinaciones de los mismos.

En dichas composiciones farmacéuticas, el anticuerpo anti-claudina-1 y el agente o agentes terapéuticos adicionales pueden combinarse en una o más preparaciones para la administración simultánea, por separado o secuencial del anticuerpo anti-claudina-1 y el agente o agentes terapéuticos. Más específicamente, una composición inventiva puede formularse de tal modo que el anticuerpo y el agente o agentes terapéuticos puedan administrarse en conjunto o independientemente entre sí. Por ejemplo, un anticuerpo anti-claudina-1 y un agente terapéutico pueden formularse en conjunto en una sola composición. Como alternativa, pueden mantenerse (p. ej., en diferentes composiciones y/o envases) y administrarse por separado.

### **C. Paquetes o kits farmacéuticos**

En otro aspecto, la presente invención proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases (p. ej., viales, ampollas, tubos de ensayo, matraces o frascos) que contienen uno o más ingredientes de una composición farmacéutica inventiva, que permite la administración un anticuerpo anti-claudina-1, o un fragmento biológicamente activo del mismo.

Los diferentes ingredientes de un paquete o kit farmacéutico pueden suministrarse en una forma sólida (p. ej., liofilizada) o líquida. Cada ingrediente será generalmente adecuado como alícuotas en su envase respectivo o se proporcionará en forma concentrada. Los paquetes o kits farmacéuticos pueden incluir medios para la reconstitución de ingredientes liofilizados. Los envases individuales de los kits se mantienen preferentemente en confinamiento cercano para la venta comercial.

En ciertas realizaciones, un paquete o kit farmacéutico incluye uno o más agentes terapéuticos adicionales como se ha descrito anteriormente. Opcionalmente asociado con el envase o los envases puede haber un aviso o prospecto en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicho aviso la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana. El aviso del prospecto puede contener instrucciones para el uso de una composición farmacéutica de acuerdo con métodos de tratamiento divulgados en el presente documento.

Un identificador, p. ej., un código de barras, radiofrecuencia, etiquetas ID, etc., puede estar presente en o sobre el kit. El identificador se puede usar, por ejemplo, para identificar de forma particular el kit con fines de control de calidad, control de inventario, seguimiento del movimiento entre estaciones de trabajo, etc.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen algunos de los modos preferentes para hacer y practicar la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que los ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Es más, a menos que la descripción en un Ejemplo se presente en tiempo pasado, el texto, como el resto de la memoria descriptiva, no pretende sugerir que los experimentos se realizaron realmente o que los datos se obtienen realmente.

Algunos de los resultados notificados a continuación se presentan en un manuscrito: T. Baumert *et al.*, "A Claudin-1-specific Monoclonal Antibody for Prevention and Treatment of Hepatocellular Carcinoma", que se ha presentado para su publicación.

### Ejemplo 1

#### Materiales y métodos

**Reactivos y anticuerpos.** Los anticuerpos monoclonales anti-claudina-1 (mAbs anti-CLDN1 se produjeron como se ha descrito previamente (Fofana *et al.*, Gastroenterology, 2010, 139: 953-964, e1-4). Erlotinib se adquirió en IC Laboratories; y el interferón-alfa 2a en Roche. Daclatasvir y sofosbuvir fueron sintetizados por Acme Biosciences. Pioglitazona, metformina y DMSO se adquirieron en Sigma-Aldrich. El kit de matriz fosfo-RTK humano se obtuvo de R&D Systems. El reactivo ECL e Hyperfilms se adquirieron en GE Healthcare. La IgG (cabra) anti-ratón conjugado con Alexa-Fluor® 647 y la IgG (cabra) anti-humano conjugado con Alexa-Fluor® 647 se adquirieron en Jackson ImmunoResearch. Dapi se obtuvo de Life Technologies.

**Líneas celulares.** Las células Huh7.5.1 ya se han descrito (Zhong *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(26): 9294-9299). Para la detención de la proliferación y la diferenciación (células Huh7.5.1<sup>diff</sup>), se cultivaron de 2,5.10<sup>4</sup> a 3,10<sup>4</sup> células Huh7.5.1 en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía un 1 % de dimetilsulfóxido (DMSO).

**Infección por VHC de las células Huh7.5.1<sup>diff</sup>.** Jc1 de VHCcc derivado de cultivo celular (genotipo 2a/2a) (Pietschmann *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(19): 7408-7413) se generaron en células Huh7.5.1 como se ha descrito anteriormente (Wakita *et al.*, Nat Med., 2005,11(7): 791-796). La infectividad del VHCcc se determinó calculando las dosis infectivas para el 50 % del cultivo tisular (TCID<sub>50</sub>) en experimentos de infección como se ha descrito previamente (Lindenbach *et al.*, Science, 2005, 309(5734): 623-626). La infección por VHC se evaluó mediante qRT-PCR del ARN del VHC intracelular (Xiao *et al.*, Gut, 2015, 64(3): 483-494), así como mediante inmunotinción usando un anticuerpo AP33 específico de E2 de VHC como se ha descrito previamente (Krieger *et al.*, Hepatology. 2010, 51(4): 1144-1157).

**Análisis transcripcionales.** Las células hepáticas se lisaron en el reactivo TRI (Molecular Research Center), y el ARN se purificó usando Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad y la calidad del ARN se evaluaron usando NanoDrop (ThermoScientific) y Bioanalyzer 2100 (Illumina). El perfil de expresión génica se realizó usando 250-500 ng de ARN total usando el sistema nCounter Digital Analyzer (NanoString).

**Análisis de fosforilación.** El análisis de fosforilación se llevó a cabo usando el kit de matriz de fosfoquinasas de Proteome Prolifer (R&D Systems) como describió anteriormente el fabricante. Para obtener imágenes, las transferencias se incubaron con ECL (GE Healthcare) y se expusieron a ECL Hyperfilm (GE Healthcare). Los resultados de la matriz de fosfoquinasas se cuantificaron integrando las densidades de membrana de transferencia puntual mediante el software Image J (NIH).

**Efecto de los antivirales y las pequeñas moléculas sobre la firma de riesgo de CHC.** Siete (7) días después de la infección por Jc1 de VHC, las células Huh7.5.1<sup>diff</sup> se incubaron con una combinación de 1 nM de daclatasvir y 1 µM de sofosbuvir; 10 UI/ml de interferón-alfa 2a; 1, 10 o 100 µg/ml de mAb específico de CLDN1; o erlotinib 0,1 mM en presencia de 1 % de DMSO. Las células incubadas con un 1 % de DMSO sirvieron como control negativo. Tres (3) días después del tratamiento, las células se lisaron, el ARN total se purificó como se ha descrito anteriormente, y se analizó la expresión génica y la carga viral intracelular como se ha descrito anteriormente.

**Análisis bioinformáticos y estadísticos.** La predicción del resultado clínico basada en la firma de 186 genes se realizó tal y como se ha notificado previamente usando el algoritmo de predicción de plantilla más cercana, que se implementó en GenePattern (King *et al.*, Gut, 2014, 20. pii: gutjnl-2014-307862. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307862; Hoshida *et al.*, PLoS ONE, 2010, 5(11), e15543). Se determinó una predicción de la firma génica de alto o bajo riesgo de CHC usando  $p < 0,05$  y TDF  $< 0,25$ . La inducción/supresión de cada conjunto de genes a lo largo del tiempo según la infección por Jc1 de VHC y el control no infectado se evaluó mediante los módulos GSEA y GSEA de muestra única (ssGSEA) implementados en GenePattern como se ha descrito anteriormente (Subramanian *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(43): 15545-15550; Barbie *et al.*, Nature, 2009, 462(7269): 108-112). El análisis de enriquecimiento de vías se realizó con ToppGene Suite (página web: toppgene.cch-mc.org) como se ha descrito anteriormente (Chen *et al.*, Nucleic Acids Res., 2009, 37(Web Server issue): W305-311). Los genes del ensayo nCounter se consideraron significativamente expresados con una prueba t TDF  $< 0,05$  y múltiplos de cambio de  $\pm 1,8$ . A partir de los genes expresados de manera diferencial, se realizó un análisis de redes usando las vías canónicas del repositorio de la Base de Conocimiento de Ingenuity (Ingenuity Systems Inc.).

## Resultados

**Firma de riesgo de 186 genes de CHC.** El presente estudio hace uso de una firma de riesgo de 186 genes de CHC en tejido hepático no canceroso, que ha mostrado estar fuertemente asociada con el riesgo predictivo de CHC en pacientes con cirrosis provocada por el virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la hepatitis B (VHB) y el alcoholismo (Hoshida *et al.*, N Engl J Med., 2008, 359(19): 1995-2004; Hoshida *et al.*, Gastroenterology, 2013, 144(5): 1024-1030; King *et al.*, Gut, 2014, 20. pii: gutjnl-2014-307862. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307862; King *et al.*, PLoS ONE, 2014, 9(12): e114747) en múltiples cohortes independientes de pacientes asiáticos, europeos y americanos con cirrosis y CHC provocados por múltiples etiologías en función de hasta 23 años de seguimiento. Esta firma génica comprendía 73 genes de alto riesgo de CHC en el hígado, que estaban regulados al alza, y 103 genes de bajo riesgo de CHC, que estaban regulados a la baja en los tejidos hepáticos (Hoshida *et al.*, Gastroenterology, 2013, 144(5): 1024-1030).

El análisis de las vías moleculares había revelado que la infección crónica por VHC en el hígado humano aumenta la activación de NF-κB, de la interleucina-6, así como las de las vías del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y suprime los genes relacionados con la reparación del ADN (Hernandez-Gea *et al.*, Gastroenterology, 2013, 144(3): 512-527). La firma demostró una capacidad pronóstica sustancialmente superior (Hoshida *et al.*, J Hepatol., 2014, 61(1S): S79-S90) en comparación con las variantes pronósticas del ADN identificadas en estudios de casos y controles o de cohortes a gran escala (Kumar *et al.*, Nat Genet., 2011, 43(5): 455-458; Miki *et al.*, Nat Genet., 2011, 43(8): 797-800; Abu Dayyeh *et al.*, Gastroenterology, 2011, 141(1): 141-149). En modelos de roedores de CHC de origen cirroso, la firma fue inducida desde una etapa muy temprana de la fibrosis hepática, y se revirtió en respuesta al inhibidor de la vía del EGF aprobado por la FDA, erlotinib, acompañado de una reducción de la fibrosis hepática y de los nódulos de CHC (Fuchs *et al.*, Hepatology, 2014, 59(4): 1577-1590).

Por tanto, la firma de riesgo de 186 genes de CHC representa una valiosa herramienta para supervisar la progresión del CHC y comprender qué vías desempeñan un papel en el desarrollo del CHC. Aprovechando esta observación, los presentes solicitantes han desarrollado recientemente un sistema simple y robusto basado en células hepáticas con una firma de riesgo de 186 genes de CHC inducible. La firma de riesgo de CHC fue inducida por la infección persistente por VHB, la infección por VHC o la exposición al etanol. Usando este modelo, han identificado los impulsores de la firma de alto riesgo de CHC, incluyendo la señalización del EGFR, y mostraron la reversión de la firma de alto riesgo de CHC por erlotinib (S. Bandiera *et al.*, "A cell-based model unravels drivers for hepatocarcinogenesis and targets for clinical chemoprevention", que se presentó para su publicación en Nature Medicine el 12 de marzo de 2015. Este modelo celular permite desentrañar los circuitos celulares de la progresión de la enfermedad hepática en los pacientes e identificar dianas de quimiopreención del CHC para su evaluación clínica.

**Se descubrió que un mAb específico de CLDN1 revertía la firma de expresión génica de alto riesgo de CHC en un modelo basado en células hepáticas para la progresión de la enfermedad hepática y la hepatocarcinogénesis.** Para evaluar el papel del mAb anti-CLDN1 en la quimiopreención del CHC, los Solicitantes usaron un modelo desarrollado previamente basado en células Huh7.5.1 poco proliferativas (Huh7.5.1<sup>diff</sup>) en las que la firma de 186 genes relacionada con el CHC puede inducirse fácilmente tras la exposición a VHC recombinante cepa Jc1 - Bauhofer *et al.*, Gastroenterology, 2012, 143(2): 429-438 e8) (véase la Figura 1A). El mAb específico de CLDN1 se añadió a las células Huh7.5.1<sup>diff</sup> 7 días después de la inoculación viral, un punto de tiempo en el que la gran mayoría de las células estaba infectada de forma continua por VHC, según se evaluó mediante un ensayo

inmunocitoquímico (véase la Figura 1B). Ertolinib se usó como control positivo para la reversión de la firma génica. A continuación, se evaluó el efecto del tratamiento con mAb específico de CLDN1 en la expresión de la firma de 186 genes relacionada con VHC inducido por VHC usando la tecnología de recuento de transcritos digital (ensayo nCounter) (Hoshida *et al.*, N Engl J Med., 2008, 359(19): 1995-2004; King *et al.*, Gut, 2014, 20. pii: gutjnl-2014-307862. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307862). El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) indicó que los genes de alto riesgo de CHC estaban intensamente suprimidos (PEN: -2,29, TDF < 0,001), y los genes de bajo riesgo de CHC se indujeron significativamente (PEN: 1,73, TDF < 0,001) en las muestras tratadas con mAb específico de CLDN1. Es más, mediante un análisis computacional que usa un modelo de predicción de CHC que aplica un algoritmo de plantilla más cercana (Hoshida *et al.*, PLoS ONE, 2010, 5(11): e15543), los Solicitantes demostraron una reversión estadísticamente significativa de la firma de 186 genes en todas las muestras infectadas por el VHC de forma continua tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1 (véase la Tabla 1 a continuación).

**Tabla 1. El modelo de predicción de CHC mostró la reversión de los genes de alto riesgo de CHC tras el mAb específico de CLDN1.** Las células Huh7.5.1<sup>diff</sup> fueron infectadas por Jc1 de VHC. El ARN celular total se aisló y

sometió al análisis NanoString. Los datos de expresión génica se sometieron a la predicción de plantilla más cercana (NTP) de la firma de riesgo de 186 genes de CHC en células Huh7.5.1<sup>diff</sup> infectadas por el VHC y tratadas con 10 y 100 µg/ml de mAb específico de CLDN1, el análisis se realizó usando GenePattern. Se obtuvieron mapas de calor (datos no mostrados). Las células infectadas por el VHC (Ctrl) y tratadas (CLDN1\_10 o CLDN1\_100) se predijeron como de alto y bajo riesgo de CHC. A continuación se presentan las cifras estadísticas del NTP. Los valores p TDF < 0,05 se consideraron significativos.

10 µg/ml		100 µg/ml	
Muestra	valor p	Muestra	valor p
CTRL_10_3	0,0005	CTRL_100_3	0,0005
CTRL_10_2	0,0005	CTRL_100_2	0,0005
CTRL_10_1	0,008	CTRL_100_1	0,0075
CLDN1_10_2	0,0005	CLDN1_100_2	0,004
CLDN1_10_3	0,0005	CLDN1_100_1	0,0055
CLDN1_10_1	0,0005	CLDN1_100_3	0,001

**Se descubrió que el mAb específico de CLDN1 revertía la firma de riesgo de 186 genes de CHC en las células de forma más potente que los antivirales de acción directa y que los compuestos candidatos a la quimioprevención del CHC.** Sorprendentemente, el efecto del mAb específico de CLDN1 fue más potente que el de ertolinib, que indujo una supresión parcial de los genes de alto riesgo de CHC (PEN: -1,28, TDF=0,08) y la inducción de los genes de bajo riesgo de CHC (PEN: 1,26, TDF=0,09) (véase la Figura 1C).

Para evaluar aún más la potencia del mAb específico de CLDN1 en la reversión de la firma génica de riesgo de CHC, los Solicitantes compararon sus efectos con los de los antivirales de acción directa (AADs), interferón alfa y pioglitazona, compuestos que los presentes Solicitantes han mostrado previamente que suprimen parcialmente los genes de alto riesgo de CHC usando GSEA. Metformina, un compuesto que anteriormente se demostró que no presentaba ningún efecto sobre la firma de riesgo de CHC, se usó como control negativo. Los presentes Solicitantes descubrieron que el mAb específico de CLDN1 revierte los genes de alto riesgo de CHC de forma más potente que los otros compuestos analizados (véase la Figura 2A). De forma notable, a diferencia de los AAD, la supresión de los genes de alto riesgo del CHC inducida por el mAb específico de CLDN1 parece ser independiente de su efecto sobre la carga viral, ya que concentraciones muy bajas de este anticuerpo monoclonal que no modulan la carga viral en las células Huh7.5.1<sup>diff</sup> fueron potentes para revertir la firma de 186 genes (véase la Figura 2B).

Tomados en conjunto, estos datos indican que el mAb específico de CLDN1 revierte de forma potente la firma de riesgo de CHC inducida por el VHC independientemente de su efecto antiviral.

**Se descubrió que el mAb específico de CLDN1 afectaba a la señalización de EGF-MAPK como impulsor de la hepatocarcinogénesis.** Los Solicitantes han mostrado previamente que el VHC usa el EGFR y la claudina-1 como factores de dependencia del huésped para introducir el hepatocito en un cultivo celular e *in vivo* (Mailly *et al.*, Clearance of persistent hepatitis C virus infection using a claudin-1-targeting monoclonal antibody, Nat Biotech, 2015, 33(5): 549-554; Lupberger *et al.*, Hepatology, 2013, 58(4): 1225-1235; Lupberger *et al.*, Nat Med., 2011, 17(5): 589-559; Zona *et al.*, Cell Host Microbe, 2013, 13(3): 302-313). Para evaluar si el VHC no solo aprovecha el EGFR y el CLDN1 para entrar, sino que también desencadena cascadas de señalización intracelular, los presentes Solicitantes investigaron la señalización inducida por el virus en células hepáticas infectadas por el virus. Aprovechando el novedoso sistema modelo para estudiar la biología de la enfermedad del VHC (véase la Figura 1), examinaron el estado de activación de las vías de señalización canónicas de los hepatocitos, como se ha descrito anteriormente (Lupberger *et al.*, Hepatology, 2013, 58(4): 1225-1235; Lupberger *et al.*, Nat Med., 2011, 17(5): 589-59; Zona *et al.*, Cell Host Microbe, 2013, 13(3): 302-313). Observaron que la infección por VHC desencadena la activación de redes de señalización específicas del huésped, incluyendo la vía del EGFR, tal y como muestra la fosforilación del EGFR inducida por el virus (véase la Figura 3A-B), la expresión aumentada de EGF y EGFR y la inducción significativa de firmas génicas diana de EGF definidas experimentalmente (véase la Figura 3C). Resulta interesante que, también se observara una inducción de la vía de EGF/EGFR en las células infectadas por el VHB, así como en las tratadas con etanol, aunque a un nivel inferior (véase la Figura 3D-E).

El análisis de las vías de señalización corriente abajo reveló la fosforilación de la quinasa regulada por la señal extracelular (ERK) inducida por VHC (véase la Figura 3F). Dado que se ha identificado que la vía del EGFR está fuertemente asociada a la hepatocarcinogénesis en pacientes (Hoshida *et al.*, N Engl J Med., 2008, 359(19):1995-2004; Hoshida *et al.*, Gastroenterology, 2013, 144(5):1024-1030; King *et al.*, Gut, 2014, 20. pii: gutjnl-2014-307862. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307862; King *et al.*, PLoS ONE, 2014, 9(12): e114747; Abu Dayyeh *et al.*, Gastroenterology, 2011, 141(1): 141-149) y un impulsor del CHC en modelos animales (Fuchs *et al.*, Hepatology, 2014, 59(4): 1577-1590; Lanaya *et al.*, Nat Cell Biol., 2014, 16(10): 972-981, 1-7), es probable que la activación de las vías de EGFR-ERK1/2 inducida por el virus contribuya a la hepatocarcinogénesis. Notablemente, los datos de perturbación muestran que el mAb anti-claudina 1 inhibe la señalización de ERK1/2 (véase la Figura 3F). También se observó una supresión significativa de la expresión génica de la vía del EGFR mediante el análisis de las firmas oncogénicas del EGFR en el cáncer (véase la Figura 3G). El GSEA de muestra única (ssGSEA) mostró la supresión de la señalización del EGFR y de los genes relacionados con el EGFR incluso a dosis bajas del anticuerpo específico de CLDN1 (datos no mostrados). La implicación de la vía del EGFR se vio respaldada por el análisis de la red de genes expresados de manera diferencial que mostraba la supresión de las vías de señalización del EGFR (véase la Figura 4A) y de MAPK (véase la Figura 4B).

**Se observó que el mAb específico de CLDN1 afectaba a la expresión de los genes relacionados con la enfermedad hepática, así como de los genes de la respuesta inflamatoria, que son impulsores de la hepatocarcinogénesis.** Es más, el análisis de enriquecimiento funcional de los genes expresados de manera diferencial mostró que los genes de respuesta inflamatoria, incluyendo la señalización de NF- $\kappa$ B, VEB, LMP1, MyD88 y TLR, estaban regulados a la baja como se muestra en la parte A de la Tabla 2 a continuación y en la Figura 5, mientras que la expresión de los genes implicados en las vías metastásicas estaba regulada al alza (véase la parte B de la Tabla 2 a continuación).

**Tabla 2. El tratamiento con mAb específico de CLDN1 suprime los genes relacionados con la inflamación e induce los genes relacionados con el metabolismo.** Las células Huh7.5.1<sup>diff</sup> fueron infectadas por Jc1 de VHC. Tras el aislamiento del ARN total se sometieron al análisis NanoString. Los valores de expresión de la intensidad se normalizaron y transformaron en logaritmos. Los genes expresados de manera diferencial tienen valores p TDF <0,05 y un múltiplo de cambio de  $\pm 1,9$ . El análisis de las vías se realizó usando ToppGene Suite **A**. Los genes regulados a la baja pertenecen a la señalización de MAPK, NF- $\kappa$ B, y receptor tipo Toll, mientras que **B**. los genes regulados al alza pertenecen a las vías relacionadas con el metabolismo.

	valor p	valor q TDF
<b>A. Vías de genes regulados a la baja</b>		
Inducción de NF $\kappa$ B y MAP quinasas	8.75E-05	2.02E-02
Cascada dependiente de MyD88	9.81E-05	2.02E-02
Cascada del receptor tipo Toll 7/8 (TLR7/8)	9.81E-05	2.02E-02
Cascada del receptor tipo Toll 9 (TLR9)	1.22E-04	2.02E-02
Cascada del receptor tipo Toll 3 (TLR3)	1.83E-04	2.02E-02
Señalización del VEB LMP1	2.24E-04	2.16E-02
Fosforilación de CREB	6.11E-04	4.28E-02
<b>B. Vías de genes regulados al alza</b>		
Transporte de electrones respiratorio	5.77E-09	2.06E-06
El ciclo del ácido tricarboxílico (TCA)	7.50E-09	2.06E-06
Metabolismo de las proteínas	1.11E-05	5.57E-04
Regulación de la cascada del complemento	3.01E-04	1.10E-02
Complejo del proteasoma	6.23E-04	2.14E-02
Recuperación de nucleótidos de purina	1.66E-03	4.14E-02
Biosíntesis de novo de nucleótidos de purina	1.66E-03	4.14E-02

Resulta interesante que, ocho (8) de los nueve (9) genes que previamente se demostró que eran inducidos por diferentes impulsores del CHC, incluyendo HCV, VHB o el tratamiento con etanol (véase Bandiera *et al.*, "A cell-based model unravels drivers for hepatocarcinogenesis and target for clinical chemoprevention", que fue enviado a Nature Medicine para su publicación el 12 de marzo de 2015 por los Solicitantes), se suprimieron tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1 (véase la Tabla 3 a continuación). Por último, los presentes Solicitantes mostraron que el anticuerpo específico de claudina-1 suprime la expresión de los genes implicados en enfermedades hepáticas (véase la Figura 6).

**Tabla 3. El tratamiento con mAb específico de CLDN1 regula a la baja los genes habitualmente inducidos por diferentes impulsores del CHC, incluyendo la infección por VHC y VHB y el tratamiento con etanol.** Las cifras estadísticas, Los valores p TDF < 0,05 se consideraron significativos.

Símbolo del gen	Nombre del gen	valor p TDF	Múltiplos de cambio
ANXA3	Anexina A3	0,001	-1,92
FILIP1L	Tipo proteína 1 de interacción con filamina A	0,0014	-1,92
DUSP5	Fosfatasa de especificidad doble 5	0,002	-1,94
ANXA1	Anexina A1	0,005	-1,93
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	0,005	-1,94
SLC12A2	Familia de transportadores de solutos 12 (transportador de sodio/potasio/cloruro), miembro 2	0,006	-1,95
PODXL	Tipo podocalixina	0,022	-1,95
LOXL2	Tipo lisil oxidasa 2	0,036	-1,93

En conjunto, estos datos indican que el mAb específico de CLDN1 revierte el riesgo de hepatocarcinogénesis, probablemente por el deterioro de la señalización de EGF-MAPK y la expresión de los genes de la respuesta inflamatoria.

5

## Discusión

En el presente estudio, los Solicitantes han mostrado que CLDN1, un factor de entrada del VHC bien caracterizado y una diana antiviral para prevenir y tratar la infección por VHC, es una diana no descubierta anteriormente para la prevención y tratamiento del CHC. Demostraron que un mAb específico de CLDN1 revierte los genes de alto riesgo de CHC en un sistema modelo basado en células hepáticas donde una firma de riesgo de CHC común a diferentes etiologías fue inducida por la infección continua por VHC. De forma notable, el anticuerpo monoclonal específico de CLDN1 revirtió esta firma de riesgo de CHC de forma más potente que otros antivirales (antivirales de acción directa, interferón alfa) o posibles agentes quimiopreventivos del CHC (erlotinib, pioglitazona) que analizaron. Resulta interesante que, el mAb específico de CLDN1 que se descubrió fuese capaz de revertir la firma de riesgo de CHC a concentraciones que no tienen efecto sobre la carga del VHC, lo que demuestra que el mAb específico de CLDN1 puede prevenir la progresión del CHC independientemente de su efecto como agente antiviral y, por tanto, presentar una amplia actividad quimioprotectora del CHC independientemente de la etiología subyacente. De hecho, los presentes Solicitantes han mostrado que el mAb específico de CLDN1 revierte la expresión de 8 de los 9 genes comúnmente inducidos por diferentes etiologías de CHC, con la excepción de *GPX2*. En conjunto, estos datos alientan la promesa de CLDN1 como diana para la quimioprevención del CHC.

La expresión de CLDN1 aumenta durante el CHC, en particular en pacientes con hígado cirrótico (Stebbing *et al.*, *Oncogene*, 2013, 32(41): 4871-4872) y se ha mostrado que contribuye a la transición epitelial a mesenquimal (TEM), una etapa temprana en la progresión tumoral. El mecanismo molecular subyacente puede implicar las cascadas de señalización intracelular corriente abajo de CLDN1 principalmente a través de la activación del eje c-Abl-PKC-ERK1/2 que promueve la transición epitelial a mesenquimal (TEM) a través de la activación de MMP-2 (Suh *et al.*, *Oncogene*, 2013, 32(41):4873-4882; Yoon *et al.*, *J Biol Chem.*, 2010, 285(1): 226-233). De hecho, en el presente estudio, los Solicitantes mostraron que el mAb específico de CLDN1 afecta a la señalización de EGFR/MAPK (véase la Figura 3F,G), un impulsor de la hepatocarcinogénesis (Fuchs *et al.*, *Hepatology*, 2014, 59(4): 1577-1590; Lanaya *et al.*, *Nat Cell Biol.*, 2014, 16(10): 972-981, 1-7). Complementario a estas observaciones, el análisis de enriquecimiento funcional mostró que el mAb específico de CLDN1 suprimió la expresión de las vías relacionadas con el EGF (véase la Figura 4A) y la señalización de MAPK (véase la Figura 4B). Por otra parte, se mostró que la vía inflamatoria de NF-KB estaba suprimida (véase la Figura 5). Esta vía desempeña un papel importante en el agravamiento de la lesión hepática mediante la promoción de respuestas inflamatorias en hígados fibróticos y favorece la progresión hacia el CHC y la metástasis en una fase posterior (Ning *et al.*, *Hepatology*, 2014, 60(5): 1607-1619; Shen *et al.*, *Hepatology*, 2014, 60(6): 2065-2076; Song *et al.*, *Hepatology*, 2014, 60(5): 1659-1673). Es más, varias vías pertenecientes a la señalización de MyD88, un actor importante en la señalización de los receptores tipo Toll, así como las vías de TLR7 y 9 fueron reguladas a la baja tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1 (véase la Parte A de la Tabla 1 anterior). Recientemente, se ha sugerido que estas vías son potenciales dianas terapéuticas del CHC, ya que desempeñan un papel en la inducción de respuestas inflamatorias durante el CHC (Leake *et al.*, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, 2014, 11(9): 518; Mohamed *et al.*, *Liver Int.*, 2015, 64(3): 483-494).

Teniendo en cuenta la capacidad del mAb específico de CLDN1 para revertir la señalización (véanse las Figuras 1-3) y las respuestas inflamatorias que impulsan la hepatocarcinogénesis (véanse las Figuras 3 a 5) (Fuchs *et al.*, *Hepatology*, 2014, 59(4):1577-1590; Suh *et al.*, *Oncogene*, 2013, 32(41): 4873-4882; Stebbing *et al.*, *Oncogene*, 2013;32(41):4871-4872; Song *et al.*, *Hepatology*, 2014, 60(5): 1659-1673; Fortier *et al.*, *J Biol Chem.*, 2013, 288(16): 11555-11571), así como la supresión de la firma génica de riesgo de CHC bien caracterizada (véase la Figura 2) asociada a la progresión de la enfermedad hepática (Hoshida *et al.*, *N Engl J Med.*, 2008, 359(19): 1995-2004; Hoshida *et al.*, *Gastroenterology*, 2013, 144(5):1024-1030; King *et al.*, *Gut*, 2014, 20. pii: gutjnl-2014-307862. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307862; King *et al.*, *PLoS ONE*, 2014, 9(12): e114747; Abu Dayyeh *et al.*, *Gastroenterology*, 2011, 141(1): 141-149; Fuchs *et al.*, *Hepatology*, 2014, 59(4): 1577-1590), el mAb específico de CLDN1 es adecuado para la prevención y tratamiento del CHC. Dada su capacidad para revertir la firma génica de riesgo de CHC independientemente de la etiología y de su efecto antiviral, se abren perspectivas para usar mAbs específicos de

CLDN1 para prevenir y tratar el CHC independientemente de la causa etiológica, incluidos los pacientes con infección por VHC curada y los pacientes con CHC debido a la infección crónica por el virus de la hepatitis B, alcohol, enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) o enfermedad hepática autoinmune o hereditaria.

## 5 Ejemplo 2

### Materiales y métodos

10 **Líneas celulares.** Células de la línea celular Huh7.5.1 (Zhong *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(26): 9294-9299) se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía un 1 % de dimetilsulfóxido (DMSO) para su diferenciación (Huh7.5.1<sup>diff</sup>). Las células HepG2 que sobreexpresan NTCP (HepG2-NTCP) se seleccionaron usando puromicina y se cultivaron en DMEM (Ni *et al.*, Gastroenterology, 2014, 146: 1070-1083; Yan *et al.*, eLife, 2012; 1:e00049).

15 **Infección por VHC y tratamiento con mAb específico de CLDN1.** Las células Huh7.5.1<sup>diff</sup> se sembraron en placas de 6 pocillos y se infectaron con Jc1 de VHCcc (genotipo 2a/2a) (Pietschmann *et al.*, PNAS USA, 2006, 103: 7408-7413; Wakita *et al.*, Nature Medicine. 2005, 11(7): 791-796). Se añadió un mAb específico de CLDN1 o un Ab de control (10 µg/ml) en el día 7 posterior a la infección. La infección por el VHC se evaluó en el día 10 mediante qRT-PCR del ARN intracelular como se ha descrito anteriormente (Xiaa *et al.*, PLoS pathogens. 2014, 10(5): e1004128).

20 **Infección por VHB y tratamiento con mAb específico de CLDN1.** Las células HepG2-NTCP se sembraron en placas de 12 pocillos y se infectaron con VHB recombinante (cepa ayw, genotipo D) (Ladner *et al.*, Antimicrobial agents and chemotherapy, 1997, 41(8): 1715-20) o VHB purificado en suero (Habersetzer *et al.*, Liver international: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver, 2015, 35(1): 130-139). Se añadió un mAb específico de CLDN1 humano o un Ab de control (10 µg/ml) durante 7 días. Se añadió un mAb específico de CLDN1 de rata o un Ab de control (10 µg/ml) durante 3 días después de 7 días de infección. La infección por VHB se evaluó en el día 7 o 10 después de la infección mediante la cuantificación por qRT-PCR del ARN pregenómico del VHB (ARNpg) como se ha descrito anteriormente (Verrier *et al.*, Hepatology, 2016, 63(1): 35-48).

30 **Tratamiento con etanol.** Las células Huh7.5.1<sup>diff</sup> se sembraron en placas de 6 pocillos y se expusieron a etanol (40 mM) y se trataron con Ab específico de CLDN1 o de control (10 µg/ml) durante 10 días. El medio fresco que contenía etanol y anticuerpos se reponía diariamente (Ye *et al.*, Drug and alcohol dependence, 2010, 112(1-2): 107-116).

35 **Análisis transcripcionales.** Véase el Ejemplo 1 para más detalles. La expresión de la firma génica de riesgo de CHC se analizó usando la tecnología de RT-PCR de alto rendimiento de Biomark HD (Baker *et al.*, Nature Med., 2012, 9(6): 541-544). La expresión de los genes regulados por la TEM se evaluó mediante ensayos de expresión génica qRT-PCR Taqman (Life Technologies, EE.UU.). Los niveles de expresión se normalizaron a GAPDG. La expresión relativa se calculó mediante el método  $\Delta\Delta CT$ .

40 **Análisis bioinformáticos y estadísticos.** La inducción/supresión del control de firma génica de alto o bajo riesgo se evaluó mediante GSEA con TDF < 0,25 o usando puntuaciones de enriquecimiento (PE) para genes individuales y puntuaciones de enriquecimiento normalizado (PEN) para conjuntos de genes (Subramanian *et al.*, PNAS USA, 20005, 102(43): 15545-15550).

45 **Metabólica.** Las células Huh7.5.1<sup>diff</sup> infectadas por el VHC fueron tratadas con mAb específico de CLDN1 en el día 7 posterior a la infección. En el día 10 posterior a la infección, los metabolitos se extrajeron y analizaron por espectrometría de masas. Los datos se analizaron con MetaboAnalyst 3.0 (Xia *et al.*, Nucleic Acids Research, 2015, 43(W1): W251-W257).

### 50 Resultados

**Los mAbs específicos de CLDN1 revierten la firma de 32 genes de riesgo de CHC de pan-etología derivada del paciente en un modelo basado en células hepáticas infectadas por el VHB.** Para evaluar el potencial de los mAbs anti-CLDN1 para la prevención del CHC inducido por otras etiologías distintas de la infección por VHC, los Solicitantes evaluaron a continuación su capacidad para revertir los genes de riesgo de CHC modulados por la infección por VHB. Recientemente, una firma de 32 genes derivada de la firma de 186 genes de riesgo de CHC previamente descrita ha mostrado tener la mayor importancia para la predicción de la progresión de la enfermedad hepática y el desarrollo de CHC en todas las principales etiologías de CHC (VHC, VHB, alcohol y EHNA (King *et al.*, Gut, 2014, 64(8): 1296-1302). Las células derivadas de hígado HepG2 que sobreexpresan NTCP, un factor de entrada celular para VHB, fueron infectadas por el VHB y tratadas con mAbs específicos de CLDN1 humano o de control durante 7 días (Figura 7A). El tratamiento con el mAb específico de CLDN1 humano dio lugar a la inducción de la expresión génica de bajo riesgo de CHC y a la supresión de los genes de alto riesgo de CHC (Figura 7C). Estos resultados indican que los mAbs específicos de CLDN1 revierten la expresión génica de riesgo de CHC inducida por la infección por VHB y sugieren que los mAbs específicos de CLDN1 pueden presentar una actividad quimiopreventiva contra el CHC inducido por VHB.

**Los mAbs específicos de CLDN1 revierten la firma de 32 genes de riesgo de CHC de pan-etilogía derivada del paciente en un modelo basado en células hepáticas expuestas a etanol.** Después, para determinar el potencial del mAb anti-CLDN1 para la prevención del CHC inducido por el consumo de alcohol, los Solicitantes evaluaron la capacidad del anticuerpo para revertir los genes de riesgo de CHC modulados por una exposición de 10 días al etanol en células Huh7.5.1<sup>dif</sup> (Figura 8A). De este modo investigaron si la firma de riesgo de 32 genes de CHC (King *et al.*, Gut, 2014, 64(8): 1296-1302) puede revertirse en las células Huh7.5.1<sup>dif</sup> tras el tratamiento de las células expuestas al etanol con mAbs específicos de CLDN1. El tratamiento con el mAb específico de CLDN1 humano dio lugar a la inducción de la expresión génica de bajo riesgo de CHC y a la supresión de la expresión génica de alto riesgo de CHC en células expuestas a etanol (Figura 8B). Estos resultados indican que los mAbs específicos de CLDN1 revierten la expresión génica de riesgo de CHC inducida por la exposición a etanol y sugieren que los mAbs específicos de CLDN1 pueden presentar una actividad quimiopreventiva contra el CHC inducido por el consumo de alcohol.

**El mAb específico de CLDN1 revierte el cambio metabólico tipo Warburg asociado con el aumento del riesgo de cáncer y el cáncer en el modelo basado en células hepáticas.** El perfil metabólico basado en la espectrometría de masas de las células Huh7.5.1<sup>dif</sup> infectadas por Jc1 de VHC reveló la alteración de los grupos de metabolitos en estado estacionario en los hepatocitos, incluyendo efectos pronunciados en lactato. Es más, el análisis de marcado metabólico demostró un aumento del flujo entrante de lactato en los hepatocitos infectados por Jc1 de VHC - un cambio metabólico tipo Warburg conocido asociado a la transformación maligna y al cáncer (Cantor *et al.*, Cancer discovery, 2012, 2(10): 881-898). Para evaluar si el mAb específico de CLDN1 humano es capaz de revertir este cambio metabólico asociado con un mayor riesgo de cáncer y cáncer, las células Huh7.5.1<sup>dif</sup> se infectaron crónicamente por VHC y luego se trataron con el mAb específico de CLDN1 humanizado antes del análisis de metabolitos por espectrometría de masas (Figura 9A). El perfil metabólico de las células tratadas con el mAb específico de CLDN1 y las células de infección simulada indicaron que el Ab específico de CLDN1 humanizado revierte el cambio metabólico inducido por VHC en las células derivadas del hígado (datos no mostrados). El análisis de marcado metabólico demostró que el flujo de lactato inducido por VHC se restablece al nivel de las células no infectadas tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1 (Figura 9B). Es más, las expresiones de varios metabolitos pertenecientes al ciclo de Krebs se restauraron a sus niveles de expresión en las células no infectadas tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1 de las células infectadas por el VHC (Figura 9C). Tomados en conjunto, estos datos indican que el mAb específico de CLDN1 revierte el cambio metabólico asociado a la transformación maligna o al cáncer. Esto sugiere que el mAb específico de CLDN1 puede prevenir la transformación maligna de los hepatocitos, así como tratar el CHC.

**El tratamiento con mAb específico de CLDN1 revierte los reguladores de la transición epitelial a mesenquimal (TEM).** La TEM es una etapa temprano en la metástasis, durante la cual las células cancerosas pierden la polaridad y sufren una reorganización de las proteínas del citoesqueleto y de la unión celular (Lamouille *et al.*, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014, 15(3): 178-196). Es inducida por los factores de transcripción Snail, Slug y Zeb1 que se han asociado con la capacidad de invasión del tumor (Nie *et al.*, Oncogene, 2015, doi: 10.1038/onc.2015.428). Para seguir estudiando el potencial de los mAbs específicos de CLDN1 para prevenir el desarrollo del cáncer o tratar el CHC, los Solicitantes evaluaron la capacidad del mAb específico de CLDN1 humanizado para modular la expresión de los genes implicados en la TEM. Las células Huh7.5.1<sup>dif</sup> se infectaron crónicamente por Jc1 de VHC y luego se trataron con el mAb específico de CLDN1 humanizado (Figura 10A) antes de evaluar la expresión de los genes inducidos durante la TEM. La expresión de *SNAI1*, *SNAI2*, y *ZEB1* fue regulada a la baja por el mAb específico de CLDN1 humanizado (Figura 10B). Es más, los genes pertenecientes a la firma de 186 genes de CHC y desregulados en el trascurso de la TEM (Anastassiou *et al.*, BMC cancer. 2011;11:529; Medici *et al.*, Molecular Biology of the Cell, 2008, 19(11):4875-4887) se revirtieron tras el tratamiento con mAb específico de CLDN1 (Figura 10C). Estos resultados muestran que el mAb específico de CLDN1 revierte la expresión de los genes implicados en la TEM, lo que sugiere que la limitación de la progresión de la TEM mediada por el mAb específico de CLDN1 podría contribuir a prevenir la progresión del desarrollo del CHC, así como a tratar el CHC establecido.

## Conclusión

En conjunto, los datos presentados aquí demuestran que los mAb específicos de CLDN1 humanos, de ratas y ratones revierten la expresión de los genes de la firma de riesgo de CHC que predice fuertemente la enfermedad hepática y el desarrollo de CHC en pacientes con diversas etiologías de CHC. El impacto funcional del mAb para la prevención y tratamiento de la progresión de la enfermedad hepática y el desarrollo de CHC se demostró al mostrar que el tratamiento con mAb dio lugar a la reducción de la expresión de los genes implicados en la progresión de la TEM, así como una reversión del cambio metabólico tipo Warburg en las células hepáticas asociado con la transformación maligna y el cáncer. Dado que los mAbs específicos de CLDN1 revierten la expresión génica de riesgo de CHC inducida por las principales causas de CHC (infección por VHC, infección por VHB y etanol), los mAbs son adecuados para prevenir y/o tratar el CHC independientemente de su etiología, incluyendo causas virales, metabólicas y otras causas.

**Ejemplo 3****Materiales y métodos**

5 Ratones macho C3H/He de 5 semanas de edad (Janvier Labs, Saint Berthevin, Francia) recibieron una única inyección intraperitoneal de dietilnitrosamina (DEN, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, Francia), un modelo animal bien establecido para la enfermedad hepática progresiva y el CHC (Frey *et al.*, Carcinogenesis, 2000, 21: 161-166). En la semana 18 después de la inyección, se sacrificaron dos ratones para evaluar la inducción de la enfermedad hepática (Figura 11A). Entre las semanas 18 y 23, los ratones restantes recibieron inyecciones intraperitoneales semanales de PBS o de mAb anti-CLDN1 de ratón (20 mg/kg) durante 5 semanas (Figura 11A). Una semana después de la quinta inyección de mAb anti-CLDN1, es decir, en la semana 23 después de la inyección de DEN, todos los ratones fueron sacrificados y los hígados fueron recolectados y una parte fue fijada en formalina para el análisis histológico FFPE (tinción de hematoxilina/eosina), así como tinción tricrómica.

**Resultados**

15 Para evaluar el efecto del mAb específico de claudina-1 para la prevención y tratamiento de la enfermedad hepática progresiva y el CHC *in vivo*, los Solicitantes usaron el modelo de ratón de dietilnitrosamina (DEN) para la enfermedad hepática y el CHC. La DEN es una sustancia química cancerígena, que se ha demostrado que induce fuertemente esteatosis hepática, fibrosis, cirrosis y CHC en modelos animales. Los modelos de DEN se han usado satisfactoriamente para estudios de prueba de concepto del tratamiento con fármacos de la progresión de la enfermedad hepática y de los fármacos quimiopreventivos del CHC (Fuchs *et al.*, Hepatology, 2014, 59: 1577-1590; Ip *et al.*, Cancer Prev. Res. (Phila), 2013, 6: 1304-1306; Haider *et al.*, Mol. Cancer Ther., 2013, 12(10): 1947-1957; Park *et al.*, J. Cell Physiol., 2012, 227(3): 899-908).

25 En ratones C3H/He, una única administración de DEN produjo una esteatosis microvacuolar que afectó a alrededor del 10 % del hígado, como muestran los análisis histopatológicos realizados en la semana 18 después de la administración de DEN (Figura 11B, flechas). La esteatosis hepática se observó en un patrón focal y se localizó predominantemente en el espacio periportal (Figura 11B, panel izquierdo). Es más, La DEN provocó carcinogénesis hepática como muestra el desarrollo de un tumor hepático tras la administración de DEN (Figura 11E).

30 A continuación, se estudió el efecto del anticuerpo específico de CLDN1 sobre la enfermedad hepática y la carcinogénesis después de que los animales hubieran recibido el tratamiento con el anticuerpo durante cinco semanas. Si bien todos los animales de control siguieron desarrollando esteatosis hepática en la semana 23 después de la administración de DEN, no se observó esteatosis en los ratones que habían recibido el tratamiento con el anticuerpo específico de CLDN1 (Figura 11C, D). De manera análoga, si bien se observó un nódulo tumoral en la superficie del hígado de un ratón de control (ratón n.º 8841 en la Figura 11E), no se detectó ningún tumor en ninguno de los ratones tratados con el anticuerpo específico de CLDN1 (datos no mostrados).

40 En conjunto, estos resultados demuestran que el mAb anti-CLDN1 revierte la esteatosis hepática, mejora la enfermedad hepática y proporciona un efecto quimiopreventivo del CHC en un modelo de ratón del estado de la técnica para la enfermedad hepática progresiva y el CHC.

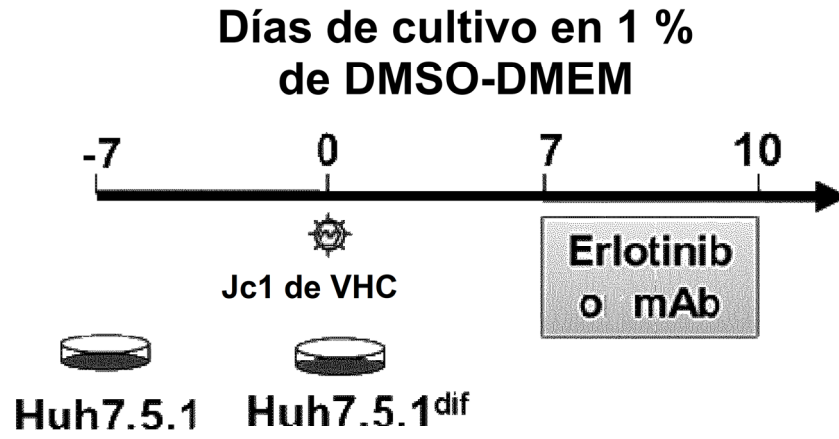
**Otras realizaciones**

45 Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de una consideración de la memoria descriptiva o práctica de la invención divulgada en el presente documento. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren solo de manera ilustrativa, estando indicado el alcance real de la invención en las siguientes reivindicaciones.

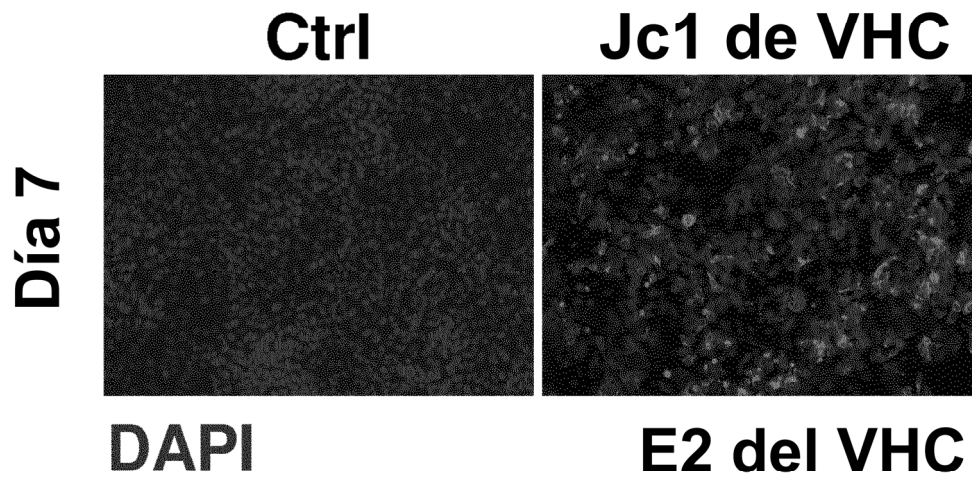
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo anti-claudina 1 para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) en un sujeto, en donde el anticuerpo anti-claudina 1 actúa sobre el dominio extracelular de claudina-1.
- 10 2. El anticuerpo anti-claudina 1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la EHGNA es esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).
3. El anticuerpo anti-claudina 1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la EHGNA no está asociada al VHC.
- 15 4. El anticuerpo anti-claudina 1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el sujeto nunca ha estado infectado por el VHC o se ha curado de la infección por el VHC.
5. El anticuerpo anti-claudina 1 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la progresión de la EHGNA se ralentiza, reduce, detiene, alivia o revierte.
- 20 6. El anticuerpo anti-claudina 1 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo anti-claudina 1 es un anticuerpo monoclonal.
- 25 7. El anticuerpo anti-claudina 1 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo anti-claudina 1 es un anticuerpo monoclonal secretado por una línea celular de hibridoma depositada en el DSMZ el 29 de julio de 2008 con un número de acceso seleccionado del grupo que consiste en DSM ACC2931, DSM ACC2932, DSM ACC2933, DSM ACC2934, DSM ACC2935, DSM ACC2936, DSM ACC2937 y DSM ACC2938.
- 30 8. El anticuerpo anti-claudina 1 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo anti-claudina 1 comprende las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de un anticuerpo monoclonal secretado por una línea celular de hibridoma como se define en la reivindicación 7.
9. El anticuerpo anti-claudina 1 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo está humanizado, desimmunizado o es quimérico.
- 35 10. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-claudina 1 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento o la prevención de una EHGNA en un sujeto, en donde el anticuerpo anti-claudina 1 actúa sobre el dominio extracelular de claudina-1.
- 40 11. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la EHGNA es EHNA.
12. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde la EHGNA no está asociada al VHC.
- 45 13. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el sujeto nunca ha estado infectado por el VHC o se ha curado de la infección por el VHC.
14. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde la progresión de la EHGNA se ralentiza, reduce, detiene, alivia o revierte.
- 50 15. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde el anticuerpo monoclonal anti-claudina 1 es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.
16. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 que comprende además un agente terapéutico adicional.
- 55 17. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en agentes antivirales, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores, analgésicos, agentes antimicrobianos, inhibidores de quinasa, moléculas que interfieren con la señalización, agentes antibacterianos, antibióticos, antioxidantes, agentes antisépticos, agentes anticancerosos y combinaciones de los mismos.
- 60

**A**



**B**



**Figura 1(A)-(B)**

C

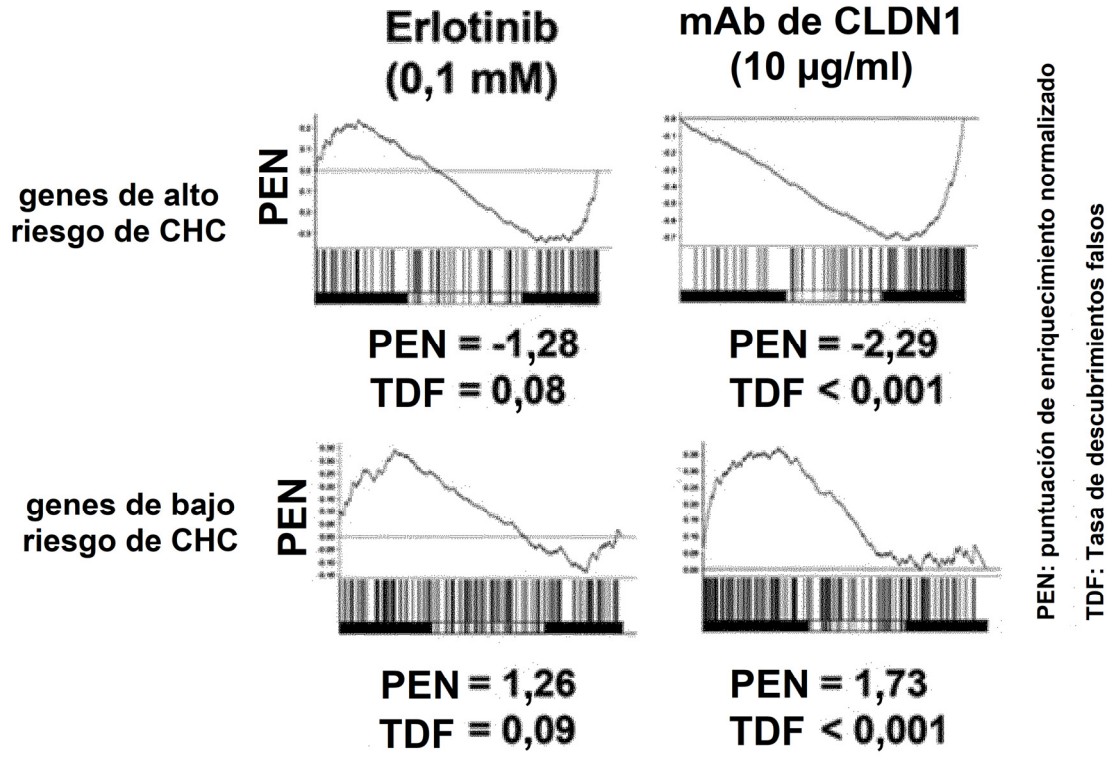


Figura 1(C)

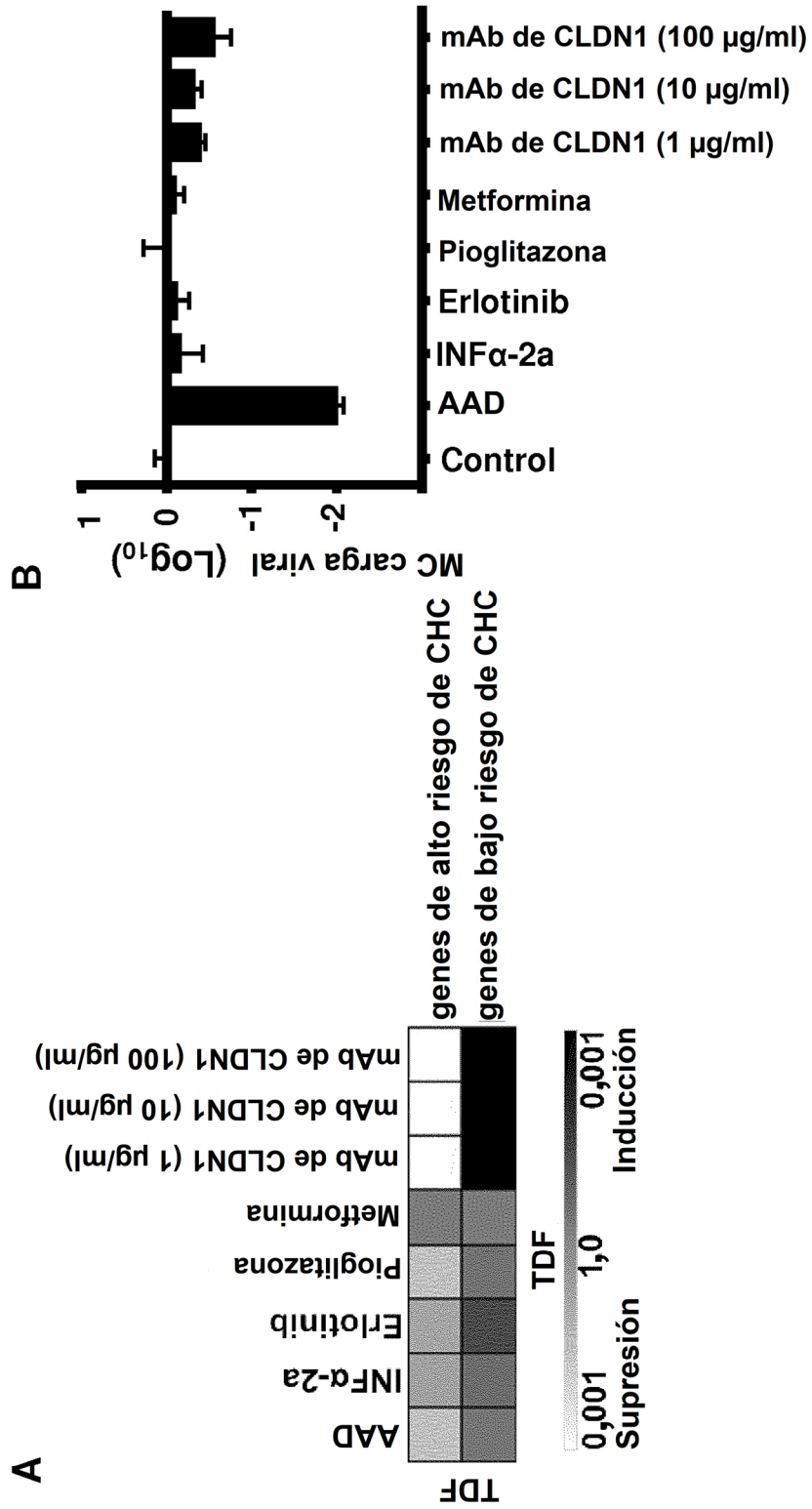


Figura 2

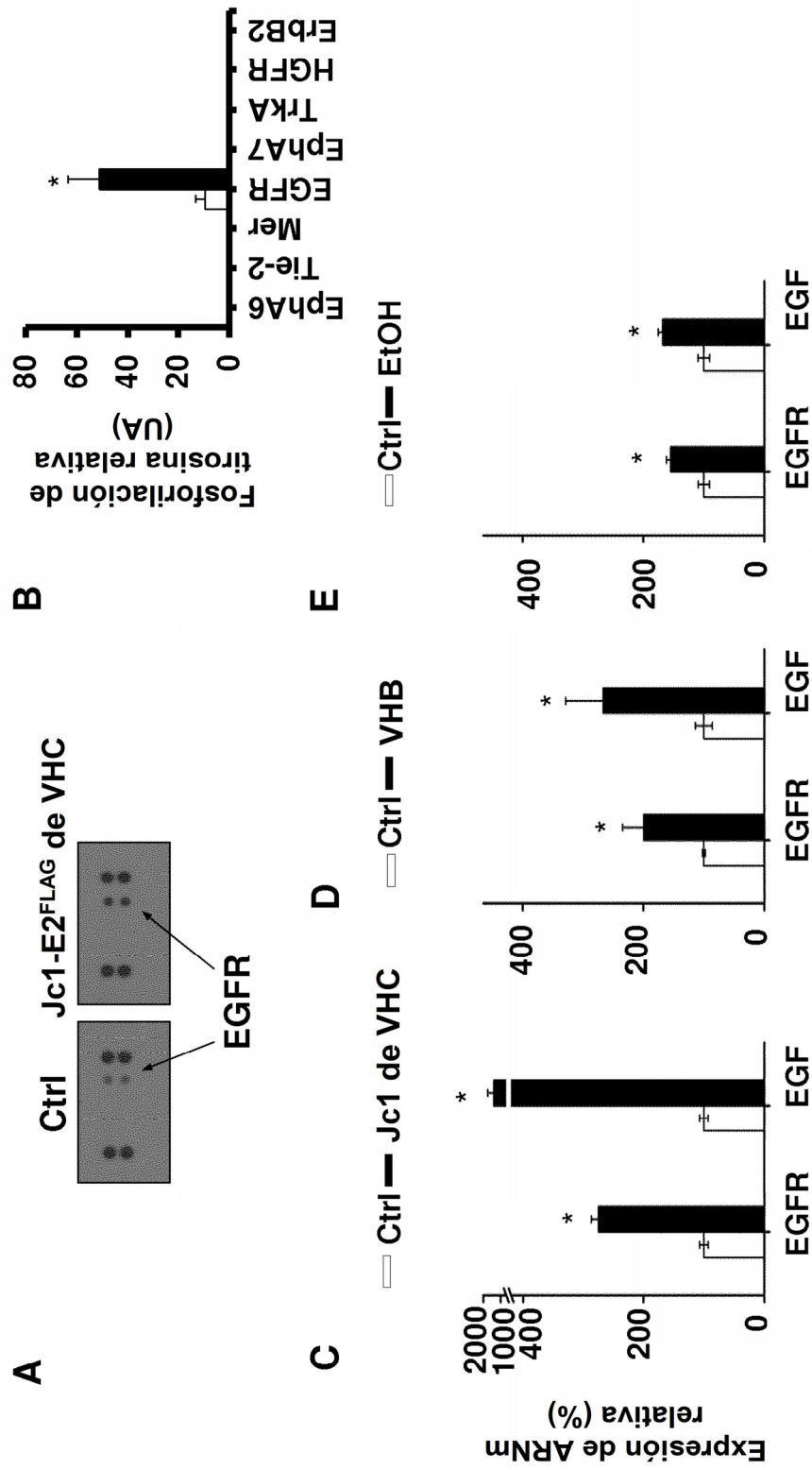


Figura 3(A)-(E)

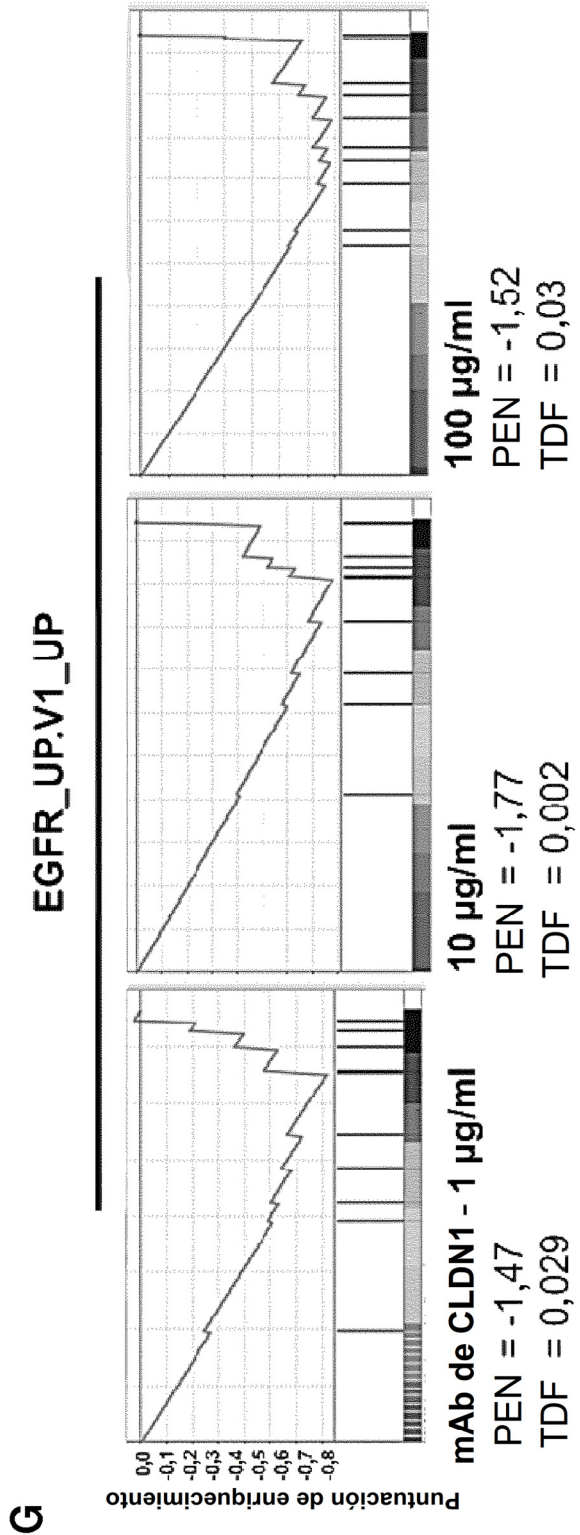
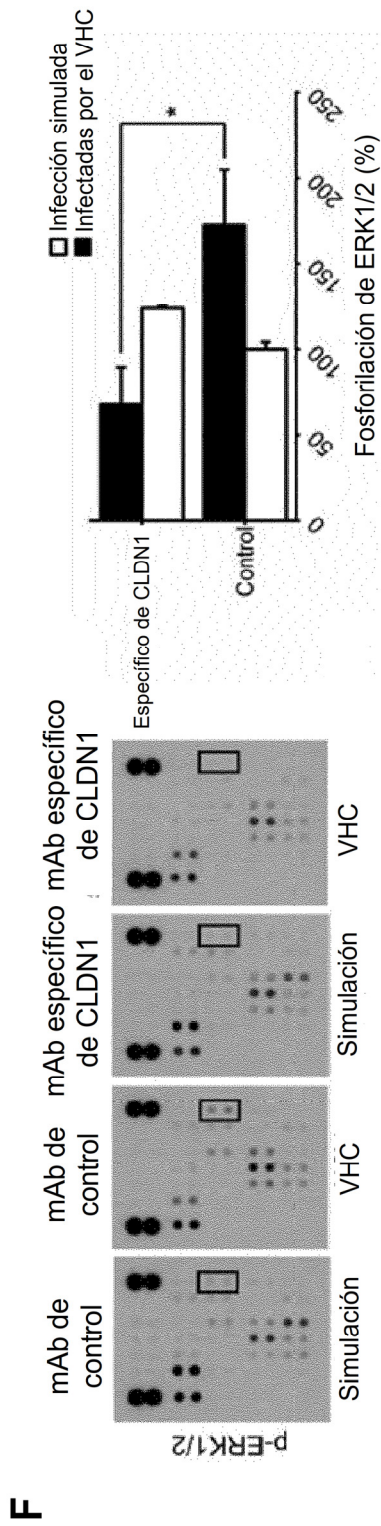
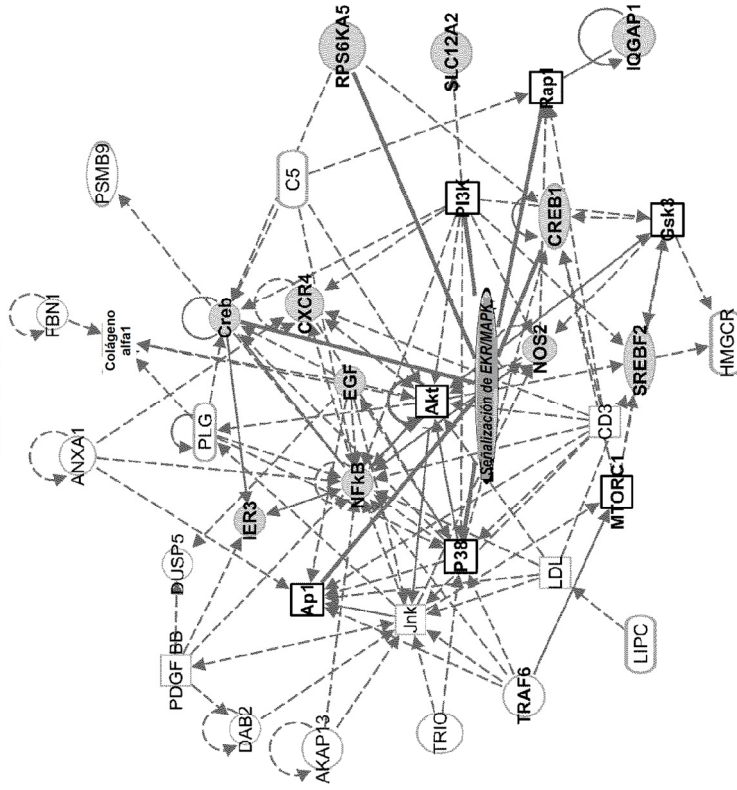
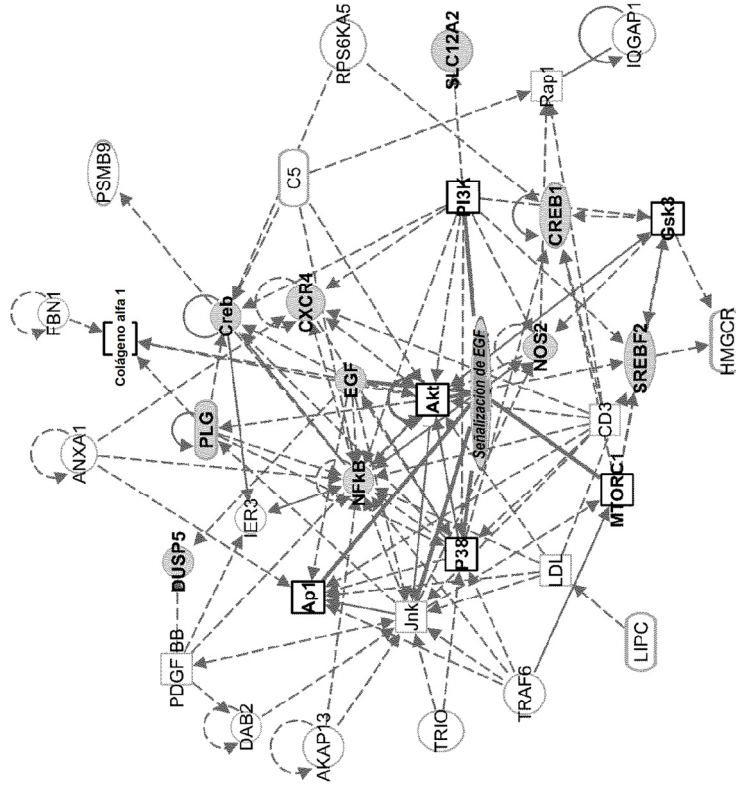


Figura 3(F)-(G)

**B** Supresión de la expresión génica relacionada con la señalización de MAPK



**A** Supresión de las vías de señalización de EGFR



**Figura 4**



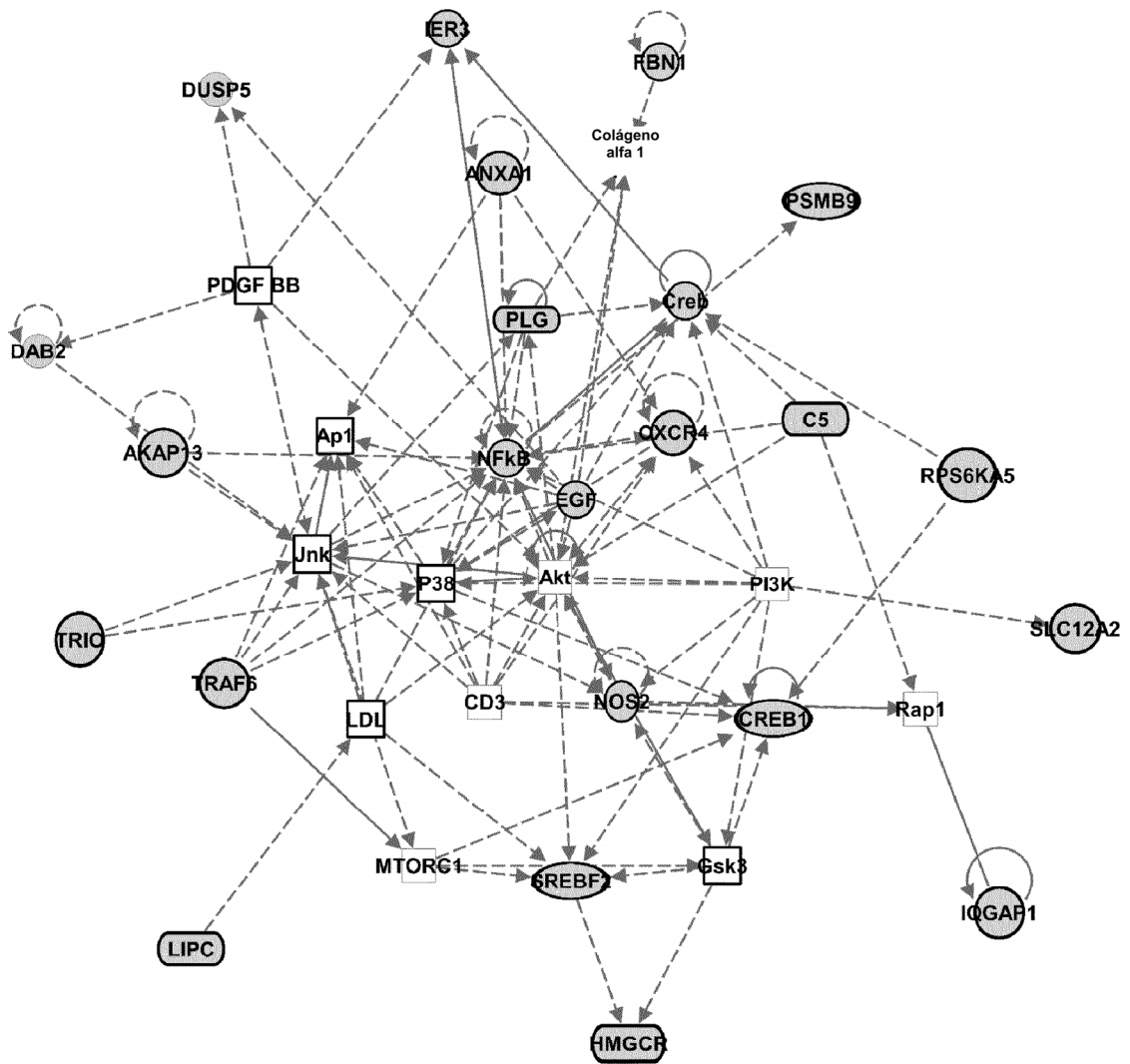
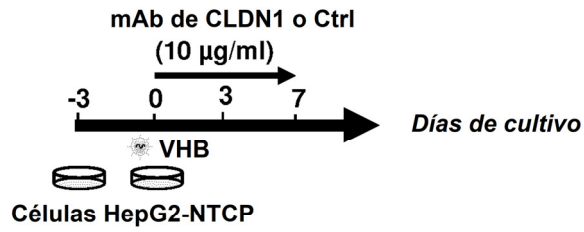
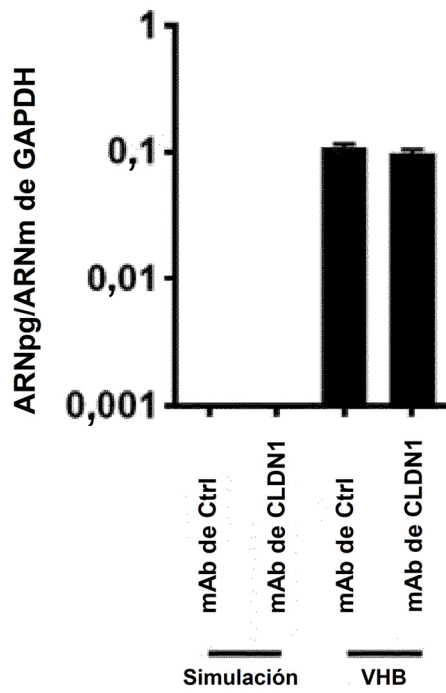


Figura 6

**A**



**B**



**C**

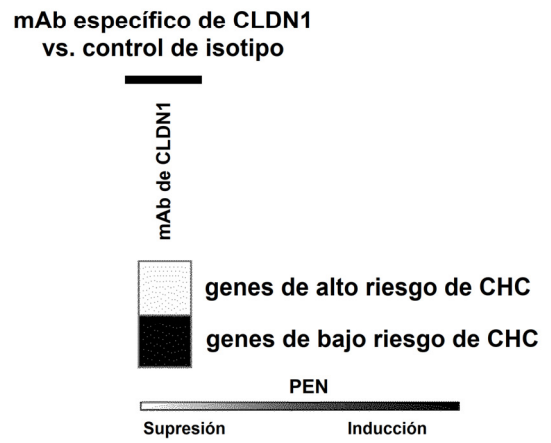


Figura 7

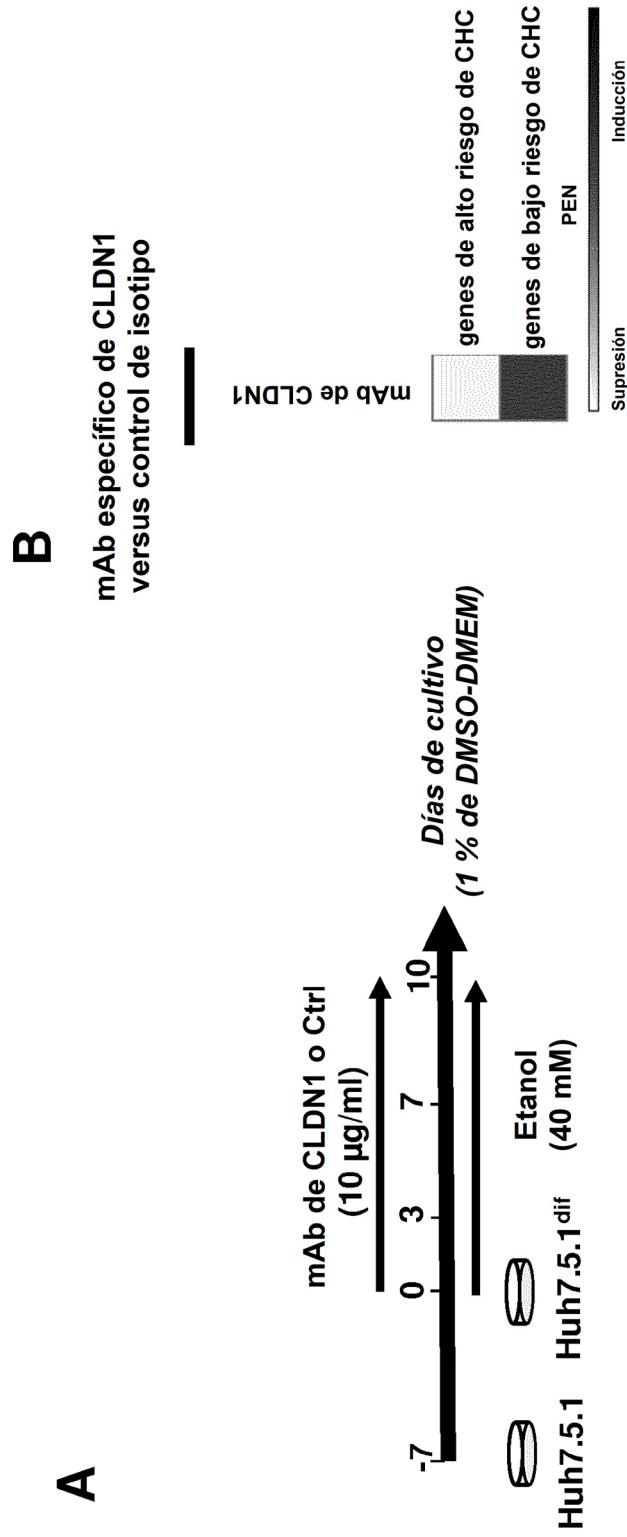
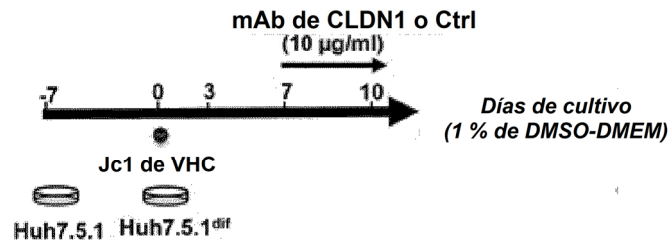


Figura 8

A



B

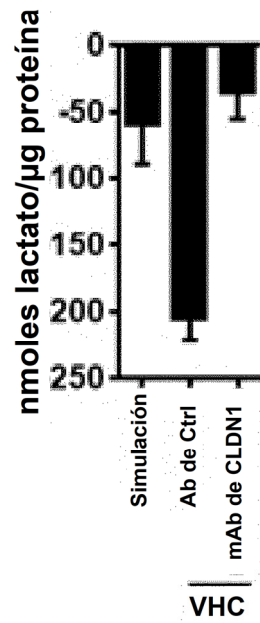


Figura 9(A)-(B)

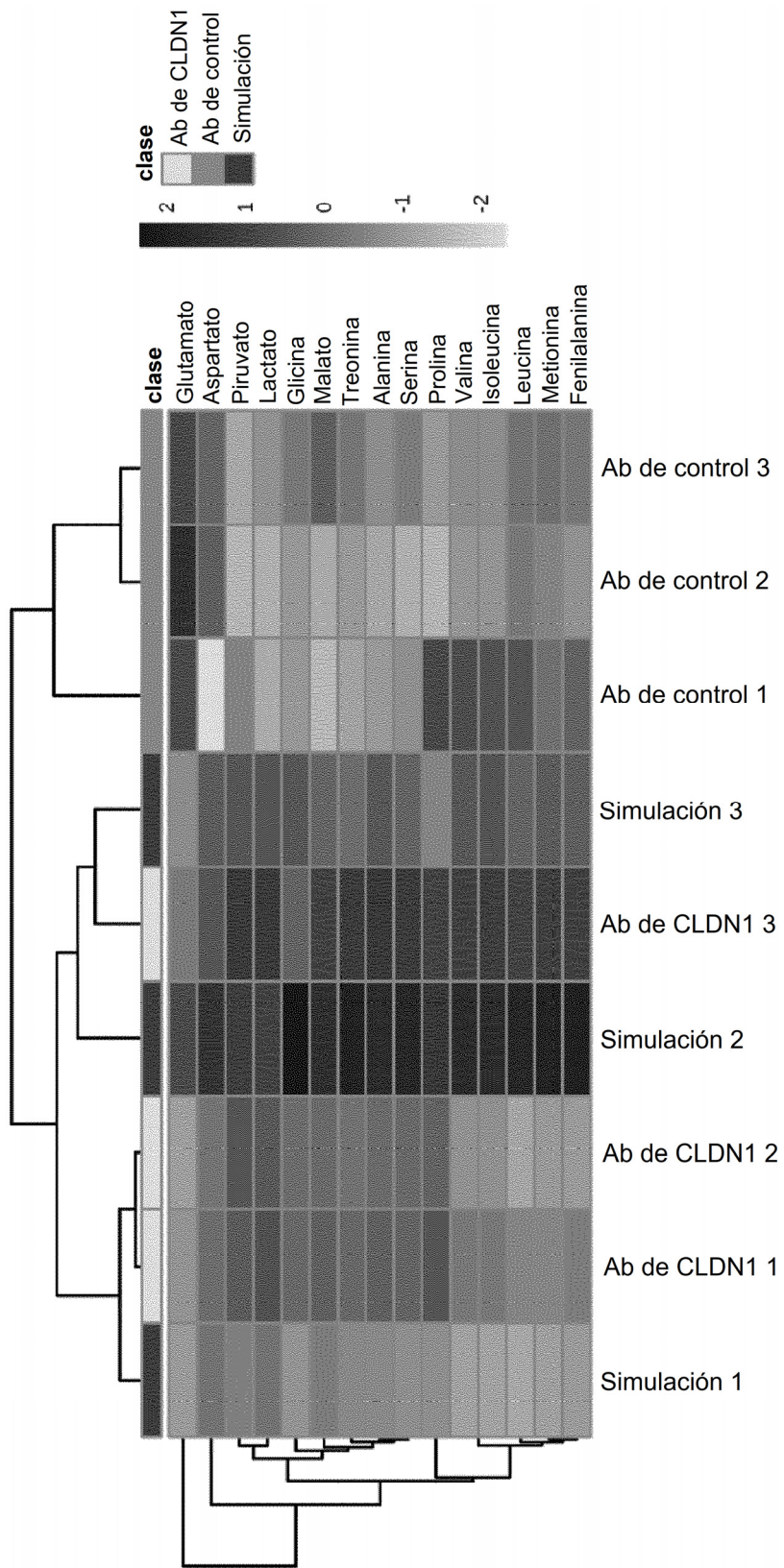
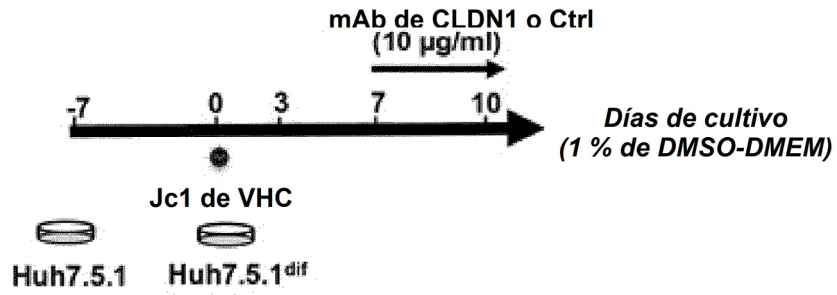
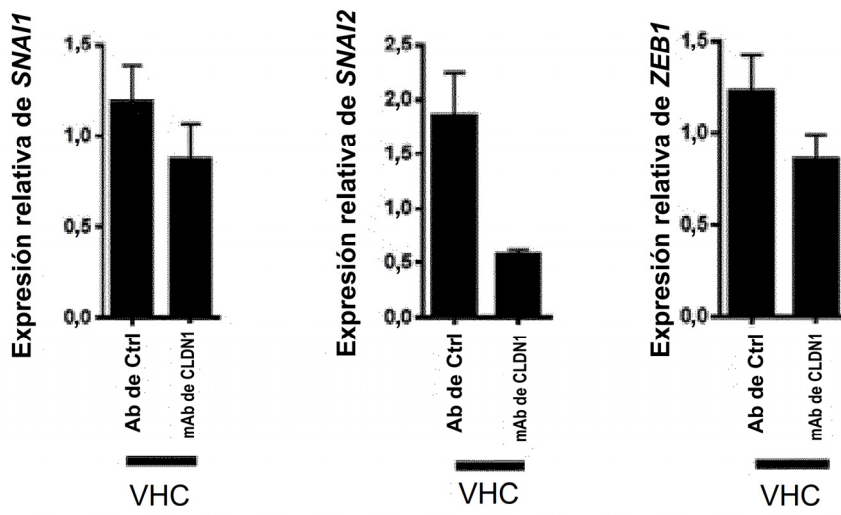


Figura 9(C)

**A**



**B**



**C**

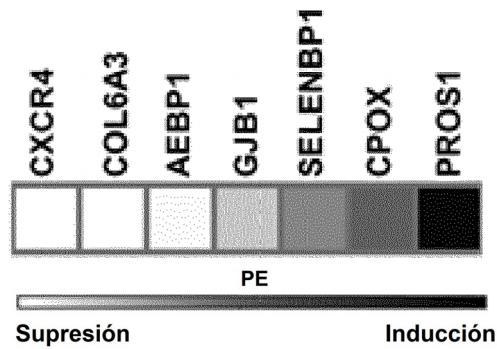


Figura 10

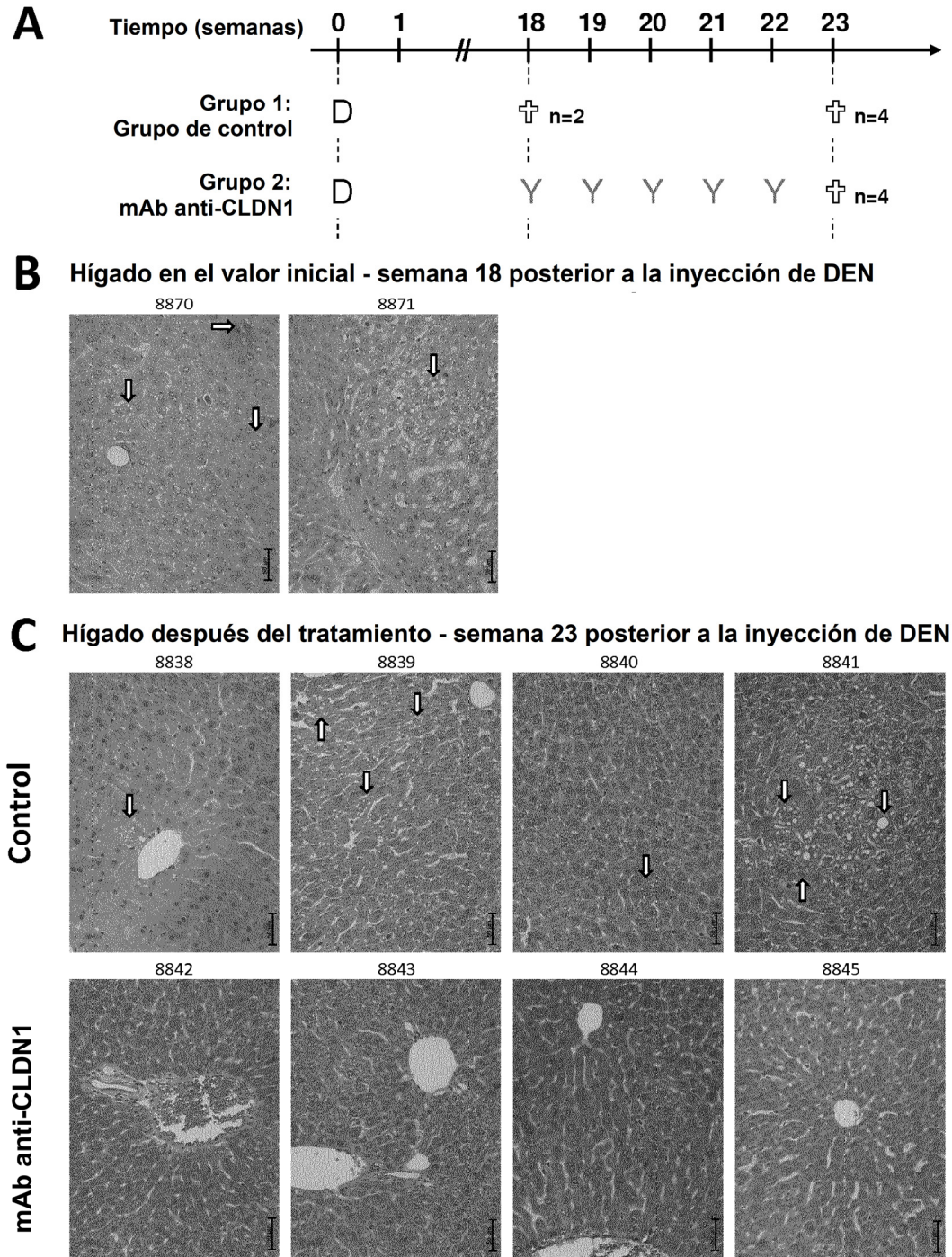
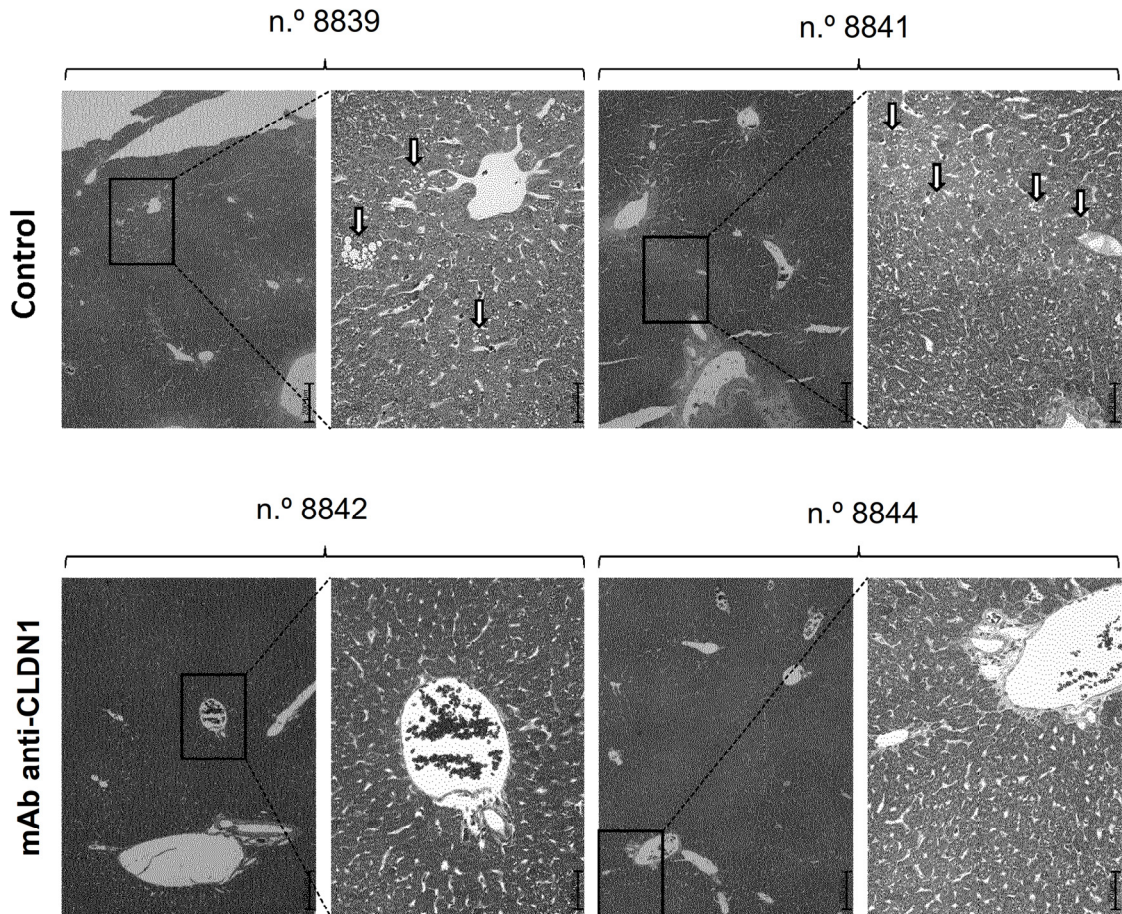


Figura 11(A)-(C)

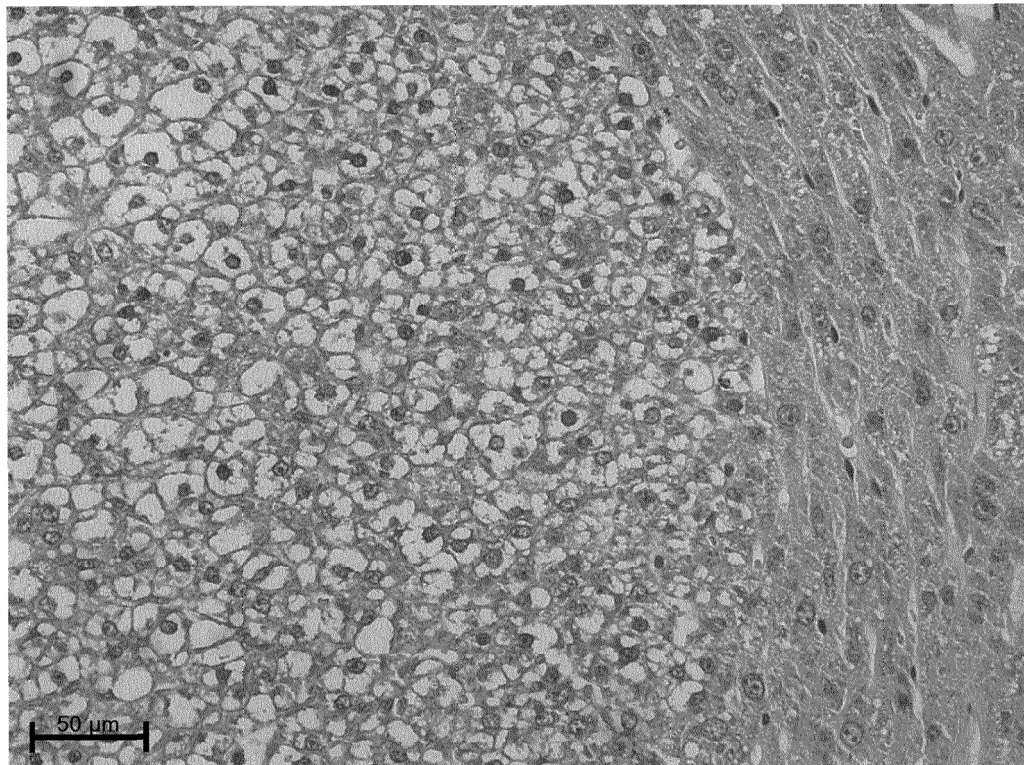
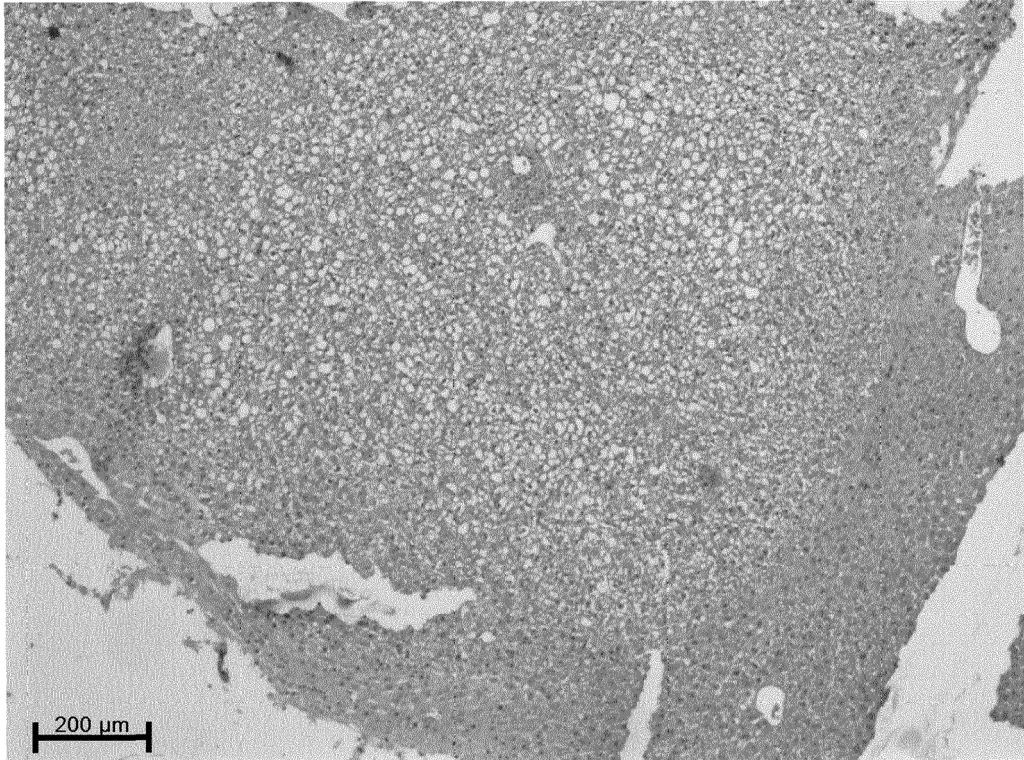
**D** Hígado posterior al tratamiento - semana 23 posterior a la inyección de DEN



**Figura 11(D)**

**E**

**Tumor hepático en un grupo de control (ratón n.º 8841)**



**Figura 11(E)**