

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 529 511**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2009 E 09783424 (6)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2328933**

(54) Título: **Anticuerpos monoclonales anti-claudina 1 para la inhibición de la infección por virus de la hepatitis C**

(30) Prioridad:

25.09.2008 EP 08305597

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2015

(73) Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
GENOVAC (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (33.3%)**

(72) Inventor/es:

**BAUMERT, THOMAS;
SCHUSTER, CATHERINE;
THOMPSON, JOHN y
GRUNERT, FRITZ**

(74) Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 529 511 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 inhibición de la infección por virus de la hepatitis C

5 Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud de Patente Europea Nº EP 08 305 597.0 registrada el 25 de septiembre de 2008.

10 Estado de la técnica

El virus de la hepatitis C (VHC) es un gran problema de salud mundial, con una estimación de 150-200 millones de personas infectadas por todo el mundo, incluyendo al menos 5 millones de individuos infectados en la Unión Europea (Pawlotsky, 2004). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, suceden de 3 a 4 millones de nuevas infecciones cada año. A menudo la infección es asintomática, sin embargo, la mayoría de individuos infectados por VHC desarrollan infección crónica (Hoofnagle, 2002; Lauer, 2001; y Seeff, 1995). La infección crónica por VHC da como resultado frecuentemente en enfermedad hepática grave, incluyendo fibrosis y esteatosis (Chisari, 2005). Aproximadamente el 20 % de los pacientes con infección crónica por VHC desarrollan cirrosis hepática, que progres a carcinoma hepatocelular en el 5 % de los casos (Hoofnagle, 2002).

20 La infección crónica por VHC es la principal indicación para trasplantes hepáticos (Seeff, 2002). Desafortunadamente, el trasplante de hígado no es una cura para la hepatitis C; la recurrencia viral es un problema invariable y una causa principal de pérdida del injerto (Brown, 2005). No hay vacunas disponibles que protejan frente al VHC. Las terapias actuales incluyen la administración de ribavirina y/o interferón alfa (IFN- α), dos agentes antivirales no específicos. 25 Usando un tratamiento combinado de IFN- α pegilado y ribavirina, se logra una eliminación persistente en aproximadamente el 50 % de los pacientes con hepatitis C crónica. Sin embargo, un gran número de pacientes tiene contraindicaciones para uno de los componentes de la combinación, no pueden tolerar el tratamiento, no responden a la terapia con IFN o experimentan una recidiva cuando se interrumpe la administración. Además de la eficacia limitada y los efectos secundarios sustanciales, tales como neutropenia, anemia hemolítica y depresión grave, las terapias antivirales actuales también se caracterizan por un elevado coste.

30 Hasta hace poco, el desarrollo de agentes terapéuticos más efectivos para combatir la infección por VHC se había visto impedido por la carencia de un sistema de cultivo celular que soportase la replicación de VHC. La producción robusta de VHC infeccioso en cultivo celular se ha logrado recientemente usando un genoma de VHC único derivado de la sangre de un paciente japonés con hepatitis C fulminante (JFH-1) (Wakita, 2005; Lindenbach, 2005; Zhong, 2005). La capacidad de la cepa JFH-1 de VHC para liberar partículas infecciosas en cultivo celular (VHCcc) y el desarrollo de seudopartículas de VHC retrovirales (VHCpp) (Bartosch, 2003; Hsu, 2003) ha permitido estudios acerca del mecanismo de la entrada y replicación del VHC que han conducido a la identificación de biomoléculas diana terapéuticas potenciales.

40 El VHC es un virus de hebra de ARN positiva clasificado en el género *Hepacivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*. La traducción del principal marco abierto de lectura del genoma de VHC da como resultado la producción de una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos de longitud, que se escinde co- y pos-traduccionalmente mediante la acción coordinada de proteasas celulares y virales en al menos 10 proteínas maduras, incluyendo dos glucoproteínas de envuelta (E1 y E2). El VHC inicia la infección uniéndose a moléculas o receptores en la superficie de los hepatocitos. Las pruebas actuales sugieren que al menos cuatro moléculas de la célula hospedadora son importantes para la entrada del VHC *in vitro*: la tetraspanina CD81 (Pileri, 1998), el receptor limpiador (*scavenger*) de clase B tipo I (SB-RI) (Zeisel, 2007; Bartosch, 2003; Grove, 2007; Kapadia, 2007; Scarselli, 2002), ocludina (Ploss, 2009) y claudina-1 (CLDN1), una proteína integral de membrana y un componente de las hebras de unión estrecha (Evans, 2007). Se ha comunicado que las glucoproteínas de VHC interactúan directamente con CD81 y SR-BI (Cocquerel, 2006). Los estudios de mutagénesis y de bloqueo mediante anticuerpos con versiones marcadas de CLDN1 sugieren que el primer bucle extracelular está implicado en las interacciones con el VHC (Evans, 2007). Sin embargo, no está claro el papel exacto que juega cada uno de los receptores.

55 La identificación de estos receptores o correceptores para el VHC ha abierto nuevas vías para el desarrollo de agentes terapéuticos y profilácticos como candidatos a fármacos para la prevención y/o tratamiento de la infección por VHC. Por tanto, por ejemplo, Nicosia y colaboradores han generado anticuerpos monoclonales frente a SR-BI humana nativa que inhiben la unión de E2 de VHC a SR-BI y bloquean de manera eficiente la infección de células de hepatoma por VHCcc de manera dependiente de la dosis (Catanese, 2007; documento WO 2006/005465). La Solicitud de Patente Europea Nº EP 1 256 348 divulga sustancias con efectos antivirales (por ejemplo, anticuerpos, proteínas, polisacáridos sulfatados y compuestos de bajo peso molecular) que inhiben la unión de E2 de VHC y CD81. La Solicitud Internacional de Patente WO 2007/130646 describe ensayos *in vitro* y basados en células para identificar agentes que interfieren en las interacciones de VHC con claudina-1, previniendo de este modo la infección por VHC. Ya que el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos contra el VHC sigue siendo una meta de elevada prioridad, estos estudios son prometedores ya que demuestran que los agentes que afectan a la entrada del VHC en células susceptibles puede constituir una alternativa efectiva y segura a las terapias contra el VHC actuales.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a sistemas y estrategias dirigidos para la prevención y/o tratamiento de la infección por VHC y enfermedades relacionadas con el VHC. En particular, la presente invención se dirige a anticuerpos que interieren en las interacciones VHC-célula hospedadora uniéndose al dominio extracelular de claudina-1, un receptor de VHC conocido. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la unión de dicho anticuerpo al dominio extracelular de claudina-1 en una superficie celular bloquea la entrada de VHC a la célula y por lo tanto previene la infección de la célula por VHC. Los solicitantes han demostrado que los anticuerpos anti-claudina inhiben la unión de la glucoproteína de la envuelta E2 y los viriones a líneas celulares permisivas a VHC en ausencia de interacción claudina-E2 detectable. Los solicitantes han demostrado que los anticuerpos neutralizan la infectividad del VHC reduciendo la asociación de la glucoproteína de la envuelta E2 con la superficie celular e interrumpiendo las interacciones CD81-claudina-1. Los anticuerpos pueden usarse para el tratamiento profiláctico o terapéutico de la infección por VHC (infección por VHC aguda o crónica) y de enfermedades o trastornos relacionados con el VHC (por ejemplo, inflamación del hígado, cirrosis, carcinoma hepatocelular y trasplante de hígado). Los anticuerpos, tales como los proporcionados en el presente documento, que inhiben la entrada de VHC a las células son particularmente atractivos como agentes terapéuticos antivirales. Un inhibidor de la entrada del VHC no necesita cruzar la membrana plasmática o modificarse intracelularmente. Además, ya que la entrada viral está mediada por estructuras conservadas de las membranas virales y celulares, los inhibidores de la entrada viral de anticuerpos pueden ser muy potentes y menos susceptibles al desarrollo de resistencia viral.

Más específicamente, en un aspecto, la presente invención proporciona líneas celulares de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al dominio extracelular de claudina-1 humana. En particular, los presentes Solicitantes han depositado ocho de dichas líneas celulares de hibridoma en el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zell-Likuren GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania) el 29 de julio de 2008. Se les asignó los Números de Acceso DSM ACC2931, DSM ACC2932, DSM ACC2933, DSM ACC2934, DSM ACC2935, DSM ACC2936, DSM ACC2937, y DSM ACC2938. El depósito se hizo de conformidad con las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con fines del procedimiento de patentes (Tratado de Budapest).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se secreta por una cualquiera de las líneas celulares de hibridoma depositadas con los Números de Acceso DSM ACC2931, DSM ACC2932, DSM ACC2933, DSM ACC2934, DSM ACC2935, DSM ACC2936, DSM ACC2937, y DSM ACC2938. El anticuerpo monoclonal puede o no aislarse y/o purificarse a partir de cultivos de hibridoma. En determinadas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es una inmunoglobulina del isotipo de cadena pesada (H) y cadena ligera kappa (L) de rIgG2a. En otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal es una inmunoglobulina del isotipo de cadena pesada (H) y cadena ligera kappa (L) de rIgG2b.

Como han demostrado los Solicitantes, los anticuerpos monoclonales secretados por las líneas celulares de hibridoma depositadas se unen específicamente al dominio extracelular de claudina-1 humana e inhiben de manera eficiente la infección por VHC *in vitro*. La presente divulgación también abarca cualquier fragmento biológicamente activo de los anticuerpos monoclonales de la invención, es decir, cualquier fragmento o porción que conserve la capacidad del anticuerpo monoclonal de interferir con las interacciones VHC-células hospedadoras, y/o unirse específicamente al dominio extracelular de claudina-1 humana, y/o inhibir o bloquear la entrada del VHC a células susceptibles a VHC, y/o reducir o prevenir la infección por VHC de células susceptibles.

Más generalmente, la presente divulgación abarca cualquier molécula que comprende un anticuerpo monoclonal anti-claudina-1 o un fragmento del mismo, incluyendo anticuerpos químéricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos desinmunitados 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 de la invención secretados por una línea celular de hibridoma, incluyendo moléculas, tales como fragmentos Fab, fragmentos F(ab')², fragmentos Fd, anticuerpos Sc (anticuerpos monocatenarios), diacuerpos, cadenas ligeras individuales de anticuerpos individuales, cadenas pesadas de anticuerpos individuales, fusiones químicas entre cadenas de anticuerpos y otras moléculas, y conjugados de anticuerpos, tales como anticuerpos conjugados a un agente diagnóstico (resto detectable) o a un agente terapéutico, siempre que estas moléculas relacionadas con los anticuerpos conserven al menos una propiedad biológica relevante del anticuerpo monoclonal de la invención del que se "derivan". La propiedad biológica relevante puede ser la capacidad de interferir en las interacciones VHC-células hospedadoras, unirse específicamente al dominio extracelular de claudina-1 humana, inhibir o bloquear la entrada del VHC a células susceptibles a VHC, y/o reducir o prevenir la infección por VHC de células susceptibles. En determinadas realizaciones preferidas, un fragmento biológicamente activo de un anticuerpo monoclonal de la invención se une específicamente al dominio extracelular de claudina-1 humana.

Los Solicitantes han demostrado que los anticuerpos monoclonales secretados por las líneas celulares de hibridoma depositadas reconocen un epítopo que se ve fuertemente afectado por las mutaciones en el motivo conservado del primer bucle extracelular de claudina-1 humana. Este motivo es: W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64). En consecuencia, en determinadas realizaciones, un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención, o un fragmento biológicamente activo del mismo, reconoce un epítopo que depende de la estructura del motivo conservado

W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64) en el primer bucle extracelular de claudina-1.

De manera similar, los Solicitantes han demostrado que los anticuerpos monoclonales secretados por las líneas celulares de hibridoma no tienen reactividad cruzada con claudina-1 murina pero tienen reactividad cruzada con su ortólogo en el primate no humano mono cinomolgo (*Macaca fascicularis*) Por lo tanto, en determinadas realizaciones, un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención, o un fragmento biológicamente activo del mismo, no se une a claudina-1 de roedor pero se une a claudina-1 de primate no humano.

En general, un anticuerpo de la presente invención inhibe la unión de la glucoproteína de la envuelta E2 o viriones infecciones a líneas celulares permisivas al VHC; e inhibe la asociación (o asociaciones) CD81-claudina-1.

Los anticuerpos monoclonales y moléculas relacionadas con anticuerpos de la presente invención pueden ser de aplicación en una variedad de tratamientos profilácticos y terapéuticos. Por consiguiente, en otro aspecto, se proporcionan los anticuerpos monoclonales y las moléculas relacionadas con anticuerpos para prevenir la infección de una célula por VHC (por ejemplo, una célula susceptible o una población de células susceptibles); para prevenir o tratar la infección por VHC o una enfermedad relacionada con el VHC en un sujeto; para controlar la infección crónica por VHC; y para prevenir la recurrencia del VHC en un paciente de trasplante de hígado. La infección por VHC puede deberse a VHC de un genotipo seleccionado del grupo que consiste en genotipo 1, genotipo 2, genotipo 3, genotipo 4, genotipo 5 y genotipo 6, o más específicamente a un subtipo seleccionado del grupo que consiste en subtipo 1a, subtipo 1b, subtipo 2a, subtipo 2b, subtipo 2c, subtipo 3a, subtipo 4a-f, subtipo 5a, y subtipo 6a.

En un aspecto relacionado, la presente divulgación proporciona un método para reducir la probabilidad de que una célula susceptible se infecte por VHC como resultado del contacto con el VHC, que comprende poner en contacto a la célula susceptible con una cantidad eficaz de un anticuerpo o molécula relacionada con el anticuerpo de la invención.

También se proporciona un método para reducir la probabilidad de que las células susceptibles de un paciente se infecten por VHC como resultado del contacto con el VHC, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o molécula relacionada con el anticuerpo de la invención. La presente invención también proporciona un método para tratar o prevenir la infección por VHC o una enfermedad asociada al VHC (por ejemplo, una enfermedad o patología hepática) en un sujeto que lo necesite que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal o molécula relacionada con el anticuerpo de la invención. La divulgación también proporciona un método para controlar la infección crónica por VHC en un sujeto que lo necesite que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal o molécula relacionada con el anticuerpo de acuerdo con la invención.

También se proporciona un método para prevenir la recurrencia del VHC en un paciente con trasplante de hígado, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal o molécula relacionada con el anticuerpo. La administración de un anticuerpo o molécula relacionada con el anticuerpo a un sujeto puede ser por cualquier vía adecuada, incluyendo, por ejemplo, por vía parenteral, aerosol, oral y tópica. El anticuerpo monoclonal o molécula relacionada con el anticuerpo puede administrarse sola o en combinación con un agente terapéutico, tal como un agente antiviral.

Los anticuerpos monoclonales y moléculas relacionadas con el anticuerpo pueden administrarse *per se* o como composiciones farmacéuticas. Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal o molécula relacionada con el anticuerpo para la fabricación de medicamentos, composiciones farmacéuticas, o kits farmacéuticos para el tratamiento y/o prevención de la infección por VHC y enfermedades asociadas al VHC.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal o molécula relacionada con el anticuerpo y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica está adaptada para su administración en combinación con un agente terapéutico adicional, tal como un agente antiviral. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un agente terapéutico adicional, tal como un agente antiviral. Los agentes antivirales adecuados para su uso en los métodos y composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, interferones (por ejemplo, interferón alfa, interferón alfa pegilado), ribavirina, anticuerpos (monoclonales o policlonales) anti-VHC, inhibidores de ARN polimerasa, inhibidores de la proteasa, inhibidores de IRES, inhibidores de helicasa, compuestos antisentido, ribozimas, y cualquier combinación de los mismos.

Cuando se conjugan a un resto detectable, un anticuerpo monoclonal o molécula relacionada con el anticuerpo de la invención puede ser de aplicación en una variedad de métodos no terapéuticos, por ejemplo, en el diagnóstico y/o pronóstico de determinadas enfermedades, tales como cánceres. De hecho, se ha demostrado que el nivel de expresión de claudina-1 es un marcador diagnóstico o pronóstico útil para diferentes cánceres. Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo monoclonal o una molécula relacionada con el anticuerpo para la fabricación de composiciones o kits para el diagnóstico y/o pronóstico de determinados cánceres.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un método para detectar claudina-1 en una muestra

biológica que comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo durante un tiempo y en condiciones que permiten que se forme un complejo anticuerpo-claudina-1 entre el anticuerpo y la claudina-1 presente en la muestra biológica; y detectar (y/o cuantificar) la presencia de cualquier complejo anticuerpo-claudina-1 formado. El anticuerpo (o molécula relacionada con el anticuerpo) usado en dicho método se conjuga preferentemente a un resto detectable. En determinadas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de un sujeto, por ejemplo, de un sujeto que se sospecha que tenga cáncer. El diagnóstico o pronóstico puede proporcionarse basándose en la presencia, ausencia o cantidad de complejo anticuerpo-claudina-1 formado, por ejemplo, después de la comparación con los resultados obtenidos en idénticas condiciones para una muestra biológica obtenida de un sujeto sano.

10 Estos y otros objetos, ventajas y características de la presente divulgación serán evidentes para los expertos habituales en la materia que hayan leído la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas.

Descripción de las figuras

15 **La Figura 1** es un conjunto de dos gráficas que ilustran la unión específica de suero de rata anti-CLDN-1 humana expresado en células CHO. El suero polyclonal anti-CLDN-1 dirigido contra el bucle del ectodominio de CLDN-1 se suscitó mediante inmunización genética de ratas Wistar usando un plásmido que porta ADNc de CLDN-1 humana (véase el Ejemplo 1). Las células CHO se transfectaron con pcADN-CLDN-1 o un vector de control (pcADN). La citometría de flujo de células CHO no permeabilizadas transfectadas con CLDN-1 o control incubadas con suero polyclonal de rata anti-CLDN-1 humana e IgG anti-rata conjugada a PE demostraron la interacción específica de anticuerpos anti-CLDN-1 con CLDN-1 (**Figura 1B**). Por el contrario, no se observó interacción en las células CHO transfectadas con el vector de control e incubadas con suero anti-CLDN-1 (**Figura 1A**).

20 25 **La Figura 2** es un conjunto de tres gráficas que demuestra la interacción de anticuerpos anti-CLDN-1 con el ectodominio de CLDN-1 en células de hepatoma humano Huh7.5.1 (**Figura 2A**), y hepatocitos humanos (**Figura 2B**). La expresión en la superficie celular de CLDN-1 se determinó mediante citometría de flujo usando suero de rata anti-CLDN-1 humana o suero pre-inmune de control (véase el Ejemplo 1). Los histogramas correspondientes a la expresión en la superficie celular de las moléculas de superficie celular respectivas (curvas abiertas) están superpuestas con los histogramas de células incubadas con el control de isotipo adecuado (curvas con sombreado gris). El suero de rata anti-CLDN-1 humana detectó específicamente a CLDN-1 en la superficie de células de hepatoma humano Huh7.5.1 y en hepatocitos humanos primarios.

30 35 **La Figura 3** es un conjunto de imágenes de inmunofluorescencia que muestra la expresión de CLDN-1 en células Caco2 (**A**) y Huh7.5.1 (**B**). Los paneles inferiores de la **Figura 3A** y de la **Figura 3B** muestran células Caco2 y células Huh7.5.1, respectivamente, que se tiñeron para CLDN-1 usando anticuerpos polyclonales anti-CLDN-1 dirigidos contra los ectodominios de CLDN-1 ("AcP anti-CLDN-1"), y un anticuerpo comercial anti-CLDN-1 dirigido contra el dominio C-terminal intracelular ("AcM anti-CLDN-1") y para el núcleo usando DAPI, tal como se describe en el Ejemplo 1. Los controles se muestran en los paneles superiores de la **Figura 3A** y de la **Figura 3B**, donde las células Caco2 y las células Huh7.5.1, respectivamente, se incubaron con IgG polyclonal de rata ("AcP de control"), IgG monoclonal de ratón ("AcM de control"), y DAPI. Las barras de escala representan 10 µm.

40 45 **La Figura 4** es un conjunto de dos gráficas que muestran la inhibición de la infección por VHC (infección por VHCcc de Jc1) por anticuerpos anti-CLDN-1 (antisuero polyclonal de rata anti-CLDN-1). **La Figura 4A** muestra los resultados obtenidos para células Huh7.5.1 que se preincubaron durante 1 hora a 37 °C con suero de rata anti-CLDN-1 (dilución 1/50) o suero de control ("pan-rata") antes de la infección con VHCcc JC1 durante 3 horas a 37 °C. La infección por VHC se determinó mediante la cuantificación de ARN de VHC en lisados de células Huh7.5.1 infectadas 72 horas después de la infección. El ARN total se aisló y se cuantificó en ARN de VHC mediante pRT-PCR. **La Figura 4B** muestra la inhibición de la infección por VHCcc de Hc1 por inmunoglobulina anti-CLDN-1 purificada. La IgG anti-CLDN-1 se purificó a partir del suero N° 2 y se añadió a células Huh7.5.1 tal como se describe en el Ejemplo 1 (CTRL - IgG de control). La infección por VHC se determinó mediante cuantificación de ARN de VHC tal como se describe anteriormente. Los resultados se muestran como media del % de infectividad de VHCcc ± DE a partir de determinaciones por duplicado de uno de al menos dos experimentos independientes.

55 60 **La Figura 5(A)** muestra la dependencia de la dosis de la inhibición de VHCcc de Luc-Jc1 por anticuerpos anti-SR-BI, anti-CD81 y anti-CLDN-1. El uso de concentraciones de anticuerpo que bloquearon la infección por VHC de manera sub-máxima permitió la observación de efectos aditivos o sinérgicos. Las células Huh7.5.1 se preincubaron durante 1 hora a 37 °C con AcM anti-CD81 (0,1 y 0,05 µg/ml), AcM de ratón de control (IgGm: 0,1 y 0,05 µg/ml), suero de rata anti-SR-BI (1/200, 1/400, y 1/800), suero de rata anti-CLDN-1 (1/100, 1/200, 1/400) o suero de rata preinmune de control (CTRL: 1/200) antes de la infección con VHCcc de Luc-Jc1 durante 4 horas a 37 °C. La infección por VHC se determinó midiendo la actividad de luciferasa a las 48 horas después de la infección. Los datos se expresan como porcentaje de infectividad de VHCcc de Luc-Jc1 en ausencia de anticuerpo. Se muestran las medias ± DE de cuatro experimentos efectuados por duplicado. **La Figura 5(B)-(D)** es un conjunto de cuatro gráficas que muestran el efecto aditivo de anticuerpos anti-SR-BI, anti-CD81 y anti-CLDN-1 en la inhibición de la entrada de VHCcc. Se preincubaron las células Huh7.5.1 durante 1 hora a 37 °C con anti-SR-BI de rata (1/400, 1/800), anti-CLDN-1 de rata (1/200, 1/400) y anti-CD81 de ratón (0,05, 0,1 µg/ml) solos (barras negras)

o en combinación (barras grises) antes de la infección con VHCcc de Luc-Jc1 durante 4 horas a 37 °C. La infección por VHCcc se determinó como se describe en **(A)**. Los datos se expresan como porcentaje de infectividad de VHCcc de Luc-Jc1 en ausencia de anticuerpo. Se muestran las medias ± DE de cuatro experimentos efectuados por duplicado.

La Figura 6(B) muestra la cinética de inhibición de la entrada de VHCcc en células de hepatoma humano por AcM anti-CD81 (■), suero de rata anti-SR-BI (♦), suero de rata anti-CLDN-1 (A) o suero de rata de control (Δ). La inhibición de la entrada de VHCcc de Luc-Jc1 en células Huh7.5.1 mediante suero de rata anti-CLDN-1 (1/100), suero de rata anti-SR-BI (1/100), suero de rata de control (1/100) o anticuerpo monoclonal anti- CD81 (5 µg/ml) se llevó a cabo tal como se muestra en la ilustración esquemática del diseño experimental presentado en la **Figura 6(A)**. Después de la unión del virus a las células diana, se lavaron las células, y se añadieron los inhibidores cada 20 minutos durante 120 minutos a 37 °C para permitir que se produjese la entrada. Las líneas discontinuas indican los intervalos de tiempo en los que los inhibidores estuvieron presentes. La actividad de luciferasa se determinó 48 horas después y se expresa en relación a las infecciones de control efectuadas del mismo modo pero sin adición de inhibidores. Los resultados en **(B)** se expresan como porcentaje de infectividad de VHCcc de Luc-Jc1 en ausencia de anticuerpo. Se muestran las medias ± DE de uno de tres experimentos efectuados en duplicado.

La Figura 7 es un conjunto de cinco gráficas que muestran los resultados del análisis por citometría de flujo para los sueros obtenidos de 5 ratas inmunizadas contra claudina-1 humana (tal como se describe en el Ejemplo 2). Las curvas negras muestran los resultados en células de mamífero (BOSC23) transfectadas de manera transitoria con vector de expresión de claudina-1 humana y las curvas en rojo con un ADNc irrelevante. Un desplazamiento en la curva negra hacia la derecha indica positividad. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo IgG anti-rata marcado con PE (FL2).

La Figura 8 es una gráfica que muestra los resultados del análisis de la inhibición de la infección con VHC infeccioso recombinante (VHCcc de Luc-Jc1) con sobrenadantes de hibridoma que contienen anticuerpos anti-CLDN-1 (cuyos nombres se indican sobre el eje x). Los sobrenadantes de hibridoma se obtuvieron tal como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran como porcentaje de infección por VHCcc de Luc-Jc1 en presencia o ausencia de sobrenadante de hibridoma (con infección en presencia de PBS = 100 %). OM-3E5, OM-6D9, OM-7C11, OM-4A4, OM-6E1, OM-7D3, OM-7D4, OM-7C8 y OM- 8A9 mostraron una inhibición marcada de infección por VHC, mientras que OM-5A1, OM-6G10, y OM-5A8 no mostraron efectos. El control negativo corresponde a células no infectadas.

La Figura 9(A) es un conjunto de ocho gráficas que muestran los resultados del análisis por citometría de flujo para sobrenadantes de anticuerpo monoclonal obtenidos de linfocitos agrupados de ratas inmunizadas contra claudina-1 humana (tal como se describe en el Ejemplo 2). Las curvas en negro muestran los resultados en células de mamífero transfectadas de manera transitoria con vector de expresión de claudina-1 humana (pCMV-SPORT6-CLDN1) y las curvas en rojo con un ADNc irrelevante (pCMV-SPORT6). Un desplazamiento en la curva negra hacia la derecha indica positividad. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo IgG anti-rata marcado con PE (FL2). Los ejes x e y muestran las intensidades medias de fluorescencia y el número relativo de células teñidas, respectivamente. **La Figura 9(B)** es una gráfica que muestra la unión específica de seis anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 humana a CLDN-1 expresada en la superficie celular de células CHO transfectadas estudiada mediante citometría de flujo. Las células CHO se transfecaron con pCMV-SPORT6-CLDN1 (barras rayadas) o vector de control (pCMV-SPORT6; barras negras). **La Figura 9(C)** es una gráfica que muestra la unión de los seis anticuerpos monoclonales a la CLDN-1 expresada en la superficie de células Huh7.5.1 de hepatoma y hepatocitos primarios humanos (PHH) y en células BOSC23 como control negativo. Los resultados se muestran como la media de unidades relativas de fluorescencia (URF) calculadas para cada experimento efectuado por duplicado. **La Figura 9(D)** muestra las imágenes obtenidas de CLDN-1 en la superficie celular de células Huh7.5.1 vivas no permeabilizadas mediante anticuerpo monoclonal anti-CLDN-1. Las células Huh7.5.1 se incubaron con anticuerpos control de isotipo de rata u OM-7D3-A3 anti-CLDN-1 (10 µg/ml), un anticuerpo secundario anti-rata conjugado a Cy5 y se analizó tal como se describe en el Ejemplo 2. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI. **La Figura 9(E)** es una gráfica que muestra la unión de los seis anticuerpos monoclonales a CLDN-1 expresado en la superficie celular en hepatocitos primarios de chinomolgo estudiada mediante citometría de flujo.

La Figura 10 es un conjunto de dos gráficas que muestran las propiedades de unión de AcM anti-CLDN-1 a líneas celulares Huh7.5.1 permisivas a VHC. Las células Huh7.5.1 se incubaron con concentraciones en aumento de AcM anti-CLDN-1 tal como se describe en el Ejemplo 2. La unión de los AcM se reveló mediante citometría de flujo usando AcM de IgG anti-rata conjugado a PE. Como control, se usó una IgG2 humana de isotipo emparejado.

La Figura 11 es una gráfica que muestra la inhibición dependiente de la dosis de la infección por VHCcc por anticuerpos anti-CLDN-1 usando viriones infecciosos que contienen las proteínas estructurales de la cepa de genotipo 2a J6 de VHC(Luc-Jc1) y de la cepa de genotipo 1b Con1 (Luc-Con1). **(A)** las células Huh7.5.1 se preincubaron con concentraciones en aumento de anticuerpos anti-CLDN-1 o de control de isotipo de rata (CTRL IgI) durante 1 hora a 37 °C antes de la infección con VHCcc de Luc-Jc1 (genotipo 2a), **(B)** las células Huh7.5.1 se preincubaron con anticuerpos anti-CLDN-1 (10 µg/ml de anticuerpos OM6E1-B5; OM-7D3-B3; OM-8A9-A3),

5 anti-CD81 (10 µg/ml) o de control de isotipo de rata (CTRL IgG; 10 µg/ml) o en ausencia de anticuerpo (CTRL) antes de la incubación con VHCcc de Luc-Con1 durante 4 horas a 37 °C. El VHCcc de Luc-Con1 contiene las proteínas estructurales de la cepa de genotipo 1b Con1 de VHC. La infección por VHC se determinó mediante la medición de la actividad de luciferasa 48 horas después de la infección tal como se describe en el Ejemplo 2. Se muestra la media ± DE de un experimento representativo efectuado en triplicado.

10 **La Figura 12** es un conjunto de gráficas que muestra que los anticuerpos monoclonales anti-CLDN1 neutralizan de manera cruzada a los VHCpp que portan las glucoproteínas de la envuelta derivadas de los principales genotipos de VHC. Se usaron diferentes cepas de VHCpp basados en MLV que portan las glucoproteínas de la envuelta de las cepas H77 (genotipo 1a), HCV-J (genotipo 1b), JFH1 (genotipo 2a), UKN3a 1.28 (genotipo 3), UKN4a 21.16 (genotipo 4), UKN 5.14.4 (genotipo 5), y UKN 6.5.340 (genotipo 6). Se usaron seudopartículas de VSV como control. Las VHCpp y VSVpp se produjeron tal como se describe en el Ejemplo 2. Las células Huh7 se preincubaron con concentraciones en aumento de anticuerpos anti-CLDN-1 de rata o de control de isotipo de rata durante 1 hora a 37 °C antes de la infección con VHCpp o VSVpp durante 4 horas a 37 °C. La infección por VHCpp y VSV se determinó mediante medición de la actividad de luciferasa 72 horas después de la infección tal como se describe en el Ejemplo 2. Se muestra la media ± DE de un experimento representativo efectuado en triplicado.

15 20 **La Figura 13** es un conjunto de gráficas que muestran la inhibición de la infección por VHCpp en hepatocitos humanos primarios. Las VHCpp basadas en VIH que portaban glucoproteínas de la envuelta de VHC H77 (genotipo 1a) HCV-J (genotipo 1b), JFH-1 (genotipo 2a), UKN3A.1.28 (genotipo 3) se produjeron tal como se describe en el Ejemplo 2. Los hepatocitos humanos primarios se preincubaron con anticuerpos anti-CLDN-1 de rata o de control de isotipo de rata (10 µg/ml) durante 1 hora a 37 °C antes de la infección con VHCpp durante 4 horas a 37 °C. La infección por VHCpp se determinó mediante la medición de la actividad de luciferasa 72 horas después de la infección tal como se describe en el Ejemplo 2. Se muestra la media ± DE de experimentos representativos efectuados en triplicado.

25 30 **La Figura 14** muestra que los anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 neutralizan de manera cruzada la infección por cuasiespecies de VHC en dos pacientes individuales con infección crónica por VHC (véase el Ejemplo 2). **La Figura 14(A)** muestra la distribución relativa de las tres variantes denominadas VJ, VI, VK (subtipo 1b) en el primer paciente infectado por VHC basándose en el alineamiento de secuencias de HVR1. Los aminoácidos deducidos de dominios de glucoproteínas de la envuelta se muestran a la derecha. Los cambios de aminoácidos se indican en letras rojas en negrita. **La Figura 14(B)-(C)** es un conjunto de dos gráficas que muestran la inhibición de la infección por VHCpp que portan glucoproteínas de la envuelta de cuasiespecies virales en este paciente mediante anti-CLDN1 OM-7D3 (25 µg/ml) en células Huh7.5.1 (**B**) y hepatocitos humanos primarios (**C**). **La Figura 14(D)** muestra la distribución relativa de las variantes (denominadas VA-VY; subtipo 1b) en un segundo paciente con infección crónica por VHC basándose en el alineamiento de las secuencias E1E2 completas. **La Figura 14(E)-(F)** es un conjunto de dos gráficas que muestran la infección de células Huh7.5.1 por VHCpp que portan glucoproteínas de la envuelta de cuasiespecies virales del segundo paciente con hepatitis C crónica (**D**) y su neutralización por anti-CLDN-1 OM-7D3 (25 µg/ml) (**E**). La infección por VHCpp se analizó tal como se describe en el Ejemplo 2. La neutralización mediante anticuerpo anti-CLDN-1 solo se determinó para VHCpp derivados de las cuasiespecies con infectividad detectable. Las variantes virales que contienen un codón de terminación se indican mediante un asterisco. Se muestra la media ± DE de un experimento representativo efectuado en triplicado. ND - no efectuado; CTRL IgG - anticuerpo de control de isotipo de rata.

40 45 **La Figura 15** es un conjunto de dos gráficas que muestran la prevención de la infección por VHC de VHCpp que portan glucoproteínas de la envuelta de pacientes con escapada de las respuestas neutralizantes del hospedador y reinfección del injerto de hígado. Las VHCpp (cepas denominadas VD, VH, VK) que portan glucoproteínas de la envuelta de tres pacientes diferentes con escapada de las respuestas neutralizantes del hospedador y reinfección del injerto hepático (subtipo 1b de VHC) se produjeron tal como se describe en el Ejemplo 2. La prevención de la infección por VHCpp se determinó preincubando hepatocitos humanos primarios con anticuerpo anti-CLDN-1 OM-7D3 (25 µg/ml) o anticuerpos anti-CD81 o de control de isotipo (CTRL) (25 µg/ml) durante 1 hora a 37 °C antes de la infección con VHCpp durante 4 horas a 37 °C. La infección se analizó tal como se describe en el Ejemplo 2. Se muestra la media ± DE de experimentos representativos efectuados en triplicado.

50 55 **Figure 16** es un conjunto de gráficas que muestran la ausencia de toxicidad de los anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 en células Huh7.5.1 y hepatocitos humanos primarios (PHH). Los efectos citotóxicos en las células se determinaron en triplicados por metabolización de MTT. Las células Huh7.5.1 (**A**) y los hepatocitos humanos primarios de tres donantes distintos (**B-D**) se incubaron con anticuerpo monoclonal de rata, anti-CLDN-1 OM-7D3-B3 (10 µg/ml), flavopiridol (10 µM) o compuesto C (20 µM) durante 48 horas y se analizaron por metabolización de MTT. La viabilidad celular relativa se determinó en comparación con hepatocitos humanos primarios o células Huh7.5.1 incubadas con placebo (= 100 %). (**D**) Se añadieron compuesto C (0,01-100 µM), anticuerpo anti-CLDN-1 OM-7D3 (0,01-100 µM) o anticuerpo de control de isotipo a hepatocitos humanos primarios en dosis en aumento y se determinó la toxicidad tal como se describe en los paneles (**B**) y (**C**).

60 65 **La Figura 17** es un conjunto de gráficas que muestra la competición cruzada de dos anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 en estudios de unión e infección. **Figura 17(A):** La competición entre AcM anti-CLDN-1 se midió

- 5 usando un ELISA basado en células. Las células Huh7.5.1 se incubaron con 0,1 µg/ml de AcM anti-CLDN-1 biotinilado (OM-8A9-A3 - panel superior u OM-7D3-B3 - panel inferior) junto con concentraciones en aumento de AcM anti-CLDN-1 no marcados como competidores. Después del lavado de las células en PBS, se detectó la unión de anticuerpo biotinilado mediante incubación con estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. La unión se midió como unidades relativas de fluorescencia (URF). Las curvas determinadas por medición de la unión en presencia de un control emparejado de isotipo (AcM de control negativo) se compararon con aquellas determinadas en presencia del anticuerpo competidor. **Figura 17(B):** Competición cruzada entre el panel completo de anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1. La competición cruzada se analizó tal como se muestra en el panel A usando 0,1 µg/ml de AcM anti-CLDN-1 biotinilado (mostrado sobre el eje x) y 10 µg/ml del AcM anti-CLDN-1 o un control de isotipo no marcado (anticuerpo de control irr) (mostrado en el eje y). La unión de AcM anti-CLDN-1 biotinilado sucedió solo en presencia de anticuerpo de control de isotipo. **Figura 17(C):** Competición cruzada de anticuerpos en estudios de infección. Las células Huh7.5.1 se preincubaron con anticuerpos anti-CLDN-1 o de control de isotipo de rata durante 1 hora a 37 °C antes de la infección con VHCcc de Luc-Jc1 tal como se describe en el Ejemplo 2. Para estudiar la competición cruzada, se añadieron simultáneamente bajas concentraciones de AcM anti-CLDN-1 (0,5 µg/ml) antes de la infección por VHC. El uso de concentraciones de anticuerpo que bloquearon la infección por VHC de manera sub-máxima permitió la observación de efectos aditivos o sinérgicos. El efecto de las combinaciones de anticuerpos se indica mediante un "+" (concentración final 1 µg/ml) (barras rayadas).
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- La Figura 18** es un conjunto de gráficas que muestran que los anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 se unen a un epítopo que es fuertemente dependiente de la conservación del motivo elevadamente conservado de claudina: W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64). La unión del anticuerpo se efectuó tal como se describe en el Ejemplo 2 usando plásmidos pQCXIN-hClaudin1 que codifican CLDN-1 de tipo silvestre o CLDN-1 que contiene mutaciones definidas indicadas en el eje x. Se muestra la unión de los anticuerpos monoclonales anti-CLDN1 (OM- 7D3-B3 **(A)** y OM-8A9-A3 **(B)**) a CLDN1 mutante en relación a la unión a CLDN1 de tipo silvestre (barras negras). La expresión adecuada de CLDN-1 de tipo silvestre y mutante en células Bosc transfectadas de manera transitoria se confirmó mediante análisis por citometría de flujo de los niveles de expresión del marcador HA y anticuerpo anti-HA (barras abiertas) excepto para el mutante I32A donde el marcador HA estaba ausente y se determinó la expresión de CLDN-1. La unión de anticuerpo anti-HA a HA de CLDN-1 mutante en relación a HA de CLDN-1 de tipo silvestre se muestra como control interno para la expresión de CLDN-1 mutante (barras abiertas).
- La Figura 19** es una gráfica que muestra la unión de los seis anticuerpos monoclonales a la expresión de CLDN-1 de la superficie celular en células Huh7.5.1 de hepatoma humano y células de hepatoma Hepa1.6 de ratón estudiadas mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran como la fluorescencia relativa media y cada experimento se realizó por duplicado. Se usó un anticuerpo monoclonal anti-CD81 como control positivo.
- La Figura 20** es un conjunto de gráficas que muestran la inhibición dependiente de la dosis de la unión de E2 a líneas celulares permisivas mediante anticuerpos anti-CLDN-1. **(A)** Unión de glucoproteína E2 recombinante a células Huh7.5.1 permisivas. Las células Huh7.5.1 se preincubaron con suero preinmune de control de rata (CTRL: panel izquierdo) o anticuerpos anti-CLDN-1 de rata (panel derecho) diluidos a 1/100 durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión de E2 se detectó mediante citometría de flujo. Las células incubadas en ausencia de anticuerpo y E2 (PBS) sirvieron como control negativo (NC - histogramas con sombreado suave). Se muestra un experimento representativo. **(B)** Unión de glucoproteína E2 recombinante a células Huh7.5.1 permisivas. Las células Huh7.5.1 se preincubaron con anticuerpos anti-CD81 de rata, anti-SR-BI de rata y anti-CLDN-1 de rata o suero preinmune de control de rata (todos diluidos a 1/100) durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión a E2 se detectó mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como porcentaje de unión de E2 en ausencia de anticuerpo (PBS). Se muestra la media ± DE de cuatro experimentos efectuados por duplicado. **(C)** Inhibición dependiente de la dosis de unión de E2 a células Huh7.5.1 por anti-CLDN-1. Las células Huh7.5.1 se preincubaron con diferentes diluciones de anticuerpos policlonales anti-CLDN-1 de rata (cuadrados negros) o suero preinmune de control de rata (rombos negros)- Los resultados se expresan como porcentaje de unión de E2 en ausencia de anticuerpo. Se muestra la media ± DE de cuatro experimentos efectuados por duplicado. **(D)** Unión de glucoproteína E1 recombinante a células Huh7.5.1 permisivas. Las células Huh7.5.1 se preincubaron con heparina, anti-CD81 de ratón (JS-81; 5 µg/ml), IgG de control (CTRL) de ratón (5 µg/ml), anti-CLDN-1 de rata (1/100), suero preinmune de rata (1/100) durante una hora a temperatura ambiente. La unión de E1 se detectó mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como porcentaje de unión de E1 en ausencia de anticuerpo (PBS). Se muestra la media ± DE de dos experimentos efectuados por duplicado. Los resultados se expresan como porcentaje de unión de E2 en ausencia de anticuerpo (PBS). Se muestra la media ± DE de dos experimentos efectuados por duplicado. ***P<0,0001 (prueba t). **(E)** Unión de VHCcc a células Huh7.5.1 permisivas. Las células Huh7.5.1 se preincubaron con heparina, anti-CLDN-1 de rata, anti-SR-BI de rata o suero preinmune de control de rata (PI) (todos diluidos a 1/100) durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la incubación con VHCcc (cepa Jc1) que se habían purificado parcialmente a partir de sobrenadantes de cultivos celulares usando ultracentrifugación de gradiente. Después de la incubación con VHCcc, los VHCcc no unidos se retiraron lavando las células con PBS. La unión de VHCcc se cuantificó entonces mediante RT-PCR del ARN de VHC unido a las células, que se indica en el eje y.
- La Figura 21** es un conjunto de gráficas que muestra la unión celular de la glucoproteína de la envuelta E2 a células CHO que expresan CD81 y SR-BI pero que no expresan CLDN-1- **(A)** Expresión de factores de entrada

humanos en células CHO transfectadas. Las células CHO se transfectaron con plásmidos de expresión que codifican CLDN-1, SR-BI o CD81 humanos tal como se describe en el Ejemplo 3. Las células CHO transfectadas se analizaron mediante citometría de flujo usando control de rata (CTRL), anti-CLDN-1 de rata (panel izquierdo), anti-SR-BI de rata (panel intermedio) o IgG de control de ratón y anti-CD81 (JS-81; panel derecho). (B) Unión de glucoproteína de la envuelta E2 a células CHO que expresan factores de entrada de VHC humanos. Las células CHO se transfectaron con plásmidos individuales de expresión que codifican CLDN-1, SR-BI o CD81 tal como se ha indicado. La unión celular de E2 se analizó mediante citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo efectuado por duplicado.

La Figura 22 es un conjunto de dos gráficas que muestra la inhibición por anti-CLDN-1 de la asociación del coreceptor de CD81-CLDN-1 usando análisis FRET. Las células HEK293T cotransfectadas para expresar AcGFP, CD81 y DsRED.CD81, AcGFP-CLDN1 y DsRED.CD81, o AcGFP-CLDN1 y DsRED-CLDN1 se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio y se trataron con sueros preinmunes o anti-CLDN-1 durante 1 hora. Se fijaron las células, se obtuvieron las imágenes mediante microscopía confocal de barrido de láser y se midió el FRET entre las proteínas AcGFP donantes y DsRED aceptoras. El porcentaje de FRET se define como la frecuencia de píxeles que demuestran FRET en relación al número total de píxeles analizados en la membrana plasmática de diez células. ***P<0,0001, **P<0,01 (prueba t). Se cuantificaron AcGFP-CLDN1 y DsRED-CLDN1 en localizaciones intracelulares (en negro) y de la membrana plasmática (en blanco) en células no tratadas y tratadas con anti-CLDN-1 y se determinó el porcentaje de CLDN-1 en cada localización.

La Figura 23 es un conjunto de gráficas que muestra la inhibición de la transmisión célula a célula de VHC mediante un anticuerpo monoclonal anti-CLDN-1. Las células Huh7.5.1 productoras de Jc1 por electroporación se co-cultivaron durante 24 horas con células Huh7.5 GFP+ receptoras en ausencia de anticuerpos (**A**) o en presencia de anti-CD81 y anti-CLDN-1 para bloquear la transmisión libre de células de VHC (**B**) o en presencia de anti-CD81 y anti-CLDN-1 para bloquear la transmisión libre de células y de célula a célula (**C**). En cada panel, los cuadrantes inferiores contienen células no infectadas (el inferior izquierdo representa células GFP- VHC-, el inferior derecho representa células GFP+ VHC-); el superior izquierdo representa células productoras infectadas GFP-VHC+; y el superior derecho representa células receptoras recién infectadas GFP+ VHC+. En la representación de puntos, la altura de FL1 (FL1-H) representa la intensidad de fluorescencia de GFP y la altura de FL2 (FL2-H) representa la intensidad de fluorescencia de anticuerpos anti-núcleo/PE (A-C). La frecuencia relativa de células receptoras GFP+ VHC+ con los distintos tratamientos se ilustra en (**D**). Se muestran los resultados de un experimento representativo. La incubación de células con anticuerpos de control de isotipo de rata mostró no tener ningún efecto sobre el nivel de infección de VHC (datos no mostrados).

La Figura 24 es una gráfica que muestra la inhibición de infección por VHC mediante un anticuerpo monoclonal anti-CLDN-1 (7D3) añadido después de la infección. Las células Huh7.5.1 se infectaron con VHCcc de Luc-Jc1. Cuatro horas después de la infección, se añadieron a las células el anticuerpo monoclonal anti-CLDN-1 (7D3) o un anticuerpo monoclonal de control de isotipo de rata (50 µg/ml). La infección por VHC se cuantificó mediante expresión de indicador de luciferasa en los días 3, 5, 7 y 9 después de la infección y se ilustra como carga viral (Log_{10} RLU). El medio se cambió cada 2 días con reposición de nuevos anticuerpos (50 µg/ml). El umbral para detección positiva de la carga viral en este ensayo es 800 RLU (línea de puntos). Se muestran los resultados de un experimento representativo. Los valores son medias de duplicados. Abreviaturas: RLU - unidades de luz relativa.

Definiciones

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

Tal como se usa en el presente documento, el término "**sujeto**" se refiere a un ser humano u a otro mamífero (por ejemplo, primate, perro, gato, cabra, caballo, cerdo, rata, conejo, y similares), que puedes ser el hospedador del virus de la hepatitis C (VHC), pero puede o no estar infectado por el virus, y puede o no padecer una enfermedad relacionada con el VHC. Los sujetos no humanos pueden ser animales transgénicos o modificados por otros medios. En varias realizaciones de la presente invención, el sujeto es un ser humano. En dichas realizaciones, se cita normalmente al sujeto como a un "**individuo**". El término "individuo" no indica una edad particular, y por lo tanto abarca recién nacidos, niños, adolescentes, y adultos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "**VHC**" se refiere a cualquier genotipo, subtipo, aislado y/o cuasiespecie principal de VHC. Los genotipos de VHC incluyen, pero sin limitación, los genotipos 1, 2, 3, 4, 5, y 6; los subtipos de VHC incluyen, pero sin limitación, los subtipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a, 4a-f, 5a y 6a.

Las expresiones "**afectado por VHC**" o "**infectado por VHC**" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Cuando se usan en referencia a un sujeto, se refieren a un sujeto que tiene al menos una célula que está infectada por VHC. La expresión "**infección por VHC**" se refiere a la introducción de la información genética del VHC en una célula diana, tal como mediante fusión de la membrana de la célula diana con el VHC o una célula positiva a glucoproteína de la envuelta de VHC.

Los términos "**enfermedad relacionada con VHC**" y "**enfermedad asociada a VHC**" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Se refieren a cualquier enfermedad o trastorno que se sabe o se sospecha

- que está asociado con y/o causado por, directa o indirectamente, el VHC. Las enfermedades relacionadas con el VHC (o asociadas con el VHC) incluyen, pero sin limitación, una amplia variedad de enfermedades hepáticas, tales como el estado de portador subclínico de hepatitis aguda, hepatitis crónica, cirrosis, y carcinoma hepatocelular. La expresión incluye síntomas y efectos secundarios de cualquier infección por VHC, incluyendo infecciones latentes, persistentes y subclínicas, ya sea o no clínicamente evidente la infección.
- 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 (por ejemplo, infección por VHC o enfermedad relacionada con VHC); (2) frenar o detener la progresión, agravamiento, o deterioro de los síntomas de la enfermedad o afección; (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, puede administrarse un tratamiento después del inicio de la enfermedad o afección, para una acción terapéutica.
- Se define que una "**composición farmacéutica**" en el presente documento comprende una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo (o un fragmento del mismo) de la invención, y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- Tal como se usa en el presente documento, la expresión "**cantidad efectiva**" se refiere a cualquier cantidad de un compuesto, agente, anticuerpo, o composición que es suficiente para cumplir su fin (o fines) previsto, por ejemplo, una respuesta biológica o médica deseada en una célula, tejido, sistema o sujeto. Por ejemplo, en determinadas realizaciones de la presente invención, el fin (o los fines) puede ser: prevenir la infección por VHC, prevenir la aparición de una enfermedad relacionada con el VHC, frenar, aliviar o detener la progresión, agravamiento o deterioro de los síntomas de una enfermedad relacionada con el VHC (por ejemplo, hepatitis C crónica, cirrosis, y similares); producir la mejora de los síntomas de la enfermedad, o curar la enfermedad relacionada con el VHC.
- La expresión "**vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable**" se refiere a un medio transportador que no interfiere con la efectividad 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 dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W. Martin, 18^a Ed., 1990, Mack Publishing Co.: Easton, PA, que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad).
- El término "**anticuerpo**", tal 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 epítopo 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 abarca cualquier proteína que tenga un dominio de unión, que es homólogo o elevadamente homólogo a un dominio de unión de inmunoglobulina. Estas proteínas pueden derivarse de fuentes naturales, o producirse parcial o completamente de manera 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. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad de al menos $1 \times 10^7 M^{-1}$, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que la afinidad de unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína).
- 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 a cualquier variante de origen natural que se encuentra de manera común en poblaciones humanas permisivas a 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).
- Las expresiones "**célula susceptible**" y "**célula susceptible a VHC**" se usan de manera intercambiable. Se refieren a cualquier célula que puede infectarse con VHC. Las células susceptibles incluyen, pero sin limitación, a células de hígado o hepáticas, células primarias, células de hepatoma, células Caco2, células dendríticas, células placentarias, células endometriales, células de los nódulos linfáticos, células linfoides (linfocitos B y T), células mononucleares de sangre periférica, y monocitos/macrófagos.
- La expresión "**prevenir, inhibir o bloquear infecciones por VHC**" cuando se usa en referencia a un anticuerpo o a una molécula relacionada con el anticuerpo de la invención, significa reducir la cantidad de información genética de VHC introducida en una célula susceptible o población de células susceptibles en comparación con la cantidad que podría introducirse en ausencia del anticuerpo o molécula relacionada con el anticuerpo.
- El término "**aislado**", tal como se usa en el presente documento en referencia a una proteína o polipéptido, significa una proteína o polipéptido, que por virtud de su origen o manipulación se separa de al menos algunos componentes

con los que se asocia de manera natural o con los que se asocia cuando se obtiene inicialmente. Por "aislado", se pretende indicar como alternativa o adicionalmente que la proteína o el polipéptido de interés se produce o sintetiza por la acción del hombre.

- 5 Los términos "**proteína**", "**polipéptido**", y "**péptido**" se usan de manera intercambiable en el presente documento, y se refieren a secuencias de aminoácidos de una variedad de longitudes, ya sea en sus formas neutras (no cargadas) o como sales, y ya estén o no modificadas por glucosilación, oxidación de cadenas laterales, o fosforilación. En determinadas 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 adicionales, la secuencia de aminoácidos se modifica mediante sustituyentes adicionales unidos a las cadenas laterales de aminoácidos, tales como unidades de glucosilo, lípidos, o iones orgánicos, tales como fosfatos, así como modificaciones relativas a 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, sometida a aquellas modificaciones que no cambian de manera significativa sus propiedades específicas. En particular, el término "proteína" abarca isoformas de proteínas, es decir, variantes que están codificadas por el mismo gen, pero que difieren en su pI o PM, o en ambas cosas. Dichas isoformas pueden diferir en su secuencia de aminoácidos (por ejemplo, como resultado de una variación alélica, corte y empalme alternativo o proteólisis limitada), o como alternativa, pueden surgir a partir de modificaciones pos-traduccionales (por ejemplo, glucosilación, acilación, fosforilación).
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- El término "**análogo**", tal 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 de la proteína pero no comprende necesariamente una secuencia de aminoácidos que sea similar o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína o una estructura que sea 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 un 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**", tal 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**", tal como se usa en el presente documento para caracterizar a una variante, análogo o fragmento de proteína, se refiere a una molécula que comparte suficiente identidad u homología de secuencia de aminoácidos con la proteína para mostrar propiedades similares o idénticas a las de la proteína. Por ejemplo, un fragmento biológicamente activo de un anticuerpo de la invención es un fragmento que mantiene la capacidad del anticuerpo para unirse al dominio extracelular de claudina-1.
- El término "**homólogo**" (u "**homología**"), tal 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 se ocupa una posición en ambas secuencias comparadas por la misma base o el mismo resto de aminoácido, las moléculas respectivas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias se corresponde con el número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias divididas entre el número de posiciones comparadas y multiplicado por 100. En general, se efectúa una comparación cuando se alinean dos secuencias para proporcionar la máxima homología. Las secuencias de aminoácidos homólogos comparten secuencias de aminoácidos idénticas o similares. Los restos similares son sustituciones conservativas para, o "mutaciones puntuales permitidas" de, los 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, por ejemplo, que tienen un tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas similares, incluyendo la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Las sustituciones conservativas particularmente preferidas son aquellas que cumplen los criterios para una "mutación puntual aceptada" tal 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).
- Las expresiones "**marcado**", "**marcado con un agente detectable**" y "**marcado con un resto detectable**" se usan en el presente documento de manera intercambiable. Estos términos se usan para especificar que una entidad (por ejemplo, un anticuerpo) puede visualizarse, por ejemplo, después de la unión a otra entidad (por ejemplo, un antígeno). Preferentemente, un agente o resto detectable se selecciona de tal modo que genera una señal que puede medirse y cuya intensidad está relacionada con la cantidad de entidad unida. Los métodos para marcar proteínas y polipéptidos, incluyendo anticuerpos, se conocen bien en la técnica. Los polipéptidos marcados pueden prepararse mediante incorporación de o conjugación a 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, varios ligandos, radionúclidos, tintes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, micropartículas, enzimas, marcadores colorimétricos, marcadores

magnéticos, y haptenos.

Las expresiones "**aproximadamente**" y "**alrededor de**", tal como se usan en el presente documento en referencia a un número, incluyen generalmente números que se encuentran dentro de un intervalo de un 10 % en ambas direcciones del número (mayor que o menor que el número) a menos que se indique lo contrario o sea de otro modo evidente a partir del contexto (excepto cuando dicho número pudiera exceder el 100 % de un valor posible).

Descripción detallada de la invención

10 Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que previenen la infección por VHC interfiriendo con las interacciones VHC-células hospedadoras, y líneas celulares de hibridoma que secretan dichos anticuerpos monoclonales.

I - Hibridomas y anticuerpos monoclonales anti-claudina-1

15 Tal como se muestra en la sección de ejemplos más adelante, los presentes Solicitantes han producido anticuerpos policlonales dirigidos contra el dominio extracelular de claudina-1 humana mediante inmunización genética usando un vector de expresión que contiene el gen de CLDN-1 de longitud completa. Se descubrió que los anticuerpos policlonales producidos de este modo inhiben de manera eficiente la infección por VHC usando sistemas basados en VHCcc y VHCpp (véase el Ejemplo 1). A la vista de estos motivadores resultados, los Solicitantes han usado inmunización genética de ratas y métodos de exploración para generar líneas celulares de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al dominio extracelular de claudina-1 humana e inhiben eficazmente la infección por VHC (véase el Ejemplo 2).

25 A. Líneas celulares de hibridoma y anticuerpos monoclonales anti-claudina-1

Por consiguiente, la presente invención proporciona líneas celulares de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al dominio extracelular de claudina-1 humana, y, en particular, a W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64), un motivo conservado localizado en el primer bucle extracelular de claudina-1. Más 30 específicamente, la presente invención proporciona ocho de dichas líneas celulares de hibridoma, generadas mediante inmunización genética tal como se describe en el Ejemplo 2 (Lohrmann, 2003). Estas líneas celulares de hibridoma, que se llaman 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, se depositaron el 29 de julio de 2008 en el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania) con los Números de Acceso DSM ACC2931, 35 DSM ACC2932, DSM ACC2933, DSM ACC2934, DSM ACC2935, DSM ACC2936, DSM ACC2937, y DSM ACC2938, respectivamente.

La presente invención también proporciona anticuerpos monoclonales secretados por una cualquiera de estas líneas celulares de hibridoma. Los métodos para la producción y aislamiento de anticuerpos monoclonales a partir de cultivos 40 de hibridoma se conocen bien en la técnica. Las células de hibridoma se crecen usando métodos estándar, en medios de cultivo adecuados, tales como, por ejemplo, medio D-MEM y RPMI-1640. Un anticuerpo monoclonal anti-claudina-1 puede recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células de hibridoma mediante purificación de proteína A, precipitación por sulfato de amonio o etanol, extracción de ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, 45 cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, tal como en columna de proteína A, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de lectina, o cualquier combinación adecuada de estos métodos. También puede emplearse cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la purificación.

Se determinó que cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-claudina-1 secretados por las líneas celulares de hibridoma de la invención eran una inmunoglobulina del isotipo de cadena pesada (H) y cadena ligera kappa (L) de rIgG2b o una inmunoglobulina del isotipo de cadena pesada (H) y cadena ligera kappa (L) de rIgG2a. Sin embargo, los 50 anticuerpos monoclonales de la presente invención comprenden más generalmente cualquier anticuerpo monoclonal (o fragmento del mismo), que se secreta por una línea celular de hibridoma de la invención (o una línea celular derivada), y que se une específicamente al dominio extracelular de claudina-1 humana. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la unión de un anticuerpo monoclonal al dominio extracelular de claudina-1 en una célula 55 susceptible interfiere con las interacciones VHC-células hospedadoras, y de este modo previene, inhibe o bloquea la entrada de VHC a la célula y la infección de la célula.

En vez de usar los hibridomas descritos en el presente documento como fuente de los anticuerpos, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, 60 puede prepararse un anticuerpo monoclonal anti-claudina-1 mediante métodos de ADN recombinante. Estos métodos implican generalmente el aislamiento de los genes que codifican al anticuerpo deseado, la transferencia de los genes a un vector adecuado, y la expresión en bruto en un sistema de cultivo celular. Los genes o el ADN que codifica el anticuerpo monoclonal deseado pueden aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótido que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las líneas celulares de hibridoma proporcionadas en el 65 presente documento sirven como una fuente preferida para dicho ADN. Las células hospedadoras para la producción

recombinante de anticuerpos monoclonales incluyen, pero sin limitación, células hospedadoras de mamífero adecuadas, tales como CHO, HeLa, o CV1. Los plásmidos de expresión adecuados incluyen, sin limitación, pcDNA3.1 Zeo, pIND(SP1), pREP8 (todos comercialmente disponibles a través de Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), y similares. Los genes de los anticuerpos pueden expresarse mediante vectores virales o retrovirales, incluyendo vectores basados en MLV, vectores basados en virus *vaccinia*, y similares. Los anticuerpos de la presente invención pueden expresarse como anticuerpos monocatenarios. El aislamiento y purificación de anticuerpos monoclonales producidos de manera recombinante puede efectuarse como se describe anteriormente.

B. Fragmentos de anticuerpos

En determinadas realizaciones, se usa un anticuerpo monoclonal de la invención en su forma nativa. En otras realizaciones, puede estar truncado (por ejemplo, mediante escisión enzimática u otro método adecuado) para proporcionar fragmentos o porciones de inmunoglobulinas, en particular, fragmentos o porciones que son biológicamente activos. Los fragmentos o porciones biológicamente activos de un anticuerpo monoclonal de la invención incluyen fragmentos o porciones que mantienen la capacidad del anticuerpo monoclonal para interferir con las interacciones VHC-células hospedadoras, y/o unirse específicamente al dominio extracelular de claudina-1 humana, y/o inhibir o bloquear la entrada del VHC a células susceptibles, y/o reducir o prevenir la infección por VHC de células susceptibles. Los fragmentos o porciones biológicamente activos de anticuerpos monoclonales de la invención descritos en el presente documento están abarcados por la presente invención.

Un fragmento biológicamente activo de un anticuerpo monoclonal de la invención puede ser un fragmento F(ab')₂.

Los fragmentos de anticuerpo de la presente invención pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitación a, escisión enzimática (por ejemplo, digestión proteolítica de anticuerpos intactos) o mediante técnicas sintéticas o recombinantes. Los fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y ScFv (Fv monocatenario) pueden, por ejemplo, expresarse en forma secretada a partir de células hospedadoras de mamífero o a partir de *E. coli*. Los anticuerpos también pueden producirse en una variedad de formas truncadas usando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de terminación cadena arriba del sitio natural de terminación. Las diversas porciones de anticuerpos pueden unirse químicamente mediante técnicas convencionales, o pueden prepararse como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética.

C. Proteínas de fusión

Los anticuerpos de la presente divulgación (o fragmentos de los mismos) pueden producirse en forma modificada, tal como una proteína de fusión (es decir, una molécula de inmunoglobulina o porción unida a una entidad polipeptídica). Preferentemente, las proteínas de fusión de la divulgación conservan la capacidad de unión del anticuerpo monoclonal hacia el dominio extracelular de claudina-1 humana. Una entidad polipeptídica para su unión a un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de la misma, puede seleccionarse para conferir cualquier número de propiedades ventajosas a la proteína de fusión resultante. Por ejemplo, la entidad polipeptídica puede seleccionarse para proporcionar una expresión aumentada 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 purificación de afinidad. Puede añadirse un sitio de escisión proteolítica a la proteína recombinante de tal modo que en última instancia, la secuencia deseada pueda 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 el objetivo es la estabilidad. Los ejemplos de entidades polipeptídicas adecuadas incluyen, por ejemplo, marcadores de polihistidina, que permiten una fácil purificación de la proteína de fusión resultante en una columna quelante de níquel. La glutatión-S-transferasa (GST), la proteína de unión a maltosa B, o la proteína A son otros ejemplos de entidades polipeptídicas adecuadas.

Dependiendo del uso previsto, puede rediseñarse un anticuerpo para optimizar la estabilidad, solubilidad, semivida *in vivo*, o la capacidad para unirse a dianas adicionales. Se conocen bien en la técnica enfoques de modificación por ingeniería genética así como modificaciones químicas para lograr cualquiera de o toros estos cambios en las propiedades. Por ejemplo, se sabe que la adición, retirada, y/o modificación de las regiones constantes de un anticuerpo juegan un papel particularmente importante en la biodisponibilidad, distribución, y semivida de los anticuerpos administrados terapéuticamente. La clase y subclase del anticuerpo, determinada por la región Fc o constante del anticuerpo (que media las funciones efectoras), cuando está presente, confiere propiedades adicionales importantes. Por tanto, los anticuerpos anti-claudina-1 con dominios constantes reconfigurados, rediseñados, o de otro modo alterados están abarcados por la presente divulgación.

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales de la divulgación mediante las técnicas de reordenamiento de ADN bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nº 5.605.793, 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458). El reordenamiento de ADN puede emplearse para modular la actividad de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, por ejemplo, para obtener anticuerpos con mayor afinidad y menores velocidades de disociación. En dichos métodos, los polinucleótidos que codifican a los anticuerpos de la divulgación pueden alterarse mediante mutagénesis al azar mediante PCR propensa a errores, inserción al azar de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. Como alternativa, pueden recombinarse una o más porciones de un

polinucleótido que codifica a un anticuerpo con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc., de una o más moléculas heterólogas.

Como alternativa, un anticuerpo puede unirse a otro anticuerpo, por ejemplo, para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-claudina-1 de la presente invención, o un fragmento biológicamente activo del mismo, puede unirse a un anticuerpo (o fragmento del mismo) que se une específicamente a otro receptor de VHC en células susceptibles, tales como CD81 y SR-BI. Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, síntesis química que implica reticulación mediante enlaces disulfuro reducibles o enlaces tioéter no reducibles, y métodos recombinantes.

10 D. Anticuerpos quiméricos/humanizados o desinmunizados

Los anticuerpos monoclonales anti-claudina-1 de la presente invención también pueden "humanizarse": las diferencias de secuencia entre anticuerpos de roedor y secuencias humanas pueden minimizarse sustituyendo restos que difieren de aquellos en las secuencias humanas mediante mutagénesis dirigida a sitios de restos individuales o insertando regiones completas o mediante 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 sustituyen con aminoácidos de moléculas de inmunoglobulina humana, mientras que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos en una o más regiones CDR permanecen sin cambios. Pequeñas adiciones, 20 delecciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos son permisibles siempre que no abroguen la capacidad del anticuerpo resultante para unirse al dominio extracelular de claudina-1 humana. Las moléculas de inmunoglobulina de "reemplazo" humanas incluyen moléculas de IgG14, IgG2 IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgD o IgE, y fragmentos de las mismas. Como alternativa, los epítopos de linfocitos T presentes en anticuerpos de roedor pueden modificarse mediante mutación (desinmunización) para generar anticuerpos de roedor no inmunogénicos que 25 pueden aplicarse con fines terapéuticos en seres humanos (véase www.accurobio.com).

E. Conjugados de anticuerpos

Un anticuerpo monoclonal de la invención, o una variante o fragmento del mismo biológicamente activo, puede estar 30 unido funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u de otra manera) con una o más entidades moleculares. Se conocen en la técnica métodos para la preparación de dichos anticuerpos modificados (o anticuerpos conjugados). (Véase, por ejemplo, "Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B", Methods in Enzymol., 1974, Volumen 34, W.B., Jakoby y M. Wilneck (Eds.), Academic Press, New York, NY; y 35 M. Wilchek y E.A. Bayer, Anal. Biochem. 1988, 171: 1-32). Preferentemente, las entidades moleculares se unen en posiciones de la molécula del anticuerpo que no interfieren con las propiedades de unión del conjugado resultante, es decir, posiciones que no participan en la unión específica del anticuerpo al dominio extracelular de claudina-1 humana.

En determinadas realizaciones, la molécula y la entidad molecular están unidas directamente de manera covalente entre sí. La unión covalente directa puede ser a través de un engarce, tal como un engarce amida, éster, carbono-carbono, disulfuro, carbamato, éter, tioéter, urea, amina o carbonato. La unión covalente puede lograrse beneficiándose de los grupos funcionales presentes en el anticuerpo y la entidad molecular. Puede usarse un agente 40 activador, tal como una carbodiímida, para formar un engarce directo. En otras realizaciones, la molécula de anticuerpo y la entidad molecular están covalentemente unidas entre sí a través de un grupo enlazante. Esto puede lograrse usando cualquiera de una variedad de agentes bifuncionales estables bien conocidos en la técnica, 45 incluyendo enlazantes homofuncionales y heterofuncionales.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la presente invención (o un fragmento biológicamente activo del mismo) se conjuga a 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 (por ejemplo, 50 agentes citostáticos o citocidas), agentes terapéuticos, e iones de metales radiactivos (por ejemplo, emisores alfa y emisores alfa unidos a quelantes macrocíclicos, tales como DOTA). Las citotoxinas y los agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubricina, dihidroxí antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 55 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, timidina cinasa, endonucleasa, RNasa, y puromicina y fragmentos, variantes u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cisdiClorodiamina de 60 platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubricina y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, bleomicina, mitramicina, y antramicina), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Los conjugados de anticuerpo resultantes pueden ser de aplicación en el tratamiento del cáncer de hígado asociado con la infección por VHC (véase más adelante).

65 Otros restos terapéuticos incluyen proteínas o polipéptidos que poseen una actividad biológica deseada. Dichas proteínas incluyen, pero sin limitación, toxinas (por ejemplo, abrina, ricina A, toxina alfa, exotoxina de seudomonas, la

5 toxina diftérica saporina, momordina, gelonina, proteína antiviral de la hierba carmín, alfa-sarcina y toxina colérica); 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 (por ejemplo, TNF- α , TNF- β) o, modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo, linfoquinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulador de las colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF), y otros factores de crecimiento).

10 Como alternativa o adicionalmente, un anticuerpo de la presente invención (o un fragmento biológicamente activo del mismo) puede conjugarse a un agente detectable. Puede usarse cualquiera de una amplia variedad de agentes detectables en la práctica de la presente divulgación, incluyendo, sin limitación, varios ligandos, radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{131}I , y similares), tintes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeriterina, ficocianina, aloficocianina, o-ftalaldehído y fluoresceína), agentes quimioluminiscentes (por ejemplo, luciferina, luciferasa y aecuorina), micropartículas (tales como, por ejemplo, puntos cuánticos, nanocristales, fósforos y similares), enzimas, por ejemplo, aquellas usadas en un ELISA, es decir, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores colorimétricos, marcadores magnéticos, y biotina, digoxigenina u otros haptenos y proteínas para los que hay disponibles anticuerpos o anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos detectables resultantes pueden usarse en métodos diagnósticos y/o pronósticos (véase más adelante).

15 Otras entidades moleculares que pueden conjugarse a 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 éster de ácidos grasos.

20 Por tanto, además de anticuerpos monoclonales anti-claudina-1 secretados por las líneas celulares de hibridoma descritas en el presente documento, y cualquier variante o fragmento de los mismos biológicamente activo, la presente divulgación también se refiere a anticuerpos químicos, anticuerpos humanizados, y moléculas derivadas de anticuerpo que comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de una región variable de cadena pesada o de cadena ligera de un anticuerpo monoclonal anti-claudina-1 de la invención, incluyendo moléculas, tales como fragmentos Fab, fragmentos F(ab')², fragmentos Fd, fragmentos Fabc, anticuerpos Sc (anticuerpos monocatenarios), diacuerpos, cadenas ligadas individuales de anticuerpos individuales, cadenas pesadas de anticuerpos individuales, fusiones químicas entre cadenas de anticuerpos y otras moléculas, y conjugados de anticuerpos, tales como anticuerpos conjugados a un agente diagnóstico o terapéutico. Todos estos anticuerpos y moléculas relacionadas con anticuerpos se unen específicamente al dominio extracelular de claudina-1 humana.

F. Actividad y especificidad de anticuerpos monoclonales y moléculas relacionadas de la invención

25 35 Cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-claudina-1 descritos en el Ejemplo 2 se produjo a partir de una línea celular de hibridoma proporcionada en el presente documento y se seleccionó por su capacidad para inhibir la infección por VHCcc de células Huh7.5.1. Como apreciarán los expertos en la materia, el efecto inhibidor de la infección por VHC de otros anticuerpos y moléculas relacionadas con anticuerpos de la invención también puede evaluarse usando un sistema de infección por VHCcc. El efecto inhibidor de los anticuerpos y moléculas relacionadas con anticuerpos sobre la infección por VHC puede, como alternativa o adicionalmente, evaluarse usando partículas seudotipadas de VHC retrovirales (VHCpp) como se conoce en la técnica. Preferentemente, un anticuerpo de la presente invención mostrará inhibición de la infección por VHC de células susceptibles mediante VHCcc o VHCpp de manera dependiente de la dosis.

40 45 Otros métodos que pueden usarse para ensayar la especificidad de los anticuerpos y reactivos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, análisis por citometría de flujo, análisis por transferencia de Western, ELISA y ensayos de inhibición de la unión que implican unión ligando/receptor por el anticuerpo. Estos métodos pueden usarse para ensayar sobrenadantes de hibridomas que producen anticuerpos, para ensayar la actividad de anticuerpos aislados/purificados, y/o para ensayar la actividad de anticuerpos modificados (moléculas relacionadas con anticuerpos). El ensayo de la especificidad de unión puede llevarse a cabo usando al anticuerpo o molécula relacionada con el anticuerpo contra un panel de células, por ejemplo, células humanas, incluyendo, sin limitación, líneas celulares hepáticas (tales como, por ejemplo, Huh7, Hep3b o HepG2), células de riñón embrionario (293T), fibroblastos (HeLa), linfocitos B, linfocitos T (por ejemplo, Molt-4, Sup-T1, o Hut-78), células monocíticas (THP-1), células astrocíticas (U87), células de hepatoma (PLC/PRF:5) u otros tipos celulares hepáticos, por ejemplo, las células de adenocarcinoma hepático SkHepl, células de sangre periférica humanas y varios subtipos fraccionados de las mismas que incluyen linfocitos y monocitos u otras líneas celulares incluyendo células CaCo2. El análisis por citometría de flujo puede revelar especificidad de unión de los anticuerpos o moléculas relacionadas con anticuerpos a claudina-1 en varios tipos celulares. También pueden usarse células de mamíferos no humanos en dichos ensayos.

50 55 60 65 Usando dichos ensayos, pueden determinarse los valores de CI_{50} para los anticuerpos y moléculas relacionadas con anticuerpos de la presente invención. Estos valores, que dan una indicación de la concentración de anticuerpo o molécula relacionada con anticuerpo necesaria para la inhibición del 50 % de la infectividad viral, proporcionan criterios cuantitativos relevantes y significativos y permiten la comparación de la actividad inhibidora de la infección de diferentes anticuerpos y moléculas relacionadas con anticuerpos.

Se ha descubierto que los anticuerpos monoclonales anti-claudina-1 descritos en el Ejemplo 2 neutralizan potenteamente de manera cruzada la infección por VHC de todos los genotipos principales así como de todos los aislados de la población completa de cuasiespecies de dos pacientes infectados por VHC de manera crónica. Puede evaluarse la capacidad de otros anticuerpos de la invención para neutralizar de manera cruzada la infección por VHC

5 de los principales genotipos de VHC y a partir de aislados de cuasiespecies de pacientes individuales usando cualquier método adecuado, tal como mediante el uso de partículas seudotipadas de VHC (VHC_{pp}) que portan glucoproteínas de la envuelta de VHC de un genotipo específico de VHC, o VHC_{pp} que portan glucoproteínas de la envuelta de VHC de un paciente individual infectado de manera crónica con VHC, tal como se describe en el Ejemplo 2. Preferentemente, se mostrará que un anticuerpo de la presente invención inhibe la infección por VHC de genotipos 10 principales de VHC y de cuasiespecies de un paciente infectado por VHC de manera dependiente de la dosis.

De manera similar, se ha demostrado que un anticuerpo de la presente invención no reacciona de manera cruzada con claudina-1 de roedor (tal como claudina-1 murina) pero se une específicamente a claudina-1 de primate (tal como claudina-1 de mono cinomolgo).

15 **II - Tratamiento o prevención de la infección por VHC y enfermedades asociadas a VHC**

A. Indicaciones

20 Los anticuerpos anti-claudina-1 de la presente invención pueden usarse en métodos terapéuticos y profilácticos para tratar y/o prevenir la infección por VHC, o para tratar y/o prevenir una enfermedad hepática o una afección patológica que afecte a células susceptibles a VHC, tales como células hepáticas, células linfoides, o monocitos/macrófagos. Dicho anticuerpo anti-claudina-1 interfiere con las interacciones VHC-células hospedadoras uniéndose al dominio 25 extracelular de claudina-1 en una superficie celular, de este modo reduciendo, inhibiendo, bloqueando o previniendo la entrada del VHC en la célula y/o la infección de la célula por VHC.

Los métodos de tratamiento de la presente invención pueden lograrse usando un anticuerpo o una composición farmacéutica que comprenda a un anticuerpo (véase más adelante). Estos métodos comprenden generalmente la administración de una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo anti-claudina-1, o una composición farmacéutica del 30 mismo, a un sujeto que lo necesite. La administración puede efectuarse usando cualquiera de los métodos conocidos para un experto en la técnica. En particular, el anticuerpo o composición puede administrarse a través de varias rutas incluyendo, pero sin limitación, por aerosol, por vía parenteral, oral o tópica.

35 En general, se administrará un anticuerpo o composición en una cantidad eficaz, es decir, una cantidad que sea suficiente para cumplir su fin previsto. La cantidad exacta de anticuerpo o composición farmacéutica a administrar variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad, sexo, peso y estado general de salud del sujeto a tratar, de la respuesta biológica o médica deseada (por ejemplo, prevención de infección por VHC o tratamiento de enfermedad 40 hepática asociada a VHC), y similares. En muchas realizaciones, una cantidad eficaz es una que inhibe o previene la entrada de VHC en las células susceptibles del sujeto y/o la infección de las células de un sujeto, para de este modo prevenir la infección por VHC, tratar o prevenir la enfermedad hepática u otra patología asociada con el VHC en el sujeto.

45 Los anticuerpos y composiciones de la presente invención pueden usarse en una variedad de métodos terapéuticos o profilácticos. En particular, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o patología hepática en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo (o composición del mismo) que inhibe la entrada o la infección del VHC en las células del sujeto, para de este modo tratar o prevenir la enfermedad o patología hepática en el sujeto. La enfermedad o patología hepática puede ser inflamación del hígado, fibrosis hepática, cirrosis, y/o carcinoma hepatocelular (es decir, cáncer de hígado) asociados con la 50 infección por VHC.

50 La presente invención también proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con el VHC (incluyendo una enfermedad hepática) en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención (o composición del mismo) que inhibe la entrada o la infección del VHC en las células del sujeto, para de este modo tratar o prevenir la enfermedad o afección asociada con el VHC en el sujeto. En 55 determinadas realizaciones de la presente invención, el anticuerpo o composición se administra a un sujeto al que se le ha diagnosticado hepatitis C aguda. En otras realizaciones de la invención, el anticuerpo o composición se administra a un sujeto al que se le ha diagnosticado hepatitis C crónica.

60 La administración de un anticuerpo o composición de acuerdo con dichos métodos puede dar como resultado la mejora de al menos uno de los síntomas experimentados por el individuo incluyendo, pero sin limitación, síntomas de hepatitis C aguda, tales como disminución del apetito, fatiga, dolor abdominal, ictericia, picor, y síntomas parecidos a la gripe; síntomas de hepatitis C crónica, tales como fatiga, pérdida de peso pronunciada, síntomas parecidos a la gripe, dolor muscular, dolor articular, fiebres leves intermitentes, picor, alteraciones del sueño, dolor abdominal, cambios en el apetito, náuseas, diarrea, dispepsia, cambios cognitivos, depresión, cefalea, y cambios de humor; síntomas de 65 cirrosis, tales como ascitis, tendencia a moretones y sangrado, dolor de huesos, varices (especialmente en el estómago y esófago), esteatorrea, ictericia y encefalopatía hepática; y síntomas de manifestaciones extrahepáticas

asociadas con el VHC, tales como tiroiditis, porfiria cutánea tardía, crioglobulinemia, glomerulonefritis, síndrome seco, trombocitopenia, liquen plano, diabetes mellitus y trastornos linfoproliferativos de linfocitos B.

Como alternativa o adicionalmente, la administración de un anticuerpo o composición de acuerdo con dichos métodos puede frenar, reducir, detener o aliviar la progresión de la infección por VHC o de una enfermedad asociada con el VHC, o revertir la progresión hasta el punto de eliminar la infección o enfermedad. La administración de un anticuerpo o composición de la invención de acuerdo con dichos métodos también puede dar como resultado una reducción del número de infecciones virales, reducción del número de partículas virales infecciosas, y/o reducción en el número de células infectadas por el virus.

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 infección por VHC y/o enfermedad hepática. Dichos ensayos incluyen, pero sin limitación, pruebas serológicas en sangre, pruebas de función hepática para medir una o más de albúmina, alanina transaminasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), aspartato transaminasa (AST), y gamma glutamil transpeptidasa (GGT), y pruebas moléculas de ácidos nucleicos que usan diferentes técnicas, tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), o ADN ramificado (ADNr).

Los anticuerpos y composiciones de la presente invención también pueden usarse para terapias de inmunización. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para reducir la probabilidad de que células susceptibles se infecten por VHC como resultado del contacto con el VHC. El método comprende poner en contacto las células susceptibles con una cantidad eficaz de un anticuerpo o composición que inhibe la entrada o la infección del VHC en las células susceptibles, para reducir la probabilidad de que las células se infecten con VHC como resultado del contacto con el VHC. La presente divulgación también proporciona un método para reducir la probabilidad de que las células susceptibles de un sujeto se infecten con VHC como resultado del contacto con VHC. En este método, el contacto de las células susceptibles con el anticuerpo o composición de la invención puede efectuarse administrando al sujeto el anticuerpo o la composición.

Reducir la probabilidad de que las células susceptibles de un sujeto se infecten con VHC significa disminuir la probabilidad de que las células susceptibles o un sujeto se infecten con VHC como resultado del contacto con el VHC. La disminución puede ser en cualquier cantidad significativa, *por ejemplo*, una disminución de al menos 2 veces, una disminución de más de 2 veces, una disminución de al menos 10 veces, una disminución de más de 10 veces, una disminución de al menos 100 veces, o una disminución de más de 100 veces.

En determinadas realizaciones, el sujeto está infectado con VHC antes de la administración del anticuerpo o composición de la invención. En otras realizaciones, el sujeto no está infectado por VHC antes de la administración del anticuerpo o composición. En otras realizaciones adicionales, el sujeto no está infectado, pero se ha expuesto al VHC. En determinadas realizaciones, el sujeto puede estar infectado por VIH o VHB.

Por ejemplo, los métodos de la presente invención pueden usarse para reducir la probabilidad de que las células susceptibles de un sujeto se infecten con VHC como consecuencia de un trasplante hepático. Como ya se ha mencionado anteriormente, cuando se extirpa un hígado enfermo de un paciente infectado por VHC, los niveles virales en suero se desploman. Sin embargo, después de recibir un trasplante de hígado sano, los niveles de virus rebaten y pueden sobrepasar a los niveles previos al trasplante a los pocos días (Powers, 2006). Los pacientes con trasplante hepático pueden beneficiarse de la administración de un anticuerpo que se une al ectodominio de claudina-1 en la superficie de los hepatocitos y de este modo reducir, inhibir, bloquear o prevenir la entrada del VHC en las células. La administración puede efectuarse antes del trasplante hepático, durante el trasplante hepático, y/o después del trasplante hepático.

Otros sujetos que pueden beneficiarse de la administración de un anticuerpo o composición incluyen, pero sin limitación, bebés nacidos de madres infectadas por VHC, en particular, de madres que también son seropositivas; trabajadores sanitarios que han estado en contacto con sangre contaminada por VHC o instrumentos médicos contaminados con sangre; consumidores de drogas que han estado expuestos a VHC compartiendo equipamiento para inyectar o de otro modo administrar drogas; y gente que haya estado expuesta al VHC por hacerse tatuajes, perforaciones en la oreja/cuerpo y acupuntura con procedimientos de control de infecciones deficientes.

Otros sujetos que pueden beneficiarse de la administración de un anticuerpo o composición incluyen, pero sin limitación, sujetos que muestran uno o más factores conocidos por aumentar la velocidad de la progresión de la enfermedad por VHC. Dichos factores incluyen, en particular, la edad, género (los varones muestran generalmente una progresión más rápida de la enfermedad que las mujeres), consumo de alcohol, coinfección por VIH (asociada con una velocidad pronunciadamente aumentada de progresión de la enfermedad), e hígado graso.

En determinadas realizaciones, se administra un anticuerpo o composición solo de acuerdo con un método de tratamiento de la presente invención. En otras realizaciones, se administra un anticuerpo o composición en combinación con al menos un agente terapéutico adicional. El anticuerpo o composición puede administrarse antes de la administración del agente terapéutico, de manera concurrente con el agente terapéutico, y/o después de la administración del agente terapéutico.

Los agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con un anticuerpo o composición pueden seleccionarse de entre una variedad de compuestos biológicamente activos que se sabe que tienen un efecto beneficioso en el tratamiento o prevención de la infección por VHC, o una enfermedad o afección asociada con el VHC.

- 5 Dichos agentes incluyen, en particular, agentes antivirales, incluyendo, pero sin limitación, interferones (por ejemplo, interferón alfa, interferón alfa pegilado), ribavirina, anticuerpos (monoclonales o policlonales) anti-VHC, inhibidores de ARN polimerasa, inhibidores de la proteasa, inhibidores de IRES, inhibidores de helicasa, compuestos antisentido, ribozimas, y cualquier combinación de los mismos.

10 **B. Administración**

Un anticuerpo, (opcionalmente después de la formulación con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables), en una dosificación deseada puede administrarse a un sujeto que lo necesite a través de cualquier vía adecuada. Se conocen varios sistemas de administración y pueden usarse para administrar anticuerpos de la presente invención, incluyendo comprimidos, cápsulas, soluciones inyectables, encapsulación de 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 o composición de la invención puede administrarse por cualquier vía conveniente o adecuada, por ejemplo, mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, oral, mucosa, mucosa rectal o 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. Como apreciarán los expertos en la materia, en las realizaciones donde un anticuerpo de la invención se administra en combinación con un agente terapéutico adicional, el anticuerpo y el agente terapéutico puede administrarse por la misma vía (por ejemplo, intravenosa) o por diferentes vías (por ejemplo, intravenosa y oral).

C. Dosificación

30 La administración de un anticuerpo (o composición) de la presente invención será en una dosificación tal que la cantidad administrada es eficaz para el fin previsto. La vía de administración, la formulación y la dosificación administrada dependerán del efecto terapéutico deseado, de la gravedad de la afección relacionada con el VHC 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, la 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 tratante durante el trascurso de la terapia. Como alternativa o adicionalmente, la dosificación a administrar puede determinarse a partir de estudios usando modelos animales (por ejemplo, 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 se encuentra dentro de las capacidades de los médicos expertos. A medida que se efectúen estudios usando los anticuerpos monoclonales de la invención, surgirá información adicional referente a los niveles de dosificación adecuados y a la duración del tratamiento.

45 Un tratamiento de acuerdo con la invención puede consistir en una sola dosis o en múltiples dosis. Por tanto, la administración de un anticuerpo, o una composición del mismo, puede ser constante durante un determinado periodo de tiempo o periódica a intervalos específicos, por ejemplo, cada hora, cada día, cada semana (o a otro intervalo de múltiples días), cada mes, cada año (por ejemplo, en una forma de liberación a lo largo del tiempo). Como alternativa, la administración puede suceder a múltiples tiempos durante un periodo de tiempo dado, por ejemplo, dos o más veces por semana, dos o más veces por mes, y similares. La administración puede ser administración continua durante un periodo de tiempo, *por ejemplo*, administración intravenosa.

50 En general, la cantidad de anticuerpo monoclonal se encontrará preferentemente en 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.

55 III - Composiciones farmacéuticas

60 Tal como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos anti-claudina-1 (y moléculas relacionadas) de la invención pueden administrarse *per se* o como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición comprende además uno o más agentes biológicamente activos adicionales.

65 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 de la dosificación deseada. Dichas formulaciones pueden

influir el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo*, y la velocidad de eliminación *in vivo* del principio activo administrado.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La expresión "forma de dosis unitaria", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente discreta de un anticuerpo anti-claudina-1 de la invención para el paciente a tratar. Se entenderá, sin embargo, que la dosis diaria total de las composiciones se decidirá por el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico.

10 **A. Formulación**

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes adecuados, y agentes suspensores. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 2,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución de cloruro sódico isotónica. Además, se emplean aceites estériles no volátiles como medio de solución o suspensión. Para esta finalidad puede emplearse cualquier aceite suave no volátil incluyendo mono 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 las composiciones en forma líquida estériles para administración parenteral.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando 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 una sola dosis o por infusión gradual.. en los casos donde sea necesario o se deseé, la composición puede incluir un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de inyección.

Para prolongar el efecto de un principio activo (en este caso un anticuerpo anti-claudina-1), a menudo es deseable ralentizar la absorción del ingrediente mediante inyección subcutánea o intramuscular. El retardo en la absorción de un principio activo administrado por vía parenteral puede lograrse disolviendo o suspendiendo el ingrediente en un vehículo oleoso. Las formas en depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del principio activo en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolido. Dependiendo de la relación de principio activo a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del principio. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables en depósito también pueden prepararse atrapando al principio activo en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Las formas de dosificación líquida para administración oral incluyen, pero sin limitación, emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes, elixires y composiciones a presión farmacéuticamente aceptables. Además del anticuerpo anti-claudina-1, la forma de dosificación 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, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofururílico, 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 suspensores, conservantes, agentes edulcorantes, aromatizantes, y perfumantes, agentes espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizantes u osmo-reguladores. Los ejemplos de vehículos líquidos adecuados para administración oral incluyen agua (que contiene potencialmente aditivos como anteriormente, por ejemplo, derivados de celulosa, tales como solución de carboximetilcelulosa de sodio), alcoholes (incluyendo alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos, tales como glicoles) y sus derivados, y aceites (por ejemplo, aceite de coco fraccionado y aceite de cacahuete). Para las composiciones presurizadas, el vehículo líquido puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propelador farmacéuticamente aceptable.

Las formas de dosificación sólida para administración oral incluyen, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, puede mezclarse un anticuerpo anti-claudina-1 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 o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico; (b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, y goma arábiga; (c) humectantes tales como glicerol; (d) agentes desgregantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos, y carbonato sódico; (e) agentes retardantes de la solución, tales como parafina; (f) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (h) absorbente 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 tensioactivos, tales como agentes tensioactivos no iónicos y aniónicos. Los ejemplos representativos de agentes tensioactivos incluyen, pero sin limitación, poloxamer 188, cloruro de benzalconio, estearato de calcio, alcohol cetoestearílico, 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 píldoras, la forma de dosificación puede comprender agentes tamponadores.

Se pueden emplear también composiciones sólidas de un tipo similar como rellenantes en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar lácteo, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación 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, estos pueden contener agentes opacificantes y también pueden tener una composición tal, que liberan al principio activo (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 determinadas realizaciones, puede ser deseable administrar una composición de la invención de manera local a una zona que necesite tratamiento (por ejemplo, el hígado). Esto puede lograrse, por ejemplo, pero no como limitación, mediante infusión local durante la cirugía (por ejemplo, trasplante de hígado), aplicación tópica, mediante inyección, mediante un catéter, mediante un suppositorio, o mediante un parche dérmico o endoprótesis vascular u otro implante.

Para 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 vaselina líquida, palmitato de isopropilo, polietilenglicol, etanol (al 95 %), monolaureato de polioxietileno (al 5 %) en agua, o lauril sulfato de sodio (al 5 %) en agua. Pueden añadirse otros materiales, tales como antioxidantes, humectantes, estabilizantes de la viscosidad, y agentes simulares según sea necesario.

Además, en determinadas casos, se prevé que las composiciones se puedan disponer dentro de dispositivos transdérmicos situados sobre, en, o debajo de la piel. Dichos dispositivos incluyen parches, implantes, e inyecciones que liberan al principio activo mediante mecanismos de liberación pasiva o activa. Las administraciones transdérmicas incluyen todas las administraciones a través de la superficie del cuerpo y de los revestimientos interiores de los pasos corporales 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) y un vehículo que no es tóxico para la piel, y permite la administración del principio para absorción sistémica al torrente sanguíneo a través de la piel. El vehículo puede tomar cualquier forma, tal como cremas y pomadas, pastas, geles, y dispositivos oclusivos. Las cremas y pomadas pueden ser líquidos viscosos o emulsiones semisólidas del tipo de aceite en agua o de agua en aceite. Pueden ser adecuadas las pastas compuestas de polvos absorbentes dispersos en vaselina o vaselina hidrófila que contienen al principio activo. Pueden usarse una variedad de dispositivos oclusivos para liberar el principio activo al torrente sanguíneo, tal como una membrana semipermeable que recubre a un reservorio que contiene al principio activo con o sin un vehículo, o una matriz que contiene al principio activo.

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

Cuando se usa una composición farmacéutica de la presente invención como "vacuna" para prevenir que células susceptibles al VHC se infecten con VHC, la composición farmacéutica puede comprender demás vehículos para vacunas conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, tiroglobulina, albúmina, toxoide tetánico, y poliaminoácidos, tales como polímeros de D-lisina y D-glutamato. La vacuna también puede incluir cualquiera de una variedad de adyuvantes bien conocidos, tales como, por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund, alumbre, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, monofosforil lípido A (MPL, GlaxoSmithKline), una saponina, oligonucleótidos de CpG, montanida, vitamina A y varias emulsiones de agua en aceite preparadas a partir de aceites biodegradables, tales como escualeno y/o tocoferol, Quil A, Ribi Detox, CRL-1005, L-121 y combinaciones de las mismas.

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

B. Agentes biológicamente activos adicionales

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-claudina-1 es el único principio activo en una composición

farmacéutica de la presente invención. En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende adicionalmente uno o más principios activos adicionales. Los ejemplos de agentes biológicamente activos incluyen, pero sin limitación, adyuvantes de vacunas y agentes terapéuticos, tales como agentes antivirales (tal como se ha descrito anteriormente), agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, antibióticos, antioxidantes, agentes antisépticos, y combinaciones de los mismos.

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

C. Kits de paquetes farmacéuticos

En otro aspecto, la presente invención proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases (por ejemplo, viales, ampollas, tubos de ensayo, matraces o frascos) que contienen uno o más ingredientes de una composición farmacéutica de la invención, que permiten la administración de un anticuerpo anti-claudina-1 de la presente invención.

Los diferentes ingredientes de un paquete o kit farmacéutico pueden suministrarse en forma sólida (por ejemplo, liofilizada) o líquida. Cada ingredientes será generalmente adecuado tal como se haya alicuotado en su respectivo recipiente o proporcionado en forma concentrada. Los paquetes o kits farmacéuticos pueden incluir medios para la reconstitución de ingredientes liofilizados. Los envases individuales de los kits se mantendrán preferentemente en confinamiento cerrado para venta comercial.

En determinadas realizaciones, un paquete o kit farmacéutico incluye uno o más agentes terapéuticos adicionales (por ejemplo, uno o más agentes antivirales, tal como se describe anteriormente). Puede haber un aviso o prospecto asociado opcionalmente al envase de la manera prescrita por una organismo gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación por el organismo para la fabricación, uso o venta para administración a seres humanos. 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.

Puede estar presente un identificador, por ejemplo, un código de barras, etiquetas de identificación por radiofrecuencia, etc., en o sobre el kit. El identificador puede usarse, por ejemplo, para identificar únicamente el kit con fines de control de calidad, control de inventario, el seguimiento de los movimientos entre estaciones de trabajo, etc.

IV - Usos no terapéuticos de anticuerpos monoclonales anti-claudina-1

Los anticuerpos de la presente invención, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-claudina-1 producido mediante una línea celular de hibridoma proporcionada en el presente documento, puede emplearse en una variedad de aplicaciones no terapéuticas, tales como métodos de purificación, exploración y diagnóstico.

A. Métodos de purificación

Por tanto, los anticuerpos de la invención pueden usarse como agentes de purificación por afinidad. En la presente solicitud, se inmoviliza un anticuerpo sobre una fase sólida, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene claudina-1 humana (o un fragmento de la misma) que se va a purificar, y a continuación se lava el soporte con un disolvente adecuado que retire sustancialmente todo el material de la muestra a excepción de la proteína claudina-1, que se encuentra unida al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, se lava el soporte con otro disolvente adecuado que liberará a la proteína claudina-1 del anticuerpo.

B. Métodos de exploración

Los anticuerpos anti-claudina-1 de la presente invención también pueden usarse en métodos de exploración de fármacos basados en ensayos de unión competitiva. Dichos métodos pueden implicar las etapas de permitir la unión competitiva entre un compuesto de ensayo (por ejemplo, un anticuerpo de ensayo) en una muestra y una cantidad conocida de un anticuerpo monoclonal anti-claudina-1, para la unión a células a las que se une el anticuerpo, y medir la cantidad del anticuerpo monoclonal conocido unido. El anticuerpo monoclonal se marca de manera adecuada, por ejemplo, con un marcador enzimático, quimioluminiscente o fluorescente.

C. Métodos diagnósticos

Los anticuerpos anti-claudina-1 de la presente invención también pueden ser útiles en ensayos diagnósticos y/o pronósticos, en particular para el diagnóstico o el pronóstico de diferentes cánceres, *por ejemplo*, detectando la expresión de claudina-1 en células específicas, tejidos, o suero. Por tanto, por ejemplo, se ha demostrado que una expresión disminuida de claudina-1 es un fuerte indicador de la recurrencia del cáncer de colon y de una escasa supervivencia del paciente en cáncer de colon en estadio II (Resnick, 2005); la expresión aumentada de claudina-1 es un buen marcador diagnóstico para la detección de neoplasia intraepitelial de cuello de útero (Sobel, 2005) y se ha comunicado que es un marcador útil para la transformación maligna de células escamosas del cuello del útero (Lee, 2005); la expresión disminuida de claudina-1 se correlaciona con elevado grado del tumor y de recurrencia de enfermedad bioquímica en adenocarcinoma de próstata (Sheeban, 2007); se ha demostrado que la expresión disminuida de claudina-1 es correlativa al estado de recurrencia y potencial maligno del cáncer de mama (Morohashi, 2007).

Los ensayos diagnósticos y/o pronósticos de la presente invención comprenden generalmente poner en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente con un anticuerpo anti-claudina-1 durante un periodo de tiempo y en condiciones que permitan que se forme un complejo anticuerpo-claudina-1 entre el anticuerpo y la claudina-1 presente en la muestra biológica; y detectar (y/o cuantificar) la presencia o ausencia de cualquier complejo anticuerpo-claudina-1 formado. La presencia o cantidad determinada puede usarse como indicación de la presencia de una afección dada (*por ejemplo*, un cáncer). En determinados métodos, se compara la cantidad medida con la cantidad de complejo anticuerpo-claudina-1 formado en las mismas condiciones para una muestra biológica obtenida de un sujeto sano (o de una serie de muestras biológicas obtenidas de un número significativo de sujetos sanos).

Estos métodos pueden aplicarse al estudio de cualquier tipo de muestras biológicas. Los ejemplos de muestras biológicas adecuadas incluyen, pero sin limitación, sangre completa, orina, suero, plasma, saliva, fluido sinovial, fluido seminal, fluido linfático, fluido cefalorraquídeo, fluido peritoneal, así como muestras endocervicales, uretrales, rectales y vaginales. Las muestras biológicas pueden contener secciones de tejido (*por ejemplo*, muestras de biopsia mamaria), secciones congeladas, y muestras archivadas con historial de diagnóstico, tratamiento y/o desenlace conocido. Las muestras biológicas pueden tomarse pro cualquier medio no invasivo, tal como, *por ejemplo*, extrayendo sangre de un sujeto, o usando aspiración por aguja fina o biopsia.

Los métodos diagnósticos pueden efectuarse sobre la muestra biológica en sí sin, o con procesamiento limitado de la muestra. Como alternativa, pueden llevarse a cabo después del procesado de la muestra biológica. El procesado de una muestra biológica puede implicar uno o más de: filtración, destilación centrífugación, extracción, concentración, dilución, purificación, inactivación de componentes interferentes, adición de reactivos y similares. Por ejemplo, el método de diagnóstico puede llevarse a cabo en un extracto proteico preparado a partir de la muestra biológica. Se conocen bien en la técnica métodos de extracción de proteínas.

En los métodos diagnósticos descritos anteriormente, la detección de un complejo anticuerpo-claudina-1 puede llevarse a cabo mediante cualquier método adecuado (*véase, por ejemplo*, E. Harlow y A. Lane, "Antibodies: A Laboratories Manual", 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Por ejemplo, la detección de un complejo anticuerpo-claudina-1 puede llevarse a cabo usando un inmunoensayo. Hay disponible una gran variedad de técnicas de inmunoensayo, incluyendo radioinmunoensayo, inmunoensayos enzimáticos (EIA), ensayos inmunoabsorbentes acoplados a enzimas (ELISA), e inmunoprecipitación de inmunofluorescencia. Los inmunoensayos se conocen bien en la técnica. Los métodos para llevar a cabo dichos ensayos así como aplicaciones prácticas y procedimientos se resumen en libros de texto (*véase, por ejemplo*, P. Tijssen, En: Practice and theory of enzyme immunoassays, eds. R.H., Burdon y v. P.H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam (1990), págs. 221-278 y varios volúmenes de "Methods in Enzymology", Eds. S.P. Colowick et al., Academic Press, que tratan sobre métodos de detección inmunológica, especialmente en los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121). Los inmunoensayos pueden ser competitivos o no competitivos.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo se inmoviliza uniéndolo covalentemente o pasivamente a la superficie del portador o soporte sólido. El soporte sólido es cualquier soporte sólido conocido en la técnica sobre el que puede fijarse operativamente el anticuerpo; Fijado operativamente se refiere a que el anticuerpo se fija de manera que permite la formación de un complejo entre el anticuerpo fijado y el dominio extracelular de claudina-1. Los ejemplos de materiales portadores o de soporte incluyen, pero sin limitación, agarosa, celulosa, nitrocelulosa, dextrano, Sephadex, sefarosa, carboximetil celulosa, poliacrilamidas, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, gabros, resina magnética de intercambio iónico, vidrio, copolímero de poliamina-metilvinil-éter-ácido maleico, copolímero de aminoácidos, copolímero de etileno-ácido maleico, nailon, seda y similares. La inmovilización de un anticuerpo sobre la superficie de un portador o soporte sólido puede implicar reticulación, unión covalente o adsorción física, usando métodos bien conocidos en la técnica. El portador o soporte sólido puede estar en forma de un lecho, una partícula, un pozo de microplaca, una matriz, una cubeta, un tubo, una membrana o cualquier otra forma adecuada para acondicionar un inmunoensayo. En determinadas realizaciones, la inmovilización de un antígeno a un portador o soporte sólido incluye electroforesis en gel seguido de transferencia a una membrana (típicamente nitrocelulosa o PVDF) en un proceso denominado transferencia de Western (o immunotransferencia) bien conocido en la técnica.

D. Kits diagnósticos

La presente invención también proporciona kits que comprenden materiales, incluyendo al menos un anticuerpo monoclonal anti-claudina-1, útiles para llevar a cabo métodos de exploración o diagnóstico descritos anteriormente. Preferentemente, el kit comprende una combinación de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para llevar a cabo uno de los métodos. En las realizaciones en las que el anticuerpo está marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores necesitados por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Pueden variarse ampliamente las cantidades relativas de los diversos reactivos para proporcionar concentraciones en soluciones de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, normalmente liofilizados, que incluyen excipientes que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración adecuada. El anticuerpo puede o no inmovilizarse sobre una superficie de sustrato (por ejemplo, perlas, matrices y similares). Los kits también pueden contener un aviso en la forma prescrita por un organismo gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos.

15 Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen algunos de los modos preferidos para producir y poner en práctica la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que los ejemplos son solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Además, a menos que la descripción en un Ejemplo se presente en tiempo pasado, el texto, al igual que el resto de la memoria descriptiva, no pretende sugerir que se efectuasen realmente experimentos o que realmente se obtuviesen datos.

20 Algunos de los resultados comunicados a continuación para antisueros policloniales se presentaron en el 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (15º Simposio internacional sobre la hepatitis C y virus relacionados) (San Antonio, Texas, EE.UU, 5-9 de octubre de 2008) y se resumen en un resumen titulado "Production of anti-claudin1 antibodies potently inhibiting HCV infection reveals that Claudin-1 is required for an entry step closely linked to SR-BI and CD81" por S. Krieger *et al.* Otros resultados se presentan en S. Krieger, et al., "Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-Claudin antibodies is mediated by inhibition of E2-CD81-CLDN1 25 association", que se ha remitido para su publicación en agosto de 2009 así como S. Krieger, et al., "Monoclonal anti-claudin-1 antibodies for prevention and treatment of hepatitis C virus infection", que se remitió para su publicación en octubre de 2009.

30 Ejemplo 1: Anticuerpos policloniales contra claudina-1 humana

35 Materiales y métodos

Células. Se han descrito las células de ovario de hámster chino (CHO), las células BOSC23 y las células Huh7.5.1 de hepatoma usadas en los presentes estudios (Barth, 2005; Barth, 2003; Bartosch, 2003; Blight, 2002). Las células BOSC23 son células de empaquetamiento ecotrópico derivadas de HEK293 que no expresan CLDN1 endógeno (Pear, 1993). Los hepatocitos primarios humanos se aislaron y cultivaron como se describe por David, 1998.

40 **Producción de anticuerpos policloniales anti-CLDN1.** Se provocaron anticuerpos dirigidos contra el bucle extracelular de claudina-1 humana mediante inmunización genética de ratas Wistar usando un vector de expresión pcCMV Sport6 que contiene el ADNc de CLDN-1 humana de longitud completa (pcDNA CLDN-1). En resumen, los animales recibieron cinco aplicaciones de pcDNA CLDN-1, por vía intradérmica a intervalos de 2 semanas. Se recogió el suero de control preinmune del mismo animal sangrado antes de la inmunización. Para analizar la especificidad del suero policlónico anti-CLDN-1 producido, se transfecaron células BOSC23 o CHO con pcDNA (vector de control) o pcDNA CLDN-1 usando transferencia génica mediada por liposomas (Lipofectamina; Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) 45 de acuerdo con el protocolo del fabricante. A continuación se incubaron las células BOSC23 o CHO con suero policlónico anti-CLDN-1 o suero de control preinmune y se analizó la expresión de CLDN-1 superficial mediante citometría de flujo como se ha descrito anteriormente (Barth, 2005).

50 **Caracterización de anticuerpos policloniales anti-CLDN-1 mediante inmunofluorescencia.** Se sembraron células Caco2 y células Huh7.5.1 sobre cubreobjetos de vidrio, se fijaron con paraformaldehído al 3 % en PBS durante 20 minutos, y se tiñeron para CLDN-1 usando anticuerpos anti-CLDN-1 dirigidos contra los ectodomínios de CLDN-1 (es decir, anticuerpos policloniales de la invención, "AcP anti-CLDN1", 50 µg/mL de IgG de rata anti-CLDN1), un anticuerpo anti-CLDN1 dirigido contra el dominio intracelular C-terminal ("AcM anti-CLDN1", clon 1C5-D9, Abnova), y para el núcleo usando DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol). Se usaron IgG policlonal de rata de control ("AcP CTRL") e IgG monoclonal de ratón ("AcM CTRL") como controles. Los anticuerpos primarios unidos se visualizaron usando anticuerpos secundarios Alexa Fluor® 488 anti-Cy5 de rata y anti-ratón y un microscopio Zeiss Axio Observer (Carl Zeiss, S.A.S, Le Pecq, Francia).

55 **Producción de VHC recombinante y ensayos de infección.** Los plásmidos pFK-Jc1 (Pietschmann, 2006) codifican el ADNc de VHC JFH1 de longitud completa o el genoma químérico de VHC diseñado Jc1 que consiste en los segmentos H6CF y JFH1. La síntesis *in vitro* de ARN de VHC y la transfección de ARN se llevó a cabo tal como se ha

descrito (Wakita, 2005). Los sobrenadantes de cultivo de células transfectadas se aclararon y concentraron como se ha descrito anteriormente usando Amicon Ultra 15 (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) y se usaron directamente o se almacenaron a 4 °C o a -80 °C. Se titularon los virus usando el ensayo de dilución limitante en células Huh7.5.1 con unas pocas modificaciones menores y se calculó la TCID₅₀ (la dosis infectiva para el 50 % del cultivo tisular) basándose en el método descrito por Lindenbach, 2005. Las células Huh7.5.1 se mezclaron con anti-CLDN-1 o suero de control (comenzando a una concentración de 5 µg/ml a 100 µg/ml) y se preincubaron durante 1 hora a 37 °C. Se añadieron las VHCcc y se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Los sobrenadantes se retiraron y se incubaron las células en medio regular durante 72 horas a 37 °C y se determinó la infección por VHC mediante qRT-PCR de ARN de VHC intracelular tal como se ha descrito. La neutralización mediada por anticuerpos se determinó mediante la infectividad específica.

Producción de pseudopartículas retrovirales de VHC e inhibición mediada por anticuerpos de infección por VHCpp. Se generaron VHCpp que portan proteínas de la envuelta de la cepa H77 u otras cepas y VSVpp tal como se ha descrito (Bartosch, 2003). Las VHCpp sin glucoproteínas de envuelta (pp de control) sirvieron como control negativo. Para el estudio de neutralización mediada por anticuerpos, se sembraron células Huh7.5.1 el día antes de los ensayos de infección en placas de 96 pocillos a una densidad de 0,5 x 10⁴ células/pocillo. Las células Huh7.5.1 se mezclaron con anti-CLDN-1 o suero de control (comenzando a una dilución 1/20) y se preincubaron durante 1 hora a 37 °C. Se retiraron los sobrenadantes y se incubaron las células en medio regular durante 72 horas a 37 °C. La entrada de VHC se determinó mediante análisis de expresión del gen indicador de luciferasa tal como se ha descrito. La neutralización mediada por anticuerpos se determinó mediante la infectividad específica de VHCpp en presencia de suero anti-claudina-1 o suero preinmune.

Resultados

Producción de anticuerpos policlonales dirigidos contra el bucle extracelular de claudina 1 expresada en células BOSC23 o CHO que expresan claudina-1. Para determinar el papel funcional de CLDN-1 en la iniciación de la infección por VHC, se generaron en primer lugar sueros policlónicos de rata anti-CLDN-1 dirigidos contra el bucle extracelular de CLDN-1 mediante inmunización genética tal como se ha descrito anteriormente. Después de completar la inmunización, se seleccionaron los anticuerpos por su capacidad para unirse a CLDN-1 humana expresada en la superficie celular de células BOSC23 o CHO transfecadas no permeabilizadas. Tal como se muestra en la Figura 1, la incubación de células CHO que expresan CLDN-1 humana con anticuerpos policlónicos de rata anti-CLDN-1 dio como resultado la interacción específica del suero con el ectodominio extracelular de CLDN-1 (Figura 1B). Por el contrario, no se observó interacción en células CHO transfecadas con el vector de control pcDNA3.1 e incubadas con suero de rata anti-CLDN-1 o en células CHO transfecadas con ADNC que expresan CLDN-1 humana e incubadas con un suero preinmune de rata (Figura 1A).

Para estudiar si anti-CLDN-1 humana reconoce a CLDN-1 en células susceptibles de infección por VHC, se incubaron hepatocitos humanos y células Huh7.5.1 de hepatoma con el suero y se analizaron mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la Figura 2, la incubación de células Huh7.5.1 humanas (Figura 2A) y hepatocitos humanos (Figura 2B) con anticuerpo políclonal de rata anti-CLDN-1 demostró que el anticuerpo reconoció a CLDN-1 expresada en células diana de VHC incluyendo hepatocitos humanos. En su conjunto, estos datos demuestran que los anticuerpos policlónicos anti-CLDN-1 producidos mediante inmunización genética se unen al ectodominio de CLDN-1 humana expresada sobre hepatocitos humanos así como en células de hepatoma humano.

Caracterización de anticuerpos policlónales anti-CLDN-1 mediante inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia se presentan en la Figura 3. Estos demuestran que, como era de esperar, los anticuerpos policlónicos anti-CLDN-1 se localizan en la superficie celular.

Inhibición de infección por VHC mediante anticuerpos policlónales anti-CLDN-1. Para determinar el papel de CLDN-1 en la infección por VHC, se estudió la infección por VHCcc de JFH1 en células Huh7.5.1 en presencia de anticuerpos anti-CLDN-1 dirigidos contra los epítopos de los bucles extracelulares de CLDN-1. La Figura 4a muestra que el suero de rata anti-CLDN-1 inhibió la infección por VHCcc de JC1 en más de un 80 % a una concentración de 100 µg/ml. Por el contrario, el suero preinmune de control no tuvo efecto en la infección por VHCcc (Figura 4A). En su conjunto, estos datos demuestran que los anticuerpos dirigidos contra el ectodominio de CLDN-1 inhiben de manera eficiente la infección por VHC.

Para confirmar que la inhibición de la infección por VHCcc de JFH1 estaba de hecho mediada por anticuerpos anti-CLDN-1, se purificó IgG de suero de rata anti-CLDN-1 y de suero de control. Tal como se muestra en la Figura 4B, la IgG purificada anti-claudina-1 inhibió de manera destacada la infección por VHC de células Huh7.5.1 de manera similar al suero anti-CLDN-1. Por el contrario, la IgG de control (100 µg/ml) purificada a partir de suero preinmune no inhibió la infección por VHCcc (Figura 4B). Estos datos demuestran claramente que el efecto inhibidor del suero anti-CLDN-1 está mediado por un anticuerpo anti-CLDN-1 y no por otras sustancias presentes en el suero (tales como ligandos de CLDN-1 que potencialmente interfieren con la función de CLDN-1). Además, el efecto inhibidor de los anticuerpos anti-claudina-1 purificados en la infección por VHC se confirmó usando partículas seudotipadas de VHC retroviral (VHCpp). Los anticuerpos anti-claudina-1, pero no los anticuerpos de control, inhibieron la infección de células Huh7.5.1 por VHCpp de manera dependiente de la dosis (datos no

mostrados).

En conclusión, estos datos demuestran que los anticuerpos policlonales anti-claudina-1 inhiben de manera eficaz la infección por VHC.

Usando un anticuerpo monoclonal anti-CD81, suero de rata anti-SR-BI, y suero de rata anti-CLDN-1 obtenidos tal como se describe anteriormente, los solicitantes han demostrado que el bloqueo de CLDN-1 y CD81, o CLDN-1 y SR-BI, o CLDN-1, CD81 y SR-BI inhibió la infección por VHCcc de manera más potente que bloqueando solo cada uno de los factores de entrada (véase la Figura 5(A)-(D)). En su conjunto, estos datos sugieren que CLDN-1 media la entrada de VHC en cooperación con CD81 y SR-BI. Se descubrió que el anticuerpo monoclonal anti-CD81, el suero de rata anti-SR-BI, y el suero de rata anti-CLDN-1 inhibían la infección por VHCcc de células Huh7.5.1 con cinética similar, lo que sugiere que CLDN-1, SR-BI y CD81 actúan de manera prácticamente simultánea durante el proceso de entrada del VHC en las células Huh7.5.1 (véase la Figura 6).

15 Ejemplo 2: Anticuerpos monoclonales anti-claudina-1

Materiales y métodos

Líneas celulares y hepatocitos primarios. El cultivo de células Huh7 humanas (Steinmann, 2004), Huh7.5.1 (Zhong, 2005), 293T (Pestka, 2007), BOSC23 (Pear, 1993), CHO de hámster (Barth, 2005) y Hepa1.6 murinas (Steinmann, 2004) se ha descrito con anterioridad. Los hepatocitos primarios humanos y de ratón se aislaron y cultivaron tal como se ha descrito (Codran, 2006; Lan, 2008; Zeisel, 2007). Los hepatocitos primarios de cinomolgo se compraron a través de PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH, Alemania.

Unión de AcM anti-CLDN-1 a hepatocitos primarios humanos y análisis de competición cruzada. Las células Huh7.5.1 o los hepatocitos primarios de humano o cinomolgo (2×10^5 células/pocillo) se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con concentraciones en aumento de AcM anti-CLDN-1 en suero salino tamponado con fosfato (PBS)-suero fetal de ternera (FCS) al 3 %. La unión del AcM se reveló mediante incubación de AcM de IgG anti-rata conjugado a PE (Southern Biotechnology Associates). Como control, se usó IgG2b de rata de isotipo emparejado (Genovac). Las adquisiciones FACS y el análisis se llevó a cabo con un dispositivo FACScan (Beckton Dickinson) y el programa informático CellQuest. La competición entre AcM anti-CLDN-1 se midió mediante un ELISA basado en células. Las células Huh7.5.1 de hepatoma humano (2×10^5 células/pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos. Después de bloquear los pocillos, las células se incubaron durante 60 minutos con 0,1 µg/ml de AcM anti-CLDN-1 biotinilado junto con concentraciones en aumento de AcM anti-CLDN-1 no marcados como competidores. Después del lavado de las células en PBS se detectó la unión de anticuerpo biotinilado mediante incubación con estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (BD). La unión se midió como unidades relativas de fluorescencia (590 nm) después del lavado y el revelado con reactivo Amplex Red. Las curvas determinadas por medición de la unión en presencia de un control emparejado de isotipo se compararon con aquellas determinadas en presencia del anticuerpo competidor. El marcaje con biotina se efectuó usando Sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo Scientific) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Estudios de imagen de CLDN-1 de la superficie celular. Se incubaron células Huh7.5.1 vivas con control de isotipo de rata u OM-7D3-B3 anti-CLDN-1 (10 µg/ml) y un anticuerpo secundario anti-rata conjugado a Cy5 (1/300; Jackson Immunoresearch) en ausencia de reactivos de permeabilización. Después de la tinción, se fijaron las células, se montaron y se observaron un dispositivo Leica LSR2 CLSM (IGBMC Imaging Center, Illkirch, Francia).

Mapeo de epítopos usados como diana por AcM anti-CLDN-1. El mapeo de epítopos se llevó a cabo usando plásmidos pQCXIN-hCladin1 que codifican CLDN-1 de tipo silvestre o CLDN-1 que contiene mutaciones definidas introducidas mediante mutagénesis dirigida a sitios (Cukierman, 2009). Estos plásmidos mutantes en CLDN-1 fueron amablemente proporcionados por la Dra. Tanya Dragic (Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, Nueva York). La CLDN-1 de tipo silvestre y mutante contiene un marcador citoplásmico N-terminal de hemaglutinina (HA), que permite la cuantificación de la eficacia de la transfección y expresión de proteínas (Cukierman, 2009). Para estudiar la unión de AcM anti-CLDN-1 a CLDN-1 mutante, se transfecaron de manera transitoria células BOSC23 negativas a CLDN-1 con construcciones de expresión de CLDN-1 (0,05 µg de ADN; Lipofectamina). 48 horas después, se determinó la unión de anticuerpo monoclonal OM-7D3-B3 u OM-8A9-A3 a las células BOSC23 transfecadas de manera transitoria con plásmidos pQCXIN-hCladin1 mediante citometría de flujo. La cuantificación mediante citometría de flujo de la expresión del marcador HA usando anticuerpo anti-HA sirvió como control interno. Las células transfecadas se permeabilizaron con Cytoperm/Cytofix (BD) para el análisis de la expresión marcador HA citoplásmico o se dejaron sin tratar para el análisis de las interacciones anti-CLDN-1-CLDN-1 mutante. Para el análisis FACS, las células transfecadas se incubaron con AcM anti-CLDN1 o anti-HA (Covance) durante 30 minutos seguido de incubación con 10 µg/ml de AcM de IgG anti-rata (para anti-CLDN1) o con 10 µg/ml de AcM de IgG anti-ratón marcado con ficoeritrina (para anti-HA).

Producción de VHCcc e infección. Las VHCcc (cepas Jc1, Luc-Jc1, Luc-Con1) se generaron tal como se ha descrito anteriormente (Haberstroh, 2008; Koutsoudakis, 2006; Pietschmann, 2006; Wakita, 2005; y Zeisel, 2007). Para los experimentos de infección, se sembraron células Huh7.5.1 en placas de cultivo tisular de 48 pocillos a una densidad de

2 x 10⁴ células/pocillo. Las células se preincubaron en presencia o ausencia de anticuerpos durante 1 hora a 37 °C y después se infectaron a 37 °C durante 4 horas con VHCcc de Jc1 o VHCcc de Luc-Jc1. 48 horas después, se analizó la infección por VHC en lisados celulares mediante cuantificación de ARN de VHC intracelular usando RT-PCR o actividad de luciferasa tal como se ha descrito anteriormente (Haberstroh, 2008; Koutsoudakis, 2006; Tscherne, 2006; y Zeisel, 2007).

Producción de pseudopartículas de VHC (VHCpp) e infección. Las VHCpp basadas en MLV o VIH (cepas H77, HCV-J, JFH-1, UKN3A.1.28, UKN4A.21.16, UKN5.14.4, UKN6.5.340, VI, VJ, VD, VH, VK y VA-VY) y las VSVpp se produjeron tal como se ha descrito (Lavilette, 2005; Bartosch, 2003; Pietschmann, 2006; Zeisel, 2007; Fafi-Kremer, 2009). Para los experimentos de infección, Se emplacaron células HEK293T, 293T/CLDN1+ y Huh7.5.1 en placas de 24 pocillos el día antes de los experimentos cinéticos tal como se ha descrito anteriormente (Haberstroh, 2008). 72 horas después, se lisaron las células y se analizó la entrada de VHCpp mediante cuantificación de la expresión del gen indicador de luciferasa tal como se ha descrito (Koutsoudakis, 2006).

Ensayos de toxicidad. Los efectos citotóxicos sobre las células se determinaron por triplicado analizando la capacidad de las células para metabolizar bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazoil-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Mosmann, 1983). Las células Huh7.5.1 y los hepatocitos humanos primarios de tres donantes distintos se incubaron con anticuerpo monoclonal de rata, OM-7D3-B3 anti-CLDN1 (0,01-100 µg/ml), flavopiridol (10 µM, Sigma) o compuesto C (0,01-100 µM, Sigma). La concentración final de MTT fue de 0,6 mg/ml. Los cristales de formazan producidos por las células se solubilizaron y midieron tal como se ha descrito (Mosmann, 1983).

Análisis estadístico. Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando la prueba de la *t* de Student con valor de P de < 0,05 considerado como estadísticamente significativo.

Resultados

Producción de anticuerpos monoclonales específicos para los dominios extracelulares de CLDN-1 de la superficie celular.

Se inmunizaron cinco ratas con un ADNc de claudina-1 humana de longitud completa (Número de Acceso del NCBI: NM_021101) en un vector de expresión en mamífero aplicando protocolos de inmunización genética estándar usados por Genovac GmbH y resumidos en otra parte (Lohrmann, 2003), con la exploración basada en un sistema Genovac descrito en la Patente de Alemania Nº: DE 198 52 800. En resumen, para esta exploración, se ensayan sueros y sobrenadantes de hibridoma contra células de mamífero transfectadas con construcciones de ADNc marcadas que expresan las dianas contra las que se están generando los anticuerpos. Los vectores de ADN se diseñan de tal modo que la proteína resultante se secreta y une temporalmente a la membrana plasmática. Esto permite un ensayo de exploración basado en células usando citometría de flujo o un ELISA basado en células.

Después de varios refuerzos de ADN, se sacrificó a los animales, y se recogieron el suero y los linfocitos de los animales individuales. Se ensayó el suero de cada animal mediante citometría de flujo para el reconocimiento de la proteína claudina-1 humana, después de la transfección transitoria del ADNc de claudina-1 en células de mamífero (Figura 7).

Se retiraron los linfocitos de la rata 3 y se fusionaron con células de mieloma de ratón SP2/0/Ag14 (Número de ATCC: CRL-1581) usando condiciones de PEG estándar y los hibridomas resultantes se emplacaron en placas de 96 pocillos en condiciones de selección estándar (véase, por ejemplo, E. Harlow y D. Lane, en "Antibodies, A Laboratory Manual", capítulo 6, 1988, Cold Spring Harbor). Después de dos semanas, se ensayaron los sobrenadantes de hibridoma en un ELISA basado en células contra células de mamífero que se habían transfectado transitoriamente con el ADNc de claudina-1 y células transfectadas con un ADNc irrelevante como control negativo de expresión. Esta preselección permitió la identificación de hibridomas positivos que se transfirieron para su expansión a placas de 24 pocillos seguido de placas de 6 pocillos y sus sobrenadantes se volvieron a ensayar mediante citometría de flujo contra células de mamífero que se habían transfectado transitoriamente con las mismas construcciones de ADNc positivas y negativas que se habían usado para el ELISA basado en células.

Entonces se llevó a cabo el análisis de la inhibición de la infección con VHC infeccioso recombinante (VHCcc de Luc-Jc1) mediante sobrenadantes de hibridoma que contenían anticuerpos anti-CLDN-1. Más específicamente, se incubaron células Huh7 con 100 µl de sobrenadante de hibridoma que contenía anticuerpos durante 1 hora a 37 °C. Después, se añadieron VHCcc infecciosas (TCID 10⁵/ml; derivadas de la cepa Luc-Jc1 que contiene un elemento indicador de luciferasa) durante 3 horas a 37 °C. Entonces se retiró el sobrenadante y se sustituyó por medio fresco (DMEM, FBS al 10 %). Dos o tres días después, la infección viral se cuantificó mediante expresión de gen indicador de luciferasa en lisados celulares (Zeisel, 2007). Los resultados obtenidos, expresados como porcentaje de infección por VHCcc de Luc-Jc1 en presencia o ausencia de sobrenadante de hibridoma (infección en presencia de PBS = 100 %) se representan en la Figura 8. Como puede verse en esta Figura, OM-3E5, OM-6D9, OM-7C11, OM-4A4, OM- 6E1, OM-7D3, OM-7D4, OM-7C8 y OM-8A9 mostraron una inhibición marcada de infección por VHC, mientras que OM-5A1, OM- 6G10, y OM-5A8 no mostraron efectos.

Después del análisis de su actividad de bloqueo, los clones madre OM-3E5, OM-6D9, OM-7C11, OM-4A4, OM-6E1, OM-7D3, OM-7D4, OM-7C8 y OM-8A9 se subclonaron plantándolos en un medio semisólido, recogiendo las colonias de subclones resultantes y transfiriéndolas a placas de 96 pocillos (OM7C11 reveló actividad de bloqueo pero dado que este era un productor ineficiente de anticuerpos no se subclonó). Los subclones resultantes se recogieron y

5 volvieron a ensayar para su capacidad de unirse a CLDN-1 humana expresada en la superficie celular de células BOSC23 transfectadas no permeabilizadas así como en células CHO de hámster transfectadas. Las células BOSC23 humanas son células de empaquetamiento ecotrópico derivadas de HEK293 (Pear, 1993) que no expresan CLDN-1 endógeno (datos no mostrados). Los resultados de estos análisis se presentan en la Figura 9. Se seleccionaron los 10 siguientes subclones: OM-3E5-B6, OM-6D9-A6, OM-4A4-D4, OM-6E1-B5, OM-7D3-B3, OM-7D4-C1, OM-7C8-A8 y OM-8A9-A3.

La incubación de células BOSC23 y CHO que expresaban CLDN-1 humana con anticuerpos monoclonales de rata anti-CLDN-1 humana dio como resultado una interacción específica con CLDN-1 humana (Figura 9A y Figura 9B).

15 Para estudiar si los anticuerpos anti-CLDN-1 humana se unen a los bucles extracelulares de CLDN-1 en la superficie celular de las células Huh7.5.1 permisivas a VHC y a hepatocitos primarios humanos, se incubaron las células con anticuerpos anti-CLDN-1 y se analizaron mediante citometría de flujo en ausencia de reactivos de permeabilización. La tinción positiva de las células Huh7.5.1 de hepatoma humano y de los hepatocitos humanos con anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 demostró que estos anticuerpos se unen a CLDN-1 expresada en la superficie celular de 20 hepatocitos primarios y líneas celulares permisivas a VHC (Figura 9C). Por el contrario, no se observó tinción en las células BOSC23 deficientes en CLDN-1 humana (Figura 9A) incubadas con AcM anti-CLDN o en células Huh7.5.1, CHO/CLDN+ o hepatocitos primarios humanos incubados con anticuerpos de control de isotipo (Figura 9B). La tinción de CLDN1 nativa de la superficie celular mediante anticuerpos monoclonales también se confirmó por inmunofluorescencia en células Huh7.5.1 vivas no permeabilizadas (Figura 9D). En su conjunto, estos datos 25 demuestran que los anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 producidos mediante inmunización genética se unen específicamente a los bucles extracelulares de CLDN-1 nativa expresada en la superficie celular de líneas celulares permisivas a VHC y hepatocitos humanos.

30 Para investigar si los anticuerpos anti-CLDN-1 humana reaccionan de manera cruzada con CLDN-1 murina, se estudió la unión de AcM a CLDN-1 murina expresada en líneas celulares derivadas de hígado murino. Interesantemente, los anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 no interactuaron con CLDN-1 murina expresada en la línea celular de hepatoma de ratón Hepa1.6. Además, tal como se muestra en la Figura 9, los anticuerpos anti-CLDN-1 no tuvieron la 35 línea celular CHO de hámster. Estos descubrimientos sugieren que no hay reactividad cruzada de anticuerpos anti-CLDN-1 humana con los bucles extracelulares de CLDN-1 murina o de hámster (Figura 9 y Figura 19). Por el contrario, los anti-CLDN-1 monoclonales de rata mostraron reactividad cruzada con hepatocitos primarios del primate no humano, mono cinomolgo (*Macaca fascicularis*) (Figura 9E). Estos datos sugieren que el epítopo (o los epítopos) usado como diana por los anticuerpos está conservado entre los primates pero es diferente en roedores, tales como ratón o hámster.

40 Cada subclon se congeló y se expandió una porción en medio ISF-1 sin suero (Biochrom AG, Número de Catálogo: 9061-01). Los anticuerpos se purificaron en una columna de proteína G y sus concentraciones se determinaron en tampón PBS. Se determinaron los isotipos para cada clon usando una prueba ELISA comercial de BD-Pharmigen (Número de Catálogo: 557081). La naturaleza de las cadenas ligeras también se determinó usando el mismo kit de 45 ELISA comercial. Los resultados de estos análisis se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Características de los anticuerpos monoclonales secretados por las líneas celulares de hibridoma seleccionadas

Línea celular de hibridoma	Anticuerpo monoclonal secretado	
	Isotipo	Cadena ligera
OM-6E1-B5	rIgG2b	kappa
OM-8A9-A3	rIgG2b	kappa
OM-6D9-A6	rIgG2b	kappa
OM-7D4-C1	rIgG2b	kappa
OM-3E5-B6	rIgG2a	kappa
OM-7C8-A8	rIgG2b	kappa
OM-4A4-D4	rIgG2a	kappa
OM-7D3-B3	rIgG2b	kappa

Caracterización de las propiedades de unión de AcM anti-CLDN-1 a células permisivas a VHC y hepatocitos primarios humanos. Las propiedades de unión de AcM anti-CLDN-1 a células permisivas a VHC y a hepatocitos primarios humanos se caracterizaron mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la Figura 10, las concentraciones de semisaturación medidas para la unión a células Huh7.5.1, que se corresponde con la K_D de los anticuerpos, fueron las siguientes: 7D3-B3 4 nM; 7D4-C1 5 nM; 8A9-A3 2 nM; 4A4-D4 9 nM, 6D9-A6 8 nM, 6E1-B5 3 nM, 7C8-A8 7 nM (Figura 10A). Se obtuvieron similares concentraciones de semisaturación y K_D aparente de los anticuerpos para la unión de anticuerpo a hepatocitos humanos (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que los anticuerpos anti-CLDN-1 se unen a líneas celulares permisivas a VHC y a hepatocitos humanos con una elevada afinidad.

Neutralización cruzada de aislados de VHC de todos los genotipos principales y cuasiespecies individuales mediante anticuerpos anti-CLDN-1. Para investigar si los anticuerpos producidos mediante inmunización genética eran capaces de inhibir la infección por VHC, se infectó a las células Huh7.5.1 con virus J6/CF-JFH1 indicador de luciferasa de luciérnaga Luc-J1 químico (Koustsoudakis, 2006) en presencia de anticuerpos anti-CLDN-1 o de control de isotipo. La Figura 11 muestra que los anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 inhibieron la infección por VHC de células Huh7.5.1 por virus Luc-Jc1 y Luc-Con1 de manera dependiente de la dosis mientras que los anticuerpos de control de isotipo no tuvieron efecto inhibidor. En su conjunto, estos datos demuestran que los anticuerpos dirigidos contra los bucles extracelulares de CLDN-1 inhiben la infección por VHC. Para determinar si los anticuerpos anti-CLDN-1 eran capaces de neutralizar de manera cruzada la infección por VHC de todos los genotipos principales, se analizó el impacto de los anticuerpos en partículas pseudotipadas de VHC (VHC_{pp}) que portaban glucoproteínas de la envuelta de VHC de los genotipos 1-6 de VHC. Tal como se muestra en la Figura 12, los anticuerpos monoclonales anti-CLDN1 inhibieron de manera eficiente y dependiente de la dosis la infección de células Huh7.5.1 con VHC_{pp} de los genotipos 1-6 con una IC_{50} para la inhibición de la infección por VHC en el intervalo de 0,1 a 5 $\mu\text{g/ml}$. Se obtuvieron resultados similares en la infección de hepatocitos humanos primarios (Figura 13).

Un reto principal para el desarrollo de antivirales y estrategias inmunosupresoras, es la elevada variabilidad del virus. El VHC tiene una muy elevada velocidad de replicación y la polimerasa elevadamente propensa a errores permite la rápida producción de variantes virales menores llamadas "cuasiespecies" que pueden sobrepasar las respuestas inmunes humorales y celulares (Aurora, 2009; Farci, 2006; Ray, 2005; Uebelhoer, 2008). Estas variantes están en constante presión inmune en el hospedador infectado, y los procesos de selección conducen a la dominación de las cuasiespecies por el virus más fuerte que pueda evadir el reconocimiento inmune o conferir resistencia a terapias antivirales.

Para determinar si los anticuerpos anti-CLDN-1 inhibieron de manera eficiente la población de cuasiespecies en pacientes individuales, se clonaron, secuenciaron y expresaron las glucoproteínas de la envuelta de dos pacientes individuales infectados por VHC de manera crónica. Tal como se muestra en la Figura 14, los anticuerpos anti-CLDN-1 neutralizaron ampliamente la infección por VHC de VHC_{pp} que portaban glucoproteínas de la envuelta de cuasiespecies de dos pacientes individuales. Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-CLDN-1 neutralizan de manera cruzada la infección por VHC de todos los genotipos principales así como aislados de la población de cuasiespecies de un paciente individual.

Neutralización de cuasiespecies de VHC y cepas virales que han escapado de los anticuerpos neutralizantes del hospedador y reinfectan el injerto hepático. La enfermedad hepática terminal debida a infección por VHC es una de las causas principales de trasplante hepático. Debido a la evasión viral de las respuestas inmunes del hospedador y a la ausencia de estrategias antivirales preventivas, la reinfección del injerto es universal y se caracteriza por una progresión acelerada de la enfermedad hepática. Mediante el uso de hepatocitos humanos primarios y seudotipos de VHC retrovirales que portan las glucoproteínas de la envuelta viral derivadas de pacientes infectados por VHC que se someten a trasplante hepático, los Solicitantes han demostrado con anterioridad que la entrada viral potenciada y la evasión de la neutralización mediada por anticuerpos son determinantes clave para la selección de variantes virales durante la reinfección por VHC del injerto hepático (Fafi-Kremer, 2009, remitido para su publicación).

En el presente estudio, se usaron VHC_{pp} que mostraban glucoproteínas de la envuelta de pacientes que se sometieron a trasplante hepático y con reinfección por VHC para determinar si los anticuerpos anti-CLDN-1 eran capaces de inhibir la infección de hepatocitos humanos primarios con aislados virales que habían escapado de las respuestas neutralizantes del hospedador y habían dado como resultado la reinfección del injerto hepático. Para lograr este objetivo, los Solicitantes han estudiado el efecto de los anticuerpos anti-CLDN-1 sobre la entrada de VHC_{pp} que portan glucoproteínas de la envuelta de cepas de VHC seleccionadas durante el trasplante y reinfección del injerto hepático (cepas de VHC VD, VH, VK). Tal como se muestra en la Figura 15, la preincubación de células con anticuerpo anti-CLDN-1 inhibió de manera notable la entrada de VHC_{pp} derivadas de paciente en hepatocitos humanos primarios. Estos datos demuestran claramente que anti-CLDN-1 inhibe específicamente la entrada de VHC de aislados derivados de pacientes que reinfectan el injerto hepático.

Los análisis de viabilidad celular basados en el ensayo de MTT se llevaron a cabo para determinar los potenciales efectos tóxicos de anticuerpos anti-CLDN-1. No se detectaron efectos tóxicos en un análisis de lado a lado de la viabilidad celular basándose en el ensayo MTT incluso a elevadas dosis de anti-CLDN-1 (Figura 16). Por el contrario, el compuesto C, un inhibidor de AMPK bien caracterizado con toxicidad conocida, dio como resultado una toxicidad

fácilmente detectable (Figura 16).

La unión de anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 es dependiente de la conservación del motivo elevadamente conservado W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64) en los bucles extracelulares de CLDN-1.

Finalmente, los Solicitantes intentaron mapear el epítopo (o los epítopenos) usado como diana por los anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1. Se llevaron a cabo experimentos de competición cruzada usando los seis anticuerpos monoclonales para investigar si los AcM anti-CLDN-1 reconocen epítopenos similares o diferentes no relacionados. La unión de OM-8A9-A3 o OM-7D3-B3 marcados a células Huh7.5.1 se midió después de preincubación con concentraciones en aumento de una IgG de isotipo emparejado de control o de los AcM anti-CLDN1. La coincubación con todos los AcM anti-CLDN1 redujo la unión de 8A9-A3 a anti-CLDN-1 mostrado en la superficie celular en prácticamente un 80 %, mientras que la IgG de control no impidió el reconocimiento de las células Huh7.5.1 (Figura 17A). Se obtuvieron resultados similares no solo para OM-8A9-A3 u OM-7D3-B3 sino para todo los AcM OM marcados demostrado usando concentraciones saturadas de AcM inhibidores (Figura 17B). Los resultados obtenidos en el ensayo de unión se confirmaron llevando a cabo estudios de competición cruzada en experimentos de infección. Tal como se muestra en la Figura 17C, la combinación de diferentes anticuerpos anti-CLDN-1 no mostró un efecto aditivo o sinérgico destacado sobre la magnitud de inhibición de infección por VHC. Además de confirmar los resultados obtenidos en los ensayos de unión, estos resultados sugieren que los seis anticuerpos anti-CLDN-1 reconocen un motivo similar o estrechamente relacionado en los bucles extracelulares de CLDN-1. Sin embargo, los datos de secuenciación provisionales en dos de los anticuerpos monoclonales indican que varían en secuencia en las cadenas ligeras y pesadas (datos no mostrados).

Se estudiaron las interacciones de los seis anticuerpos monoclonales con un panel de mutantes de CLDN-1 descrito por Cukierman y colaboradores (Cukierman, 2009) para definir adicionalmente el motivo usado como diana por los anticuerpos. Usando un enfoque de mutagénesis de barrido de alanina, Cukierman y colaboradores han identificado siete restos en el primer bucle extracelular de CLDN-1 que son críticos para la entrada de aislados de VHC tomados de seis subtipos distintos. La mayor parte de los restos críticos pertenecen al motivo W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64), que está elevadamente conservado entre todas las claudinas humanas (Cukierman, 2009). Usando células BOSCC23 transfectadas de manera transitoria que expresan moléculas de CLDN-1 1 de tipo silvestre y mutantes, los Solicitantes han demostrado que la sustitución de restos de aminoácidos por alanina en las posiciones 30, 35, 49, 50, 51, 54, y 64 de CLDN-1 redujeron de manera drástica la unión del anticuerpo monoclonal OM-7D3-B3, mientras que las otras mutaciones no afectaron a la interacción de los anticuerpos (Figura 18A).

Los estudios anteriores han demostrado que el resto I32 es importante para la entrada (Evans, 2007) y el resto proximal D38 (Cukierman, 2009) era igualmente importante para la entrada viral. Interesantemente, la mutagénesis de estos restos aún permitió la unión parcial de anticuerpos anti-CLDN-1 (Figura 18), lo que sugiere que estos restos juegan un papel menos importante para la interacción anti-CLDN-1- CLDN-1. Además, el análisis de la unión de anti-CLDN-1 a CLDN-1 mutante demuestra que el resto Y35 parece ser reconocido por los anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 (Figura 18A y B). La expresión adecuada de CLDN-1 de tipo silvestre y mutante en células BOSC23 transfectadas de manera transitoria se confirmó mediante análisis por citometría de flujo de los niveles de expresión del marcador HA y anticuerpo anti-HA (Figura 18AB) excepto para el mutante I32A donde estaba ausente el marcador HA (Figura 18AB) y se determinó la expresión de CLDN1 mediante análisis FACS usando un anticuerpo no relacionado dirigido contra el dominio C-terminal de CLDN-1 no mutada (mutante I32A: datos no mostrados). Se observó un patrón similar para el anticuerpo OM-8A9-A3 (Figura 18B). Estos resultados sugieren que los AcM reconocen epítopenos dependientes de la conformación afectados por el motivo W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64) que se han identificado como restos coesenciales para la entrada del VHC (Cukierman, 2009).

Discusión

Por primera vez, se han generado anticuerpos monoclonales contra los bucles extracelulares de claudina-1 que neutralizan de manera cruzada y potente la infección por VHC de todos los principales genotipos. El reconocimiento es fuertemente dependiente de la conservación del motivo W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64) del bucle 1 extracelular de CLDN-1 humana. Queda aún por determinar si este motivo representa el epítopo o si las mutaciones que afectan al reconocimiento causan cambios conformacionales que conducen a la pérdida de o al enmascaramiento de este epítopo. Los anticuerpos anti-CLDN-1 inhiben de manera cruzada la entrada de aislados de VHC en pacientes individuales así como la entrada de variantes principales de VHC seleccionadas durante el trasplante hepático usando VHCpp que portan glucoproteínas de la envuelta derivadas de paciente procedentes de cuatro pacientes con reinfección por VHC durante el trasplante hepático.

Una limitación importante de las terapias antivirales actuales y en evolución que usan al virus como diana es el rápido desarrollo de resistencia viral. Un desafío importante para el desarrollo de antivirales y de estrategias inmunopreventivas es la elevada variabilidad del virus. El VHC tiene una muy elevada velocidad de replicación y la polimerasa viral elevadamente propensa a errores permite la rápida producción de variantes virales menores llamadas "cuasiespecies" que pueden sobrepasar a la respuesta inmune humoral y celular y dar como resultado aislados virales que confieren resistencia viral a la terapia antiviral convencional (Aurora, 2009). El uso como diana de factores esenciales del hospedador puede representar una alternativa complementaria. Si sucede el escape viral, consistirá en diferentes mecanismos y factores virales. El hecho de que los anticuerpos anti-CLDN-1 inhiben de manera similar la infección por VHC de aislados virales de todos los genotipos y cuasiespecies en pacientes individuales sugiere la

ausencia de variantes o genotipos preexistentes resistentes a anticuerpos anti-CLDN-1.

Mediante el desarrollo de anticuerpos anti-CLDN-1 que neutralizan de manera eficiente la infección por VHC, los Solicitantes han demostrado una prueba de concepto para CLDN-1 como diana para nuevas estrategias antivirales. Ya que la entrada del VHC es la primera etapa de las interacciones virus-hospedador y una diana principal de las respuestas neutralizantes del hospedador, representa una diana prometedora para terapias antivirales que puedan complementar los esfuerzos actuales para bloquear los sucesos de replicación intracelular con inhibidores de las proteasas y polimerasa del VHC (Stamatakis, 2008; Timpe y McKeating, 2008; Zeisel, 2008). El desarrollo clínico exitoso de inhibidores de la entrada para otras infecciones virales tales como VIH (Este y Telenti, 2007) subraya la relevancia de la etapa de la entrada viral como diana terapéutica o preventiva.

Una aplicación importante de los anticuerpos monoclonales puede ser la prevención de la reinfección por VHC después del trasplante hepático. Una limitación principal actual del trasplante hepático (TH) es la reinfección universal por VHC del injerto seguida de un trascurso acelerado de la enfermedad hepática inducida por VHC (Brown, 2005). Se carece de una estrategia profiláctica para la prevención de la reinfección y las terapias antivirales basadas en interferón tienen una eficacia y tolerabilidad limitadas en receptores de TH (Brown, 2005). Debido a la evasión viral de las respuestas inmunes del hospedador y a la ausencia de estrategias antivirales preventivas, la reinfección del injerto es universal y se caracteriza por una progresión acelerada de la enfermedad hepática (Brown, 2005). Mediante el uso de hepatocitos humanos primarios y seudotipos de VHC retrovirales que portan las glucoproteínas de la envuelta viral derivadas de pacientes infectados por VHC que se someten a trasplante hepático, el equipo de uno de los Solicitantes ha demostrado con anterioridad que la entrada viral potenciada y la evasión de la neutralización mediada por anticuerpos son determinantes clave para la selección de variantes virales durante la reinfección por VHC del injerto hepático (Fafi-Kremer, 2009, remitido para su publicación).

En el presente estudio, los Solicitantes han demostrado que los anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 inhibieron de manera eficiente la infección por VHC de hepatocitos humanos primarios con aislados que habían escapado de la respuesta inmune celular del hospedador durante el trasplante hepático. La neutralización eficaz de variantes virales que han escapado de las respuestas neutralizantes del paciente por medio de un anticuerpo anti-CLDN-1 de neutralización cruzada demuestra que la entrada de VHC es una diana viable para estrategias antivirales que prevengan la reinfección del injerto. Este descubrimiento está apoyado además por estudios recientes en un modelo de ratón humanizado para infección por VHC, que demuestra que los anticuerpos monoclonales anti-E2 y anti-CD81 eran capaces de neutralizar aislados de VHC genéticamente diversos y de proteger contra la exposición a cuasiespecies de VHC heterólogas (Meuleman, 2008; Law, 2008). Por tanto, la administración de anticuerpos monoclonales de neutralización cruzada anti-CLDN-1, con o sin terapia antiviral concomitante, puede ofrecer una opción viable y prometedora para prevenir la reinfección por VHC del hígado transplantado.

Una limitación potencial para el uso de anticuerpos anti-receptor para la prevención o tratamiento de la infección por VHC puede ser la toxicidad. Los factores de las células hospedadoras tienen funciones importantes que pueden estar relacionados con mecanismos de entrada viral. Por tanto, los anticuerpos que se unen a factores de entrada del VHC pueden alterar la función o expresión de receptores, dando como resultado efectos secundarios. Interesantemente, no se detectaron efectos tóxicos en un análisis de lado a lado de la viabilidad celular basándose en el ensayo MTT incluso a elevadas dosis de anti-CLDN-1 (Figura 16). En este sentido, cabe destacar que los Solicitantes han demostrado con anterioridad que el antisero políclonal anti-CLDN-1 no tuvo efecto sobre la permeabilidad de las uniones estrechas y la integridad en células de hepatoma HepG2 polarizadas (Krieger, 2009, manuscrito remitido). Aunque se necesitan estudios adicionales para determinar la toxicidad *in vivo*, los estudios piloto de toxicidad llevados a cabo por los Solicitantes en células permisivas a VHC y hepatocitos humanos sugieren que los anticuerpos anti-CLDN-1 pueden tolerarse bien.

¿Cuál es el mecanismo de neutralización de la infección por VHC por medio de anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1? Las CLDN son componentes críticos de las uniones estrechas y tienen una topología de tretraspanina con cuatro dominios transmembrana, dos extracelulares y un bucle intracelular, y dominios citoplásicos N- y C-terminales (Van Itallie y Anderson, 2006). Se ha demostrado que el bucle 1 extracelular (EL1) de CLDN-1 es necesario para la entrada de VHC (Evans, 2007) y está implicado en la función de barrera y contribuye a la formación de poros entre células polarizadas (Krause, 2008). Los estudios de mutagénesis en células HEK293T no polarizadas han demostrado que el enriquecimiento de CLDN-1 en los contactos célula-célula pueden ser importantes para la entrada de VHC (Cukierman, 2009). Mediante el uso de una variedad de técnicas de formación de imágenes y bioquímicas, varios laboratorios han comunicado que CLDN-1 se asocia con CD81. Los datos más recientes del laboratorio de los Solicitantes han demostrado que CLDN-1 media la entrada del VHC formando un complejo virus/correceptor que incluye E2 de VHC, CD81 y CLDN1, que es necesario para la entrada viral (véase el Ejemplo 3). Los solicitantes demostraron además que los anticuerpos anti-CLDN-1 neutralizan la infectividad del VHC reduciendo la asociación de E2 con la superficie celular e interrumpiendo las interacciones CD81-CLDN-1 (véase el Ejemplo 3).

Interesantemente, mientras que la magnitud de la inhibición pareció ser similar para la infección de células Huh7.5.1 con VHCcc (Figura 11) y VHCpp (Figura 12), la magnitud de la inhibición de la infección por VHCpp pareció ser más pronunciada en hepatocitos humanos primarios en comparación con células Huh7.5.1 (Figura 13-15 y datos no mostrados). Esto puede deberse al hecho de que la expresión de receptores o complejos de correceptores puede ser

diferente en hepatocitos humanos primarios parcialmente polarizados en comparación con líneas celulares de hepatoma Huh7 no polarizadas.

Los estudios de unión de competición cruzada de anticuerpos e infección demostraron claramente que los anticuerpos monoclonales usaban como diana un dominio de epítopo estrechamente relacionado (Figura 17). Mediante el uso de un panel de mutantes de CLDN-1 bien caracterizado, los Solicitantes han demostrado que la sustitución de los aminoácidos en las posiciones 30, 35, 49, 50, 51, 54 y 64 de EL1 de CLDN-1 por alanina redujo drásticamente la unión del anticuerpo monoclonal OM-7D3-B3 a CLDN-1, mientras que la interacción de anticuerpos con otros mutantes no se vio afectada en absoluto, o afectada en menor medida (Figura 19).

Estos datos sugieren que los AcM reconocen un epítopo presente dentro del grupo de aminoácidos que comprenden W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64) del EL1 de CLDN-1 o un epítopo que puede perderse o enmascararse mediante cambios estructurales. En el primer caso, ya que estos aminoácidos conservados no están estructuralmente agrupados juntos, es probable que los epítopos reconocidos sean dependientes de la conformación. Esta hipótesis está además apoyada por el descubrimiento de que la preincubación de anticuerpos con péptidos lineales que codifican los aminoácidos del EL1 de CLDN-1 no fue capaz de revertir la inhibición mediada por anticuerpos de la infección (datos no mostrados). Además, los anticuerpos anti-CLDN-1 producidos mediante inmunización genética no mostraron una interacción fácilmente detectable con péptidos lineales de CLDN-1 como antígenos en un ELISA (datos no mostrados).

Los restos identificados en el primer bucle extracelular de CLDN-1 y usados como diana por los anticuerpos monoclonales han demostrado ser críticos para la entrada de aislados de VHC extraídos de seis subtipos diferentes (Cukierman, 2009). El hecho de que los anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 usen este epítopo como diana neutraliza eficientemente de manera cruzada la entrada de aislados de VHC de seis aislados diferentes subraya además la relevancia de estos restos de CLDN-1 para la entrada del VHC. Cabe destacar que las sustituciones por alanina de estos restos no impidió la expresión de CLDN-1 en la superficie celular (Cukierman, 2009). Ya que los anticuerpos policlónicos producidos mediante el mismo enfoque han demostrado alterar el complejo virus/correceptor que incluye E2 de VHC, CD81 y CLDN1 (Ejemplo 3), es conceible que los restos de aminoácidos usados como diana en EL1 juegan un papel clave para la formación de un complejo E2-CD81-correceptor de CLDN-1 que es esencial para la entrada viral. Existen estudios adicionales en desarrollo para abordar este asunto.

En conclusión, los anticuerpos monoclonales que son dependientes de la conservación del motivo W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64) en EL1 de CLDN-1 han demostrado neutralizar de manera cruzada la infección por VHC. Estos resultados definen restos en EL1 de CLDN-1 que son cruciales para la entrada del VHC y son accesibles para anticuerpos que bloquean la infección por VHC. Finalmente, los datos sugieren que usar como diana el EL1 de CLDN-1 mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 constituye un nuevo enfoque antiviral para prevenir la infección primaria por VHC, tal como después del trasplante hepático y también puede contener la difusión del virus en pacientes infectados de manera crónica.

Ejemplo 3: Mecanismo de acción de anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1

Materiales y métodos

Líneas celulares. Tal como se describe en el Ejemplo 2, se obtuvieron células HEK293T/CLDN1+ (clon IIIA6) por transfección estable de células HEK293T con un vector pcDNA3.1 que codifica ADNc de CLDN-1.

Anticuerpos. Tal como se describe en el Ejemplo 2, Además, se obtuvieron anticuerpos policlónicos de rata anti-SR-BI o CD81 mediante inmunización genética tal como se ha descrito (Zeisel, 2007). La IgG de cabra anti-rata conjugada a R-ficoeritrina fue de Jackson ImmunoResearch Laboratories, la IgG de ratón de Caltag, el anti-CD81 de ratón (JS-81) de BD Biosciences.

Unión celular de glucoproteínas de envuelta de VHC y viriones infecciosos. Se ha descrito la producción y unión de glucoproteínas E1 y E2 de envuelta truncadas en C-terminal a células diana (Haberstroh, 2008; Dreux, 2009). Para el estudio de la interacción del factor de entrada E2, se transfecaron de manera transitoria células CHO con vectores de expresión basados en pcDNA3 que codificaban SR-BI, CD81 o CLDN1 (Barth, 2005). La expresión de factores de entrada se determinó mediante citometría de flujo usando anticuerpos anti-receptor tal como se ha descrito previamente (Barth, 2005). Para el estudio de la unión de la glucoproteína de la envuelta en presencia de anticuerpos anti-receptor, se preincubaron células Huh7.5.1 (Zhong, 2005) durante 1 hora a temperatura ambiente con anti-SR-BI de rata, anti-CLDN-1 y suero anti-CD81 (1/100) o anti-CD81 humano de ratón (JS-81.5 µg/ml) o anticuerpos de control (1/100 o 5 µg/ml). Se añadió E2 recombinante (30 µl de sobrenadante de cultivo celular concentrado) o E1 (10 µg/ml) a las células durante 1 hora a temperatura ambiente. Despues de lavar con PBS, las glucoproteínas de la envuelta unidas se detectaron usando citometría de flujo y anti-E1 humano (IGH526; Haberstroh, 2008) o anti-His de ratón (RGS-His, Qiagen) y anticuerpos secundarios conjugados a PE (Dreux, 2009; Barth, 2008). Para el estudio de unión de VHCcc a células Huh7.5.1 permisivas, las células Huh7.5.1 se preincubaron con heparina, anti-CLDN-1 de rata, anti-SR-BI de rata o suero preinmune de control de rata (PI) (todos diluidos a 1/100) durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la incubación con VHCcc (cepa Jc1) que se habían purificado parcialmente a partir de sobrenadantes de cultivos celulares usando ultracentrifugación de gradiente. Despues de la incubación con VHCcc,

los VHCcc no unidos se retiraron lavando las células con PBS. A continuación se cuantificó la unión de VHCcc mediante RT-PCR de ARN de VHC unido a células tal como se describe por Ploss *et al.*, (2009).

Asociación de receptor usando transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Se analizaron las interacciones homotípicas y heterotípicas de CD81 y CLDN-1 tal como se ha descrito (Harris, 2008; Mee, 2009). En resumen, las células HEK293T transducidas para expresar CD81 y CLDN1 marcadas con AcGFP y DsRED se crecieron sobre cubreobjetos de vidrio y se fijaron en metanol enfriado en hielo. Se obtuvieron las imágenes de las células en un LSCM Zeiss Meta Head, con ajustes de microscopio optimizados para cada proteína fluorescente para obtener la relación señal a ruido más alta. Para el análisis FRET, se usó el método de fotoblanqueamiento gradual de aceptor de FRET, que implicaba fotoblanquear el fluoróforo DsRED de manera gradual a lo largo del tiempo a la vez que se controlaba la intensidad de fluorescencia de AcGFP (Harris, 2008). Después de la corrección de fondo y diafonía, cualquier aumento en la intensidad de AcGFP después del fotoblanqueamiento de DsRED se debe a FRET entre proteínas, lo que implica una distancia de menos de 10 nm. El porcentaje de FRET se define como el número de píxeles que muestran FRET frente al número total de píxeles analizados en la membrana plasmática de las células (Harris, 2008). La intensidad de CD81 y CLDN-1 marcadas con AcGFP y DsRED (unidades arbitrarias de fluorescencia/píxel) en la membrana plasmática proporciona de 500 a 1000 mediciones por célula. Se normalizaron los datos de 10 células y se calculó la expresión localizada.

Resultados

Anti-CLDN-1 inhibe la unión de la glucoproteína E2 de la envuelta y de viriones infecciosos a células permisivas a VHC en ausencia de interacción CLDN-1-E2. Para investigar si los anticuerpos anti-CLDN-1 pueden interferir en la unión de E2 a líneas celulares permisivas, se llevaron a cabo estudios de unión usando glucoproteínas E1 y E2 recombinantes en presencia de anticuerpos anti-receptor o de control. Tal como se muestra en la Figura 20B, los anticuerpos anti-CD81, anti-CD81, y anti-SR-BI y anti-CLDN1 inhibieron la unión de E2 a células Huh7.5.1. Por el contrario, el suero preinmune o de control no relacionado no tuvieron efecto (Figura 20A-C). Interesantemente, la magnitud de la inhibición de la unión de E2 a células Huh7.5.1 (Figura 20C) se correlacionó con la magnitud de la inhibición de la infección por VHC, lo que sugiere que la inhibición de la unión de las interacciones E2-superficie celular proporciona un mecanismo de acción para la actividad neutralizante de los anticuerpos anti-CLDN-1. La relevancia de estas observaciones para viriones infecciosos se confirmó adicionalmente mediante estudios de unión usando VHCcc (Figura 20E). Por el contrario, la unión de E1 no se vio afectada por anti-CLDN-1 (Figura 20D).

Para estudiar si la inhibición por parte del anticuerpo de la unión de E2 a líneas celulares permisivas era atribuible a interacciones de CLDN-1 con E2, los Solicitantes han investigado si CLDN-1 era capaz de unirse a glucoproteína E2 recombinante truncada. Para abordar esta cuestión, se modificaron por ingeniería genética células CHO para expresar CLDN-1, SR-BI o CD81 humanas (Figura 21A). La expresión en la superficie celular de CD81 humana o SR-BI humana confirió unión de E2 a células CHO (Figura 21B), mientras que la expresión de CLDN-1 no tuvo efecto (Figura 21B). Estos datos sugieren que CLDN-1 no interactúa directamente con la glucoproteína E2 de la envuelta del VHC y que el anticuerpo que bloquea las interacciones de E2-superficie celular pueden estar mediadas por mecanismos indirectos.

Los anticuerpos anti-CLDN-1 inhiben las asociaciones CLDN-1-correceptor de CD81. Ya que los anticuerpos anti-CLDN-1 inhiben la unión de E2 a células permisivas a VHC en ausencia de una interacción directa CLDN-1-E2 (Figura 21B), los Solicitantes plantearon la hipótesis de que los anticuerpos anti-CLDN-1 pueden interferir con complejos CD81-correceptor de CLDN-1. Para determinar si los anticuerpos anti-CLDN-1 alteran la asociación CLDN-1-CD81, se transfecaron células HEK293 para expresar Ac-GFP-CD81 y DsRED-CD81 o AcGFP-CLDN-1 y DsRED-CD81 o AcGFP-CLDN-1 y DsRED-CLDN-1, se incubaron con suero preinmune y anti-CLDN-1 (1/100 y 1/400) y se analizaron las interacciones de correceptor mediante FRET. Tal como se muestra en la Figura 22, los anticuerpos anti-CLDN-1 redujeron significativamente el FRET entre CD81 y CLDN-1 de manera dependiente de la dosis. La preincubación de células con suero de control no modificó las interacciones CD81-correceptor de CLDN-1. La inhibición de la interacción CD81-correceptor de CLDN-1 fue específica, tal como se demuestra por el FRET no cambiado entre CD81-CD81 y CLDN-1-CLDN-1 después de la preincubación con suero anti-CLDN-1. En su conjunto, estos datos sugieren que los anticuerpos anti-CLDN-1 interfieren con la asociación del heterodímero CD81-CLDN-1.

Discusión

CLDN-1 es un cofactor esencial que confiere entrada de VHC. Sin embargo, el papel preciso de CLDN-1 en el proceso multietapa de entrada sigue aún poco entendido. Mediante el uso de células CHO transfectadas que expresan factores de entrada de VHC humanos, los Solicitantes han demostrado que a diferencia de CD81 y SR-BI, CLDN-1 no interactúa directamente con la glucoproteína de envuelta E2 en la superficie celular. Mediante el uso de un sistema basado en FRET para estudiar la asociación CD81-correceptor de CLDN-1, se demostró que los anticuerpos neutralizantes de la invención interrumpen específicamente el FRET de CD81-CLDN-1 (Figura 22).

Estos datos sugieren que los anticuerpos que usan como diana CLDN-1 neutralizan la infectividad de VHC reduciendo las asociaciones con la superficie celular y reduciendo las interacciones CD81-CLDN-1. Los complejos CD81-correceptor de CLDN-1 son críticos para la entrada del VHC y CLDN-1 puede potenciar la asociación de CD81 con las partículas de VHC a través de interacciones con E2. También proporcionan una nueva vía para estrategias

antivirales que usan las interacciones E2-CD81-CDLN-1 como diana.

Ejemplo 4: Los anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 inhiben la transmisión de VHC de célula a célula

5 **y bloquean la diseminación viral cuando se añaden después de la infección**

Materiales y métodos

10 **Ensayo de transmisión de célula a célula.** Las células Huh7.5.1 fueron proporcionadas por el Dr. F. Chisari (The Scripps Research Institute, EE.UU.; Zhong, 2005) y se cultivaron del modo que se ha descrito (Zeisel, 2007; Barth, 2008; Dimitrova, 2008). Las células Huh7 GFP fueron proporcionadas por el Dr. Patel (University of Glasgow, R.U.; Witteveldt, 2009). Las líneas celulares derivadas de Huh7 se habían obtenido por transducción con un vector de retrovirus que portaba la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), seguida de selección en medio suplementado con 300 µg de G418/ml (Witteveldt, 2009). Para detectar la transmisión de VHC de célula a célula, se 15 sembraron células Huh7.5.1 recién electroporadas y se incubaron durante un periodo de 24 horas, y después se lavaron con medio para retirar el VHC unido a la superficie celular residual antes de añadir las células receptoras que expresaban EGFP con 10 µg/ml de anticuerpos anti-CLDN-1. Las células co-cultivadas se crecieron hasta confluencia, se trypsinizaron, se fijaron con paraformaldehído al 1 % y se permeabilizaron con saponina al 0,1 % para el análisis FACS. Las células se tiñeron usando anticuerpo de ratón anti-núcleo seguido de un anticuerpo secundario conjugado 20 a ficoeritrina (PE) para el análisis FACS tal como se ha descrito anteriormente para SR-BI (Barth, 2006; Barth, 2008).

Resultados y discusión

25 En general, los virus pueden diseminarse dentro de un hospedador mediante dos mecanismos que incluyen la liberación de viriones libre de células y la transmisión directa entre células infectadas y células no infectadas. La transferencia célula-célula directa se considera más rápida y eficiente que la diseminación libre de célula ya que obvia las etapas tempranas limitantes de la velocidad del ciclo de replicación del virus, tal como la unión del virión. Además, la transferencia célula-célula de infectividad viral puede permitir a los virus evadir elementos de la respuesta inmune, tales como anticuerpos neutralizantes.

30 Los estudios recientes han demostrado que la infección por VHC de células de hepatoma da como resultado áreas focales de infección que se potencian mediante contacto célula-célula, lo que sugiere la transmisión localizada entre células adyacentes. De hecho, mediante el uso de células productoras o receptoras marcadas, dos laboratorios han 35 demostrado que el VHC puede transmitirse *in vitro* tanto por infección de virus libre de célula como por transferencia entre células, siendo esta última una nueva vía para evadir a los anticuerpos neutralizantes (Timpe, 2008; Witteveldt, 2009).

40 Para evaluar la capacidad de anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 para inhibir la transmisión célula-célula, se estableció un ensayo de transmisión de célula a célula de VHC basándose en células receptoras marcadas que expresan proteína fluorescente verde (GFP). En este ensayo, las células productoras de VHC se co-cultivan con células receptoras marcadas con GFP en presencia o ausencia de anticuerpos anti-receptor. Mediante el bloqueo de la transmisión de virus libres de células con anticuerpos anti-CD81 (Timpe, 2008; Witteveldt, 2009), este ensayo permite 45 estudiar el efecto específico de antivirales sobre la transmisión célula-célula cuantificando las células receptoras VHC+, GFP+ en análisis FACS.

45 Después de 24 horas de cultivo conjunto de células productoras y receptoras en ausencia de anticuerpos (o anticuerpos de control), el 43,6 % de todas las células corresponden a células receptoras VHC+GFP+ (Figura 23A). Cuando se bloquea la transmisión libre de células mediante anticuerpos anti-CD81 (Figura 23B), el número de células receptoras VHC GFP+ disminuye al 6,20 %. Estas células corresponden a células infectadas exclusivamente por transmisión célula a célula tal como se demostró anteriormente por otros dos laboratorios (Timpe, 2008; Witteveldt, 2009) y por el laboratorio de los Solicitantes (Baumert, observaciones no publicadas). Tal como se muestra en la Figura 23C, los anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 redujeron de manera destacada el número de células receptoras VHC+GFP+. La adición de anticuerpo monoclonal 7D3 anti-CLDN-1 redujo el porcentaje de células receptoras GFP+ infectadas por VHC del 6,20 % al 2,98 %, lo que sugiere que el anticuerpo monoclonal anti-CLDN-1 55 fue capaz de reducir la infección por transmisión célula-célula en más de un 50 %. Por el contrario, los anticuerpos de control de isótipo no tuvieron efecto (datos no mostrados). Estos resultados indican que los anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 inhiben la transmisión célula a célula del VHC.

60 Para confirmar la relevancia de este descubrimiento de diseminación viral en un sistema de cultivo tisular infeccioso, los Solicitantes han llevado a cabo experimentos de lapso de tiempo en células Huh7.5.1. Para estudiar el efecto de anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 en la diseminación viral, se añadió el anticuerpo monoclonal anti-CLDN-1 1 OM-7D3 4 horas después de la infección de las células con virus libre de células. Tal como se muestra en la Figura 24, el anticuerpo monoclonal anti-CLDN-1 inhibió de manera eficaz la diseminación viral. Mientras que la incubación de células Huh7.5.1 después de la infección con anticuerpos de control de isótipo dio como resultado un aumento dependiente del tiempo de la carga viral durante un periodo de 7 días ($> 10^6$ unidades de luz relativas), la adición de anti-CLDN-1 después de la infección dio como resultado bajos niveles de carga viral próximos al límite de detección 65

(aproximadamente 10^3 unidades de luz relativas). Estos datos indican adicionalmente la relevancia del efecto de los anticuerpos anti-CLDN-1 en la transmisión célula-célula de la diseminación viral en un sistema de cultivo celular infeccioso y sugieren que los anticuerpos monoclonales anti-CLDN-1 de la invención pueden no solo ser útiles en la prevención de la infección por VHC, sino también en control de la infección viral crónica.

5

Referencias

- R. Aurora, et al., J.Clin. Invest., 2009, 119: 225-236.
 H. Barth, et al., J. Biol. Chem., 2003, 278: 41003-41012.
 H. Barth, et al., J. Virol., 2005, 79: 5774-5785.
 H. Barth, et al., J. Virol., 2008, 82: 3466-3479.
 B. Bartosch, et al., J. Exp. Med., 2003, 197: 633-642.
 K. J. Blight, et al., J. Virol., 2002, 76: 13001-13014.
 R. S; Brown, Nature, 2005, 436: 973-978
 M.T. Catanese, et al., J. Virol., 2007, 81: 8063-8071 F.V. Chisari, Nature, 2005, 435: 930-932
 L. Cocquerel, et al., J. Gen. Virol., 2006, 87: 1075-1084
 A. Codran, et al., J. Gen. Virol., 2006, 87: 2583-2593.
 L. Cukierman, et al., J. Virol., 2009, 83: 5477-5484.
 P. David, et al., Hum. Exp. Toxicol., 1998, 17: 544-553.
 M. C. Dimitrova, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, 105: 16320-16325.
 M. Dreux, et al., PLoS Pathog 2009; 5:e1000310.
 JA. Este y A. Telenti, Lancet, 2007, 370: 81-88.
 M.J. Evans, et al., Nature, 2007, 446: 801-805
 S. Fafi-Kremer, et al., "Escape from antibody-mediated neutralization and viral entry are key determinants for hepatitis C virus re-infection in liver transplantation", 2009, remitido para su publicación.
 P. Farci, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103: 8475-5480.
 J.J. Feld, et al., Nature, 2005, 436: 967-972
 J.T. Grove, et al., J. Virol., 2007, 81: 3162-3169
 A. Haberstroh, et al., Gastroenterology, 2008, 135: 1719-1728.
 H.J. Harris, et al., J. Virol., 2008, 82: 5007-5020.
 J.H. Hoofnagle, Hepatology, 2002, 36: S21-S29
 M. Hsu, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100: 7271-727
 S.B. Kapadia, et al., J. Virol., 2007, 81: 374-383
 T. Kato, et al., J. Virol., 2007, 81: 4405-4411
 G. Koutsoudakis, et al., J. Virol., 2006, 80: 5308-5320.
 G. Krause, et al., Biochim. Biophys. Acta, 2008, 1778: 631-645.
 SE. Krieger, et al., "Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-Cladin 1 association(s)", 2009, remitido para su publicación.
 L. Lan, et al., J. Immunol., 2008, 181: 4926-4935.
 G.M. Lauer, et al., N. Engl. J. Med., 2001, 345: 41-52
 D. Lavillette, et al., Hepatology, 2005, 41: 265-274.
 M. Law, et al., Nature Med., 2008, 14: 25-27.
 J.W. Lee, et al., Gynecol. Oncol., 2005, 97: 53-59
 B.D. Lindenbach, et al., Science, 2005, 309: 623-626.
 B. D. Lindenbach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103: 3805-3809
 J. Lorhmann, et al., Curr. Drug Disc., 2003, October, 17-21.
 C. J. Mee, et al., J. Virol., 2009, 83: 6211-6221.
 P. Meuleman, et al., Hepatology, 2008, 48: 1761-1768.
 S. Morohashi, et al., Int. J. Mol. Med., 2007, 20: 139-143
 T. Mosmann, J. Immunol., 1983, 65: 55-63.
 Pawlotsky, Trends Microbiol., 2004, 12: 96-102
 WS. Pear, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1993, 90: 8392-8396.
 JM. Pestka, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2007, 104: 6026-6030.
 T. Pietschmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103: 7408-7413.
 P. Pileri, et al., Science, 1998, 282: 938-941.
 A. Ploss, et al., Nature, 2009, 457: 882-886
 K. A. Powers, et al., Liver Transpl., 2006, 12: 207-216
 SC. Ray, et al., J. Exp. Med., 2005, 201: 1753-1759.
 M.B. Resnick, et al., Mod. Pathol., 2005, 18: 511-518
 L. B. Seeff, Semin. Gastrointest., 1995, 6: 20-27.
 L. B. Seeff y J.H. Hoofnagle, Hepatology, 2002, 36: 1-2
 D. Scarselli, et al., EMBO J., 2002, 21: 5017-5025
 G.M. Sheeban, et al., Hum. Pathol., 2007, 38: 564-569
 G. Sobel, et al., Hum. Pathol., 2005, 36: 162-169
 Z. Stamatakis, et al., Clin. Liver Dis., 2008, 12: 693-712.
 B. Steinmann, et al., J. Virol., 2004, 78: 9030-9040.

- M. Timpe y JA. McKeating, Gut, 2008, 57: 1728-1727.
J.M. Timpe, et al., Hepatology, 2008, 47: 17-24.
DM. Tscherne, et al., J. Virol., 2006, 80: 1734-1741.
L. Uebelhoer, et al., PLoS Pathog, 2008, 4: e1000143.
5 CM. Van Itallie y JM. Anderson, Annu. Rev. Physiol., 2006, 68: 403-429.
T. Wakita, et al., Nat. Med., 2005, 11: 791-796.
J. Witteveldt, et al., J. Gen. Virol., 2009, 90(Pt 1) : 48-58.
M. Yi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103: 2310-2315
10 M.B. Zeisel, et al., Hepatology, 2007, 46: 1722-1731.
MB. Zeisel, et al., "Hepatology, 2008, 48: 299-307.
J. Zhong, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, 102: 9294-9299.

Otras realizaciones

- 15 Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tomando teniendo en consideración la memoria descriptiva o la práctica de la invención divulgada en el presente documento. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren solo ilustrativos, indicándose el verdadero alcance de la invención por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular de hibridoma depositada en el DSMZ el 29 de julio de 2008 con el 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.
- 5
2. Un anticuerpo monoclonal secretado por una línea celular de hibridoma depositada en el DSMZ el 20 de julio de 2008 con el 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, o un fragmento biológicamente activo del mismo que se une al dominio extracelular de claudina-1.
- 10
3. El anticuerpo monoclonal o fragmento biológicamente activo del mismo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo monoclonal o fragmento biológicamente activo se une a un epítopo que es fuertemente dependiente de la conservación del motivo conservado W(30)-GLW(51)-C(54)-C(64) en el primer bucle extracelular de claudina 1.
- 15
4. El anticuerpo monoclonal o fragmento biológico activo del mismo de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que el anticuerpo monoclonal o fragmento biológico activo del mismo no se une a claudina-1 de roedor pero se une a claudina-1 de primate no humano.
- 20
5. El anticuerpo monoclonal o fragmento biológico activo del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que el anticuerpo monoclonal está humanizado, desinmunizado o es quimérico.
- 25
6. El anticuerpo monoclonal o fragmento biológico activo del mismo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el anticuerpo monoclonal comprende las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal secretado.
- 30
7. El anticuerpo monoclonal o fragmento biológico activo del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo inhibe:
- la unión de la glucoproteína E2 de la envuelta del VHC o viriones infecciosos a líneas celulares permisivas a VHC,
 - las asociación o asociaciones CD81-claudina-1, y/o
 - la transmisión de célula a célula o la diseminación viral del VHC.
- 35
8. Una molécula que comprende al anticuerpo monoclonal o fragmento biológico activo del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en el que, opcionalmente, el anticuerpo monoclonal, o fragmento del mismo, se une a un resto detectable o a un agente terapéutico.
- 40
9. El anticuerpo monoclonal o fragmento biológico activo del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-7 o la molécula de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en:
- la prevención o tratamiento de infección por VHC, o una enfermedad relacionada con el VHC en un sujeto,
 - el tratamiento de una infección crónica por VHC en un paciente,
 - la inhibición de la infección por la población entera de cuasiespecies en un paciente infectado de manera crónica con VHC, y/o
 - prevenir la reinfección y recurrencia del VHC en un paciente con trasplante hepático.
- 45
10. El anticuerpo monoclonal o fragmento biológico activo del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la infección por VHC se debe a VHC de un genotipo seleccionado del grupo que consiste en genotipo 1, genotipo 2, genotipo 3, genotipo 4, genotipo 5 y genotipo 6.
- 50
11. El anticuerpo monoclonal o fragmento biológico activo del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la infección por VHC se debe a VHC de un subtipo seleccionado del grupo que consiste en subtipo 1a, subtipo 1b, subtipo 2a, subtipo 2b, subtipo 2c, subtipo 3a, subtipo 4a-f, subtipo 5a, y subtipo 6a.
- 55
12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal o fragmento biológico activo del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-7 o una molécula de acuerdo con la reivindicación 8, y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 60
13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende además al menos un agente antiviral.
- 65
14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en interferones, ribavirina, anticuerpos monoclonales anti-virus de la hepatitis C, anticuerpos policlonales anti-virus de la hepatitis C, inhibidores de ARN polimerasa, inhibidores de la proteasa, inhibidores de IRES, inhibidores de helicasa, compuestos antisentido, ribozimas, y cualquier combinación de los mismos.

ES 2 529 511 T3

15. Un kit para detectar claudina-1 en una muestra biológica que comprende un anticuerpo monoclonal, o un fragmento biológicamente activo del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-7 o una molécula de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo está unido a un resto detectable.

5

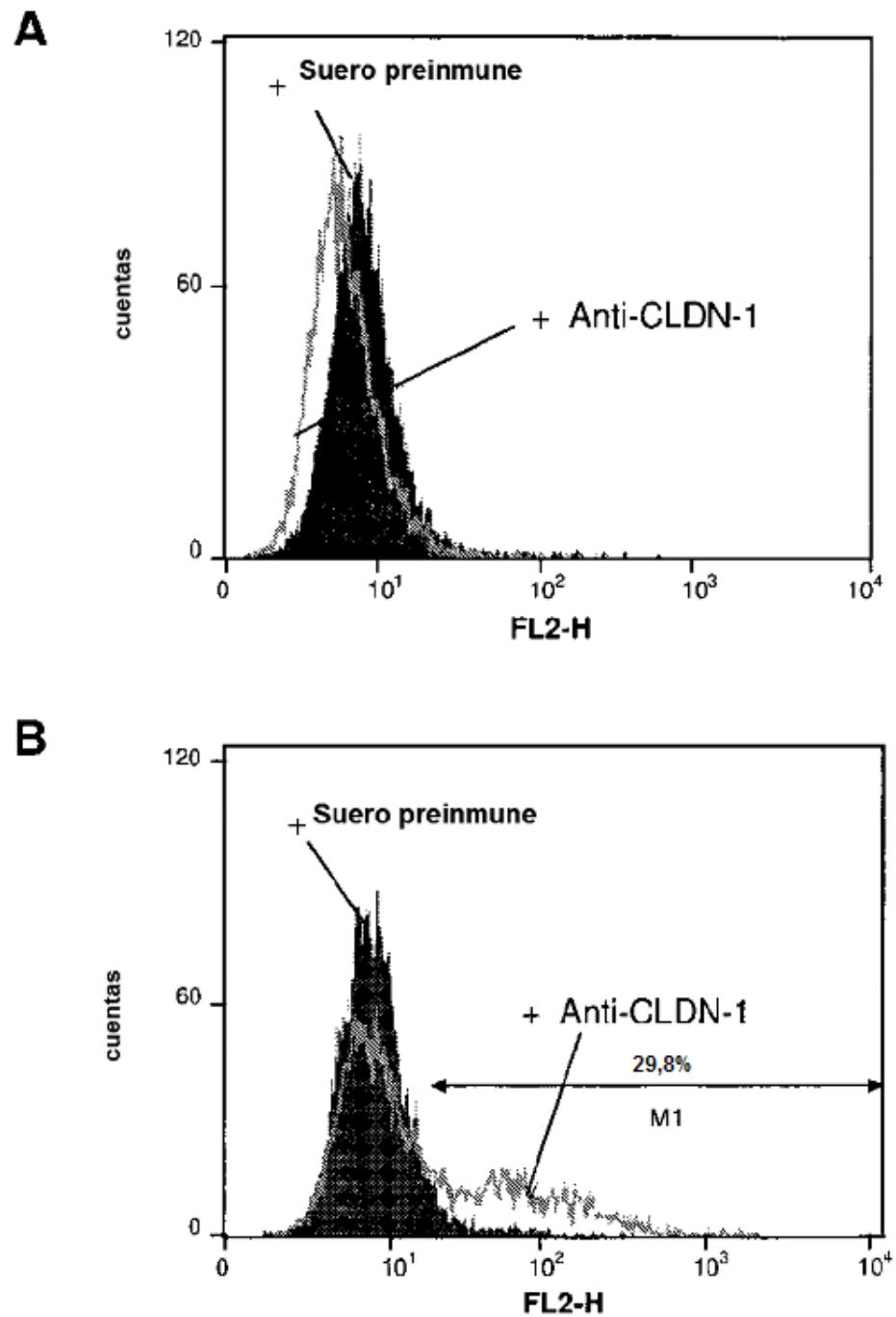
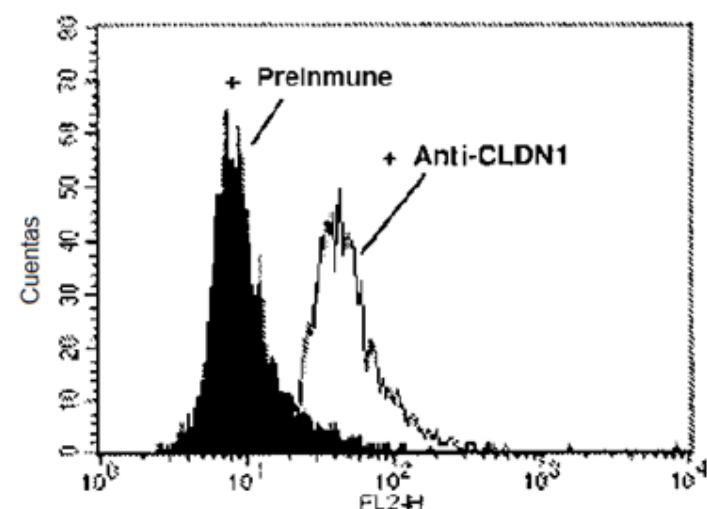


Figura 1

A

Huh 7.5



B

Hepatocitos
Humanos

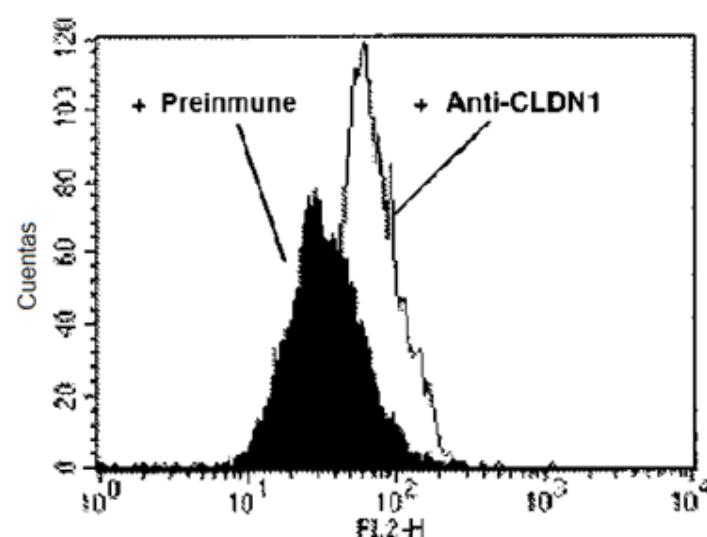


Figura 2

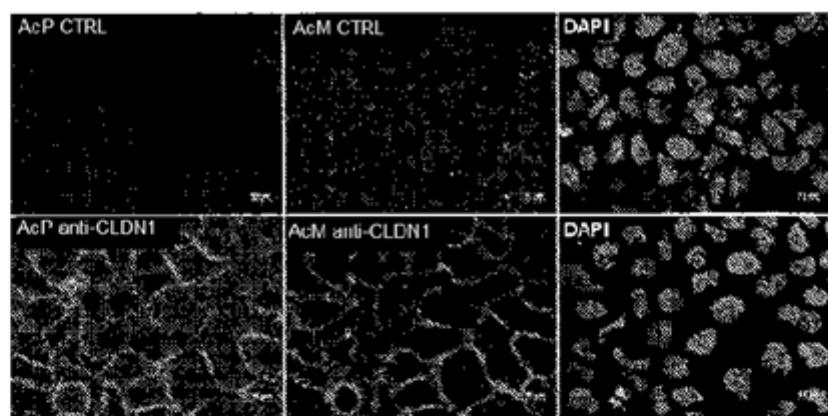
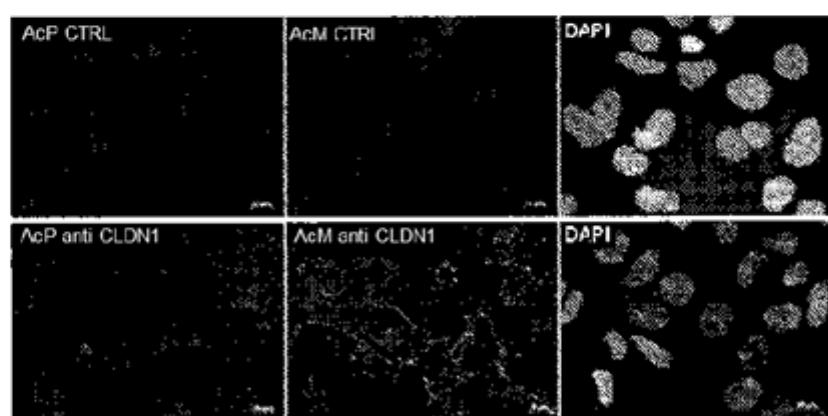
A**Caco2****B****Huh7.5.1**

Figura 3

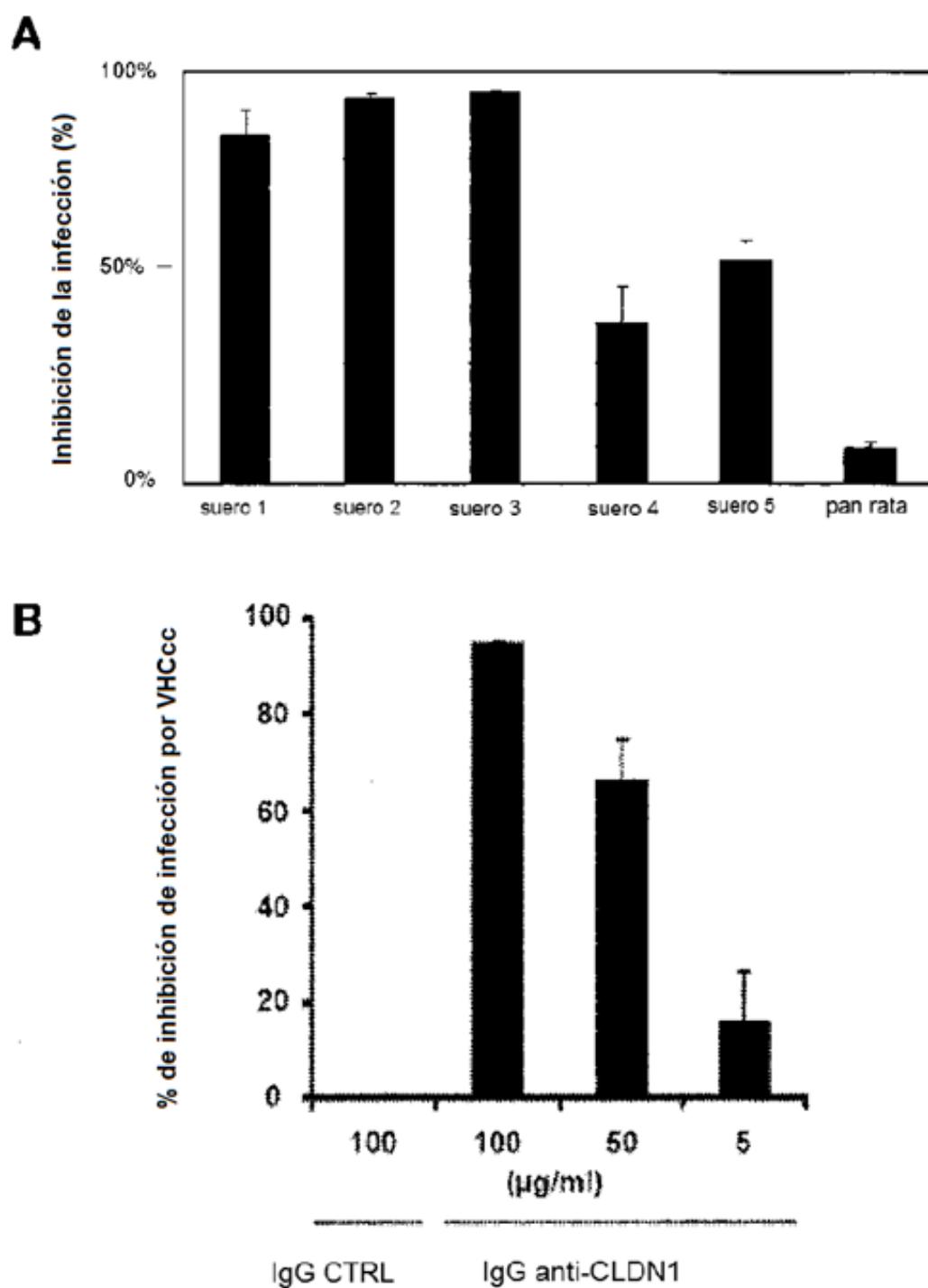


Figura 4

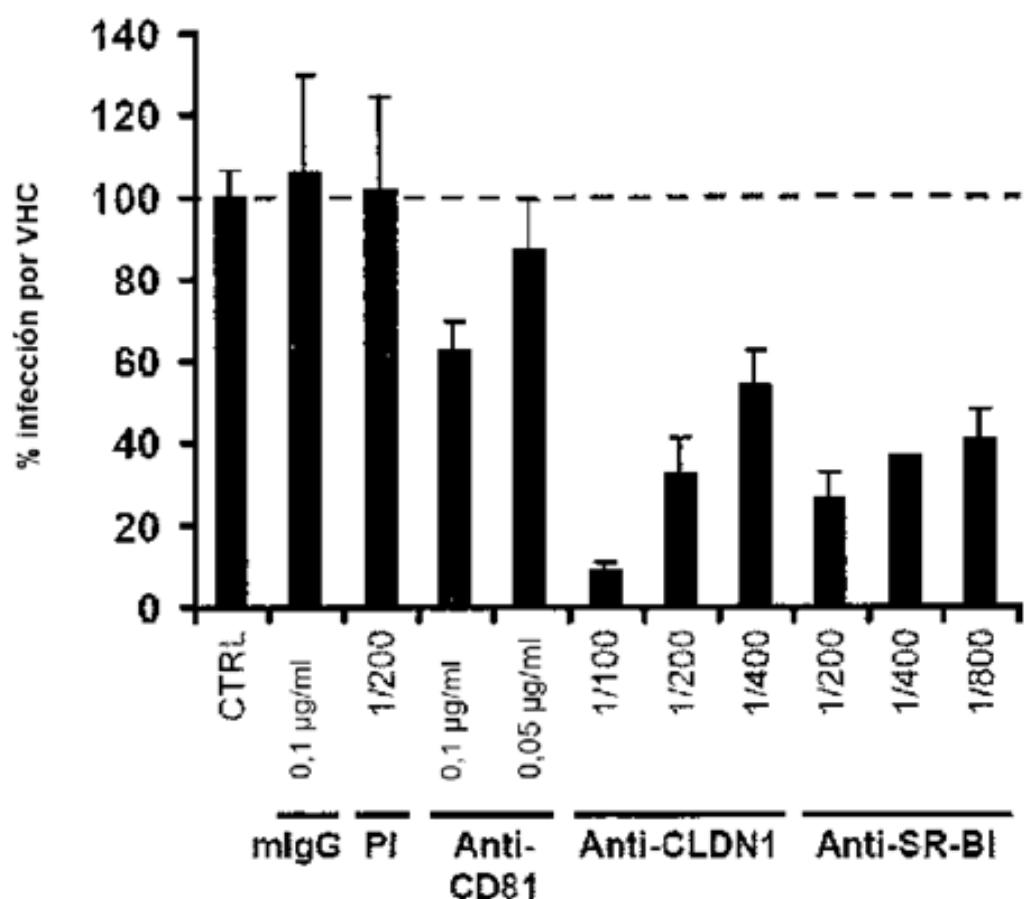
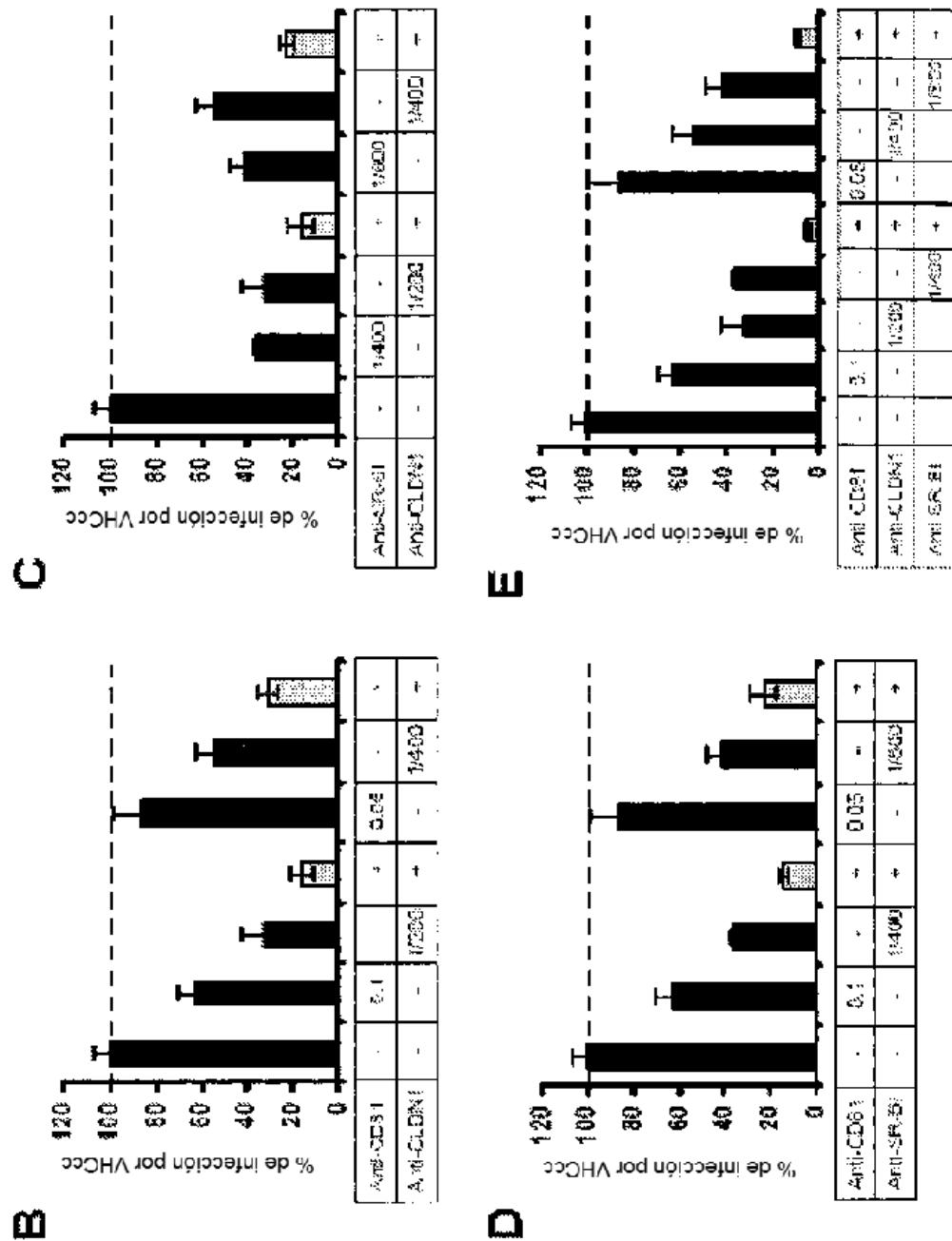
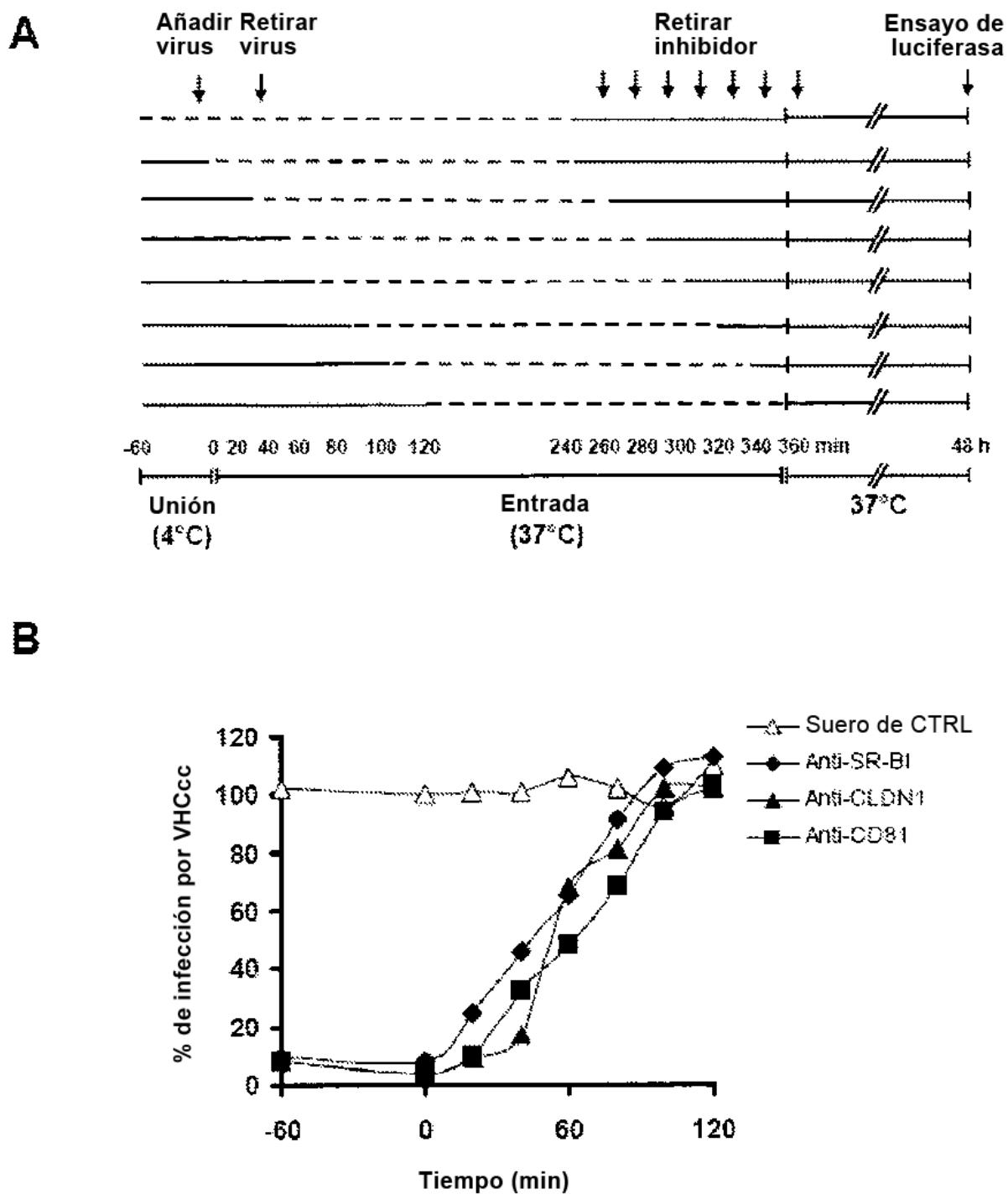


Figura 5(A)



Figuras 5(B)-(E)

**Figura 6**

ES 2 529 511 T3

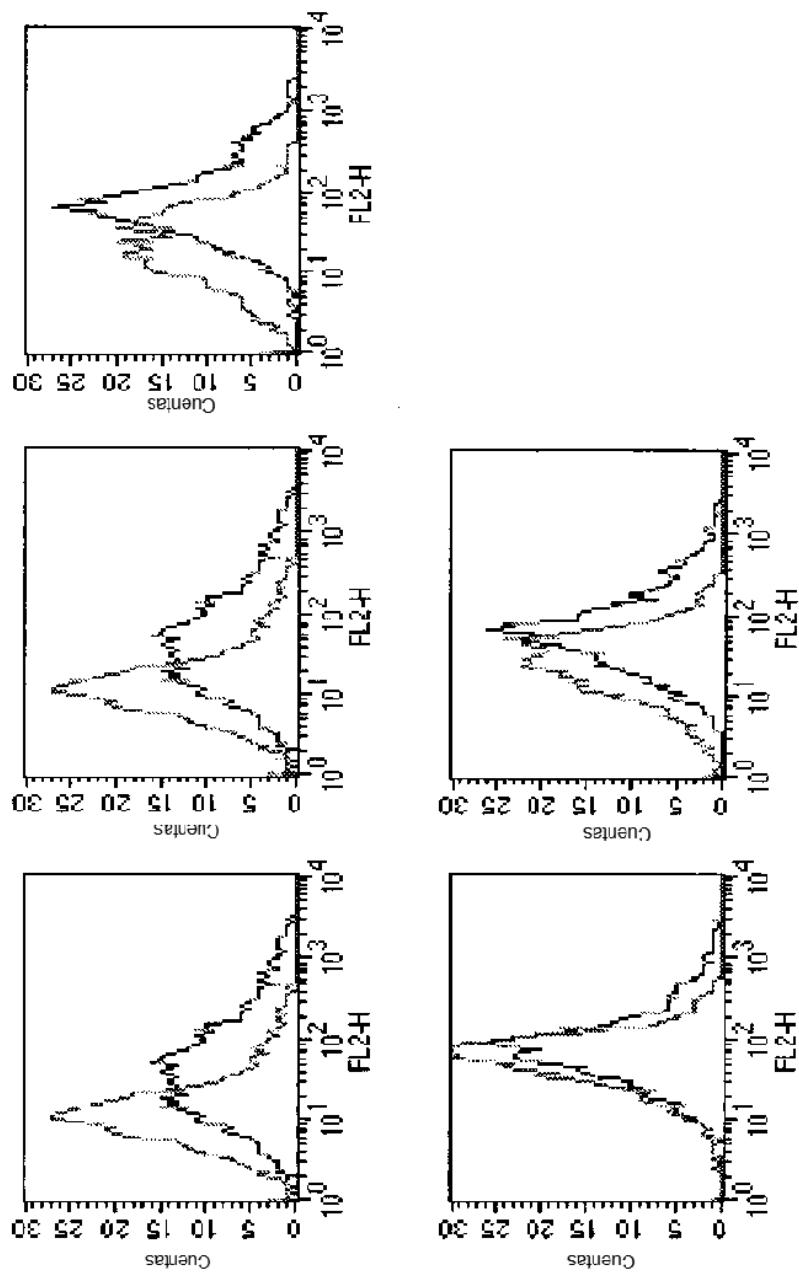


Figura 7

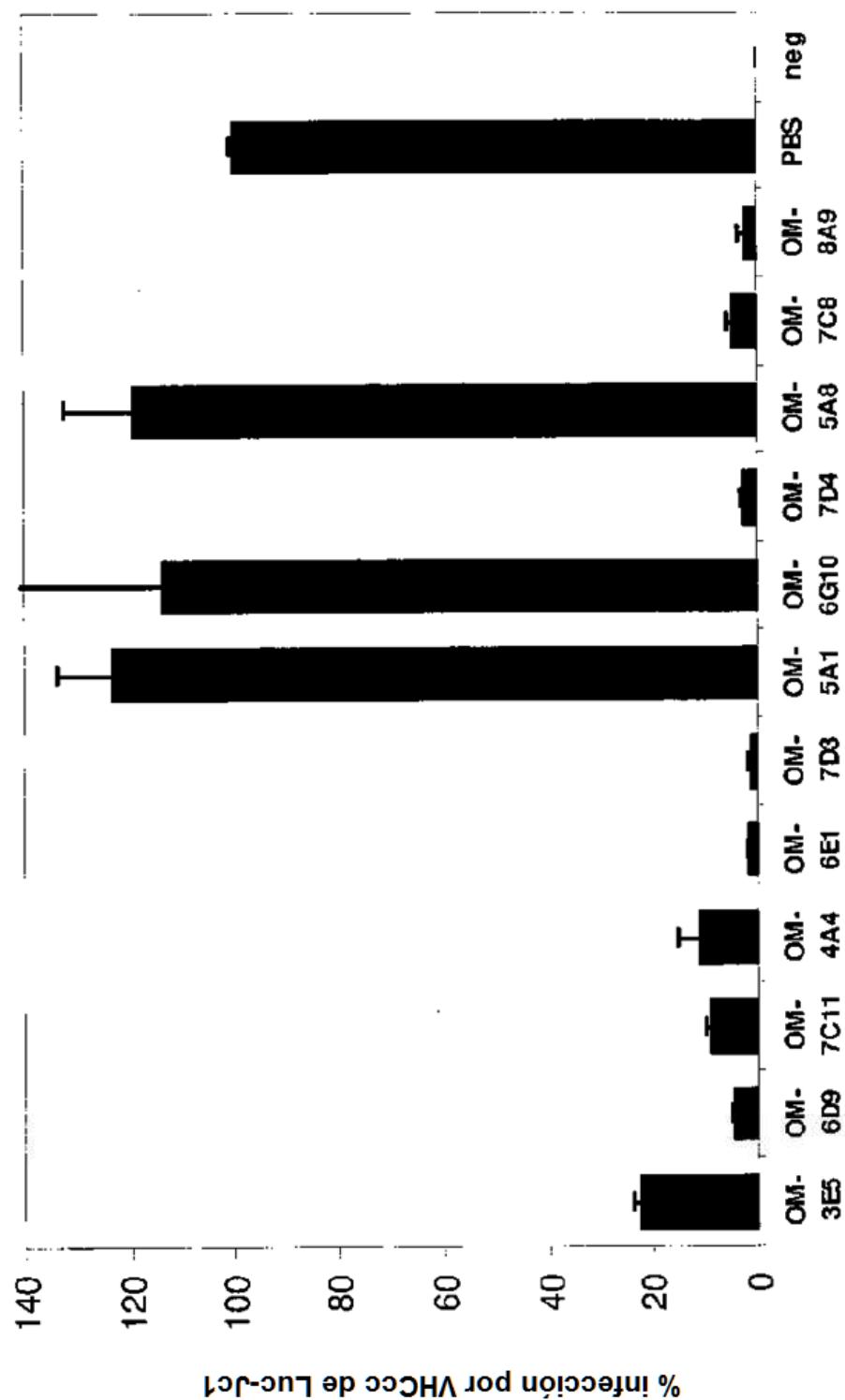


Figura 8

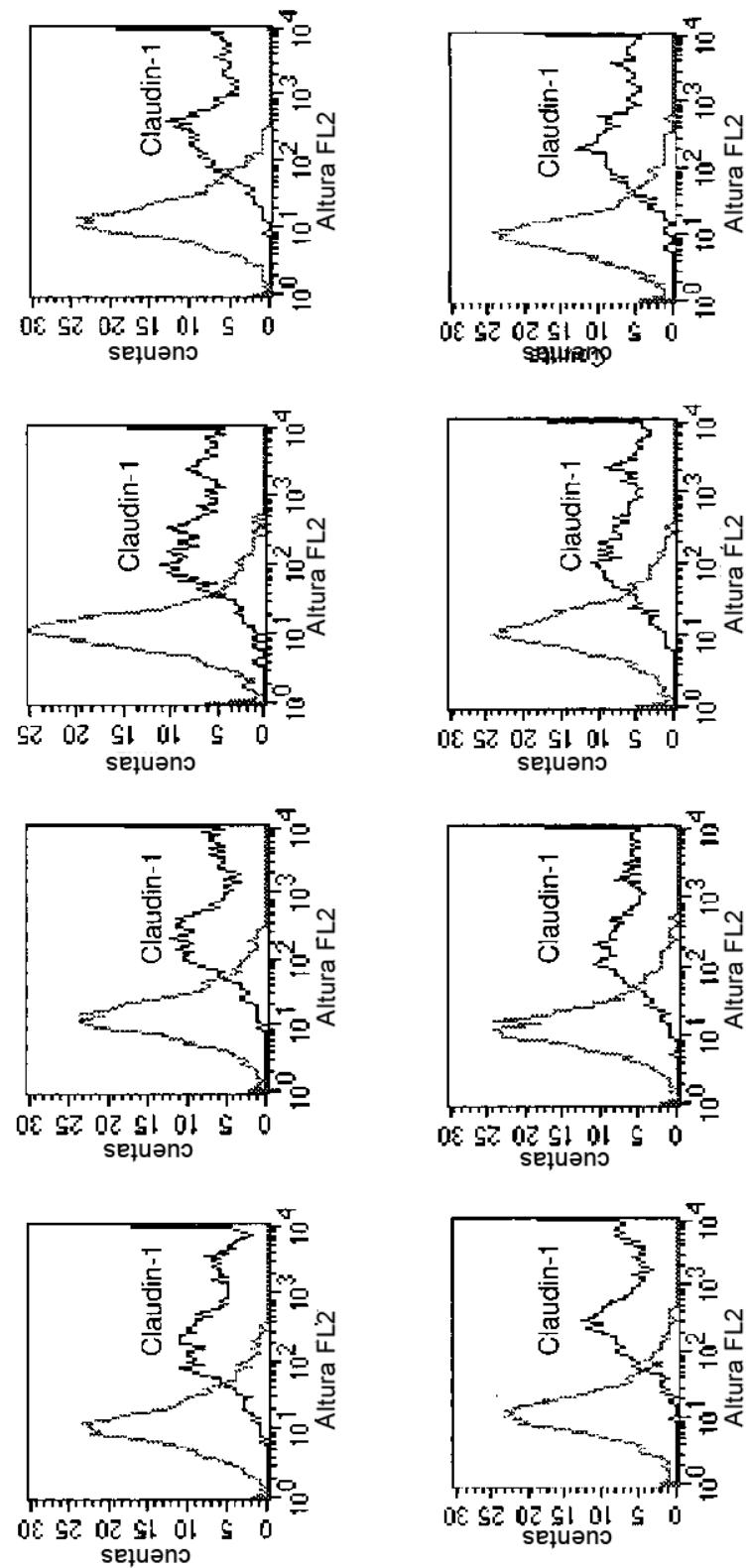


Figura 9(A)

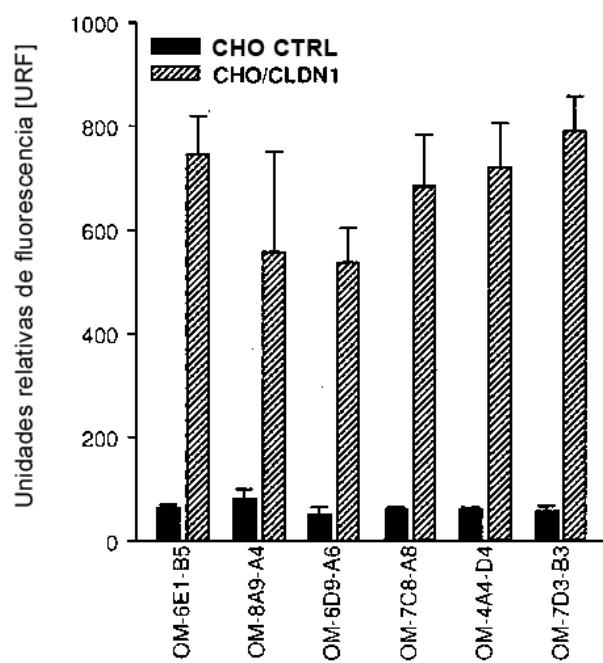
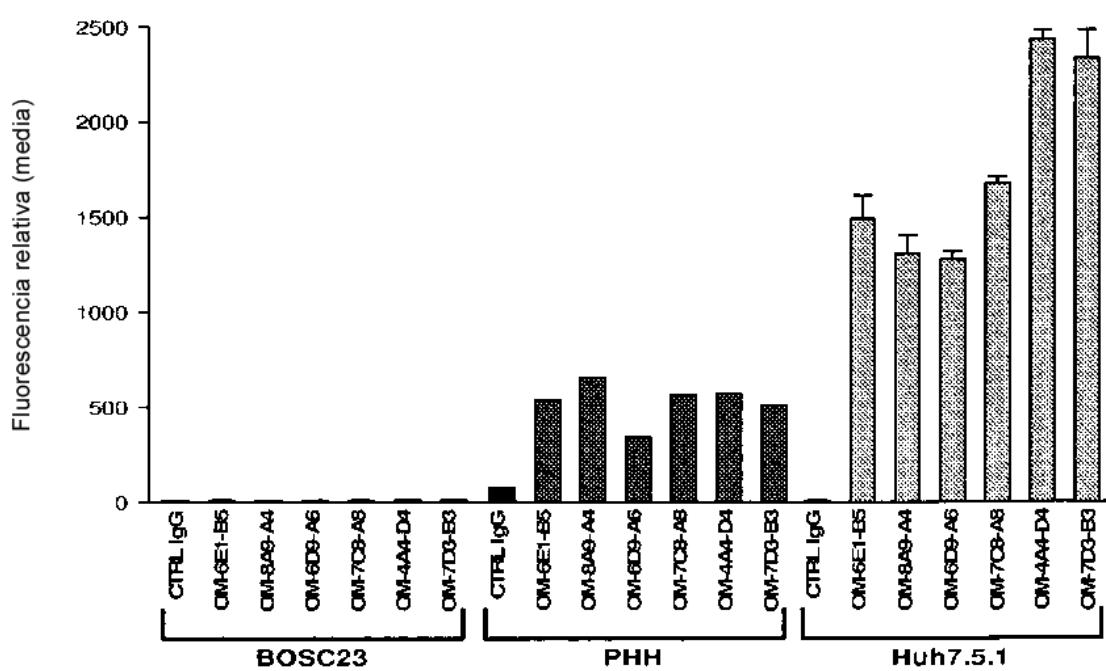
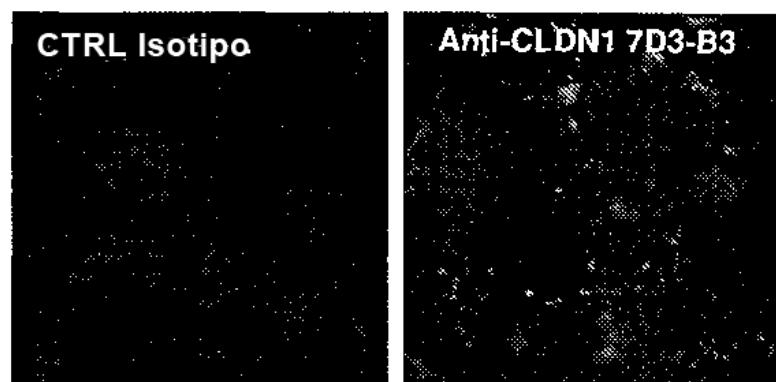
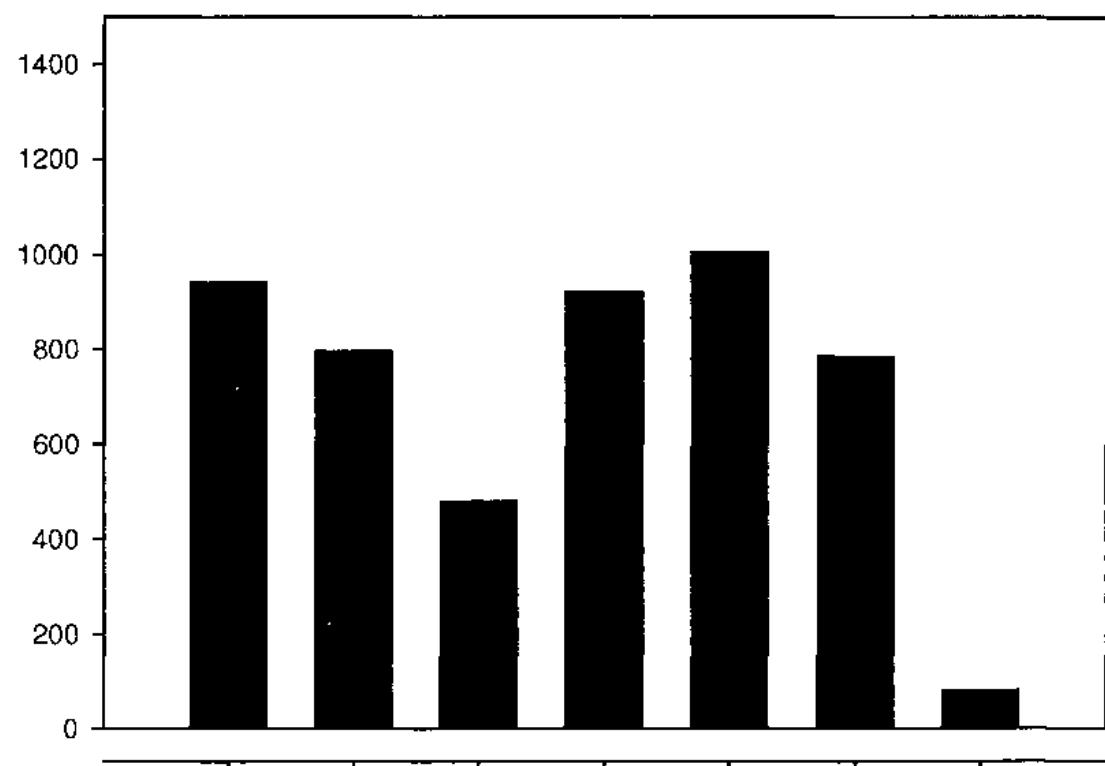
B**C**

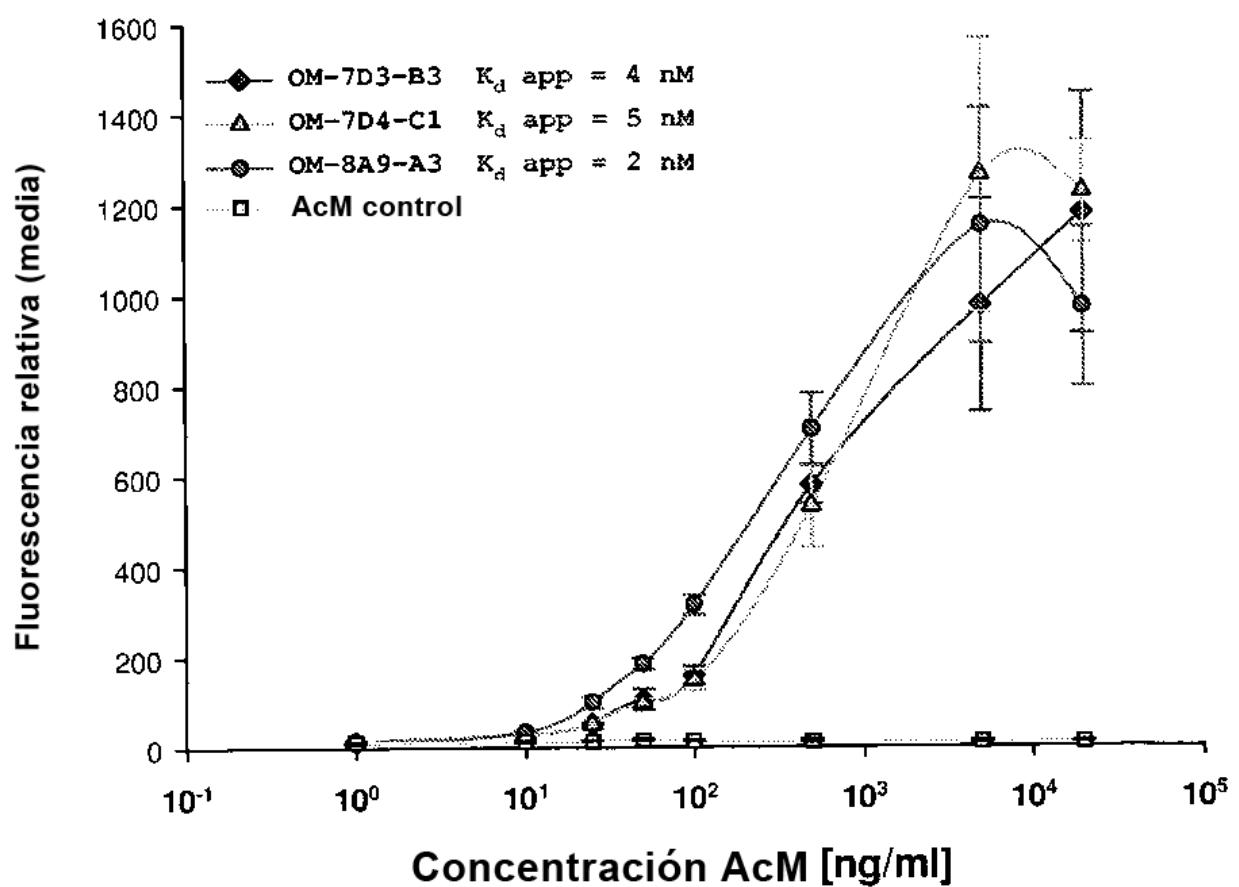
Figura 9(B)-(C)

D



E



**Figura 10(A)**

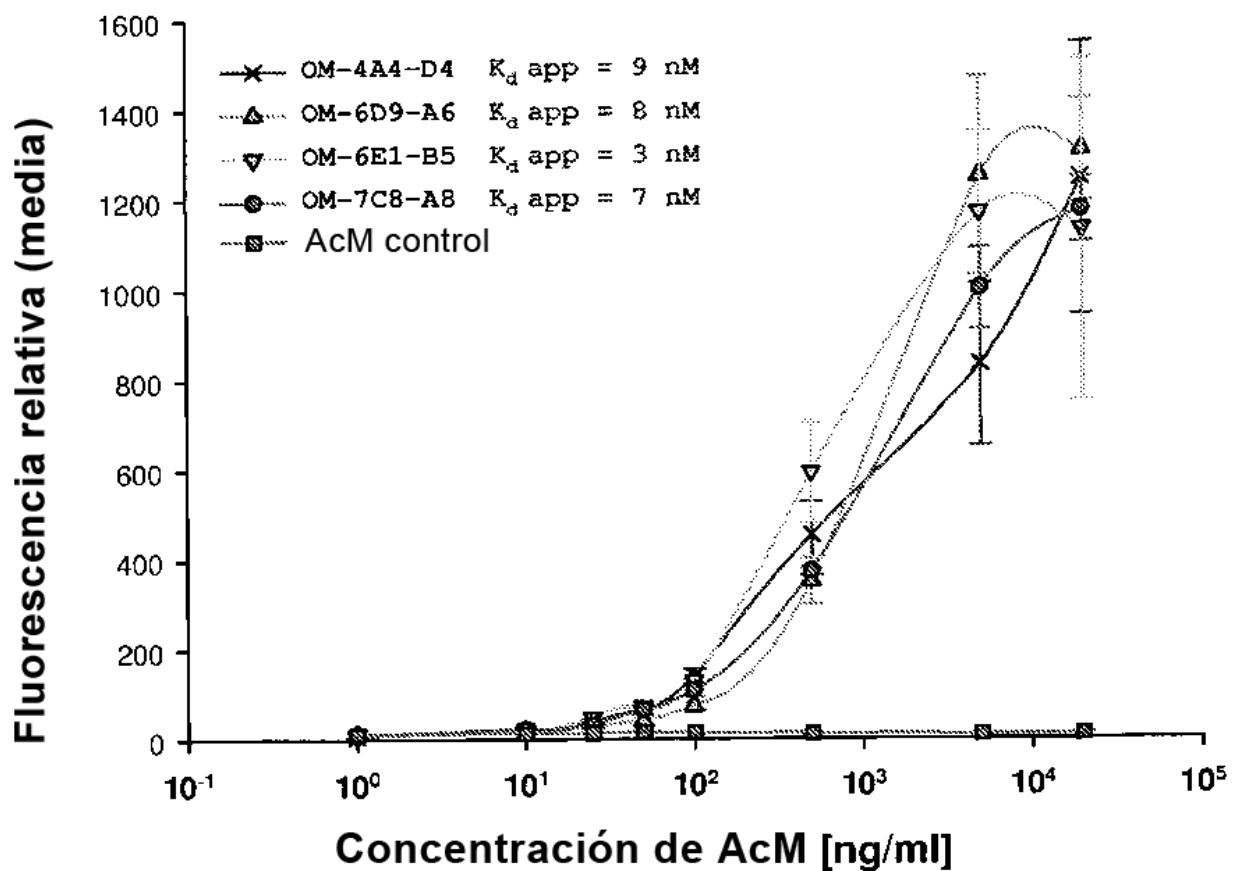


Figura 10(B)

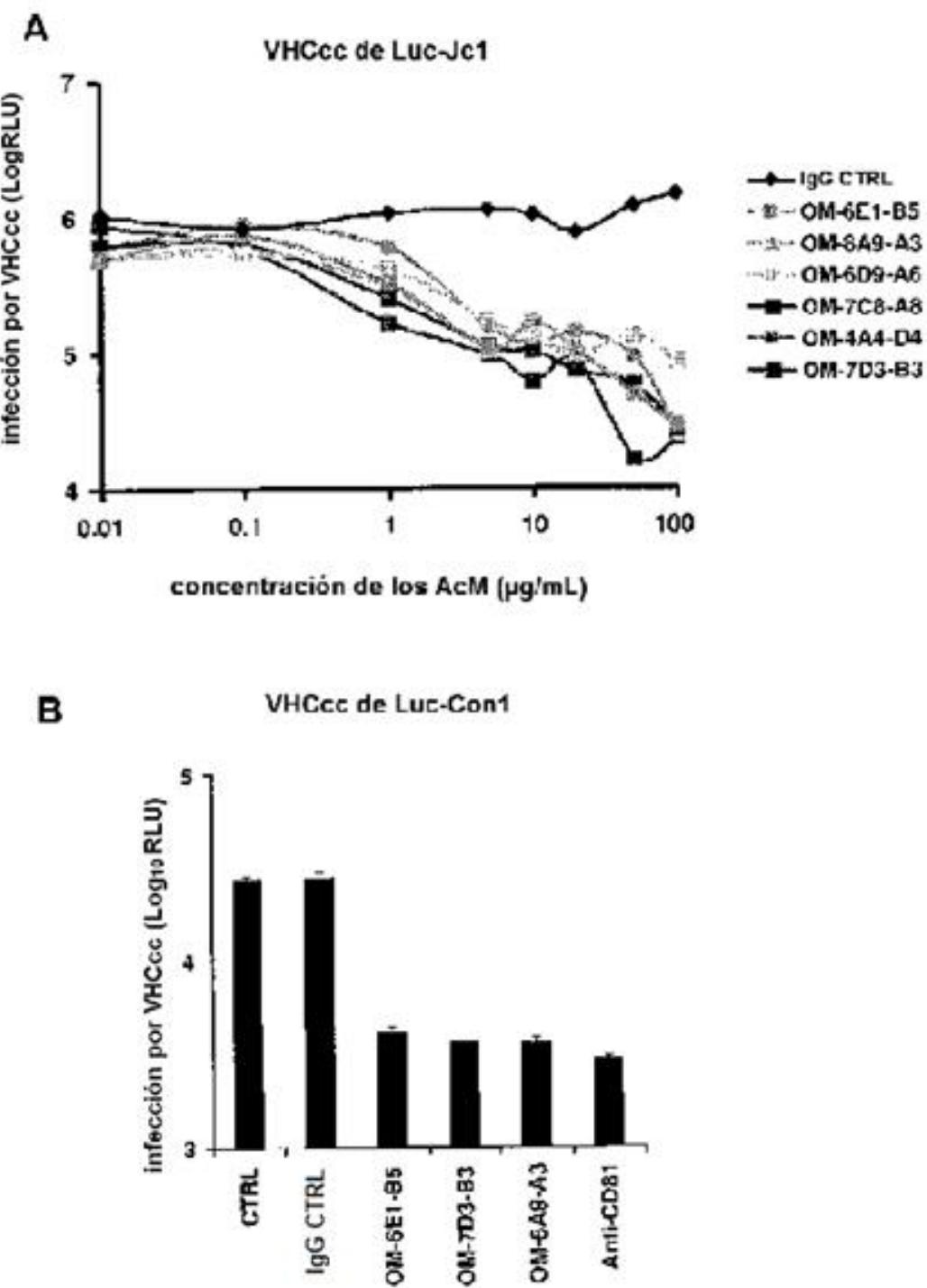


Figura 11

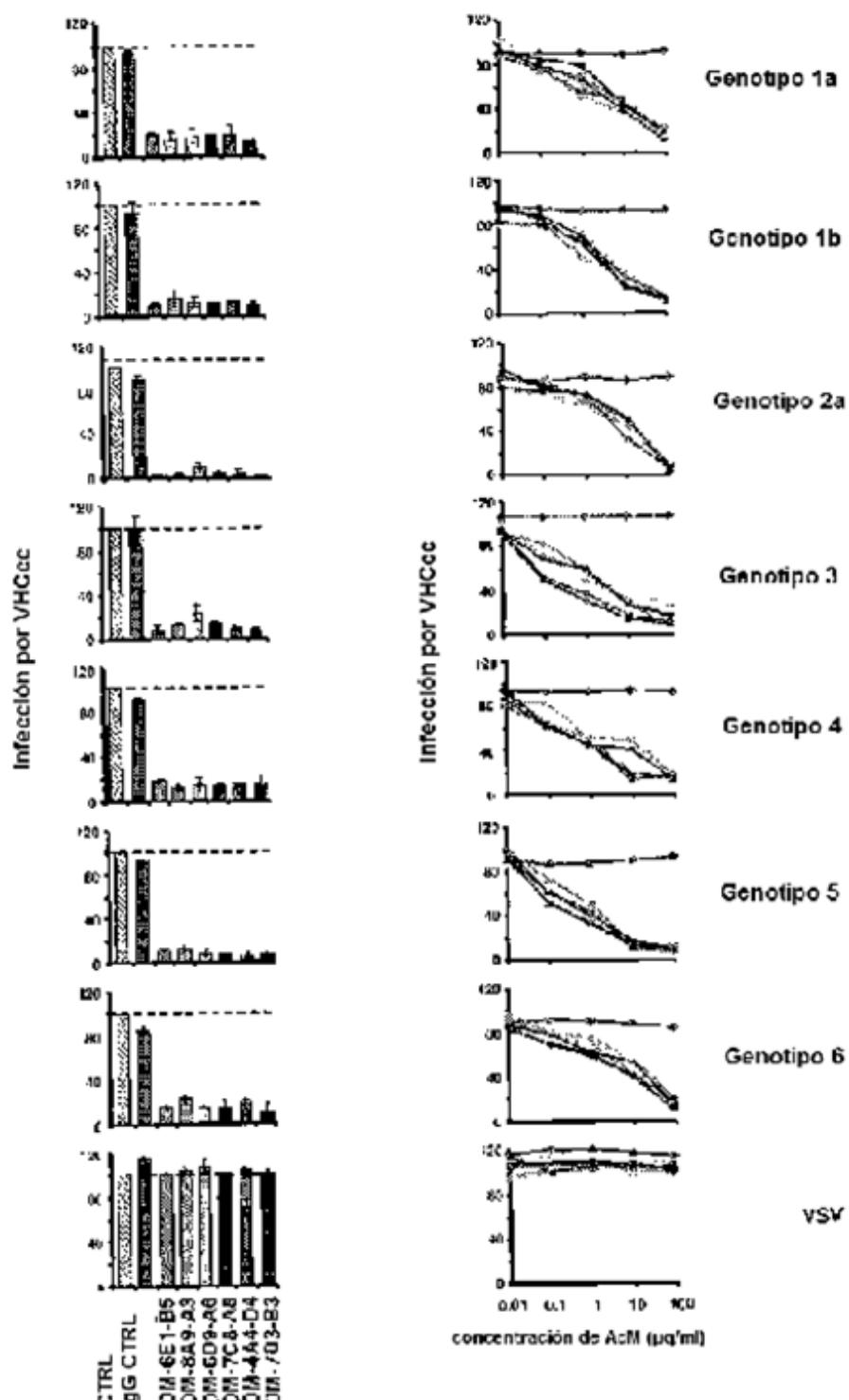


Figura 12

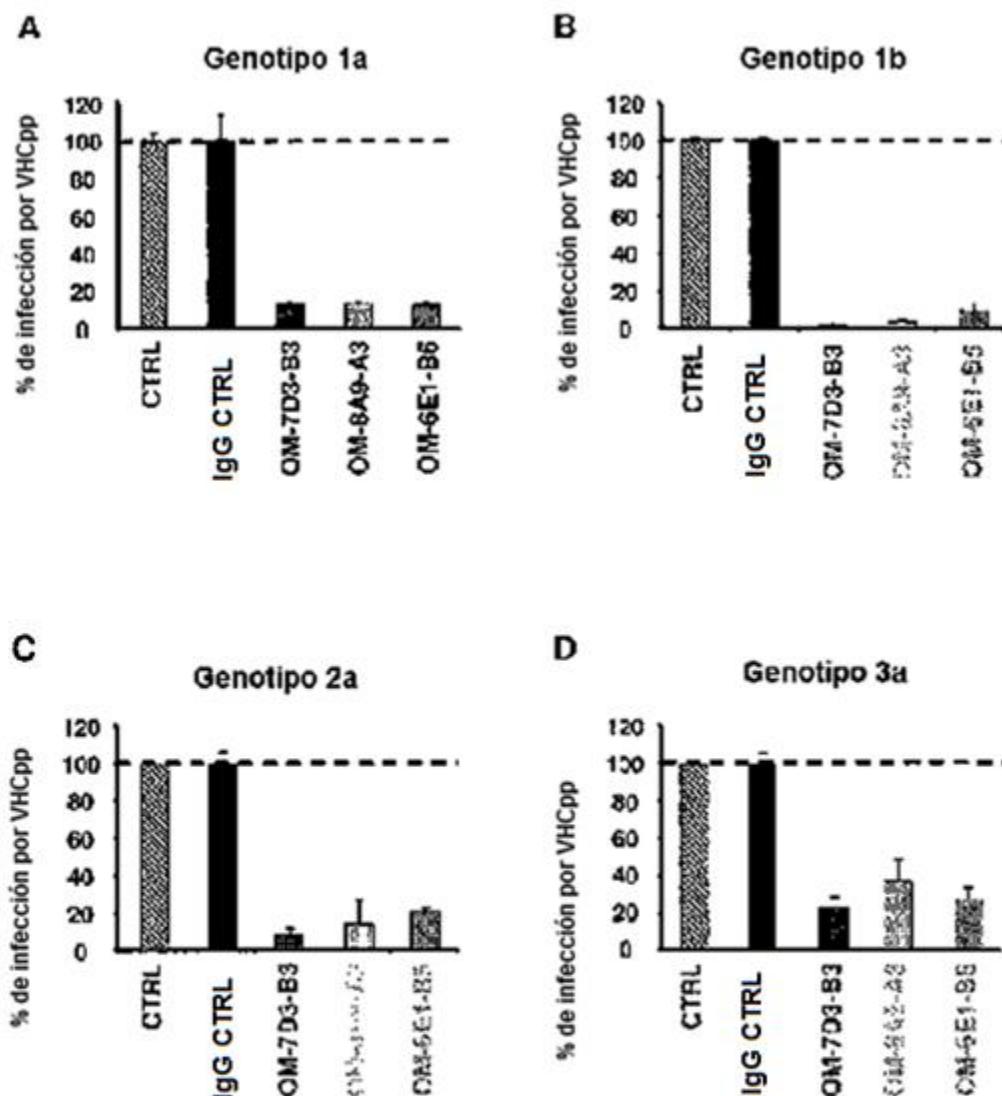


Figura 13

	209	228	384	412	718	727
E1	VI NSSIVYEE <u>ADMIMIHTPGCVP</u>					
	VJ NSSIVYEA <u>ADMIMIHTPGCVP</u>					
	VK NSSIVYEVYD <u>ADMIMIHTPGCVP</u>					
E2	VI ETTVSGGAA <u>KDVERAGFSTGPACEIK</u> " .. "YIVVLFILLA					
	VJ ETTVSGGAA <u>KDVERAGFSTGPACEIK</u> " .. "YIVVLFILLA					
	VK ETTVSGGAA <u>KDVERAGFSTGPACEIK</u> " .. "YIVVLFILLA					

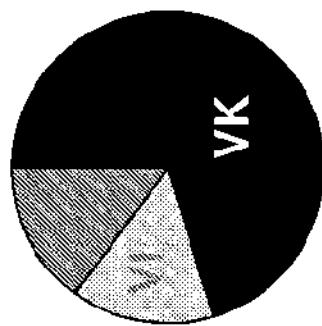
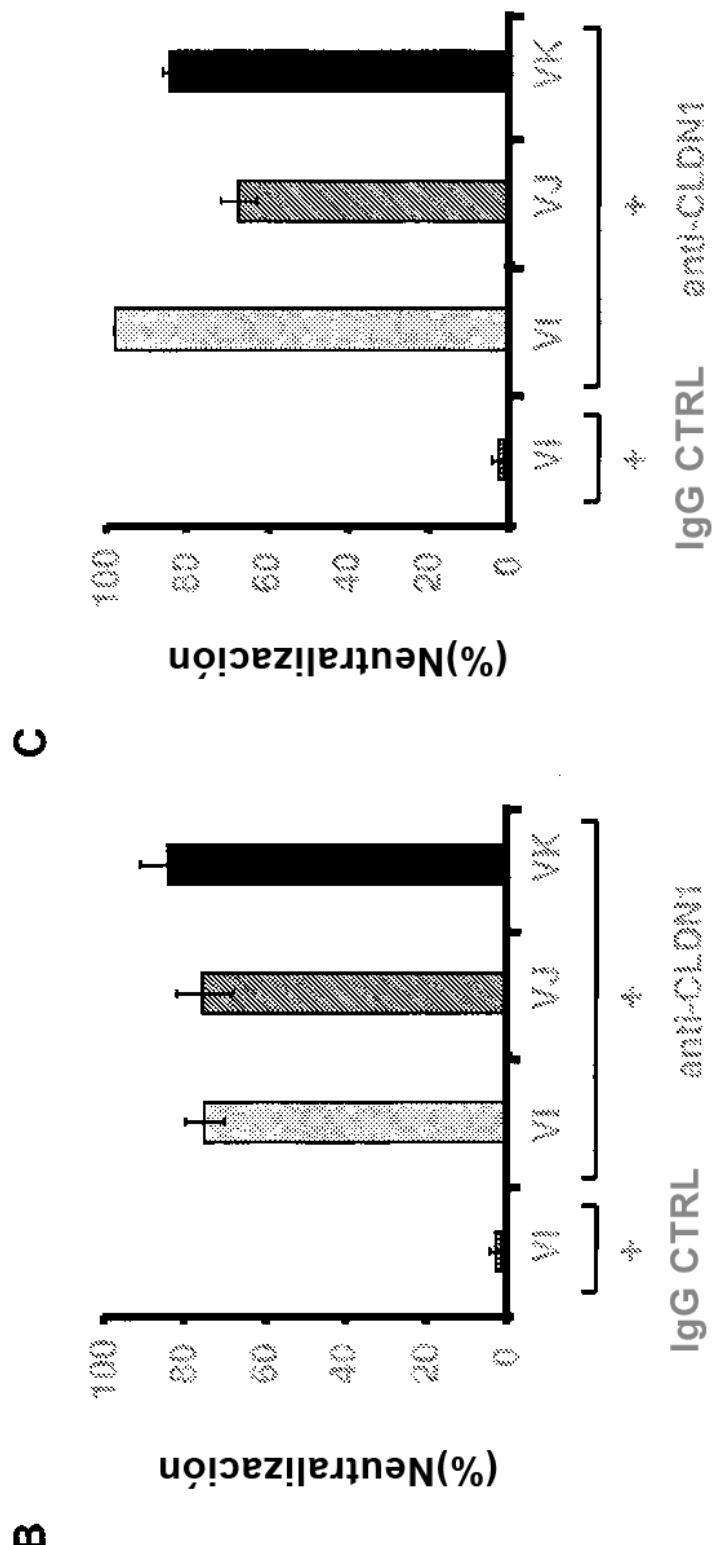


Figura 14(A)

**Figura 14(B)-(C)**

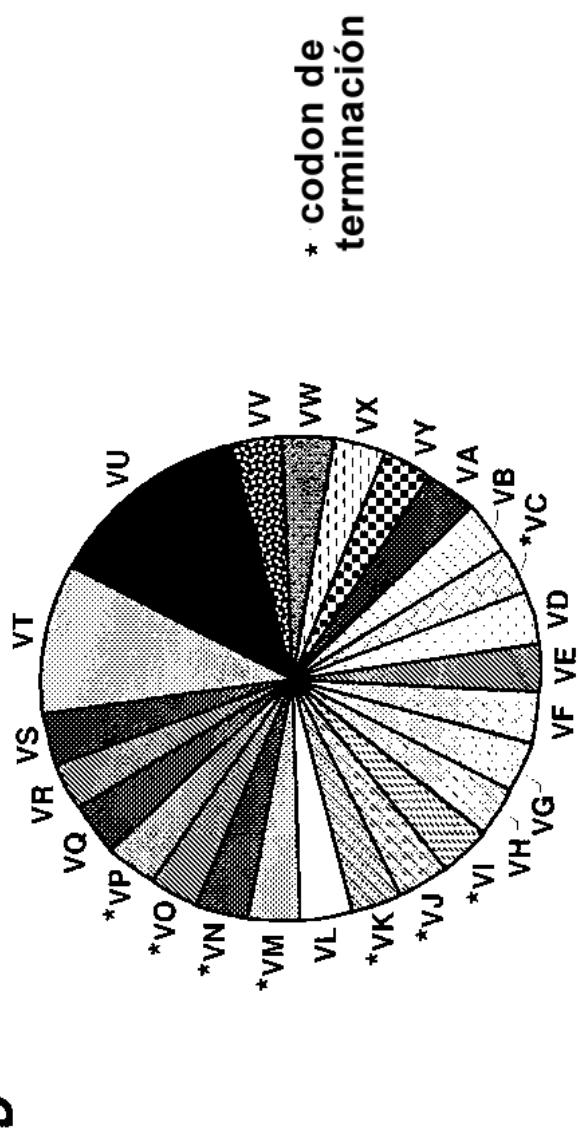


Figura 14(D)

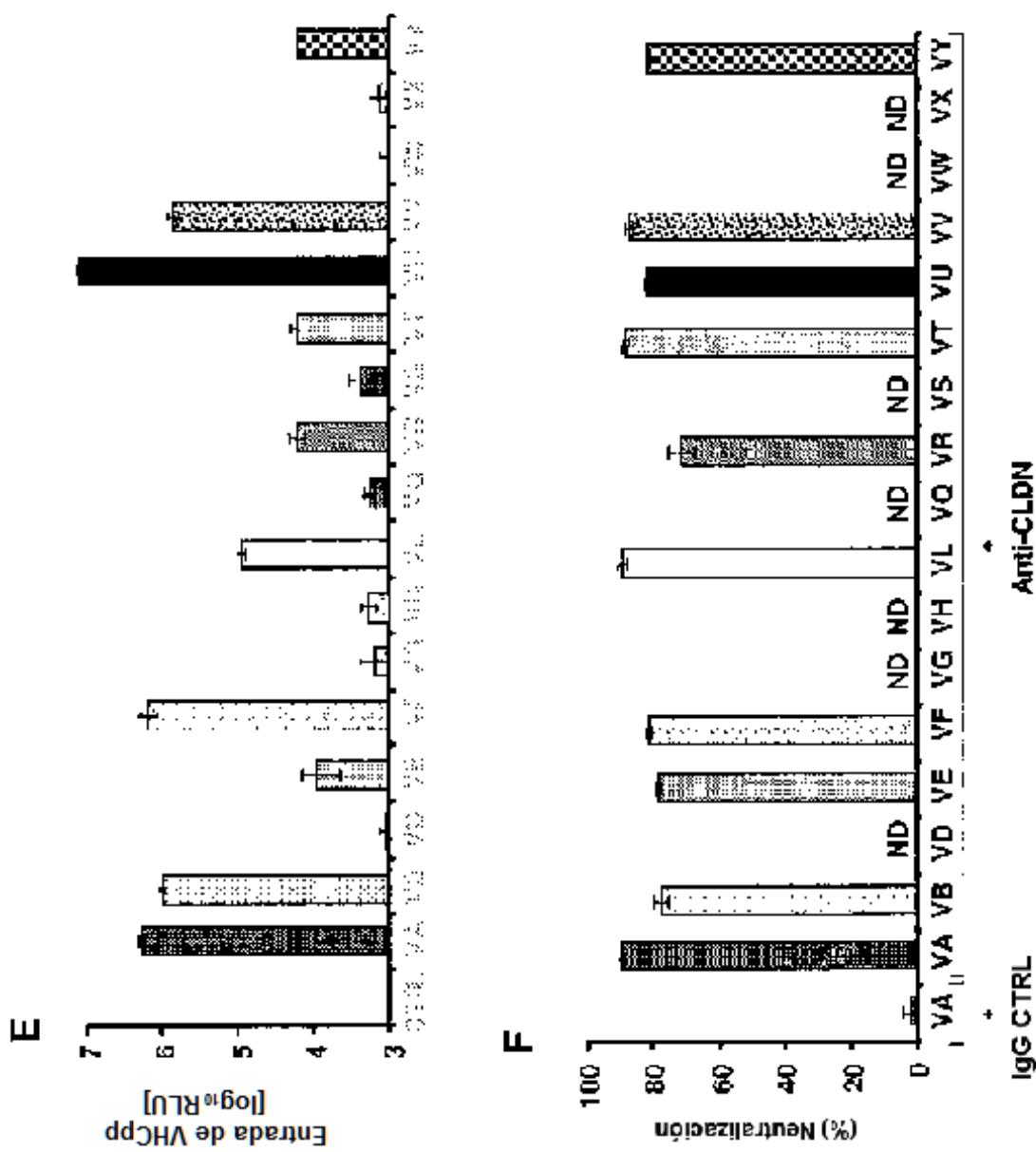
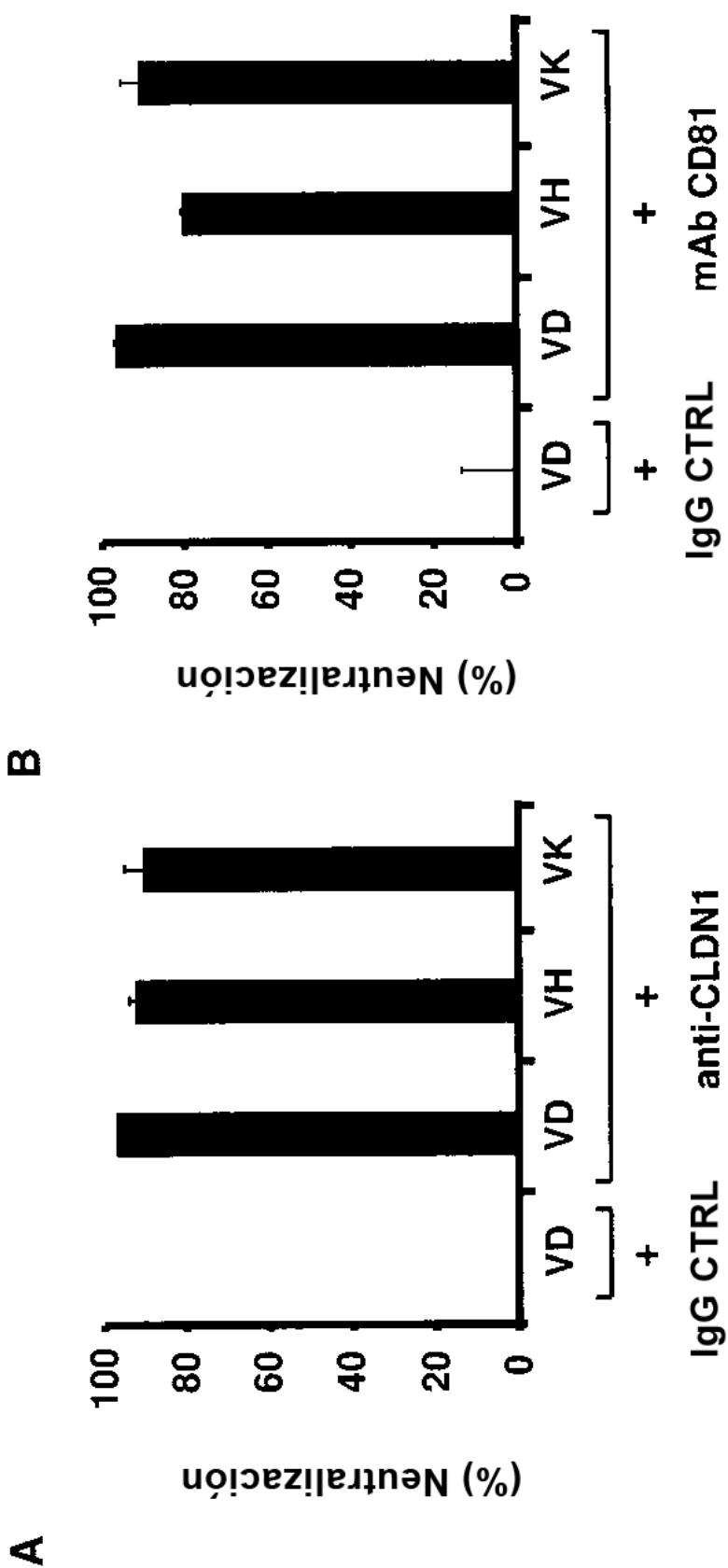


Figura 14(E)-(F)

**Figura 15(A)-(B)**

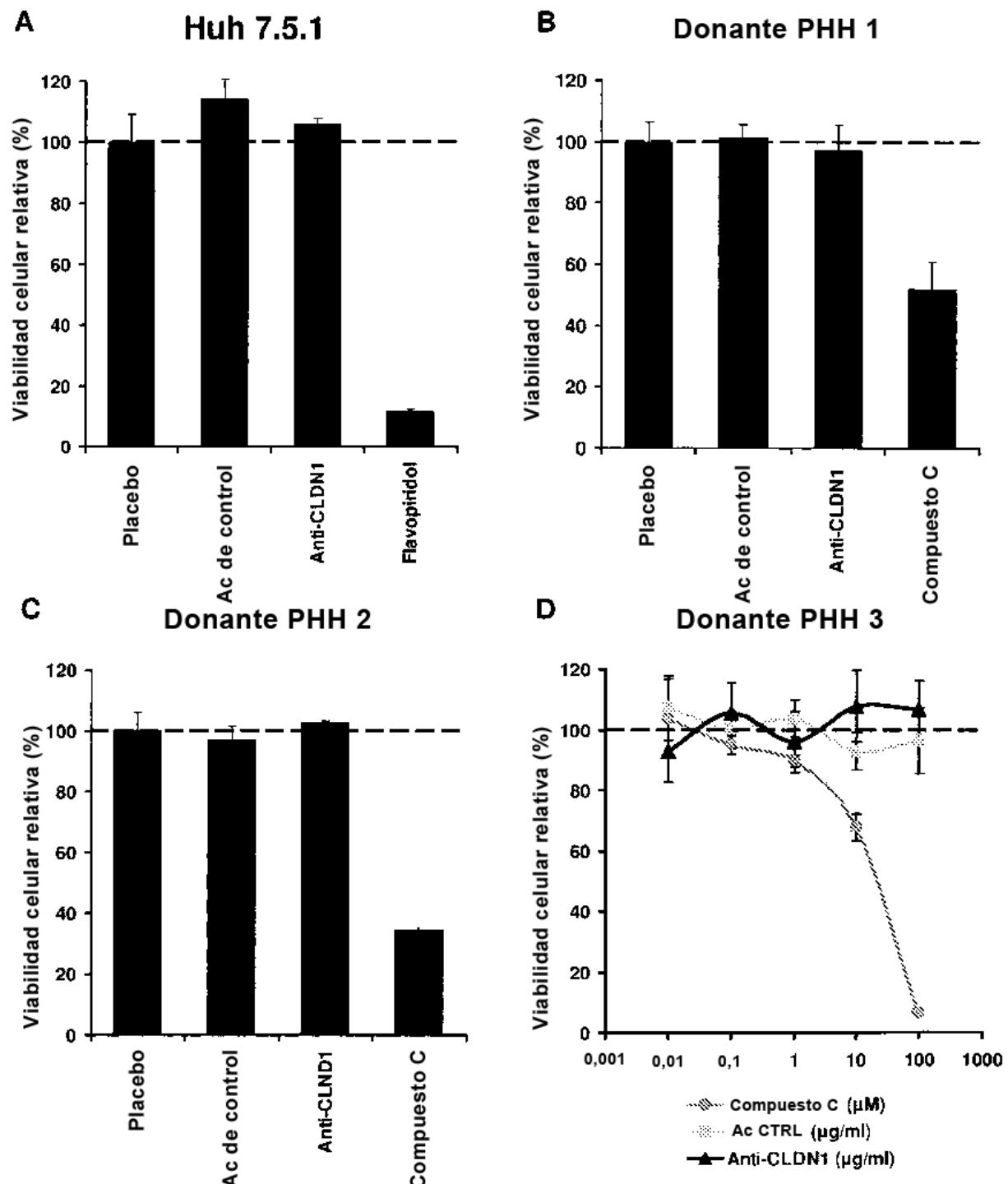
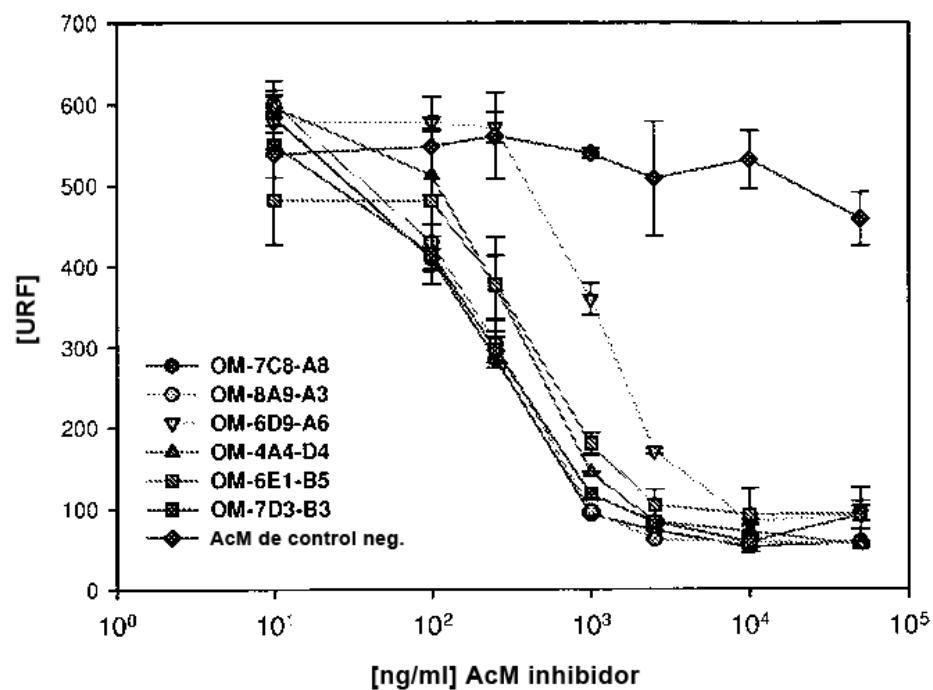


Figura 16(A)-(D)

A

OM-8A9-A3



OM-7D3-B3

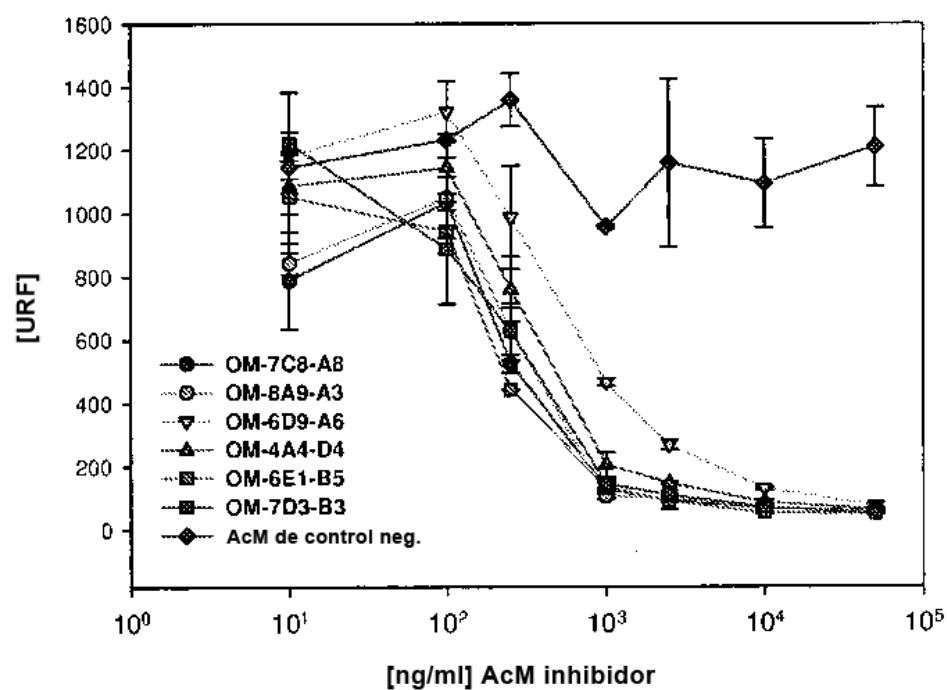
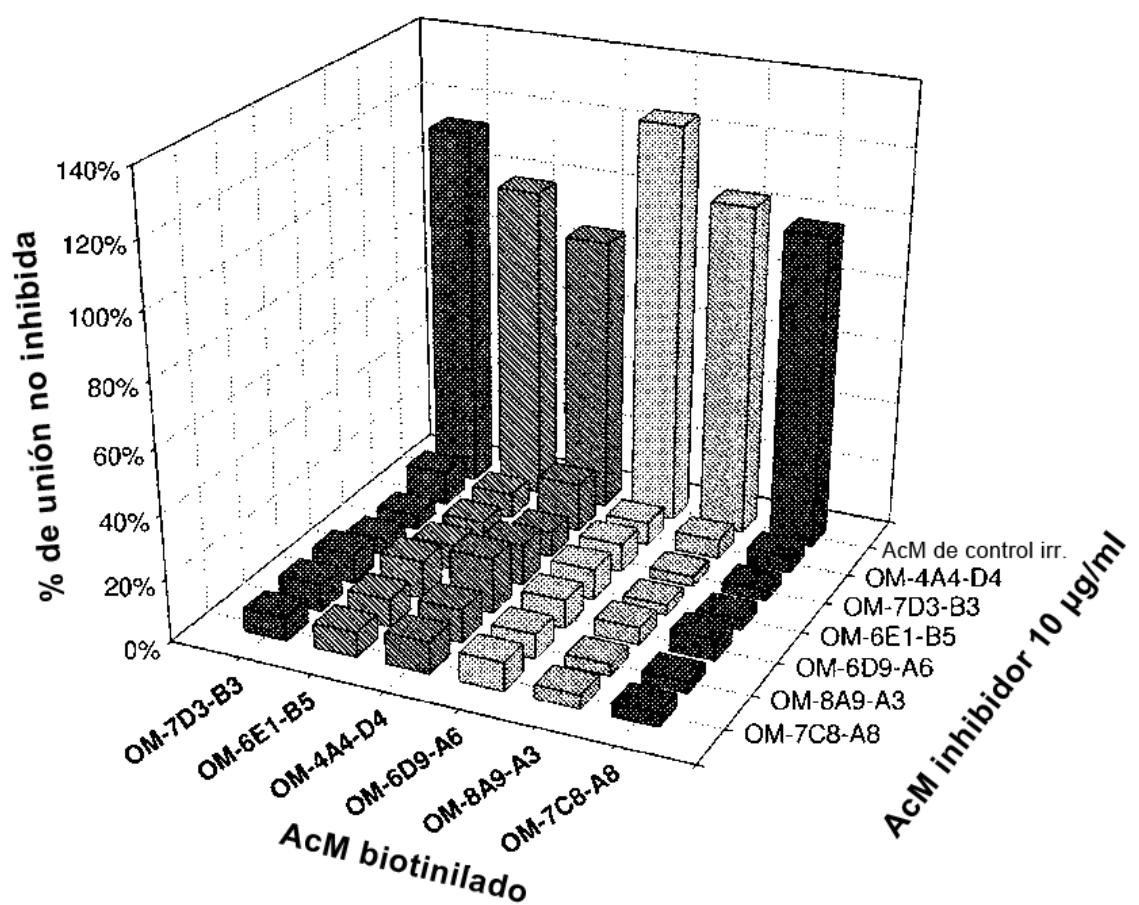
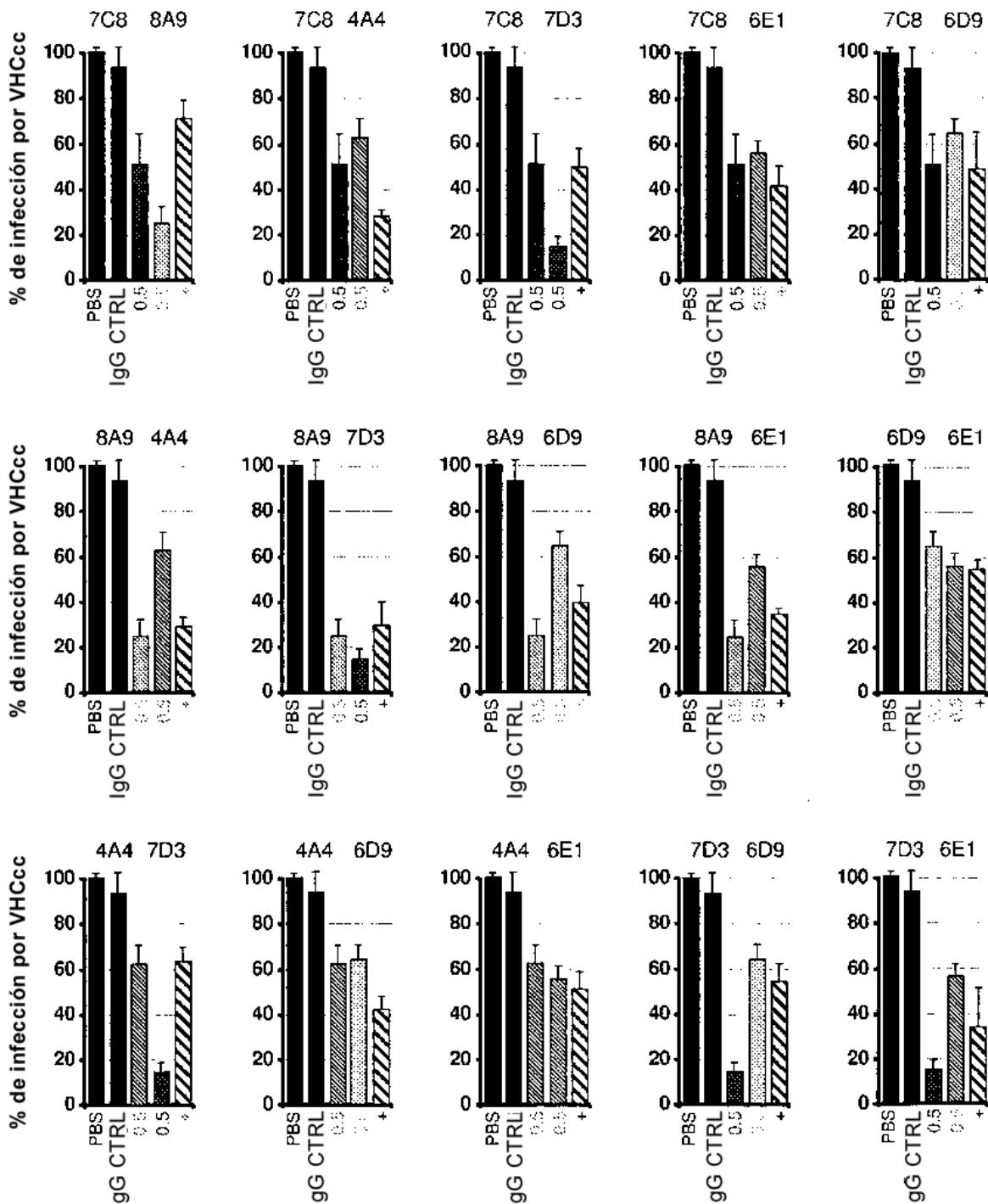
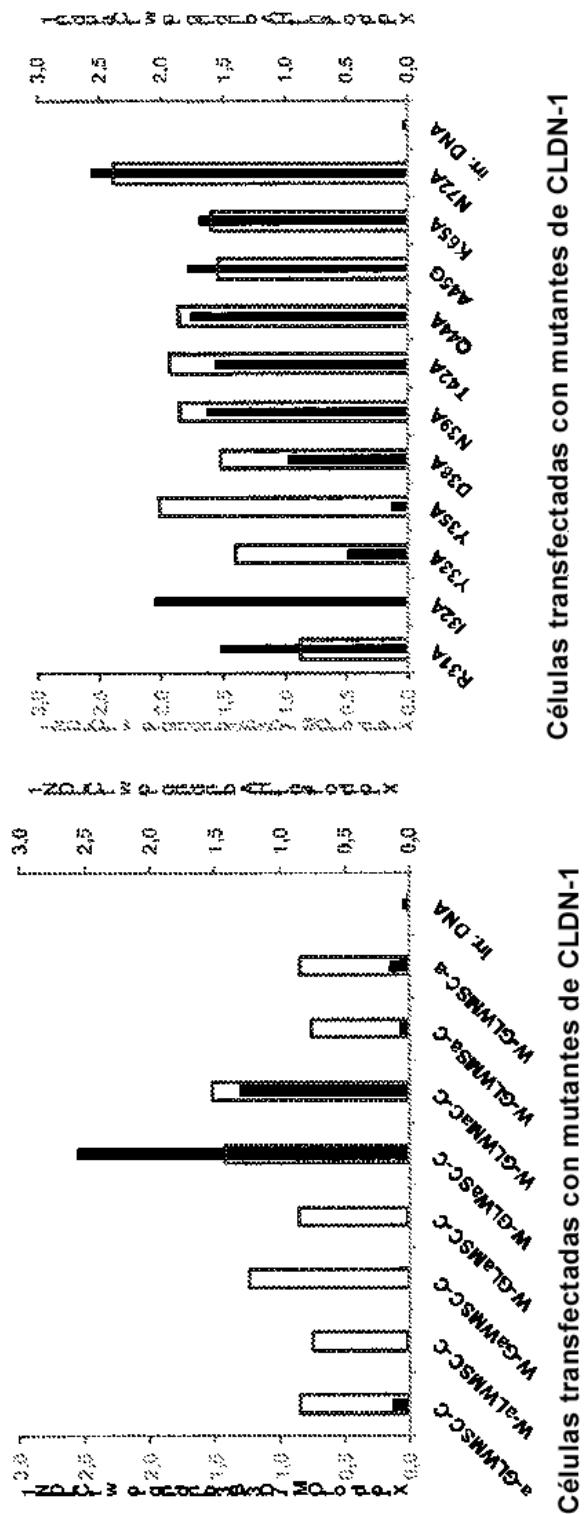
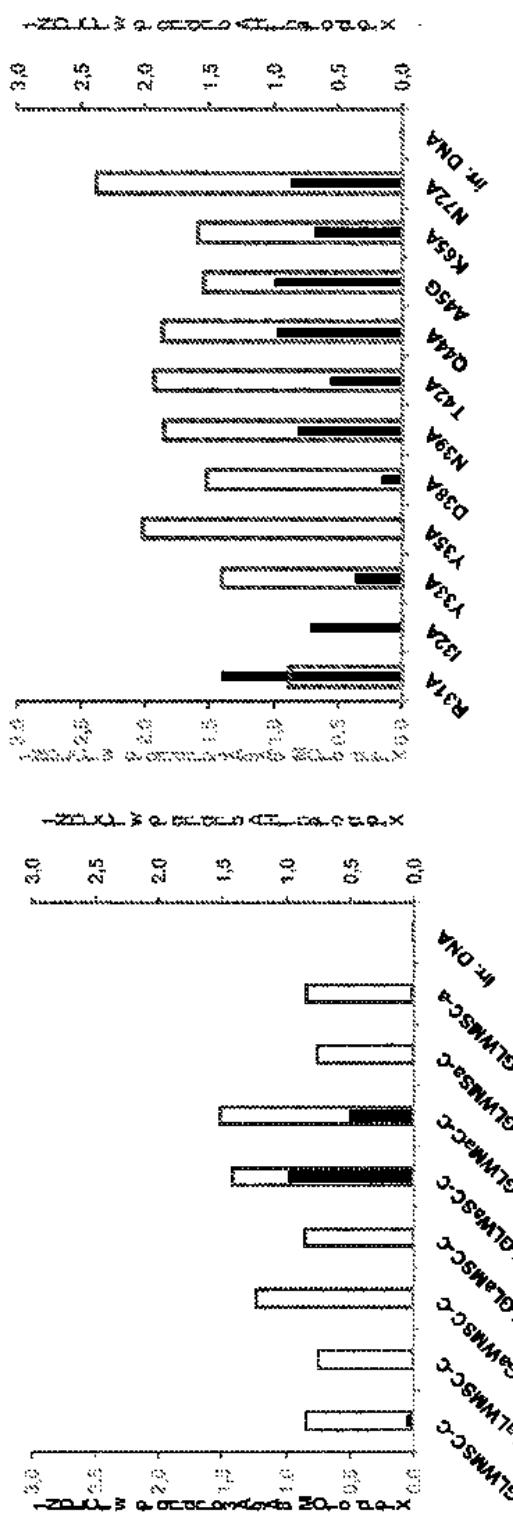


Figura 17(A)

B**Figura 17(B)**

C**Figura 17(C)**

OM-7D3-B3

OMI-8A9-A3

Células transfectadas con mutantes de CLDN-1

Células transfectadas con mutantes de CLDN-1

Figura 18(B)

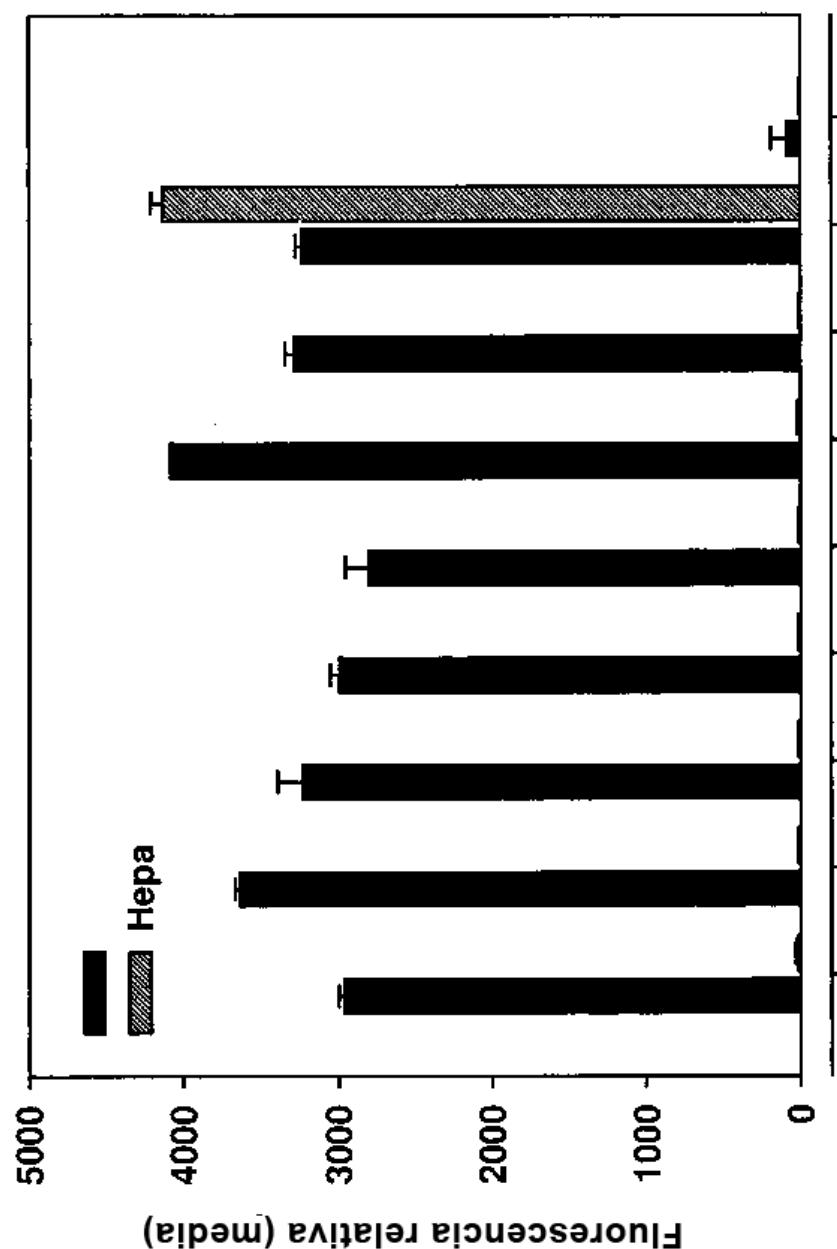
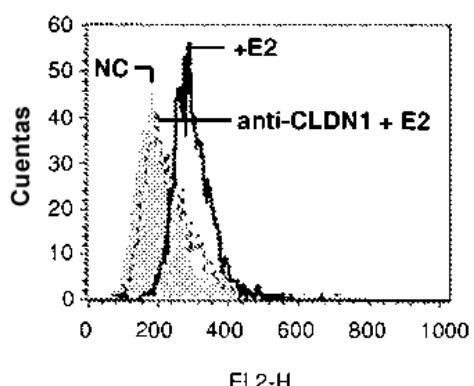
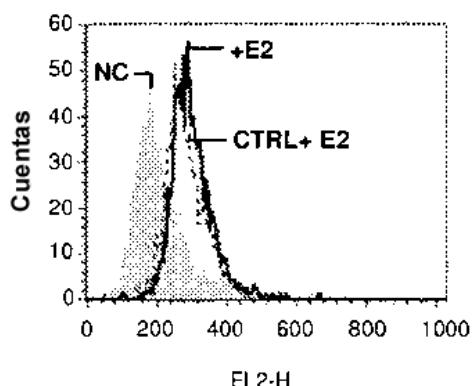
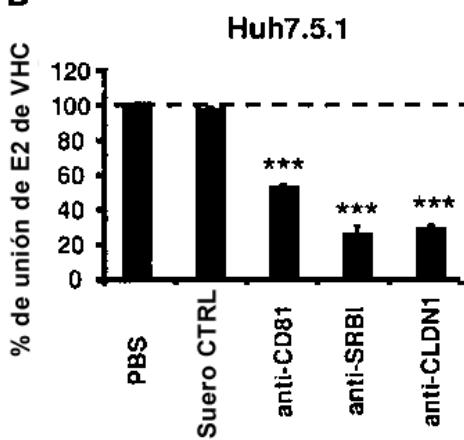
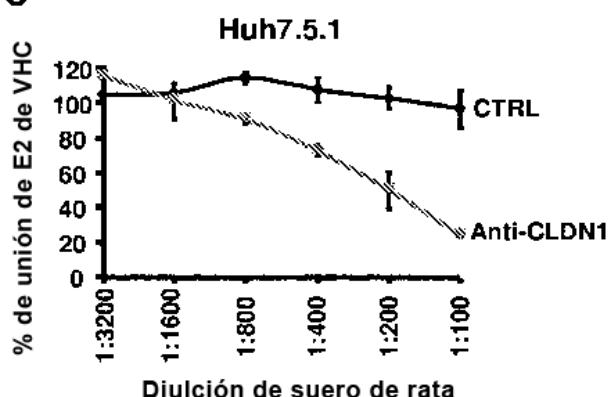
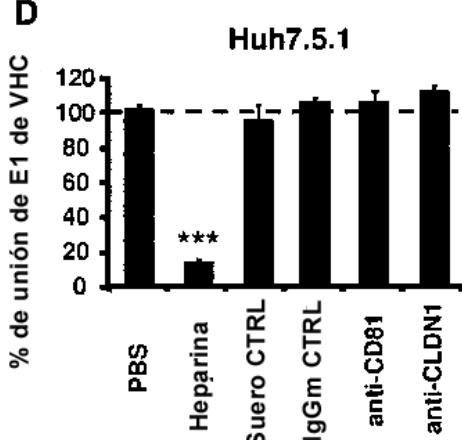
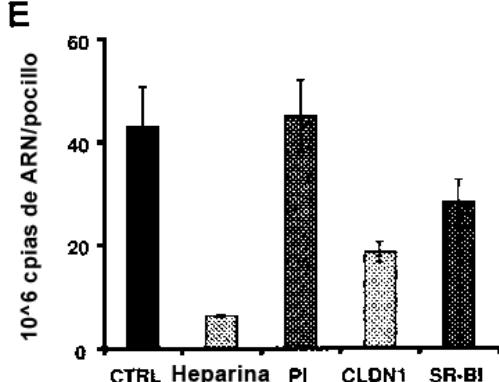
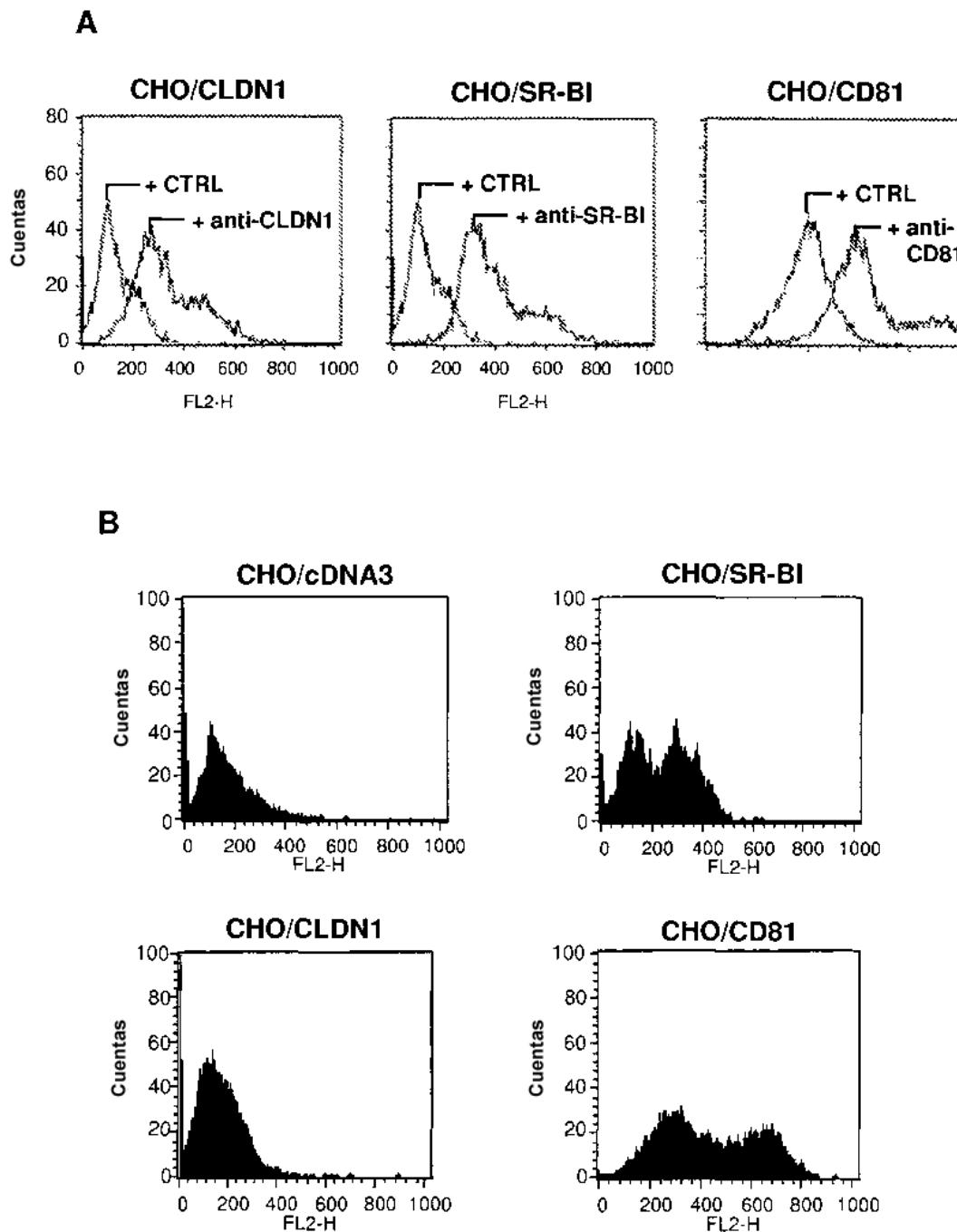


Figura 19

A**B****C****D****E****Figura 20**

**Figura 21**

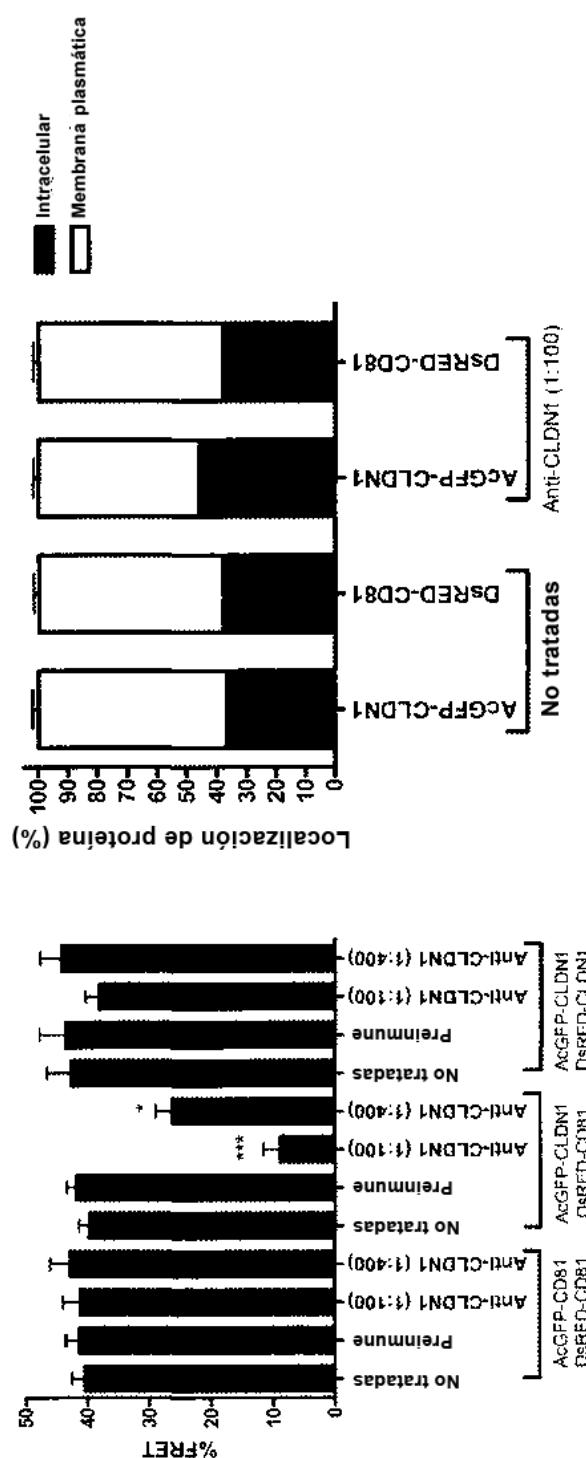
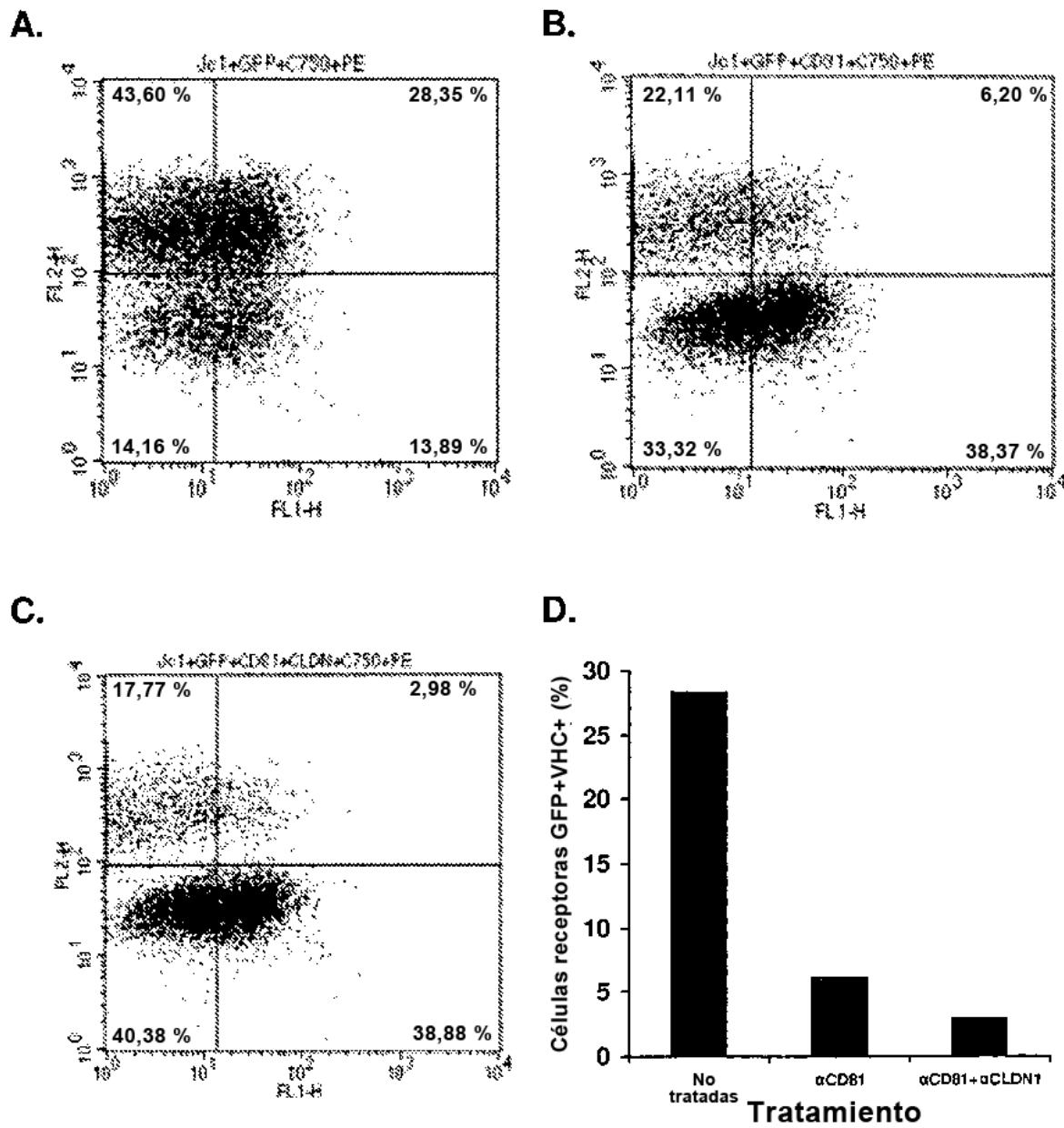


Figura 22

**Figura 23**

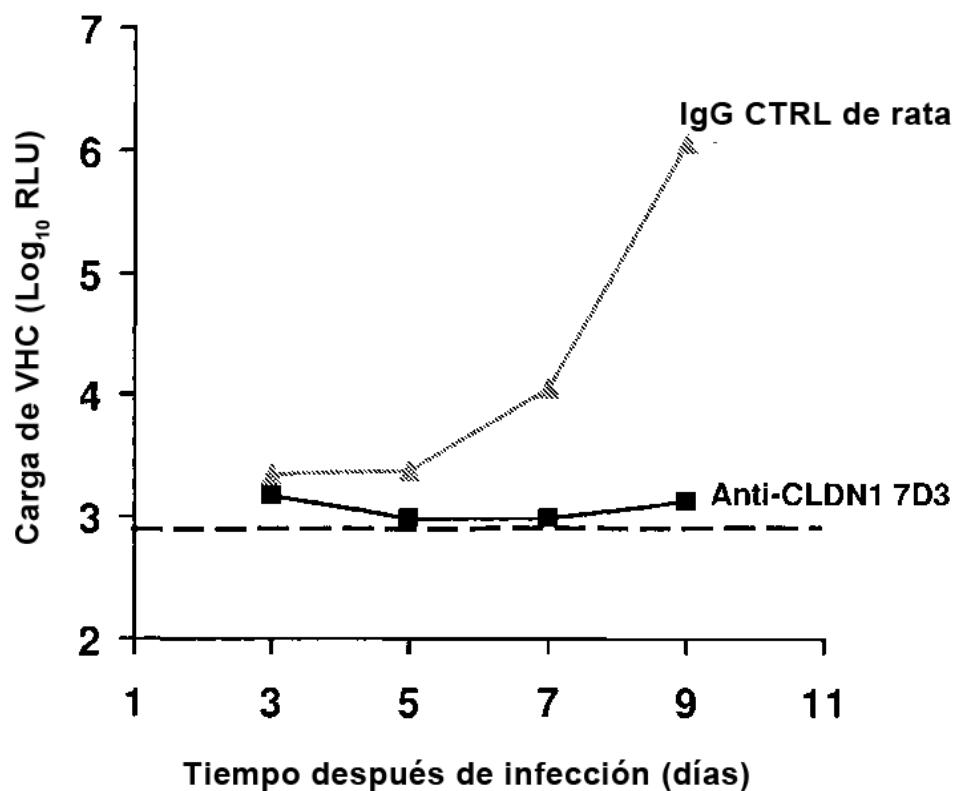


Figura 24