

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 469 743**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2007** **E 07783895 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014** **EP 2152307**

54 Título: **Inhibición de la metástasis tumoral por anticuerpos anti neuropilina 2**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2014

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:

WU, YAN;
LIANG, WEI-CHING;
WATTS, RYAN, JEFFERSON y
BAGRI, ANIL, DURGADAS

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 469 743 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

Inhibición de la metástasis tumoral por anticuerpos anti neuropilina 2.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a antagonistas de neuropilina 2 (Nrp2), especialmente anticuerpos anti Nrp2, y su uso en la prevención y tratamiento de metástasis tumoral.

10 **Antecedentes de la invención**

Se ha establecido bien ahora que la angiogénesis está implicada en la patogénesis de diversos trastornos. Estos incluyen tumores sólidos y metástasis, aterosclerosis, fibroplasia retrolental, hemangiomas, inflamación crónica, enfermedades neovasculares intraoculares tales como retinopatías proliferativas, por ejemplo, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), glaucoma neovascular, rechazo inmunitario de tejido corneal trasplantado y otros tejidos, artritis reumatoide y psoriasis. Folkman *et al.*, J. Biol. Chem., 267: 10931-10934 (1992); Klagsbrun *et al.*, Annu. Rev. Physiol. 53: 217-239 (1991); y Garner A., "Vascular diseases", En: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2ª Edición (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710.

En el caso del crecimiento tumoral, la angiogénesis parece ser crucial para la transición de hiperplasia a neoplasia, y para proporcionar alimento para el crecimiento o metástasis del tumor. Folkman *et al.*, Nature 339: 58 (1989). La neovascularización permite que las células tumorales adquieran una ventaja de crecimiento y autonomía proliferativa en comparación con las células normales. Un tumor habitualmente comienza como una única célula aberrante que puede proliferar solamente hasta un tamaño de unos pocos milímetros cúbicos debido a la distancia de los lechos capilares disponibles, y puede permanecer "durmiente" sin crecimiento adicional y diseminación durante un periodo de tiempo largo. Algunas células tumorales cambian después al fenotipo angiogénico para activar células endoteliales que proliferan y maduran a nuevos vasos sanguíneos capilares. Estos vasos sanguíneos de nueva formación no solamente permiten el crecimiento continuado del tumor primario, sino también la diseminación y recolonización de células tumorales metastásicas. En consecuencia, se ha observado una correlación entre la densidad de microvasos en secciones tumorales y la supervivencia del paciente en cáncer de mama así como en varios otros tumores. Weidner *et al.*, N. Engl. J. Med 324: 1-6 (1991); Horak *et al.*, Lancet 340: 1120-1124 (1992); Macchiarini *et al.*, Lancet 340: 145-146 (1992). Los mecanismos precisos que controlan el cambio angiogénico no se entienden bien, pero se cree que la neovascularización de la masa tumoral resulta del equilibrio neto de una multitud de estimuladores e inhibidores de la angiogénesis (Folkman Nat Med 1(1): 27-31 (1995)).

Se acepta actualmente que las metástasis son responsables de la amplia mayoría, estimado en el 90 %, de las muertes de tumores sólidos (Gupta y Massague, Cell 127, 679-695 (2006)). El complejo proceso de metástasis implica una serie de etapas distintas que incluyen la separación de células tumorales del tumor primario, intravasación de células tumorales en vasos linfáticos o sanguíneos, y extravasación y crecimiento de células tumorales en sitios secundarios. El análisis de ganglios linfáticos regionales en muchos tipos tumorales sugiere que la vasculatura linfática es una vía importante para la diseminación de cánceres humanos. Además, en casi todos los carcinomas, la presencia de células tumorales en ganglios linfáticos es el factor de pronóstico adverso más importante. Aunque se ha pensado previamente que dichas metástasis implicaban exclusivamente el paso de células malignas a lo largo de vasos linfáticos preexistentes cerca de los tumores, estudios experimentales e informes clínico patológicos recientes (revisados en Achen *et al.*, Br J Cancer 94 (2006), 1355-1360 y Nathanson, Cancer 98, 413-423 (2003)) sugieren que la linfangiogénesis puede inducirse por tumores sólidos y pueden promover la propagación tumoral. Estos y otros estudios recientes sugieren que la dirección a vasos linfáticos y linfangiogénesis puede ser una estrategia terapéutica útil para restringir el desarrollo de metástasis de cáncer, lo que tendría un beneficio significativo para muchos pacientes.

VEGFC, un miembro de la familia del factor de células endoteliales vasculares (VEGF), es uno de los mediadores mejor estudiados del desarrollo linfático. Se ha mostrado que la sobreexpresión de VEGFC en células tumorales promueve la linfangiogénesis asociada a tumor, dando como resultado metástasis potenciada a ganglios linfáticos regionales (Karpanen *et al.*, Faseb J 20, 1462-1472 (2001); Mandriota *et al.*, EMBOJ 20, 672-682 (2001); Skobe *et al.*, Nat Med 7, 192-198 (2001); Stacker *et al.*, Nat Rev Cancer 2, 573-583 (2002); Stacker *et al.*, Faseb J 16, 922-934 (2002)). La expresión de VEGFC también se ha correlacionado con linfangiogénesis asociada a tumor y metástasis de ganglios linfáticos para varios cánceres humanos (revisado en Achen *et al.*, 2006. mencionado anteriormente). Además, se ha mostrado que el bloqueo de la señalización mediada por VEGFC suprime la linfangiogénesis tumoral y la metástasis de ganglios linfáticos en ratones (Chen *et al.*, Cancer Res 65, 9004-9011 (2005); He *et al.*, J. Natl Cancer Inst 94, 8190825 (2002); Krishnan *et al.*, Cancer Res 63, 713-722 (2003); Lin *et al.*, Cancer Res 65, 6901-6909 (2005)).

Se sabe que el VEGFC se une con al menos dos familias de receptores de superficie celular, los receptores tirosina quinasa de VEGF y los receptores neuropilina (Nrp).

De los tres receptores de VEGF, VEGFC puede unirse con VEGFR2 y VEGFR3 lo que conduce a dimerización del

receptor (Shinkai *et al.*, J Biol Chem 273, 31283-31288 (1998)), activación de quinasa y autofosforilación (Heldin, Cell 80, 213-223 (1995); Waltenberger *et al.*, J Biol Chem 269, 26988-26995 (1994)). El receptor fosforilado induce la activación de múltiples sustratos lo que conduce a angiogénesis y linfangiogénesis (Ferrara *et al.*, Nat Med 9, 669-676 (2003)).

La familia de la neuropilina (Nrp) comprende dos proteínas homólogas, neuropilina 1 (Nrp1) y neuropilina 2 (Nrp2). Además de los receptores de VEGF, VEGFC también se une con Nrp2, que se identificó inicialmente como receptor de semaforina de clase 3 y mediador de la orientación de axones (Favier *et al.*, Blood 108, 1243-1250 (2006); Soker *et al.*, J Cell Biochem 85, 357-368 (2002)). Múltiples líneas de pruebas implican a Nrp2 en el desarrollo de los sistemas vascular y linfático. Los mutantes de Nrp2 homocigotos muestran una grave reducción de vasos linfáticos pequeños y capilares de forma prenatal (Yuan *et al.*, Development 129, 4797-4806 (2002)). Además, el defecto vascular letal embrionario y drástico visto en ratones mutantes para Nrp1 homocigotos se potencia por la pérdida de la función de Nrp2 lo que conduce a letalidad más temprana (Takashima *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 99, 3657-3662 (2002)). Sin embargo, el papel de Nrp2 en la modulación de la biología vascular y linfática del adulto, y más específicamente la metástasis se desconoce.

Las Nrp tienen dominios intracelulares cortos que no se conoce que tengan ninguna actividad enzimática o de señalización. Se ha propuesto que las Nrp actúan para potenciar la señalización de VEGFR potenciando la unión del receptor de VEGF-ligando (Favier *et al.*, 2006, mencionado anteriormente; Soker *et al.*, 2002, mencionado anteriormente). Adicionalmente, se ha mostrado que sema3F, el ligando de semaforina de Nrp2, modula el comportamiento celular endotelial *in vitro* e *in vivo* (Bielenberg *et al.*, J Clin Invest 114, 1260-1271(2004); Favier *et al.*, Blood 1243-1250, (2006)). Sin embargo, informes recientes han sugerido una posibilidad alternativa de que las Nrp puedan actuar de forma independiente de los receptores de VEGF o la función de semaforina para modular la migración de células endoteliales (EC) (Murga *et al.*, Blood 105, 1992-1999 (2005); Pan *et al.*, Cancer Cell 11, 53-67 (2007); Wang *et al.*, J Biol Chem 278, 48848-48860 (2003)).

Los anticuerpos neutralizadores anti VEGF suprimen el crecimiento de diversas líneas celulares tumorales humanas en ratones desnudos (Kim *et al.*, Nature 362: 841-844 (1993); Warren *et al.*, J. Clin. Invest. 95: 1789-1797 (1995); Borgström *et al.*, Cancer Res. 56: 4032-4039 (1996); Melnyk *et al.*, Cancer Res. 56: 921-924 (1996)) y también inhiben la angiogénesis intraocular en modelos de trastornos retinales isquémicos. Adamis *et al.*, Arch. Ophthalmol. 114: 66-71 (1996). Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales anti VEGF u otros inhibidores de la acción de VEGF son candidatos prometedores para el tratamiento de tumores y diversos trastornos neovasculares intraoculares. Dichos anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento EP 817.648 publicado el 14 de enero de 1998; y en los documentos WO98/45331 y WO98/45332, ambos publicados el 15 de octubre de 1998. Uno de los anticuerpos anti VEGF, bevacizumab, se ha aprobado por la FDA para su uso en combinación con un régimen de quimioterapia para tratar el cáncer colorrectal metastásico (CRC) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Se está investigando bevacizumab en muchos ensayos clínicos en curso para tratar diversas indicaciones de cáncer.

También se conocen otros anticuerpos anti VEGF y anticuerpos anti Nrp1 y se describen, por ejemplo, en Liang *et al.*, J Mol Biol 366, 815-829 (2007); Pan *et al.*, Cancer Cell 11, 53-67 (2007); y Liang *et al.*, J Biol Chem 281, 951-961 (2006)).

El documento US 2003/113324 se refiere a la identificación de moduladores de la unión de ligando VEGF-C o VEGF-D con la proteína transmembrana del sistema nervioso neuropilina 2.

El documento WO 99/29858 se refiere a ADNc que codifica una proteína de neuropilina soluble (sNP) que se aísla de células productoras de neuropilina (NP) o se obtiene por ingeniería genética de forma recombinante a partir de ADN que codifica NP.

El documento WO 99/29729 se refiere a antagonistas de la función del receptor de neuropilina y uso de los mismos en el tratamiento de cáncer, particularmente cáncer metastásico, y enfermedades angiogénicas.

Sumario de la invención

La presente invención se basa, al menos en parte, en resultados experimentales obtenidos con un anticuerpo de bloqueo de función de alta afinidad para Nrp2. Los resultados obtenidos con este anticuerpo indican que Nrp2 desempeña un papel en la modulación de la migración de células endoteliales linfáticas (LEC), y que su función se extiende más allá de su papel previamente asignado como un potenciador de la activación del receptor de VEGF. Además, los resultados demuestran que el bloqueo de Nrp2 conduce a una inhibición de la linfangiogénesis y una reducción drástica de la metástasis de ganglios linfáticos y órganos distantes.

En un aspecto como se define en las reivindicaciones la invención se refiere a medios para inhibir la migración de células endoteliales linfáticas, administrando a un sujeto mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista de neuropilina 2 (Nrp2).

En otro aspecto como se define en las reivindicaciones la invención se refiere a medios para inhibir la linfangiogénesis tumoral, administrando a un sujeto mamífero portador de tumor una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista de neuropilina 2 (Nrp2).

En otro aspecto más como se define en las reivindicaciones la invención se refiere a medios para inhibir la metástasis tumoral, administrando a un sujeto mamífero portador de tumor una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista de neuropilina 2 (Nrp2).

En todas las realizaciones, el sujeto mamífero preferentemente es un paciente humano, tal como un paciente de cáncer humano, al que se le puede haber diagnosticado o puede estar en riesgo de desarrollar metástasis.

En una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia.

En otra realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, linfoma de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de tricoleucitos; y leucemia mieloblástica crónica.

En otra realización más, el linfoma de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en linfoma no de Hodgkin folicular/de grado bajo (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL folicular/de grado intermedio; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de grado alto; NHL linfoblástico de grado alto; NHL de células no escindidas pequeño de grado alto; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom.

El antagonista de Nrp2 es un anticuerpo anti Nrp2B seleccionado de los anticuerpos YW68.4.2, YW68.4.2.36, y fragmentos de los mismos como se define en las reivindicaciones.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo que comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en YW68.4.2, YW68.4.2.36 como se define en las reivindicaciones.

La invención se refiere además a una composición que comprende un anticuerpo de la invención en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de metástasis tumoral que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista de Nrp2B de la invención en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otros aspectos como se define en las reivindicaciones, la invención se refiere a anticuerpos antagonistas de Nrp2 para su uso en la prevención o tratamiento de metástasis tumoral.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Caracterización de mAb Anti Nrp2^B. **(A)** Representación esquemática de regiones de unión a VEGF y Sema en Nrp2 en relación con regiones epitópicas Anti Nrp2^B. **(B)** Ensayo de ELISA que demuestra unión de Anti Nrp2^B con ECD de hNrp2 (cuadrados rellenos) y dominios B1-B2 de hNrp2 (círculos rellenos), pero no ECD de hNrpl (cuadrados abiertos) o los dominios A1-A2 de hNrp2 (círculos abiertos). **(C)** Bloqueo de la unión de VEGFC con Nrp2 por Anti Nrp2^B. Se preincubaron cantidades crecientes de mAb con placas recubiertas con Nrp2 ECD humano (5 µg/ml) durante 1-2 horas, seguido de la adición de VEGFC humano biotinilado prevalorado (1 nM) durante 15 minutos. El porcentaje de VEGFC unido se detectó por conjugados de estreptavidina-HRP. **(D)** Bloqueo de la unión de VEGF₁₆₅ con Nrp2 por Anti Nrp2^B. **(E)** Bloqueo de la unión de Sema3F con LEC. Las LEC se incubaron con medio acondicionado que contenía Sema3F fusionado con fosfatasa alcalina (AP) (REF), en presencia o ausencia de Anti Nrp2^B. La actividad AP derivada de Sema3F-AP unido se detectó de forma colorimétrica con los mismos tiempos de desarrollo. No se observó unión con AP (panel izquierdo). El Anti Nrp2^B no bloqueó la unión de Sema3F con LEC (paneles medios). Se usó Nrp2 ECD como un control positivo para bloquear la unión (panel derecho). Barra de escala. **Figura 2.** El Anti Nrp2^B reduce la función inducida por VEGFC *in vitro* e *in vivo*. **(A)** Imágenes representativas de LEC teñidas que migran en respuesta a 200 ng/ml de VEGFC durante 18 horas en presencia o ausencia de Anti Nrp2^B (50 µg/ml) o VEGFR3 ECD (50 µg/ml). **(B)** Cuantificación de la migración de LEC en respuesta a 200 ng/ml de VEGFC (n=6 para cada condición). **(C)** Cuantificación de la migración de LEC en respuesta a VEGF₁₆₅ 10 ng/ml en presencia o ausencia de Anti Nrp2^B (50 µg/ml) o VEGFR3 ECD (50 µg/ml). N=6 para cada condición. **(D)** Cuantificación de los recuentos de píxeles de un ensayo de microbolillo corneal descrito en (E). *p<0,05 **(E)** Imágenes representativas de córnea teñida con LYVE-1, que ilustra los efectos de la colocación intracorneal de microgránulos de 150 ng de VEGFC (P) y tratamiento sistémico con Anti Nrp2^B (10 mg/kg dos veces por semana) o VEGFR3 ECD (25 mg/kg dos veces por semana). La tinción con LYVE-1 se ha pseudocoloreado de rojo para facilitar la visualización. *p<0,05; las barras de Error representan el error típico de la media. **Figura 3.** El tratamiento con Nrp2^B da como resultado una reducción en la activación del receptor de VEGF e inhibe la formación

del complejo Nrp2/receptor de VEGF. (A) Análisis de FACS de los niveles de Nrp2, VEGFR2 y VEGFR3 en la superficie de LEC después del tratamiento con anticuerpo de control (10 µg/ml; línea verde) o Anti Nrp2^B (10 µg/ml) durante 5 minutos (línea azul) o 20 horas (línea roja). (B) Cuantificación de la migración de LEC en respuesta a HGF 20 ng/ml en presencia o ausencia de Anti Nrp2^B (50 µg/ml) o VEGFR3 ECD (50 µg/ml). N=6 para cada condición. (C) Nivel de fosforilación de VEGFR2 en LEC detectado por ensayo de ELISA usando anticuerpos que reconocen VEGFR2 total o fosforilado con tirosina. Se añadió VEGFC (concentración según se indica) durante 10 minutos en presencia o ausencia de Anti Nrp2^B (10 µg/ml) o VEGFR3 ECD (10 µg/ml) para inducir la fosforilación de VEGFR2, n=3 para cada condición. El nivel de fosforilación de VEGFR2 en células tratadas con anti Nrp2^B (10 µg/ml) fue significativamente diferente de la estimulación con VEGFC a 200 ng/ml y queda uniformemente entre el nivel de fosforilación inducido por 175 ng/ml y 150 ng/ml de VEGFC. (D) Cuantificación de la migración de LEC en respuesta a VEGFC (concentración como se indica) en presencia o ausencia de Anti Nrp2^B (10 µg/ml) o VEGFR3 ECD (10 µg/ml). Se observaron reducciones significativas en la migración a 50 ng/ml de VEGFC o cuando se bloqueó con VEGFR3 ECD. *p<0,05; las barras de Error representan el error típico de la media. Cada experimento se repitió un mínimo de tres veces. (E) **CO-IP Figura 4.** Se expresa Nrp2 en los vasos linfáticos de ratones portadores de tumores. (A-D) tinción con LYVE-1 (columna izquierda – rojo) que marca vasos linfáticos, tinción con Nrp2 (columna media - verde) y la superposición en el (A) intestino y (B) ganglio linfático de ratones adultos normales. La señal de Nrp2 no se colocaliza con vasos linfáticos marcados con LYVE-1 en ninguno de los órganos. Están presentes células inflamatorias con tinción de Nrp2 poco común dentro del núcleo fibroestromal de las vellosidades intestinales y dentro de los centros germinales de ganglios linfáticos. (C) En ganglios linfáticos de animales portadores de tumores, la señal de Nrp2 sí se colocaliza con vasos linfáticos positivos para LYVE-1 que revisten los senos de LN. También están presentes células inflamatorias con tinción de Nrp2 adicionales. (D) También se ve tinción de Nrp2 fuerte en vasos linfáticos dentro de tumores 66c14. También puede verse tinción débil en células tumorales. Los controles teñidos solo de forma secundaria no mostraron ninguna señal. Las áreas encuadradas se muestran a alto aumento dentro de los insertos. Barra de escala *** para A-C y ** para D. **Figura 5.** El tratamiento con Anti Nrp2^B da como resultado una reducción de la metástasis pulmonar en el modelo de tumor 66c14. (A) Gráfica del volumen tumoral medio del estudio de modelo de tumor 66c14 analizada posteriormente. Se dosificó a los animales dos veces por semana i.p. con Anti Nrp2^B 10 mg/kg o anticuerpo de control una vez que los tumores alcanzaron un tamaño medio de 100 mm³ y se les dosificó durante todo el estudio. (B) Cuantificación por inspección visual del número de nódulos metastásicos por pulmón en animales tratados con control y Anti Nrp2^B. (C) Imágenes representativas de pulmones de animales tratados con control (izquierda) y Anti Nrp2^B (derecha). Los pulmones se inflaron antes de la fijación por perfusión ventricular cardiaca derecha. Los nódulos se destacan en blanco para facilitar su visualización. (D, E) representación tridimensional de pulmones con exploración de micro CT representativos que demuestran nódulos metastásicos (rojo) en animales tratados con control (D) y Anti Nrp2^B (E). Las posiciones de la sección longitudinal (inserto superior) y la sección transversal (inserto inferior) se indican por las líneas de puntos negra y roja respectivamente. Este análisis confirma que la mayoría de los nódulos está en la superficie de los pulmones. (F) Cuantificación del número de nódulos metastásicos por pulmón por análisis de Micro CT de los pulmones. (G) Análisis de FACS de los niveles de Nrp2 en la superficie de células tumorales 66c14 cultivadas *in vitro*. (H) Tinción con H y E de un nódulo pulmonar que demuestra células tumorales metastásicas. Las barras de error representan el error típico de la media. Barra de escala *** para C y ** para H. **Figura 6.** El tratamiento con Anti Nrp2^B da como resultado una reducción de la metástasis pulmonar en el modelo de tumor C6. (A) Gráfica del volumen tumoral medio del estudio de modelo de tumor C6 analizado posteriormente. Se dosificó a los animales dos veces por semana i.p. con Anti Nrp2^B (10 mg/kg), VEGFR3 ECD (25 mg/kg) o anticuerpo de control (10 mg/kg) una vez que los tumores alcanzaron un tamaño medio de 100 mm³ y se les dosificó durante todo el estudio. (B) Cuantificación por inspección visual del número de nódulos metastásicos por pulmón en animales tratados con control, VEGFR3 ECD y Anti Nrp2^B. (C) Imágenes representativas de pulmones de animales tratados con control (izquierda), VEGFR3 ECD (media) y Anti Nrp2^B (derecho). Los pulmones se inflaron antes de la fijación por perfusión ventricular cardiaca derecha. Los nódulos se destacan en blanco para facilitar la visualización. (D) Representaciones tridimensionales de pulmones explorados mediante micro CT representativos que demuestran nódulos metastásicos (rojo) en animales tratados con control (izquierda) y Anti Nrp2^B (derecha). Las posiciones de la sección longitudinal (inserto superior) y la sección transversal (inserto inferior) se indican por las líneas de puntos negra y roja respectivamente. Este análisis confirma que la mayoría de los nódulos está en la superficie de pulmones. (E) Análisis de FACS de los niveles de Nrp2 en la superficie de células tumorales 66c14 cultivadas *in vitro*. (F) Tinción con H y E de un nódulo pulmonar que demuestra células tumorales metastásicas. Las barras de error representan el error típico de la media. Barra de escala *** para C y ** para F. **Figura 7.** El tratamiento con Anti Nrp2^B da como resultado una reducción de los vasos linfáticos tumorales. (A, B) Cuantificación de la densidad de vasos vasculares (A) como se detecta por IHC de PECAM-1 y densidad de los vasos linfáticos (B) como se detecta por 1H-IC de LYVE-1 en tumores 66c14 tratados con anticuerpo de control o Anti Nrp2^B. La densidad de los vasos se determinó a partir de 6 imágenes representativas de cada uno de 6 tumores por grupo, se evaluó con respecto a número de píxeles medio por ImageJ. (C) Imágenes representativas de vasos teñidos con PECAM-1 (fila superior) y vasos linfáticos teñidos con LYVE-1 (filas media e inferior) en tumores C6 tratados con anticuerpo de control (columna izquierda), VEGFR3 ECD (columna media) o Anti Nrp2^B (columna derecha). Las áreas encuadradas representadas en la fila media se presentan en la fila inferior a mayor aumento. La cuantificación de la densidad de vasos vasculares (gráfica superior) y linfáticos (gráfica inferior) está a la derecha de estas imágenes. (D) Tumores teñidos con LYVE-1 de animales tratados con Anti Nrp2^B (paneles inferiores) recogidos el día 4 (Recogida 1) y el día 11 (recogida 2) demuestran alteración de los vasos linfáticos en comparación con animales tratados con control (paneles superiores). Las fechas de la recogida en relación con las curvas de crecimiento se muestran a la izquierda. Las barras de error representan el error típico de la media. Barra de escala ***. **Figura 8.** El tratamiento

con Anti Nrp2^B da como resultado una reducción de los vasos linfáticos tumorales funcionales y conduce a un retardo en la metástasis al ganglio linfático primario. **(A, B)** Se ven microperlas fluorescentes de poliestireno (verdes) exclusivamente en vasos linfáticos marcados con IHC de LYVE-1 (rojo) después de linfangiografía intradérmica. El área encuadrada en A se muestra a mayor aumento en B. **(C-D)** El tratamiento con Anti Nrp2^B da como resultado una reducción de azul de Evans dentro de tumores C6 (C) (P=0,035) y 66c14 (D) (P=0,005), lo que indica una reducción en los vasos linfáticos funcionales dentro de esos tumores tratados. (E) porcentaje de animales con SLN que contienen células tumorales C6 que expresan β -gal en diversos puntos temporales después de la implantación tumoral en los oídos de ratones de control (negro) y tratados con Anti Nrp2^B (rojo). El tratamiento con Anti Nrp2^B da como resultado un retardo de la llegada de células al SLN (p=,006). N=7 animales por condición de tratamiento por punto temporal. **Figura 9.** Expresión de Nrp2 en diferentes tumores malignos humanos. **(A-F)** Datos de micromatrices de Affymetrix HG-U 133A y B GeneChip[®] para la expresión de Nrp2 en colon normal y adenocarcinoma colorrectal (A), tejidos de cabeza y cuello normales y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (B), páncreas normal y adenocarcinoma pancreático (C), piel normal y melanoma maligno (D), tiroides normal y carcinoma tiroideo papilar (E) y mama normal y adenocarcinoma ductal de infiltración de Her2 (F). Cada punto de datos representa un paciente. **Figura 10.** Secuencias de aminoácidos de fragmentos Fab del anticuerpo anti Nrp2^B YW68.4.2 y YW68.4.2.36. **Figura 11.** Secuencia de aminoácidos del fragmento Fab del anticuerpo anti Nrp2^A YW 126.20 **Figura 12.** Alineamiento de secuencia de dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti Nrp^A YW 126.20 con la secuencia de la humana. **Figura 13.** Alineamiento de la secuencia de dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti Nrp2^A YW126.20 con la secuencia humana III (hum III).

Figura complementaria 1. Análisis de FACS de los niveles de los receptores del eje de VEGF en la superficie de LEC cultivadas *in vitro*. Análisis de FACS de Nrp1, Nrp2, VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3 en LEC cultivadas.

Figura complementaria 2. El anti Nrp2^B no bloquea la migración inducida por VEGF₁₆₅. **(A-B)** Cuantificación de la migración de HUVEC (A) y LEC (B) en respuesta a 200 ng/ml de VEGF durante 18 horas en presencia o ausencia de Anti Nrp1^B, Anti Nrp2^B (50 μ g/ml) o ambos anticuerpos (50 μ g/ml). *p<0,05; las barras de Error representan el error típico de la media.

Figura complementaria 3. Efectos del Anti Nrp2^B en la proliferación mediada por VEGFC y la permeabilidad vascular y señalización intracelular asociada. **(A)** Cuantificación de la proliferación de LEC inducida por VEGFC 200 ng/ml en presencia o ausencia de Anti Nrp2^B (50 μ g/ml) o VEGFR3 ECD (50 μ g/ml) como se determina por la incorporación de BrdU (n=6 por condición). **(B)** Ensayo de permeabilidad vascular de piel de ratón. Se tomaron imágenes de la piel del mismo animal. La mancha azul representa filtración de azul de Evans de la vasculatura en respuesta a suministro intradérmico de VEGFC después del tratamiento sistémico con Anti Nrp2^B (10 mg/kg) o VEGFR3 ECD (25 mg/kg). **(C)** Cuantificación del colorante azul de Evans extraído de muestras de piel en el ensayo de permeabilidad. Los valores mostrados son la media de 6 experimentos independientes. *p<0.05; las barras de Error representan el error típico de la media.

Figura complementaria 4. El Anti Nrp2^B no bloquea el colapso del cono de crecimiento inducido por Sema3F. **(A)** Imágenes de conos de crecimiento del Hipocampo E 17.5 teñidos con faloidina conjugada con rodamina. Los conos de crecimiento de control muestran grandes estructuras ricas en actina en la punta de cada axón, que se reducen con el tratamiento de Sema3F. El Anti Nrp2^B (50 μ g/ml) no bloquea este colapso. Por el contrario, el Nrp2 ECD (10 μ g/ml) sí bloquea este colapso. **(B)** Control de calidad para inmunohistoquímica anti Nrp2. La imagen muestra un clon derivado de fago que reconoció Nrp2 que actúa en IHC en secciones congeladas nuevas. La expresión de la proteína Nrp2 es similar a la expresión de Nrp2 como se ve usando hibridación *in situ* (Chen *et al.*, Neuron 19, 547-559 (1997)). Este anticuerpo se usó posteriormente para IHC en secciones de tumor congeladas nuevas. (Barra de escala para imágenes principales = ** μ m y para imágenes insertas = ** μ m).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los términos “Neuropilina”, “NRP” o “Nrp” se usan de forma intercambiable y se refieren de forma colectiva a neuropilina 1 (NRP1, Nrp1), neuropilina 2 (NRP2, Nrp2) y sus isoformas y variantes, como se describe en Rossignol *et al.* (2000) Genomics 70: 211-222. Las neuropilinas son receptores no de tirosina quinasa de 120 a 130 kDa. Hay múltiples variantes de corte y empalme e isoformas solubles de NRP-1 y NRP-2. La estructura básica de las neuropilinas comprende cinco dominios: tres dominios extracelulares (a1a2, b1b2 y c), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. El dominio a1a2 es homólogo de los componentes del complemento C1r y C1s (CUB), que generalmente contienen cuatro restos de cisteína que forman dos enlace disulfuro. El dominio b1b2 es homólogo de los factores de coagulación V y VIII. La parte central del dominio C se designa como MAM debido a su homología con las proteínas meprina, A5 y tirosina fosfatasa receptora μ . Los dominios a1a2 y b2b2 son responsables de la unión al ligando, mientras que el dominio c es crítico para la homodimerización o heterodimerización. Gu *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277: 18069-76; He y Tessier-Lavigne (1997) Cell 90: 739-51.

La “actividad biológica mediada por neuropilina” se refiere en general a los acontecimientos fisiológicos o patológicos en los que la neuropilina 1 y/o neuropilina 2 desempeña un papel sustancial. Son ejemplos no limitantes de dichas actividades la orientación de los axones durante el desarrollo del sistema nervioso embrionario o regeneración

neuronal, angiogénesis (incluyendo modelación vascular), tumorogénesis y metástasis tumoral.

La “actividad biológica mediada por neuropilina 2” o “actividad biológica mediada por Nrp2”, como se usa en el presente documento, se refiere en general a acontecimientos fisiológicos o patológicos en los que la Nrp2 desempeña un papel sustancial, tales como, por ejemplo, potenciación de la activación del receptor de VEGF y, en particular, la capacidad para modular la migración de células endoteliales linfáticas (EC), papel en linfangiogénesis de adultos, especialmente linfangiogénesis tumoral y metástasis tumoral.

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y específicamente abarca anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad biológica deseada.

La expresión “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador “monoclonal” indica que el anticuerpo se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256: 495, o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352: 624-628 y Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica de u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico a u homólogo de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; y Morrison *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de región marco conservada (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, normalmente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332: 323-329; y Presta (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-596.

Un “anticuerpo dependiente de especie” es uno que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero de la que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie “se une específicamente” con un antígeno humano (es decir tiene un valor de afinidad de unión (K_d) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} M y más preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M) pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es de al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 500 veces o al menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos que se han definido anteriormente, pero preferentemente es un anticuerpo humanizado o humano.

Como se usa en el presente documento, “mutante de anticuerpo” o “variante de anticuerpo” se refiere a una variante de secuencia de aminoácidos del anticuerpo dependiente de especie en la que uno o más de los restos de aminoácidos del anticuerpo dependiente de especie se han modificado. Dichos mutantes tienen necesariamente menos del 100 % de identidad o similitud de secuencia con el anticuerpo dependiente de especie. En una realización

preferida, el mutante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo dependiente de especie, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, y más preferentemente al menos 95 %. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir el mismo resto) o similares (es decir restos de aminoácidos del mismo grupo basándose en propiedades de cadena lateral comunes, véase posteriormente) con los restos de anticuerpo dependientes de especie, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Se interpretará que ninguna de las extensiones, 5 deleciones o inserciones N terminales, C terminales o internas en la secuencia de anticuerpo fuera del dominio variable afecta a la identidad o similitud de secuencia.

Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso del anticuerpo como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta su homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Como se usa en el presente documento, “dominio variable de anticuerpo” se refiere a las partes de las cadenas ligeras y pesadas de las moléculas de anticuerpo que incluyen secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementariedad (CDR); es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) y Regiones Marco conservadas (FR). V_H se refiere al dominio variable de la cadena pesada. V_L se refiere al dominio variable de la cadena ligera. De acuerdo con los métodos usados en la presente invención, las posiciones de aminoácidos asignadas a CDR y FR pueden definirse de acuerdo con Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991)). La numeración de aminoácidos de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno también es de acuerdo con la de Kabat.

Como se usa en el presente documento, la expresión “Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR; es decir CDR1, CDR2 y CDR3) se refieren a los restos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo cuya presencia es necesaria para la unión a antígeno. Cada dominio variable normalmente tiene tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de complementariedad puede comprender restos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” como se define por Kabat (es decir aproximadamente los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un “bucle hipervariable” (es decir aproximadamente los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-10 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J Mol. Biol. 196: 901-917). En algunos casos, una región determinante de complementariedad puede incluir aminoácidos tanto de una región CDR definida de acuerdo con Kabat como un bucle hipervariable. Por ejemplo, la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo 4D5 incluye los aminoácidos 26 a 35.

Las “regiones marco conservadas” (en lo sucesivo en el presente documento FR) son los restos de dominio variable distintos de los restos de CDR. Cada dominio variable normalmente tiene cuatro FR identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si las CDR se definen de acuerdo con Kabat, los restos de FR de cadena ligera se sitúan aproximadamente en los restos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3) y 98-107 (LCFR4) y los restos de FR de cadena pesada se sitúan aproximadamente en los restos 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) y 103-113 (HCFR4) en los restos de cadena pesada. Si las CDR comprenden restos de aminoácidos de bucles hipervariables, los restos de FR de cadena ligera se sitúan aproximadamente en los restos 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) y 97-107 (LCFR4) en la cadena ligera y los restos de FR de cadena pesada se sitúan aproximadamente en los restos 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) y 102-113 (HCFR4) en los restos de cadena pesada. En algunos casos, cuando la CDR comprende aminoácidos tanto de una CDR como se define por Kabat como los de un bucle hipervariable, los restos de FR se ajustarán en consecuencia. Por ejemplo, cuando la CDRH1 incluye los aminoácidos H26-H35, los restos de FR1 de cadena pesada están en las posiciones 1-25 y los restos de FR2 están en las posiciones 36-49.

Como se usa en el presente documento, “conjunto de codones” se refiere a un conjunto de diferentes secuencias de tripletes de nucleótidos usadas para codificar aminoácidos variantes deseados. Puede sintetizarse un conjunto de oligonucleótidos, por ejemplo, por síntesis de fase sólida, incluyendo secuencias que representan todas las combinaciones posibles de tripletes de nucleótidos proporcionados por el conjunto de codones y que codificarán el grupo deseado de aminoácidos. Una forma convencional de designación de codones es la del código IUB, que se conoce en la técnica y se describe en el presente documento. Un conjunto de codones normalmente se representa

por 3 letras mayúsculas en cursiva, por ejemplo, *NNK*, *NNS*, *XYZ*, *DVK* y similares. Un “conjunto de codones no aleatorios”, como se usa en el presente documento, se refiere por lo tanto a un conjunto de codones que codifica aminoácidos seleccionados que cumplen parcialmente, preferentemente completamente, los criterios para la selección de aminoácidos como se describen en el presente documento. La síntesis de oligonucleótidos con “degeneración” de nucleótidos seleccionados en ciertas posiciones se conoce bien en la técnica, por ejemplo, el enfoque de TRIM (Knappck *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* 296: 57-86); Garrard y Henner (1993) *Gene* 128: 103). Dichos conjuntos de oligonucleótidos que tienen ciertos conjuntos de codones pueden sintetizarse usando sintetizadores de ácido nucleico comerciales (disponibles de, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA) o pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tienen un conjunto de codones particular normalmente incluirá una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, las diferencias establecidas por el conjunto de codones dentro de la secuencia general. Los oligonucleótidos, como se usan de acuerdo con la invención, tienen secuencias que permiten la hibridación con un molde de ácido nucleico de dominio variable y también pueden, pero no es necesario, incluir sitios de enzimas de restricción útiles para, por ejemplo, fines de clonación.

Un fragmento “Fv” es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión de antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de ligera en asociación estrecha, que puede ser de naturaleza covalente, por ejemplo, en scFv. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDR o un subconjunto de las mismas confieren especificidad de unión a antígeno del anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse con el antígeno, aunque habitualmente a una menor afinidad que el sitio de unión completo.

El fragmento “Fab” contiene un dominio variable y constante de la cadena ligera y un dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ comprenden un par de fragmentos Fab que generalmente están unidos de forma covalente cerca de sus extremos carboxilo terminal por cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen en la técnica otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo “Fv monocatenario” o “scFv” comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica individual. Generalmente el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L, que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H y V_L). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448.

La expresión “anticuerpos lineales” se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.* (1995 *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos.

Como se usa en el presente documento, “biblioteca” se refiere a una pluralidad de secuencias de anticuerpo o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, polipéptidos de la invención), o los ácidos nucleicos que codifican estas secuencias, siendo las secuencias diferentes en la combinación de aminoácidos variantes que se introducen en estas secuencias de acuerdo con los métodos de la invención.

“Presentación de fagos” es una técnica por la que se presentan polipéptidos variantes como proteínas de fusión al menos a una parte de la proteína de cubierta en la superficie del fago, por ejemplo, fago filamentoso, partículas. Una utilidad de la presentación de fagos está en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes proteicas seleccionadas de forma aleatoria pueden separarse rápida y eficazmente en las secuencias que se unen con un antígeno diana con alta afinidad. La presentación de bibliotecas de péptidos y proteínas en fagos se ha usado para explorar millones de polipéptidos con respecto a los que tienen propiedades de unión específicas. Se han usado métodos de presentación de fagos polivalentes para presentar péptidos aleatorios pequeños y proteínas pequeñas mediante fusiones con el gen III o gen VIII del fago filamentoso. Wells y Lowman (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 355-362, y referencias citadas en la misma. En una presentación de fagos monovalentes, se fusiona una biblioteca de proteínas o péptidos con un gen III o una parte del mismo, y se expresa a niveles bajos en presencia de proteína del gen III de tipo silvestre de modo que las partículas de fago presenten una copia o ninguna de las proteínas de fusión. Los efectos de avididad se reducen en relación con el fago polivalente de modo que la selección se basa en la afinidad de ligando intrínseca, y se usan vectores fagémidos, que simplifican las manipulaciones de ADN. Lowman y

Wells (1991) Methods: A companion to Methods in Enzymology 3: 205-0216.

Un “fagémido” es un vector plasmídico que tiene un origen bacteriano de replicación, por ejemplo, ColE1, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémido puede usarse en cualquier bacteriófago conocido, incluyendo bacteriófago filamentosos y bacteriófago lambda. El plásmido generalmente también contendrá un marcador seleccionable para resistencia a antibióticos. Los segmentos de ADN clonados en estos vectores pueden propagarse como plásmidos. Cuando las células que albergan estos vectores se proporcionan con todos los genes necesarios para la producción de partículas de fago, el modo de replicación del plásmido cambia a replicación en círculo rodante para generar copias de una cadena del ADN plasmídico y partículas de fago empaquetadas. El fagémido puede formar partículas de fago infecciosas o no infecciosas. Este término incluye fagémidos que contienen un gen de proteína de recubrimiento de fago o fragmento del mismo unido con un gen de polipéptido heterólogo como un gen de fusión de modo que el polipéptido heterólogo se presenta en la superficie de la partícula de fago.

La expresión “vector de fago” significa una forma replicativa bicatenaria de un bacteriófago que contiene un gen heterólogo y capaz de replicarse. El vector de fago tiene un origen de replicación de fago que permite la replicación de fago y la formación de partículas de fago. El fago es preferentemente un bacteriófago filamentosos, tal como un fago M 13, f1, fd, Pf3 o un derivado del mismo, o un fago lambda, tal como lambda, 21, fi80, fi81, 82, 424, 434, etc., o un derivado de los mismos.

Como se usa en el presente documento, “posición accesible al disolvente” se refiere a una posición de un resto de aminoácido en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo fuente o fragmento de unión a antígeno que se determina, basándose en su estructura, conjunto de estructuras y/o estructura modelada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, que está potencialmente disponible para acceso al disolvente y/o contacto con una molécula, tal como un antígeno específico de anticuerpo. Estas posiciones normalmente se encuentran en las CDR y en el exterior de la proteína. Las partes accesibles al disolvente de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, como se definen en el presente documento, pueden determinarse usando cualquiera de varios algoritmos conocidos en la técnica. Preferentemente, las posiciones accesibles al disolvente se determinan usando coordenadas de un modelo tridimensional de un anticuerpo, preferentemente usando un programa informático tal como el programa InsightII (Accelrys, San Diego, CA). También pueden determinarse posiciones accesibles al disolvente usando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Lee y Richards (1971) J. Mol. Biol. 55, 379 y Connolly (1983) J. Appl. Cryst. 16, 548). La determinación de posiciones accesibles al disolvente puede realizarse usando software adecuado para modelación de proteínas e información estructural tridimensional obtenida de un anticuerpo. El software que puede utilizarse para estos fines incluye software de Módulo de Biopolímeros SYBYL (Tripos Associates). Generalmente y preferentemente, cuando un algoritmo (programa) requiere un parámetro de tamaño introducido por el usuario, el “tamaño” de una sonda que se usa en el cálculo se ajusta a un radio de aproximadamente 1,4 Angstrom o menor. Además, la determinación de las regiones accesibles al disolvente y métodos de área usando software para ordenadores personales se ha descrito por Pacios (1994) Comput. Chem. 18(4): 377-386.

Un “factor o agente angiogénico” es un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de vasos sanguíneos, por ejemplo, promueve la angiogénesis, el crecimiento de células endoteliales, la estabilidad de los vasos sanguíneos y/o la vasculogénesis, etc. Por ejemplo, los factores angiogénicos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, VEGF y miembros de la familia de la VEGF, PlGF, familia de PDGF, familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), ligandos de TIE (Angiopoyetinas), efrinas, Del-1, factores de crecimiento de fibroblastos: ácido (aFGF) y básico (bFGF), Folistatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)/factor de dispersión (SF), Interleucina-8 (IL-8), Leptina, Midkina, neuropilinas, factor de crecimiento Placentario, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de Plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento derivado de Plaquetas, especialmente PDGF-BB o PDGFR-beta, Pleiotropina (PTN), Progranulina, Proliferina, factor de crecimiento Transformante alfa (TGF-alfa), factor de crecimiento Transformante beta (TGF-beta), factor de necrosis Tumoral alfa (TNF-alfa), etc. También incluiría factores que aceleran la curación de heridas, tales como hormona del crecimiento, factor de crecimiento de tipo insulina I (IGF-I), VIGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), CTGF y miembros de su familia, y TGF alfa y TGF-beta. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53: 217-39; Streit y Detmar (2003) Oncogene 22: 3172-3179; Ferrara y Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12): 1359-1364; Tonini *et al.* (2003) Oncogene 22: 6549-6556 (por ejemplo, la Tabla 1 que enumera factores angiogénicos conocidos); y Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8: 200-206.

Un “agente antiangiogénesis” o “inhibidor de la angiogénesis” se refiere a una sustancia de bajo peso molecular, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhiben la angiogénesis, vasculogénesis o permeabilidad vascular indeseable, directa o indirectamente. Debería entenderse que el agente antiangiogénesis incluye los agentes que se unen con y bloquean la actividad angiogénica del factor de crecimiento o su receptor. Por ejemplo, un agente antiangiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista de un agente angiogénico como se ha definido anteriormente, por ejemplo, anticuerpos para VEGF-A o para el receptor de VEGF-A (por ejemplo, receptor KDR o receptor Flt-1), inhibidores anti PDGFR tales como Gleevec[™] (Mesilato de Imatinib). Los agentes antiangiogénesis también incluyen inhibidores de angiogénesis nativos, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53: 217-39; Streit y Detmar (2003) Oncogene 22: 3172-3179 (por ejemplo, la

Tabla 3 que enumera la terapia de antiangiogénica en melanoma maligno); Ferrara y Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364; Tonini *et al.* (2003) *Oncogene* 22: 6549-6556 (por ejemplo, la Tabla 2 que enumera factores antiangiogénicos conocidos); y Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8: 200-206 (por ejemplo, la Tabla 1 que enumera agentes antiangiogénicos usados en ensayos clínicos).

El término “VEGF” o “VEGF-A” como se usa en el presente documento se refiere al factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humanas de 165 aminoácidos y factores de crecimiento de células endoteliales vasculares humanas de 121, 189 y 206 aminoácidos relacionados, como se describe en Leung *et al.* (1989) *Science* 246: 1306, y Houck *et al.* (1991) *Mol. Endocrin.* 5: 1806, junto con las formas alélicas y procesadas de origen natural de los mismos. El término “VEGF” también se refiere a VEGF de especies no humanas tales como ratón, rata o primate. En ocasiones el VEGF de una especie específica se indica por términos tales como hVEGF para VEGF humano, mVEGF para VEGF murino, etc. El término “VEGF” también se usa para hacer referencia a formas truncadas del polipéptido que comprende los aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humanas de 165 aminoácidos. La referencia a cualquiera de dichas formas de VEGF puede identificarse en la presente solicitud, por ejemplo, por “VEGF (8-109)”, “VEGF (1-109)” o “VEGF₁₆₅”. Las posiciones de aminoácidos para un VEGF nativo “truncado” se enumeran como se indica en la secuencia de VEGF nativa. Por ejemplo, la posición de aminoácido 17 (metionina) en el VEGF nativo truncado también es la posición 17 (metionina) en el VEGF nativo. El VEGF nativo truncado tiene afinidad de unión por los receptores KDR y Flt-1 comparable al VEGF nativo.

Un “anticuerpo anti VEGF” es un anticuerpo que se une con VEGF con suficiente afinidad y especificidad. Preferentemente, el anticuerpo anti VEGF de la invención puede usarse como un agente terapéutico en la dirección e interferencia con enfermedades o afecciones en las que está implicada la actividad de VEGF. Un anticuerpo anti VEGF habitualmente no se unirá con otros homólogos de VEGF tales como VEGF-B o VEGF-C, ni otros factores de crecimiento tales como PlGF, PDGF o bFGF. Un anticuerpo anti VEGF preferido es un anticuerpo monoclonal que se une con el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti VEGF A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709. Más preferentemente, el anticuerpo VEGF es un anticuerpo monoclonal anti VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57: 4593-4599, incluyendo pero sin limitación un anticuerpo conocido como bevacizumab (BV; Avastin[™]).

El anticuerpo anti VEGF “Bevacizumab (BV)”, también conocido como “rhMAb VEGF” o “Avastin[®]”, es un anticuerpo monoclonal anti VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57: 4593-4599. Comprende regiones marco conservadas de IgG1 humano mutadas y regiones determinantes de complementariedad de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal murino anti hVEGF A.4.6.1 que bloquea la unión de VEGF humano con sus receptores. Aproximadamente el 93 % de la secuencia de aminoácidos de Bevacizumab, incluyendo la mayor parte de sus regiones marco conservadas, deriva de IgG1 humano, y aproximadamente el 7 % de la secuencia deriva del anticuerpo murino A4.6.1. Bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149.000 dalton y está glucosilado.

Los términos “VEGFC” y “VEGF-C” se usan de forma intercambiable, y se refieren a un polipéptido humano de 419 aminoácidos (SwissProt: VEGFC_HUMAN P49767), y ortólogos de mamífero no humano de los mismos, descritos por primera vez por Joukov *et al.*, *EMBO J* 15, 290-98 (1996), y *EMBO J* 15, 1751 (1996).

La expresión “antagonista de Nrp2” se usa en el presente documento para hacer referencia a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con la capacidad de Nrp2 para modular la migración de células endoteliales linfáticas (EC), o linfangiogénesis del adulto, especialmente linfangiogénesis tumoral y metástasis tumoral.

Un “antagonista de VEGF” se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con actividades de VEGF incluyendo, pero sin limitación, su unión con uno o más receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen, sin limitación, anticuerpos anti VEGF y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente con VEGF secuestrando de este modo su unión con uno o más receptores, anticuerpos anti receptor de VEGF y antagonistas del receptor de VEGF tales como moléculas pequeñas inhibidoras de las tirosina quinasas VEGFR. La expresión “antagonista de VEGF”, como se usa en el presente documento, incluye específicamente moléculas, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, otros polipéptidos de unión, péptidos y moléculas pequeñas no peptídicas, que se unen con neuropilina 1 y/o neuropilina 2 (Nrp1 y/o Nrp2) y son capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos anti Nrp1 y anti Nrp2 y anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con Nrp1 y Nrp2, siempre que sean capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF. Por lo tanto, la expresión “actividades de VEGF” incluye específicamente actividades biológicas mediadas por neuropilina (como se ha definido anteriormente en el presente documento) de VEGF.

Un “antagonista de semaforina” se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de semaforina incluyendo, pero sin limitación, su unión con uno o más receptores de semaforina. Los antagonistas de semaforina incluyen, sin limitación, anticuerpos anti semaforina y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente con semaforina

secuestrando de este modo su unión con uno o más receptores, anticuerpos anti receptor de semaforina y antagonistas del receptor de semaforina tales como moléculas pequeñas inhibitoras de semaforinas. La expresión “antagonista de semaforina”, como se usa en el presente documento, incluye específicamente moléculas, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, otros polipéptidos de unión, péptidos y moléculas pequeñas no peptídicas, que se unen con neuropilina 1 y/o neuropilina 2 (Nrp1 y/o Nrp29) y son capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de semaforina incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos anti Nrp1 y anti Nrp2 y anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con Nrp1 y Nrp2, siempre que sean capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de semaforina. Por lo tanto, la expresión “actividades de semaforina” incluye específicamente actividades biológicas mediadas por neuropilina (como se ha definido anteriormente en el presente documento) de semaforinas de clase 3. Dichas actividades biológicas incluyen, por ejemplo, efecto inhibidor del crecimiento de neuritas durante el desarrollo del sistema nervioso embrionario y regeneración neuronal.

“Tratamiento” se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como en los que va a prevenirse el trastorno.

Un “trastorno” es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento. Por ejemplo, los mamíferos que padecen o necesitan profilaxis contra angiogénesis anómala (angiogénesis excesiva, inapropiada o descontrolada) o permeabilidad vascular. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos para tratar en el presente documento incluyen tumores malignos y benignos; tumores malignos linfoides y no leucemias; y, en particular, metástasis tumoral (cáncer).

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracterizan normalmente por crecimiento celular desregulado. Los ejemplos de cáncer incluyen pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o del estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer del hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no de Hodgkin (NHL) de grado bajo/folicular; NHL linfocítico pequeño (SL); NHL folicular/de grado intermedio; NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de grado alto; NHL linfoblástico de grado alto; NHL de células no escindidas pequeño de grado alto; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de tricoleucitos; y leucemia mieloblástica crónica.

La expresión “composición antineoplásica” se refiere a una composición útil en el tratamiento de cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, “agente antineoplásico”. Los ejemplos de agentes terapéuticos (agentes antineoplásicos) incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en radioterapia, agentes antiangiogénesis, agentes apoptóticos, agentes anti tubulina y otros agentes para tratar el cáncer, tales como anticuerpos anti HER-2, anticuerpos anti CD20, un antagonista del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa), inhibidor de HER1/EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva[™])), inhibidores del factor de crecimiento derivados de plaquetas (por ejemplo, Gleevec[™] (Mesilato de Imatinib)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizadores) que se unen con una o más de las siguientes dianas ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o receptor o receptores de VEGF, TRAIL/Apo2, y otros agentes químicos orgánicos y bioactivos, etc. También se incluyen combinaciones de los mismos en la invención.

La expresión “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. Se pretende que la expresión incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰ y Re¹⁸⁶), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocina, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenetiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas del nitrógeno tales como clorambucilo, clomafacina, colofosfamida,

estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gammall y caliqueamicina omega1 (véase, por ejemplo, Agnew (1994) Chem Intl. Ed. Engl. 33: 183-186); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; y esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino doxorrubicina, cianomorfolino doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziacuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio, hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbacin; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaciuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbacin; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol- Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.), formulación de nanopartículas obtenidas por ingeniería de albúmina, sin Cremophor de paclitaxel ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (Camptosar, CPT-11) (incluyendo el régimen de tratamiento de irinotecán con 5-FU y leucovorina); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; leucovorina (LV); oxaliplatino, incluyendo el régimen de tratamiento de oxaliplatino (FOLFOX); inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™)) y VEGF-A que reducen la proliferación celular y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas en tumores tales como antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON; inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolide y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; Vinorelbina y Esperamicinas (véase Patente de Estados Unidos Nº 4.675.187), y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

El término "profármaco" como se usa en la presente solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para células tumorales en comparación con el fármaco parental y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman (1986) "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions. 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast y Stella *et al.* (1985). "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.* (ed.), pp. 247-267, Humana Press. Los profármacos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados por aminoácido D, profármacos glucosilados, profármacos que contienen β-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Se define en el presente documento que una “molécula pequeña” tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Dalton.

- 5 Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está habitualmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico de anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta de la forma o situación en la que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen por lo tanto de la molécula de ácido nucleico como existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una
- 10 molécula de ácido nucleico contenida en células que habitualmente expresan el anticuerpo en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de células naturales.

- La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión a ribosomas. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.
- 15

- El ácido nucleico está “unido operativamente” cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente con ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido, un promotor o potenciador está unido operativamente con una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operativamente con una secuencia codificante si se posiciona para facilitar la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que están unidas son
- 20 contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlace se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, los adaptadores de oligonucleótidos sintéticos o enlazadores se usan de acuerdo con la práctica convencional.
- 25

- Como se usa en el presente documento, las expresiones “célula” “línea celular” y “cultivo celular” se usan de forma intercambiable y todas estas designaciones incluyen descendencia. Por lo tanto, las palabras “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de ella independientemente del número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la descendencia mutante que tiene
- 30 la misma función o actividad biológica para la que explora en la célula transformada originalmente. Cuando se pretenden designaciones distintas, resultará evidente a partir del contexto.
- 35

Modos de llevar a cabo la invención

- 40 En un aspecto, la presente invención se basa en datos experimentales que demuestran que el bloqueo de la función de Nrp2 inhibe la metástasis tumoral.

- Un acontecimiento clave en el proceso multietapa de la metástasis implica la salida de una célula tumoral de la masa tumoral primaria. Para tumores sólidos, el sistema linfático con frecuencia proporciona una vía para las células que se separan. Se sabe que el VEGF es un modulador clave de la linfangiogénesis y la metástasis en muchos modelos tumorales, y la inhibición del eje de VEGF se considera una estrategia prometedora para inhibir el desarrollo de metástasis. Antes de la presente invención, no se ha considerado que Nrp2, un correceptor para VEGFC, sea una diana para inhibir la metástasis tumoral, posiblemente debido a la falta de defectos sistémicos linfáticos en ratones
- 45 mutantes para Nrp2 adultos.

- Los estudios que subyacen en la presente invención, que se presentan en los ejemplos posteriores, apoyan un papel importante de la Nrp2 en la linfangiogénesis y metástasis tumoral, solamente en parte por modulación de la señalización de VEGFR3. Adicionalmente, los datos expuestos en los ejemplos demuestran la presencia de vasos linfáticos funcionales dentro de tumores y muestran que el tratamiento con Anti Nrp2^B da como resultado una
- 50 reducción de estos vasos linfáticos funcionales.
- 55

Funciones del VEGFC selectivo regulado por Nrp2, en parte mediante un mecanismo independiente de la activación del receptor de VEGF

- La inducción de la migración y la proliferación celular son dos de las funciones celulares centrales del VEGFC descritas hasta la fecha (Joukov *et al.*, *Embo J* 16, 3898-3911 (1997)). Por lo tanto, el presente hallazgo de que el bloqueo de Nrp2 con Anti Nrp2^B bloqueó la migración pero no la proliferación de LEC (Figura 2, 3) fue sorprendente. Esta selectividad se ha indicado recientemente con experimentos de anulación de ARNip de Nrp2, pero se atribuyó a limitaciones técnicas experimentales (Favier *et al.*, *Blood* 108, 1243-1250 (2006)). Los datos presentados en el
- 60 presente documento muestran que también se observó selectividad funcional de Nrp2 *in vivo*, en la que el tratamiento con Anti Nrp2^B dio como resultado una reducción de linfangiogénesis conducida por VEGFC pero no permeabilidad vascular (Figura 2, 3). Estas observaciones sugieren que la inhibición con Anti Nrp2^B no actúa
- 65

simplemente alterando la señalización de VEGFC. Sin embargo, se ha determinado que el bloqueo de Nrp2 dio como resultado una reducción modesta de la fosforilación del receptor de VEGF (Figura 3) lo que apoya un mecanismo en el que uno de los papeles del Nrp2 es potenciar la función de receptores de VEGF. Esto planteó la posibilidad de que diferentes acontecimientos fisiológicos inducidos por VEGFC puedan requerir diferentes niveles de activación del receptor de VEGF. Por lo tanto, una reducción de la activación del receptor puede ser suficiente para afectar la migración, pero no la proliferación o la permeabilidad vascular.

Para ensayar esto, la respuesta a dosis de VEGFC de la fosforilación del receptor de VEGF se comparó con la respuesta a dosis de la migración de LEC (Figura 3). Las dosis de VEGFC que condujeron a un nivel de fosforilación de receptor equivalente al visto con el tratamiento con Anti Nrp2^B no redujeron o inhibieron la migración. Esto indicó que la reducción de la activación del receptor solamente no explicaba los efectos de bloqueo de la función de Anti Nrp2^B.

Por lo tanto, se investigaron otros mecanismos por los que el bloqueo de Nrp2 puede afectar selectivamente a la migración tal como modulación de la adhesión o movilidad. El tratamiento con Anti Nrp2^D no tuvo ningún efecto en la adhesión o migración mediada por LEC inducida por VEGF₁₆₅ (Figura 2), HGF (Figura 3) o FGF-2, lo que indica que en general no afectó a la migración alterando la movilidad. Adicionalmente, se ha propuesto que sema3F, otro ligando de Nrp2, puede modular la migración de LEC o EC, actuando como un quimiorrepelente (Bielenberg *et al.*, J Clin Invest 114, 1260-1271 (2004); Favier *et al.*, Blood 108, 1243-1250 (2006)). Sin embargo, el anticuerpo Anti Nrp2^B no inhibió ni potenció la unión de sema3F con Nrp2 (Figura 1) o los efectos funcionales de sema3F en neuronas sensibles (Figura Complementaria 4). Por lo tanto, es poco probable que la reducción de la migración inducida por VEGFC por Anti Nrp2^B pueda explicarse por modulación de la función de sema3F.

El efecto de Anti Nrp2^B en la formación del complejo de receptor de VEGF/Nrp2 también se ha evaluado. A diferencia de Nrp1, Nrp2 forma un complejo con VEGFR2 y VEGFR3 en ausencia del ligando (Favier *et al.*, 2006, mencionado anteriormente; Karpanen *et al.*, Faseb J 20, 1462-1472 (2006)). Resulta importante que Anti Nrp2^B inhibe fuertemente la formación de estos complejos. Esta observación, además del hecho de que Nrp2 es significativa para más que solamente el aumento de la función del receptor de VEGF, apoya un modelo en el que Nrp2 proporciona funcionalidad adicional para modular específicamente la migración, potencialmente transportar maquinaria adicional al complejo del receptor de VEGF.

Nrp2 desempeña un papel importante en la modulación de la linfangiogénesis del adulto

El análisis de ratones KO para Nrp2 demuestra que Nrp2 es un modulador de la linfangiogénesis del desarrollo, supuestamente mediante su papel como un co-receptor de VEGFC (Yuan *et al.*, 2002, mencionado anteriormente). Sin embargo, estos ratones mutantes forman vasos linfáticos funcionales después del nacimiento, lo que indica que el defecto representa un retardo en lugar de la inhibición del crecimiento linfático o que hay una compensación funcional por otro mediador molecular. Por lo tanto, el papel de Nrp2 en el mantenimiento de vasos linfáticos maduros y la modulación de linfangiogénesis del adulto no se ha conocido. El análisis de expresión (Figura 4) no apoya un papel de Nrp2 en el mantenimiento de los vasos linfáticos. Resulta interesante que Nrp2 se expresa fuertemente en los vasos linfáticos que están presentes en tumores y dentro de LN adyacentes a tumores, lo que sugiere que Nrp2 puede desempeñar un papel en vasos linfáticos activados o en crecimiento. Las observaciones *in vitro* demuestran que Anti Nrp2^B es una herramienta eficaz en la evaluación del papel de Nrp2 en estos procesos. Por lo tanto, el Anti Nrp2^B se ensayó *in vivo* usando el ensayo de microbolsillo corneal (Figura 2). El Anti Nrp2^B bloqueó eficazmente una linfangiogénesis inducida por VEGFC, de forma sorprendentemente equivalente a VEGFR3 ECD. Resulta interesante que el Anti Nrp2^B demostró función inhibitoria selectiva *in vivo* también, no afectando a la permeabilidad vascular inducida por VEGFC. Esto se corresponde con las observaciones *in vitro* de que Nrp2 modula específicamente la migración, un proceso importante para la linfangiogénesis, pero es poco probable que desempeñe un papel en la permeabilidad vascular. Finalmente, estos animales adultos normales tratados con Anti Nrp2^B no demostraron ningún cambio en los vasos linfáticos intestinales, lo que confirma que Nrp2 no desempeña un papel en el mantenimiento de vasos linfáticos maduros.

La inhibición de Nrp2 conduce a una reducción en los vasos linfáticos funcionales dentro del tumor y una reducción en la metástasis, probablemente inhibiendo que células tumorales dejen la masa tumoral principal mediante la vía linfática

La inhibición del eje de VEGFC, más frecuentemente mediante el uso de VEGFR3 ECD, es una de las estrategias más habitualmente utilizadas para reducir la metástasis (Chen *et al.*, 2005, mencionado anteriormente; He *et al.*, 2002, mencionado anteriormente; Krishnan *et al.*, 2003, mencionado anteriormente; Lin *et al.*, 2005, mencionado anteriormente). El VEGFC puede facilitar la metástasis potencialmente iniciando linfangiogénesis, aumentando de este modo el área superficial de células tumorales en contacto con LEC, modulando las propiedades adhesivas de las LEC o expresión de citocinas o aumentando la permeabilidad vascular (Alitalo y Carmeliet, Cancer Cell 1, 219-227 (2002)). Dado que el Anti Nrp2^B modula las funciones mediadas por VEGFC selectivas incluyendo inhibición de linfangiogénesis del adulto inducida por VEGFC, a continuación, se investigaron los efectos del bloqueo de Nrp2 en la metástasis. Para minimizar las variables de confusión y para evaluar sin ambigüedades el papel del Anti Nrp2^B en la metástasis, los inventores eligieron modelos en los que el bloqueo de Nrp2 no afecta al crecimiento tumoral primario y recogieron además todos los animales en el mismo punto temporal en el estudio (Withers y Lee, Semin

Radiat Oncol 16, 111-119 (2006)).

En modelos tumorales tanto 66c14 como C6, el tratamiento con Anti Nrp2^B dio como resultado una reducción significativa de los nódulos de pulmón metastásicos por inspección visual (Figura 5, 6). Esto se confirmó por la técnica de micro CT más sensible y cuantitativa (Li *et al.*, Technol Cancer Res Treat 5, 147-155 (2006)). La comparación de tratamientos con Anti Nrp2^B y VEGFR3 ECD no fue posible en tumores 66c14 debido a una reducción del tamaño tumoral primario con tratamiento con VEGFR3. Sin embargo, este análisis se realizó en tumores C6 ya que su crecimiento no se vio afectado por el tratamiento de VEGFR3 ECD. Como con el ensayo de microbolsillo corneal, el tratamiento con Anti Nrp2^B dio como resultado un bloqueo equivalente de metástasis en comparación con VEGFR3 ECD.

El análisis histológico del tumor primario indicó que no se estaba afectando principalmente a células tumorales. Por lo tanto, se evaluaron las dos vías metastásicas potenciales que estaban disponibles para células tumorales: vasos sanguíneos y vasos linfáticos (Figura 7). El tratamiento con Anti Nrp2^B no afectó a la estructura o densidad de los vasos sanguíneos. Basándose en los datos *in vivo* de microbolsillo corneal e *in vitro*, se planteó la hipótesis de que el bloqueo de Nrp2 daría como resultado una reducción de los vasos linfáticos tumorales. El tratamiento con Anti Nrp2^B redujo drásticamente la densidad de los vasos linfáticos, y, de nuevo, hasta un grado equivalente al del tratamiento con VEGFR3 ECD. Sin embargo, estos dos tratamientos sí difirieron en la morfología de los vasos linfáticos resultantes. El tratamiento con VEGFR3 ECD condujo a la formación de redes linfáticas dispersas revestidas por células linfáticas de apariencia poco sana. El tratamiento con Anti Nrp2^B, por otro lado, condujo al desarrollo de vasos cortos y bolsillos de células linfáticas de apariencia sana aisladas. Estas diferencias apoyan adicionalmente un modelo en el que Nrp2 no actúa simplemente para aumentar la activación del receptor de VEGFC, sino que también proporciona funcionalidad única para mediar en la biología de VEGFC. Estos resultados también demuestran que para los paradigmas experimentales ensayados, el Anti Nrp2^B actúa para inhibir la linfangiogénesis (Figura 7). Sin embargo, no puede descartarse que el Anti Nrp2^B también altere vasos linfáticos más establecidos dentro de tumores.

También se buscó determinar si los vasos linfáticos intratumorales eran funcionales y por lo tanto competentes para facilitar la metástasis. Se usó linfangiografía para identificar vasos linfáticos intratumorales funcionales poco comunes (Figura 8). La técnica usada no fue adecuadamente analítica para determinar la proporción de vasos linfáticos intratumorales que eran funcionales. Sin embargo, probablemente representen una fracción pequeña de la población linfática total (Padera *et al.*, Mol Imaging 1, 9-15 (2002)). Dado que era posible que se estuviera reduciendo la densidad linfática total sin afectar a los vasos funcionales (que pueden tener diferente sensibilidad a Anti Nrp2^B), se evaluaron los efectos de bloquear Nrp2 en la formación de vasos linfáticos funcionales. El Anti Nrp2^B redujo la formación de vasos funcionales, ligando de este modo de forma más directa los efectos en vasos linfáticos tumorales con la reducción observada en metástasis.

Finalmente, para confirmar la consecuencia de reducción de los vasos linfáticos funcionales, se evaluaron los efectos de Anti Nrp2^B en la metástasis al SLN. El SLN es el primer tejido que encuentra las células tumorales después de salir del tumor mediante los vasos linfáticos. Por lo tanto, representa una de las etapas más tempranas en metástasis de órganos distantes (Stracke y Liotta, In Vivo 6, 309-316 (1992)). Como se ha predicho, el tratamiento con Anti Nrp2^B dio como resultado un retardo del desarrollo de la micrometástasis del SLN, coherente con la idea de que estaban saliendo menos células de la masa tumoral primaria. Esto es coherente con las pruebas de que el VEGFC aumenta la metástasis induciendo hiperplasia linfática y suministro aumentado de células cancerosas a ganglios linfáticos (Hoshida *et al.*, Cancer Research 66, 8065-8075 (2006)). Por lo tanto, el peso de las pruebas apunta a un mecanismo por el que el bloqueo de Nrp2 conduce a una reducción de los vasos linfáticos tumorales funcionales, evitando de este modo que las células tumorales inicien el proceso metastásico saliendo de la masa tumoral primaria.

Nrp2 como una diana de metástasis.

Numerosos estudios clínico-patológicos han indicado que la expresión de VEGFC y VEGFR3 se correlaciona con metástasis de ganglios linfáticos y metástasis distal en varios cánceres humanos (revisado exhaustivamente en Stacker *et al.*, Nat Rev Cancer, 2002, mencionado anteriormente; Stacker *et al.*, Faseb J. 2002, mencionado anteriormente, y He *et al.*, 2004, mencionado anteriormente). Sin embargo, hay información limitada en relación con la expresión de Nrp2 y su relación con la metástasis. De hecho, solo se han hecho conexiones entre la expresión de Nrp2 y malignidad, particularmente en cáncer pancreático (Cohen *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 284, 395-403 (2001); Fukahi *et al.*, Clin Cancer Res 10, 581-590 (2004)) y cáncer del pulmón (Kawakami *et al.*, Cancer 95, 2196-2201 (2002); Lantuejoul *et al.*, J Pathol 200, 336-347(2003)). Se descubrió de forma similar que Nrp2 se expresaba a niveles mayores en comparación con sus tejidos de control respectivos, no solamente en adenocarcinoma pancreático sino también en colónico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, melanoma, carcinoma de tiroides papilar y adenocarcinoma ductal de infiltración de la mama (Figura 9). De forma más importante, cuando estos tumores se subdividieron en grupos metastásicos y no metastásicos, se observó que la expresión de Nrp2 era estadísticamente superior en el grupo metastásico en la mayoría de estos tipos tumorales. Resulta interesante que estos tipos tumorales tienen todos linfangiogénesis intratumoral confirmada que además se ha correlacionado con metástasis de los ganglios linfáticos (Achen *et al.*, 2006, mencionado anteriormente; Achen y Stacker, Int J Cancer 119, 1755-1760 (2006)). Esto indica que se espera que los hallazgos experimentales analizados se extiendan a pacientes humanos con diversos tipos tumorales.

En conclusión, los datos analizados en el presente documento y presentados en los Ejemplos posteriores muestran que Nrp2 desempeña un papel en la modulación de la migración celular conducida por VEGF y proporcionan pruebas de que Nrp2 puede actuar mediante múltiples mecanismos incluyendo la potenciación de la activación del receptor de VEGF y mecanismos independientes de la señalización del receptor de VEGF. Adicionalmente, el bloqueo de la función de Nrp2 usando Anti Nrp2^B da como resultado una reducción drástica de la linfangiogénesis inducida por VEGFC en ratones adultos. Este tratamiento también da como resultado una reducción de la metástasis, probablemente mediante una reducción del desarrollo de vasos linfáticos funcionales. Estos datos, junto con análisis de la expresión de Nrp2 en varios tumores humanos, sugieren que Nrp2 es una diana válida para modular la metástasis.

Producción de anticuerpos Anti Nrp2

La invención en el presente documento incluye la producción y uso de anticuerpos anti NRP2.

Los anticuerpos anti NRP2 se seleccionan usando un antígeno de NRP2 derivado de una especie de mamífero. Preferentemente el antígeno es NRP2 humana (hNRP2). Sin embargo, también pueden usarse como el antígeno diana la NRP2 de otras especies tales como NRP2 murina (mNRP2). Los antígenos de NRP2 de diversas especies de mamífero pueden aislarse de fuentes naturales. En otras realizaciones, el antígeno se produce de forma recombinante o se realiza usando otros métodos idénticos conocidos en la técnica.

El anticuerpo seleccionado normalmente tendrá una afinidad de unión suficientemente fuerte por el antígeno de NRP2. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse con hNRP2 con un valor de K_d de no más de aproximadamente 5 nM, preferentemente no más de aproximadamente 2 nM y más preferentemente no más de aproximadamente 500 pM. Las afinidades del anticuerpo pueden determinarse por un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (tal como el ensayo BIAcore como se describe en los Ejemplos); el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); y ensayos de competición (por ejemplo, RIA), por ejemplo.

Además, el anticuerpo puede someterse a otros ensayos de la actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como un producto terapéutico. Dichos ensayos se conocen en la técnica y dependen del antígeno diana y su uso pretendido para el anticuerpo. Los ejemplos incluyen el ensayo de inhibición de HUVEC (como se describe en los ejemplos posteriores); ensayos de inhibición del crecimiento de células tumorales (como se describe en el documento WO 89/06692, por ejemplo); ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) (Patente de Estados Unidos 5.500.362); y ensayos de actividad agonista o hematopoyesis (véase documento WO 95/27062).

Para explorar con respecto a anticuerpos que se unen con un epítipo particular en el antígeno de interés, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, puede realizarse mapeo de epítopos, por ejemplo como se describe en Champe *et al.* (1995) J. Biol. Chem. 270: 1388-1394, para determinar si el anticuerpo se une con un epítipo de interés.

Mutantes de anticuerpo Anti NRP2

Los anticuerpos anti NRP2 ejemplificados en el presente documento, que se generaron a partir de bibliotecas de fagos, pueden modificarse adicionalmente dentro del alcance de las reivindicaciones para generar mutantes de anticuerpo con propiedades físicas, químicas y/o biológicas mejoradas sobre el anticuerpo parental. Cuando el ensayo usado es un ensayo de actividad biológica, el mutante de anticuerpo preferentemente tiene una actividad biológica en el ensayo elegido que es al menos aproximadamente 10 veces mejor, preferentemente al menos aproximadamente 20 veces mejor, más preferentemente al menos aproximadamente 50 veces mejor, y en ocasiones al menos aproximadamente 100 veces o 200 veces mejor, que la actividad biológica del anticuerpo parental en ese ensayo.

Los anticuerpos anti Nrp2 de la invención pueden someterse a modificaciones, dentro del alcance definido en las reivindicaciones, dependiendo con frecuencia del uso pretendido del anticuerpo. Dichas modificaciones pueden implicar la alteración de la secuencia de aminoácidos, fusión con polipéptido o polipéptidos heterólogos y/o modificaciones covalentes tales como las elaboradas posteriormente. Con respecto a alteraciones de la secuencia de aminoácidos, posteriormente, se elaboran modificaciones a modo de ejemplo posteriormente. Por ejemplo, puede sustituirse también cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del mutante de anticuerpo, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento aberrante. Por el contrario, pueden añadirse enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv). Otro tipo de mutante de aminoácido tiene un patrón de glucosilación alterado. Esto puede conseguirse suprimiendo uno o más restos de carbohidratos hallados en el anticuerpo, y/o añadiendo uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación de anticuerpos es normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier

aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Modificaciones ilustrativas:

Normalmente se comenzaría con una sustitución conservativa tal como la mostrada posteriormente bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio de la actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión), entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ilustrativas" en la siguiente tabla, o como se describe adicionalmente posteriormente en referencia a las clases de aminoácidos, y se exploran los productos.

Sustituciones preferidas:

Resto original	Sustituciones ilustrativas	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Se consiguen aún más modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de los anticuerpos seleccionados sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrófobo: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr, asn, gln;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: his, lys, arg;

5 (5) restos que influyen en la orientación de cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

10 Las moléculas de ácido nucleico que codifican mutantes de secuencia de aminoácidos se preparan por diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de una versión mutante preparada anteriormente o una versión no mutante del anticuerpo parental. El método preferido para preparar mutantes es la mutagénesis dirigida (véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488).

Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

20 Los anticuerpos anti Nrp2 de la invención pueden producirse de forma recombinante, usando técnicas y materiales fácilmente obtenibles.

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti NRP2, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla o sintetiza fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con ADN que codifica las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes de vectores generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

30 (i) Componente de secuencia señal

El anticuerpo de la presente invención puede producirse de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína o el polipéptido maduro. Las secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal de anticuerpo nativo, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes de enterotoxina estable frente al calor II. Para secreción de levadura la secuencia señal nativa puede sustituirse por, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, el líder del factor α (incluyendo líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o líder de fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como líderes secretorios virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

45 El ADN para dicha región precursora está ligado en fase de lectura con el ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Componente de origen de replicación

Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicar en una o más células hospedadoras seleccionadas. Generalmente, en vectores de clonación esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del hospedador, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias se conocen bien para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas, el origen de plásmido 2 μ es adecuado para levadura, y diversos orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero (el origen de SV40 puede usarse normalmente solamente porque contiene el promotor temprano).

(iii) Componente del gen de selección

60 Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para Bacilos.

65 Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora.

Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia farmacológica y por lo tanto sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

- 5 Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico del anticuerpo, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.
- 10 Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identifican en primer lugar cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster Chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR.
- 15 Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican anticuerpo, proteína de DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucósido, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase Patente de Estados Unidos N° 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.* (1979) *Nature* 282: 39). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1. Jones (1977) *Genetics* 85: 12. La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona entonces un ambiente eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan por plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

- 30 Además, pueden usarse vectores derivados del plásmido circular de 1,6 μ m pKD1 para transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Como alternativa, se ha indicado un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*. Van den Berg (1990) *Bio/Technology* 8:135. También se han desvelado vectores de expresión de múltiples copias estables para la secreción de albúmina de suero humano recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 968-975.

(iv) Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y está unido operativamente con el ácido nucleico del anticuerpo. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor de *phoA*, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, alcalina fosfatasa, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S. D.) unida operativamente con el ADN que codifica el anticuerpo.

Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfo-fructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en expresión de levadura se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levadura también se usan provechosamente con promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpos de vectores en células hospedadoras de mamíferos se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del polio, virus de la viruela aviar, adenovirus,

(tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferentemente virus de Simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula hospedadora.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen viral de replicación de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Se desvela un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos usando el virus del papiloma bovino como un vector en la Patente de Estados Unidos Nº 4.419.446. Se describe una modificación de este sistema en la Patente de Estados Unidos Nº 4.601.978. Véase también Reyes *et al.* (1982) Nature 297: 598-601 sobre la expresión del ADNc de interferón β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de rous como el promotor.

(v) Componente de elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores se aumenta con frecuencia insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv (1982) Nature 297: 17-18 sobre la potenciación de elementos para la activación de promotores eucariotas. El potenciador también puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante de anticuerpo, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.

(vi) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, de hongo, de insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5' y ocasionalmente 3', de ADN eucariota o viral o ADNc. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de hormona del crecimiento bovina. Véase documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

(vii) Selección y transformación de células hospedadoras

Son células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como Bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Además de procariotas, son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes de anticuerpos microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadero común, es el más habitualmente usado entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, están disponibles habitualmente varios otros géneros, especies y cepas, y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*: *Trichoderma reesei* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo glucosilado derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovirales y variantes y células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están disponibles públicamente diversas cepas virales para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y dichos virus pueden usarse como el virus en el presente documento de acuerdo

con la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También pueden utilizarse como hospedadores cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

Sin embargo, el mayor interés ha sido en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.* (1977) J. Gen Virol. 36: 59); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster Chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216); células de sertoli de ratón (TM4, Mather (1980) Biol. Reprod. 23: 243-251); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de cercopiteco verde Africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather *et al.* (1982) Annals N. Y Acad Sci. 383: 44-68); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de las células hospedadoras

Las células hospedadoras usadas para producir el anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en diversos medios. Son adecuados para cultivar las células hospedadoras medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma). Además, puede usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.* (1979) Meth. Enz. 58: 44, Barnes *et al.* (1980) Anal. Biochem. 102: 255, Patentes de Estados Unidos Nº 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente de Estados Unidos Re. 30.985. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tal como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que se conocería por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y resultarán evidentes para el experto habitual en la materia.

(ix) Purificación de anticuerpos

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, en el espacio periplásmico o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los residuos de partículas, bien células hospedadoras o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.* (1992) Biol/Technology 10: 163-167 describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, las pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los residuos celulares pueden retirarse por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran en primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.* (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1-13). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (Guss *et al.* (1986) EMBOJ. 5: 1567-1575). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio poroso controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos de lo que puede conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. También están disponibles otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía de SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo para recuperar.

Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferentemente realizado a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, de aproximadamente 0 a 0,25 M de sal).

Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones terapéuticas del anticuerpo para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butil o bencil alcohol; alquil parabenos tales como metilo o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptido de bajo peso molecular (menor de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de proteína-Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente los que tengan actividades complementarias que no se afecten de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente inmunosupresor, un agente anticanceroso, un agente antiangiogénico, un agente antineoplásico, un agente citotóxico y/o un agente quimioterapéutico. Dichas moléculas estarán presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli(metilmetakrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de forma coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

La formulación para usar para administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril.

Pueden prepararse preparaciones de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietil-metakrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de Estados Unidos Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etilen-vinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando permanecen en el cuerpo anticuerpos encapsulados durante un tiempo largo, estos pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de su exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Puede idearse estrategias racionales para estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es una formación de enlaces S-S intermoleculares mediante intercambio de tio-disulfuro, puede conseguirse estabilización modificando los restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Usos terapéuticos

Se contempla que los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar un mamífero. En una realización, el anticuerpo se administra a un mamífero no humano para los fines de obtener datos preclínicos, por ejemplo. Los mamíferos no humanos a modo de ejemplo para tratar incluyen primates no humanos, perros, gatos, roedores y otros mamíferos en los que se realizan estudios preclínicos. Dichos mamíferos pueden ser modelos animales establecidos para una enfermedad para tratar con el anticuerpo o pueden usarse para estudiar la toxicidad del anticuerpo de interés. En cada una de estas realizaciones, pueden realizarse estudios de aumento de dosis en el mamífero. Cuando el anticuerpo es un anticuerpo anti NRP2, se puede administrar a un roedor hospedador en un

modelo de tumor sólido, por ejemplo.

Además, o como alternativa, el anticuerpo se usa para tratar a un ser humano, por ejemplo, un paciente que padece una enfermedad o trastorno que podría beneficiarse de la administración del anticuerpo.

La presente invención abarca la prevención y tratamiento de linfangiogénesis tumoral, la prevención y tratamiento de metástasis tumoral y terapia de cáncer antiangiogénica, una nueva estrategia de tratamiento del cáncer dirigida a inhibir el desarrollo de vasos sanguíneos tumorales requeridos para proporcionar nutrientes para apoyar el crecimiento tumoral. La invención incluye específicamente inhibir el crecimiento neoplásico de un tumor en el sitio primario así como prevenir y/o tratar la metástasis de tumores en los sitios secundarios, permitiendo de este modo atacar los tumores por otros productos terapéuticos. Los ejemplos de cáncer para tratar (incluyendo prevención) en el presente documento incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o del estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer tiroideo, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no de Hodgkin (NHL) de grado bajo/folicular; NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de grado alto; NHL linfoblástico de grado alto; NHL de células no escindidas pequeñas de grado alto; NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de tricoleucitos; y leucemia mieloblástica crónica. Más particularmente, los cánceres que son susceptibles de tratamiento por los anticuerpos de la invención incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma no de Hodgkin (NHL), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de tejido blando, sarcoma de kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer ovárico, mesotelioma y mieloma múltiple.

Se contempla que cuando se usan para tratar diversas enfermedades tales como tumores, los anticuerpos de la invención pueden combinarse con otros agentes terapéuticos adecuados para las mismas enfermedades o similares. Cuando se usan para tratar cáncer, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en combinación con terapias de cáncer convencionales, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia o combinaciones de las mismas.

En ciertos aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para terapia de cáncer de combinación con el anticuerpo de la invención incluyen otros agentes antiangiogénicos. Se han identificado muchos agentes antiangiogénicos y se conocen en la técnica, incluyendo los enumerados en Carmeliet y Jain (2000).

En un aspecto, el anticuerpo de la invención se usa en combinación con un antagonista de VEGF o un antagonista del receptor de VEGF tal como anticuerpos anti VEGF, variantes de VEGF, fragmentos del receptor de VEGF solubles, aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos neutralizadores anti VEGFR, inhibidores de tirosina quinasas de VEGFR y cualquier combinación de los mismos. Como alternativa, o además, pueden coadministrarse dos o más anticuerpos anti NRP 1 al paciente. En una realización más preferida, el anticuerpo anti NRP1^A o anti NRP^B de la invención se usa en combinación con un anticuerpo anti VEGF para generar efectos aditivos o sinérgicos. Los anticuerpos preferidos anti VEGF incluyen los que se unen con el mismo epítipo que el anticuerpo anti hVEGF A4.6.1. Más preferentemente, el anticuerpo anti VEGF es bevacizumab o ranibizumab.

En algunos otros aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para terapia de tumor de combinación con el anticuerpo de la invención incluyen antagonista de otros factores que están implicados en el crecimiento tumoral, tales como EGFR, ErbB2 (también conocido como Her2) ErbB3, ErbB4 o TNF. Preferentemente, el anticuerpo anti NRP1 de la invención puede usarse en combinación con moléculas pequeñas inhibidoras de receptor tirosina quinasa (RTKI) que se dirigen a uno o más receptores de tirosina quinasa tales como receptores de VEGF, receptores de FGF, receptores de EGF y receptores de PDGF. Se conocen en la técnica muchas moléculas pequeñas RTKI terapéuticas, incluyendo, pero sin limitación, vatalanib (PTK787), erlotinib (TARCEVA[®]), OSI-7904, ZD6474 (ZACTIMA[®]), ZD6126 (ANG453), ZD1839, sunitinib (SUTENT[®]), semaxanib (SU5416), AMG706, AG013736, Imatinib (GLEEVEC[®]), MLN-518, CEP-701, PKC-412, Lapatinib (GSK572016), VELCADE[®], AZD2171, sorafenib (NEXAVAR[®]), XL880 y CHIR-265.

El anticuerpo anti Nrp de la invención, bien solo o bien en combinación con un segundo agente terapéutico (tal como un anticuerpo anti VEGF) puede usarse además en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos. Puede usarse diversos agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinados de la invención. Una lista a modo de ejemplo y no limitante de agentes quimioterapéuticos contemplados se proporciona en el presente documento bajo "Definición".

Cuando el anticuerpo anti Nrp se coadministra con un segundo agente terapéutico, el segundo agente terapéutico

puede administrarse en primer lugar, seguido por el anticuerpo anti Nrp. Sin embargo, la administración simultánea o administración del anticuerpo anti Nrp en primer lugar también se contempla. Son dosificaciones adecuadas para el segundo agente terapéutico las usadas en la actualidad y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y anticuerpo anti Nrp.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada del anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad para tratar, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico a cargo. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente en un momento o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para su administración al paciente, bien, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o bien por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. En un aspecto preferido, el anticuerpo de la invención se administra cada dos a tres semanas, a una dosis que varía de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. Más preferentemente, dicho régimen de dosificación se usa en combinación con un régimen de quimioterapia como la terapia de primera línea para tratar el cáncer colorrectal metastásico. En algunos aspectos, el régimen de quimioterapia implica la administración intermitente de alta dosis tradicional. En algunos aspectos adicionales, los agentes quimioterapéuticos se administran usando dosis más pequeñas y más frecuentes sin descansos programados ("quimioterapia metronómica"). El progreso de la terapia de la invención se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

La composición de anticuerpo se formulará, dosificará y administrará de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trate, el mamífero particular que se trate, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los practicantes médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo para administrar estará dominada por dichas consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, aliviar o tratar un trastorno o enfermedad. El anticuerpo se formula opcionalmente, aunque no es necesario, con uno o más agentes usados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con las vías de administración que se han usado anteriormente en el presente documento o de aproximadamente 1 a 99 % de las dosificaciones empleadas hasta la fecha. Generalmente, el alivio o tratamiento de una enfermedad o trastorno implica la reducción de uno o más síntomas o problemas médicos asociados con el trastorno o enfermedad. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede conseguir uno o una combinación de lo siguiente: reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño tumoral; inhibir (es decir, reducir en algún grado y/o detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir la metástasis tumoral; inhibir, en algún grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en algún grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. En algunas realizaciones, puede usarse una composición de la presente invención para evitar la aparición o reaparición de la enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero.

Se pretende que los ejemplos siguientes meramente ilustren la práctica de la presente invención y no se proporcionan como limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1

Generación y caracterización de anticuerpos anti Nrp2^B

El anti Nrp2^B se aisló de bibliotecas de fagos de anticuerpos sintéticos humanos como se ha descrito previamente (Lee *et al.*, J Mol Biol 340, 1073-1093 (2004)). Brevemente, se construyeron bibliotecas de anticuerpos sintéticos presentados en fagos en un único armazón humano introduciendo diversidad sintética en posiciones expuestas al disolvente dentro de las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR). Para mejorar el rendimiento de la biblioteca, se construyeron bibliotecas de fragmentos monovalentes y bivalentes de unión a antígeno (Fab), y se exploraron diferentes diversidades de CDR-H3 variando la composición de aminoácidos y la longitud de la CDR. La biblioteca se expandió después aumentando la variabilidad de la longitud de CDR-H3 y usando codones adaptados que imitaban la composición de aminoácidos de las secuencias de CDR3-H3 naturales. Usando estas bibliotecas con CDR completamente sintéticas presentadas en un único armazón se generaron anticuerpos de alta afinidad. Para más detalles de estrategias y métodos para generar bibliotecas de anticuerpos sintéticos con un único molde, véase, por ejemplo, el documento WO03/102157 publicado el 11 de diciembre de

2003.

Los procedimientos de selección para clones anti Nrp consistieron en diversas combinaciones de clasificaciones de soporte sólido y de unión en solución que se conocen en la técnica. En clasificaciones de soporte sólido, la biblioteca de fagos de anticuerpos se exploró con antígeno diana que recubría una inmunoplaaca NUNC de 96 pocillos Maxisorp a una concentración de 5 µg/ml. En el método de clasificación de unión en solución, se incubó una biblioteca de fagos con concentración decreciente de antígeno biotinilado en solución, que después se capturó por neutravidina que recubría la placa Maxisorp de 96 pocillos (2-5 µg/ml). La concentración decreciente permitió una mayor rigurosidad en la selección para buscar agentes de unión más estrechos.

Como resultado de combinar las clasificaciones de soporte sólido y de unión en solución, se identificó un clon de una biblioteca de V_H (YW68.4) y otro de una biblioteca de V_HV_L (YW126.20) como agentes de unión de NRP-2. Se realizó una serie de ensayos *in vitro* para examinar las propiedades y actividades de los nuevos anticuerpos anti NRP seleccionados, incluyendo ensayos de afinidad de unión (tales como BIAcore) y ensayos de bloqueo (tales como ensayo de colapso de cono de crecimiento inducido por Semaforina y ensayos de HUVEC).

Las CDR de clones sin tratamiento previo se modificaron por ingeniería genética para mejorar su afinidad y estabilidad y se generaron anticuerpos anti Nrp2 YW68.4.2 y YW68.4.2.36. Se usaron proteínas de fusión mNrp2 (a1a2b1b2)-His, hNrp2 (a1a2b1b2)-Fc expresada en células CHO y hNrp2 (b1b2) expresada en células de insecto para exploración y caracterización de anticuerpos. Las regiones V_L y V_H del anticuerpo de fago anti Nrp2^B (originalmente designado YW68.4.2.36) se clonaron en un vector de expresión de mamíferos respectivamente. El anti Nrp2^B IgG 1 humano o mIgG2a se expresó en células CHO de mamífero y se purificó con columna de afinidad de proteína A.

Las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti Nrp2^B YW68.4.2 y YW68.4.2.36 se muestran en la Figura 10. La secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti Nrp2^A YW126.20 se muestra en la Figura 11. El alineamiento de la secuencia de dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti Nrp2^A YW126.20 con la secuencia κ1 humana se muestra en la Figura 12. El alineamiento de la secuencia de dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti Nrp2^A YW126.20 con la secuencia humana III (hum III) se muestra en la Figura 13.

En los siguientes experimentos, se usó el anticuerpo anti Nrp2^B YW68.4.2.36, que se denominará en lo sucesivo en el presente documento "Anti Nrp2^{Bn}". Este anticuerpo se dirigió a los dominios del factor V/VII de coagulación (b1-b2) de Nrp2 (Figura 1A), ya que estos dominios se requieren para la unión de VEGFC con neuropilinas (Karpanen *et al.*, Faseb J 20, 1462-1472 (2006)). Además, este anticuerpo se une con afinidad similar con Nrp2 murina y humana pero no se une con Nrp1 (Figura 1B). Se ha confirmado que el anti Nrp2^B se une exclusivamente con los dominios b1-b2 y no se une con los dominios CUB (a1-a2) de Nrp2 humana, que son principalmente responsables de la unión con semaforina (Chen *et al.*, Neuron 21, 1283-1290 (1998); Giger *et al.*, Neuron 21, 1079-1092 (1998)).

Para determinar las afinidades de unión de anticuerpos IgG1 anti Nrp2^B, se usó la medición de resonancia de plasmón superficial (SRP) con un instrumento BIAcore™-3000. En primer lugar, se capturaron IgG humanos anti Nrp2^B por microplacas biosensoras CM5 recubiertas de IgG de conejo anti humano para conseguir aproximadamente 200 unidades de respuesta (UR). Para las mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie dobles de Nrp2 humana o de ratón (a1a2b1b2) (de 0,5 nM a 250 nM) por separado en tampón de PBT (PBS con Tween 20 0,05 % (v/v) a 25 °C con un caudal de 30 µl/minuto. Se calcularon las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) usando un modelo de unión de Langmuir de uno a uno sencillo (Software de BIAcore Evaluation versión 3.2). La constante de disociación en equilibrio (K_D) se calculó como la relación k_{off}/k_{on} .

El anti Nrp2^B se une con Nrp murina con una K_d de 4,9 nM y con Nrp2 humana con una K_d de 5,3 nM como se evalúa por la medición por resonancia de plasmón superficial.

La capacidad del Anti Nrp2^B para bloquear la unión de VEGFC con Nrp2 se ensayó tanto en formato de ELISA como en ensayos de unión basados en células.

Para ensayos de especificidad de unión basados en ELISA, se incubaron diluciones en serie triples de IgG Anti Nrp2^B (de 0,002 nM a 500 nM) en tampón PBST (tampón de PBT con BSA 0,5 % (p/v)) con placas Maxisorp de 96 pocillos recubiertas con antígeno 1 µg/ml durante al menos 1 hora, y las placas se lavaron con tampón de PBT. Se detectaron anticuerpos unidos con conjugados de HRP anti anticuerpo humano diluidos 1:2500 en tampón de PBST, se desarrollaron con sustrato TMB durante aproximadamente 5 minutos, se detuvieron con H₃PO₄ 1M y se leyeron espectrofotométricamente a 450 nm.

Para evaluar el bloqueo de Nrp2 de la unión con VEGF, se incubaron en primer lugar diluciones en serie triples de IgG anti Nrp2^B con una placa Maxisorp de 96 pocillos recubierta con NRP2-Fc (5 µg/ml) en tampón de PBST durante 2 horas, seguido de adición de VEGF₁₆₅ biotinilado o VEGFC (longitud completa) durante 15 minutos. La cantidad de unión de VEGF biotinilado con Nrp2 se detectó por conjugados de estreptavidina-HRP.

Para evaluar la unión celular, se llevó a cabo unión de VEGF₁₆₅ biotinilado o VEGFC con LEC como se ha descrito previamente (Jia *et al.*, J Biol Chem 281, 13493-13502 (2006)) y la unión se detectó por conjugados de

estreptavidina-fosfatasa alcalina. Se realizó unión de Sema3F como se ha descrito previamente (Chen *et al.*, 1998, mencionado anteriormente).

El anti Nrp2^B bloqueó fuertemente la unión de VEGFC con Nrp2 (Figura 1C) y las células HEK-293 se transfectaron con Nrp2 de longitud completa. Dado que la Nrp2 también se puede unir con VEGF (Gluzman-Poltorak *et al.*, J Biol Chem 275, 29922 (2000)), probablemente utilizando los mismos dominios, también se ensayó la capacidad del anti Nrp2^B para bloquear la unión de VEGF₁₆₅ con Nrp2. El anti Nrp2^B también bloquea fuertemente la unión de VEGF₁₆₅ con Nrp2 (Figura 1D) con una CI₅₀ similar (0,1 nM). Sin embargo, el Anti Nrp2^B no fue capaz de bloquear la unión de Sema3F con LEC (Figura 1^E) que expresa fuertemente Nrp2 (Figura Complementaria 1). Estos resultados son coherentes con observaciones previas de que los dominios a1-a2 son principalmente responsables de la unión de semaforina y los dominios b1-b2 de la unión de VEGF (Figura 1 A).

Ejemplo 2

El anti Nrp2^B bloquea las funciones mediadas por VEGFC selectivas *in vitro*

Materiales y métodos

Cultivos celulares

Se obtuvieron HMVEC-dLyAd - Células Endoteliales Microvasculares Linfáticas Dérmicas Humanas (LEC) y HUVEC de Cambrex y se cultivaron en medio EGM-2 (Cambrex). Se obtuvieron células C6 LacZ de ATCC. Las 66C14 fueron un amable regalo del Dr. Fred R Miller. Las células tumorales se cultivaron en DMEM (Gibco) complementado con FBS al 10 %. Todas las células se mantuvieron a 37 °C en un incubador de CO₂ 5 %, humedad al 95 %.

Ensayo de proliferación celular

Se recubrió una placa de fondo transparente-negro de 96 pocillos (VWR) con Fibronectina 5 µg/ml (Invitrogen) a 37 °C durante 2 horas. Las LEC se recogieron y resuspendieron en medio de ensayo (BSA 0,1 %, EGM-2) 3000 células/100 µl y se añadieron a los pocillos. Las células se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Se añadió solución de marcaje BrdU (kit de ELISA de Proliferación Celular; Roche) y las células se incubaron durante 24 horas adicionales a 37 °C. La incorporación de BrdU se determinó por inmunoensayo de quimioluminiscencia (6 pocillos por condición).

Resultados

Se examinó el papel de la Nrp2 en la migración y proliferación mediada por VEGFC. Estas son actividades celulares clave inducidas por VEGFC (Joukov *et al.*, Embo J 16, 3898-3911 (1997)). Se ha mostrado previamente que las LEC son altamente sensibles a VEGFC (Makinc *et al.*, Embo J 20, 4762-4773 (2001); Veikkola *et al.*, Faseb J 17, 2006-2013 (2003); Whitehurst *et al.*, Lymphat Res Biol 4, 119-142 (2006)). Usando un sistema de transwell, se introdujeron LEC humanas en la cámara superior mientras que se añadía VEGFC a la cámara inferior para promover la migración. Después se fijaron las LEC que migraban al fondo, se tiñeron (Figura 2A) y se cuantificaron (Figura 2B). La proteína de dominio extracelular (ECD) de VEGFR3, que comprendía los tres primeros dominios de Ig (de unión a ligando) de VEGFR3 se usó como un control positivo para bloquear la migración conducida por VEGFC en este y posteriores experimentos (Makinen *et al.*, Nat Med 7, 199-205 (2001)). Para determinar si se requería la función de Nrp2 para migración de LEC, se añadieron mAb Anti Nrp2^B a células en la cámara superior inmediatamente antes de la adición de VEGFC. El anti Nrp2^B fue capaz de reducir significativamente la migración de LEC mediada por VEGFC (Figura 2A, 2B; p=0,004). El nivel de inhibición fue menor que el visto con VEGFR3 ECD, que inhibía completamente la migración de LEC mediada por VEGFC (Figura 2A, 2B; p<0,001 frente al control; p=0,002 frente a Anti Nrp2^B). Se obtuvieron resultados similares usando otra línea celular primaria sensible a VEGFC, HUVEC.

Dado que el Anti Nrp2^B también bloqueaba la unión de VEGF₁₆₅ con Nrp2, se evaluó el papel de Nrp2 en la modulación de la migración mediada por VEGF₁₆₅. VEGF₁₆₅ indujo fuertemente la migración en LEC como se ha descrito previamente (Hirakawa *et al.*, Am J Pathol 162, 575-586 (2003); Hong *et al.*, Faseb J 18, 1111-1113 (2004); Makinen *et al.*, Embo J 20, 4762-4773 (2001); Veikkola *et al.*, Faseb J 17, 2006-2013 (2003)). Se usó un anticuerpo anti VEGF de reacción cruzada entre especies (B20.4.1) como un control positivo para bloquear esta migración conducida por VEGF (Liang *et al.*, J Biol Chem 281, 951-961 (2006)). Resulta interesante que el Anti Nrp2^B no tuvo ningún efecto en la migración mediada por VEGF₁₆₅ (Figura 2C), posiblemente debido a la presencia de Nrp1 (Figura Complementaria 1). El bloqueo de la función de Nrp1 utilizando el mAb Anti Nrp1, Anti Nrp1^B (Pan *et al* Cancer Cell 11, 53-67 (2007)) redujo drásticamente la migración mediada por VEGF, confirmando esta hipótesis (Figura Complementaria 2). La adición tanto de Anti Nrp1^B como de Anti Nrp2^B no dio como resultado ninguna inhibición adicional de la migración en comparación con la inhibición vista con Anti Nrp1^B solamente (Figura Complementaria 2), lo que indica que Nrp2 no desempeña un papel en la migración mediada por VEGF₁₆₅.

A continuación, se investigó el efecto del Anti Nrp2^B en la proliferación de LEC inducida por VEGFC. Notablemente, el Anti Nrp2^B no tuvo ningún efecto en la proliferación de LEC mientras que VEGFR3 ECD proporcionó un bloqueo

fuerte (Figura Complementaria 3), de acuerdo con informes previos en los que el ARNip de Nrp2 no consiguió inhibir la proliferación inducida por VEGFC en células endoteliales (Favier *et al.*, Blood 108, 1243-1250 (2006)). Por lo tanto, parece que la Nrp2 es importante para la migración conducida por VEGFC pero no la proliferación.

- 5 Después, se ensayó la capacidad del Anti Nrp2^B para modular la función de semaforina. Los inventores usaron el ensayo de colapso de cono de crecimiento neuronal del hipocampo, que ha demostrado previamente que se requiere Nrp2 para la retracción mediada por Sema3F de las estructuras ricas en actina (Pozas *et al.*, 2001). La adición de Anti Nrp2^B no tuvo ningún efecto en el colapso inducido por semaforina mientras que la adición del dominio AIA2 de Nrp2 recombinante o ECD de Nrp2 inhibía este colapso completamente (Figura Complementaria 4).
- 10 Este resultado es coherente con la observación previa de los inventores de que el Anti Nrp2^B no se une con la región de unión a semaforina y no interfiere con la unión de Sema3F con Nrp2. Por lo tanto, el Anti Nrp2^B actúa para bloquear aspectos específicos de la función de Nrp2, inhibiendo respuestas celulares mediadas por VEGFC pero no VEGF o Sema3F.

15 **Ejemplo 3**

El anti Nrp2^B bloquea la linfangiogénesis mediada por VEGFC *in vivo*

Materiales y métodos

20 Ensayo de microbolsillos corneales de ratón

- Se anestesió a ratones CD-1 adultos (Charles-River) y se creó un bolsillo de 2 x 3 mm del centro de la córnea en el epitelio por microdissección como se ha descrito previamente (Polverini *et al.*, Methods Enzymol 198, 440-450 (1991)). Los agentes para ensayar con respecto a actividad linfangiogénica se inmovilizaron en un microgránulo de hidrón inerte (2 x 2 mm). El microgránulo se implantó después en la base del bolsillo. Se trató a los animales con anticuerpo de control (10 mg/kg), Anti Nrp2^B (10 mg/kg) o VEGFR3 ECD 25 mg/kg IP dos veces por semana durante 2 semanas. Después se sacrificó a los animales y se diseccionaron las córneas. Los vasos linfáticos se visualizaron por IHC de montaje completo con anticuerpo anti LYVE-1 (R&D Systems 1:500). Las corneas se fotografiaron y se
- 30 cuantificaron los vasos linfáticos positivos para LYVE-1 que surgían del limbo.

Ensayo de permeabilidad de vasos de la piel de ratones

- Las espaldas y los flancos de ratones hembra C57BL6J adultos se afeitaron y se dividieron en 4 áreas de ensayo. Se les inyectó i.p. 150 µl de solución de azul de Evans 0,5 %. 1 hora después de la inyección de azul de Evans, se inyectaron 20 µl de PBS que contenía BSA o hVEGF (7,5 µg/ml) con o sin anticuerpo (0,5 mg/ml) por vía intradérmica, aleatoriamente en una de las cuatro zonas. 1 hora después, los animales se sacrificaron y la piel se diseccionó y se capturaron imágenes de ella. Se cortaron muestras de piel para cada zona de inyección y se incubaron en solución de formamida a 55 °C durante 48 horas para extraer el colorante azul. La absorbancia de la
- 40 solución se midió después con un espectrómetro a 600 nm.

Resultados

- Habiendo observado una reducción significativa en la migración de LEC bloqueando la Nrp2 *in vitro*, se examinó a continuación si se requería Nrp2 para modular la función de VEGFC *in vivo*. Los inventores estudiaron dos actividades *in vivo* mediadas por VEGFC bien caracterizadas, linfangiogénesis del adulto y permeabilidad vascular (Cao *et al.*, Circ Res 94, 664-670 (2004); Joukov *et al.*, J Biol Chem 273, 6599-6602 (1998); Kubo *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 99, 8868-8873 (2002); Saaristo *et al.*, Faseb J 16, 1041-1049 (2002)). Para estudiar la linfangiogénesis, se utilizó el ensayo de microbolsillo corneal murino (Kubo *et al.*, 2002, mencionado anteriormente).
- 50 En este ensayo, se introdujo un microgránulo de VEGFC en la córnea avascular de un ratón adulto. Durante 14 días, en respuesta al VEGFC, creció un plexo denso de vasos linfáticos en la córnea del limbo (Figura 2E; 12.000 píxeles² con tratamiento de VEGFC frente a 2284 píxeles² en control). Estos vasos se marcaron con inmunohistoquímica de LYVE-1 (IHC) y posteriormente se cuantificaron (Figura 2D). La administración sistémica de VEGFR3 ECD bloqueó casi completamente esta linfangiogénesis inducida por VEGFC (2671 píxeles²; p<0,001). El anti Nrp2^B también
- 55 bloqueó eficazmente la respuesta linfangiogénica corneal (3281 píxeles²; p<0,001). Este bloqueo fue de grado similar al bloqueo observado usando VEGFR3 ECD (Figura 2E, 2D; p=0,67).

- Para evaluar la permeabilidad vascular, se usó el ensayo de miles (Brkovic y Sirois, J Cell Biochem 100, 727-37 (2007); Eriksson *et al.*, Circulation 107, 532-1538 (2003)). Este ensayo usa inyección intradérmica de VEGFC para inducir la permeabilidad vascular e inyección intravascular de colorante azul de Evans como un indicador para detectar y cuantificar la permeabilidad en vasos cutáneos (Figura Complementaria 3). Notablemente, el tratamiento con Anti Nrp2^B no tuvo ningún efecto en la permeabilidad inducida por VEGFC, a diferencia del bloqueo observado con el tratamiento con VEGFR3 ECD (p=0,038). Estos resultados demuestran que, coherentemente con lo que se observa *in vitro*, Nrp2 parece ser importante para funciones mediadas por VEGFC selectivas *in vivo*.
- 60

Ejemplo 4

El anti Nrp2^B modula la función de VEGFC inhibiendo la formación del complejo de Nrp2/receptor de VEGF

Materiales y métodosEnsayo de migración celular

Se realizaron ensayos de migración usando una cámara de Boyden modificada con un sistema de inserto de 24 multipocillos Falcon de tamaño de poro de 8 µM (BD Biosciences). Las placas se recubrieron con Fibronectina 5 µg/ml (Invitrogen) durante 2 horas a 37 °C. Se añadieron células en 100 µl de medio de ensayo (BSA 0,1 %, EGM-2) con/sin anticuerpos a la cámara superior. Se añadió quimioatrayente a la cámara inferior en 500 µl de medio de ensayo, y las células se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Las células en la membrana superior se retiraron con un hisopo de esponja y las células en la superficie inferior se fijaron en etanol al 70 % y se tiñeron con verde Sytox (Molecular Probes). Se capturaron imágenes en la superficie inferior completa del pocillo, y se contó el número de células migradas (6 pocillos por condición).

Análisis de FACS

Se incubaron LEC confluentes con anticuerpos Anti Nrp2^B de control (10 µg/ml) durante 5 minutos, 2 horas o 20 horas a 37 °C. Las células se recogieron con tampón de disociación de células sin enzimas (Gibco), y se incubaron con anticuerpo biotinilado a 1:100 en tampón de FACS (PBS, FBS 2 %, EDTA 2 mM, azida sódica 0,1 %) que contenía suero de ratón normal al 5 %, suero de rata normal al 2 % e IgG humana 10 µg/ml al 10 %. Los anticuerpos se biotinilaron usando el kit de marcaje de proteína xx-mini biotina FluoReporter (Molecular Probes). Las células se lavaron después con tampón de FACS y se tiñeron con estreptavidina-PE (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el sistema FacsCalibur (BD Biosciences).

Ensayo de adhesión celular

Se preincubaron LEC subconfluentes en 100 µl de Medio 199 con anticuerpos de control o Anti Nrp2^B (10 µg/ml) durante 30 minutos a 37 °C, después se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano maxisorp NUNC (eBioscience) recubiertas con Fibronectina 1 µg/ml (Roche) a 10.000 células por pocillo. Las placas se centrifugaron durante 1 minuto a 140 g para sincronizar el contacto de las células con el sustrato, y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Las placas se lavaron después 3 veces con PBS, y se congelaron a -80 °C. La densidad celular se determinó con el kit CyQuant (Molecular Probes).

Ensayos de señalización del receptor de VEGF

Se estimularon HUVEC confluentes durante 10 minutos con 200 ng/ml de VEGFC en presencia o ausencia de anticuerpos de control o Anti Nrp2^B. Las células se lisaron y se ensayaron con respecto a muchos mediadores que se sabe que desempeñan un papel en la señalización del receptor de VEGF. La activación de VEGFR2 se evaluó usando ensayos de ELISA de VEGFR2 total y fosfo VEGFR2 (kit de ELISA DuoSet IC, R&D). La activación de VEGFR3 se evaluó usando un ensayo de activación del receptor quinasa (KIRA) con una línea celular VEGFR3-293 como se ha descrito previamente (Sadick *et al.*, J Pharm Biomed Anal 19, 883-891(1999)). Brevemente, se ensayaron líneas celulares 293 estables que expresaban hVEGFR3 humano marcado con Flag de longitud completa con respecto a fosforilación del receptor después de estimulación. Se privó de alimentos a 5×10^4 células durante una noche (DMEM con BSA 1 %) y después se estimularon con VEGFC 40 ng/ml (Genentech South San Francisco, CA) o VEGFC 200 ng/ml (Genentech South San Francisco, CA) durante 8 minutos. Las células se lisaron en PBS que contenía triton 1 % y ortovanadato sódico. Las placas de ELISA se recubrieron con anticuerpo Flag de captura (Sigma St Louis, MO). Las placas se recubrieron (PBS + 1 µg/ml de anticuerpo) durante una noche y se bloquearon (PBS + BSA 0,5 %) durante 1 hora. Después de 3 lavados (PBS + Tween 20 0,05 %), se añadieron lisados durante 2 horas, se lavaron tres veces, seguido de adición de anticuerpo de fosfodetección 4G 10 (Upstate Lake Placed, NY) durante 2 horas. La detección se realizó con anticuerpo de HRP (Amersham Piscataway, NJ) y sustrato de TMB. Las placas se leyeron a 450 nm. Se evaluaron la AKT total, fosfo AKT, Erk1/2 total, fosfo Erk1/2, Src total, fosfo Src, MAPK p38 total y MAPK y fosfo p38 usando kits de ELISA de tipo sándwich de BioSource.

Resultados

El hallazgo de que el Anti Nrp2^B interfiere con las acciones de VEGFC fue coherente con el hecho de que bloquea la unión de VEGFC con Nrp2. Además, el hecho de que bloquee solamente las funciones selectivas tanto *in vitro* como *in vivo* era bastante inesperado. Una posible explicación de por qué se observó una alteración de la migración de LEC y linfangiogénesis pero no de la proliferación de LEC o permeabilidad vascular es que el Anti Nrp2^B puede inhibir en general la migración, posiblemente alterando la adhesión de LEC con la matriz extracelular. Para ensayar esto, se evaluó el efecto del Anti Nrp2^B en la migración inducida por varios mitógenos de LEC. El anti Nrp2^B no tuvo ningún efecto en la migración inducida por VEGF (Figura 2C), HGF (Figura 3B) o FGF. Por lo tanto, el Anti Nrp2^B no alteró en general la migración de LEC. Además, el Anti Nrp2^B no tuvo ningún efecto en la adhesión de LEC con fibronectina o colágeno, dos sustratos de matriz extracelular.

Una segunda posibilidad es que el mAb Anti Nrp2^B puede provocar la internalización de Nrp2 (Jaramillo *et al.*, Exp Cell Res 312, 2778-2790 (2006)). Dado que Nrp2 forma un complejo con VEGFR3, incluso en ausencia del ligando (Favier *et al.*, 2006, mencionado anteriormente; Karkkainen y Alitalo, Semin Cell Dev Biol 13, 9-18 (2002)), esto
 5 podría dar como resultado una cointernalización selectiva de VEGFR3, que afectará a funciones mediadas por VEGFC específicas. Esta posibilidad se validó adicionalmente por el hallazgo de que la permeabilidad vascular conducida por VEGFC está mediada por VEGFR2 y no VEGFR3 (Joukov *et al.*, 1998, mediado anteriormente). Para abordar esta posibilidad, las LEC se incubaron con Anti Nrp2^B a 37 °C durante 5 minutos, 2 horas o 20 horas y después se realizó análisis de FACS con anticuerpos contra Nrp2, VEGFR2 y VEGFR3 para determinar el nivel de
 10 los receptores en la superficie celular. No se observaron diferencias entre los tratamientos, lo que sugiere que el Anti Nrp2^B no provocó internalización significativa de Nrp2, VEGFR2 o VEGFR3 (Figura 3A).

Dado que se ha propuesto que la Nrp2 aumenta la señalización del receptor de VEGF (Favier *et al.*, 2006, mencionado anteriormente), a continuación se estudió el efecto del Anti Nrp2^B en la activación de VEGFR2 y
 15 VEGFR3, en el que la estimulación de VEGFC conduce a dimerización del receptor y autofosforilación. De acuerdo con los datos *in vitro* e *in vivo* anteriores, VEGFR3 ECD bloqueó completamente la fosforilación de VEGFR2 (Figura 3C; $p < 0,001$) y VEGFR3 mediada por VEGFC. El tratamiento con anti Nrp2^B dio como resultado una reducción de la activación de VEGFR2 (Figura 3C; $p < 0,001$) y VEGFR3, pero en un grado significativamente menor que el tratamiento con VEGFR3 ECD ($p < 0,001$). Esta observación planteó la posibilidad de que la actividad inhibidora
 20 selectiva de Anti Nrp2^B pudiera ser un resultado de requisitos diferenciales de la activación del receptor de VEGF para migración y proliferación, requiriendo esa migración niveles mayores de activación del receptor que proliferación. Para abordar esta posibilidad, se evaluó la respuesta a dosis de la fosforilación de VEGFR2 a estimulación por VEGFC (Figura 3C). Se observó uniformemente que la reducción de la fosforilación de VEGFR2 provocada por tratamiento con Anti Nrp2^B fue equivalente a la fosforilación de VEGFR2 obtenida estimulando con
 25 VEGFC 175 ng/ml o 150 ng/ml. Después, se realizó un análisis de respuesta a dosis de la migración a estimulación de VEGFC (Figura 3D). Se ha observado que las LEC estimuladas con VEGFC 175 ng/ml o 150 ng/ml migraron de forma equivalente a células estimuladas con VEGFC 200 ng/ml. De hecho, no se observó una reducción significativa en la migración hasta que los niveles de VEGFC se redujeron a 50 ng/ml. Los inventores razonaron por lo tanto que la reducción de la fosforilación de VEGFR2 inducida por Anti Nrp2^B era, por sí sola, insuficiente para reducir la
 30 migración.

Los inventores evaluaron adicionalmente el efecto del Anti Nrp2^B en acontecimientos de señalización corriente abajo mediados por receptores de VEGF. El tratamiento con Anti Nrp2^B o estimulación con VEGFC 175 ng/ml o 150 ng/ml no redujo significativamente la activación de Erk1/2, Akt o p38 MAPK que modulan la proliferación, permeabilidad y movilidad de VEGFR2 respectivamente, de forma similar a lo que se observa con Nrp1 (Pan *et al.*, 2007). Esto indicó
 35 que la Nrp2 podría regular la migración de LEC y linfangiogénesis por un mecanismo distinto de la potenciación de la activación del receptor de VEGF o señalización corriente abajo.

En último lugar, se ensayó el efecto de Anti Nrp2^B en la formación del complejo de Nrp2/receptor de VEGF. Como se ha indicado previamente, la Nrp2 puede coimmunoprecipitarse con VEGFR2 y VEGFR3 en presencia o ausencia de
 40 VEGFC (Favier *et al.*, 2006 mencionado anteriormente; Karpanen *et al.*, 2006, mencionado anteriormente) (Figura 3E). Esta interacción se redujo drásticamente por Anti Nrp2^B (Figura 3E). Este resultado sugiere que el complejo de Nrp2/receptor de VEGF es importante para funciones mediadas por VEGFC específicas. Además, el papel de Nrp2 no es exclusivamente potenciar la señalización del receptor de VEGF en respuesta a estimulación por ligando.

45 **Ejemplo 5**

Nrp2 se expresa en vasos linfáticos asociados con tumor

Materiales y métodos

Inmunohistoquímica

Se cortaron secciones tisulares de 18 μ m y se montaron en portaobjetos de vidrio. Las secciones se incubaron durante una noche con anticuerpo primario (anti NRP2^B (tinción de control 1:500 realizada en médula espinal de
 55 ratón E12.5 en la que la expresión se ha caracterizado bien), anti LYVE-1 (anti-R&D, 1:200), anti PECAM-1 (Benton Dickinson, 1:500), anti PROX-1 (Chemicon, 1: 1000) o Ki67 (Neovision 1:100) a 4 °C. Después las muestras se tiñeron con anticuerpos secundarios Alexa 488 o Alexa 568 (1:200; Molecular Probes) durante 4 horas a TA. Se usó tinción solamente con secundario como control. Se realizó tinción con TUNNEL con un kit comercial (Roche). Se capturaron imágenes con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot. Se determinó el área de vasos
 60 sanguíneos y linfáticos a partir de 6 imágenes representativas de cada uno de 6 tumores por grupo, evaluadas con respecto a número de píxeles medio por ImageJ.

Resultados

Para determinar si Nrp2 desempeña un papel en la biología linfática del adulto, se evaluó la expresión de Nrp2 en
 65 vasos linfáticos del adulto. Dentro del sistema vascular, se ha descrito previamente la expresión de Nrp2 en venas y vasos linfáticos (Herzog *et al.*, Mech Dev 109, 115-119 (2001); Moyon *et al.*, Development 128, 3359-3370 (2001);

Yuan *et al.*, Development 129, 4797-4806 (2002)). Como se ha descrito anteriormente, las LEC en cultivo expresan fuertemente Nrp2 (Figura Complementaria 1). Sin embargo, los inventores fueron incapaces de detectar Nrp2 por IHC en vasos linfáticos positivos para LYVE-1, colónicos, de ratones adultos normales (Figura 4A; para tinción de control positiva véase Figura Complementaria 4). El colon se evaluó, dado que tiene un plexo rico de vasos linfáticos con un patrón bastante estereotipado. Los inventores tampoco pudieron detectar la expresión de Nrp2 por IHC dentro de vasos linfáticos de ganglios linfáticos (Figura 4B) y piel de ratones adultos normales. Estos resultados se confirmaron por la hibridación *in situ* (ISH) de Nrp2. Por el contrario, se observó fuerte expresión de Nrp2 en vasos linfáticos LYVE-1 + en ganglios linfáticos adyacentes a tumores trasplantados de forma ortotópica o heterotópica (Figura 4C). Esto se observó con varias líneas tumorales incluyendo la línea de adenocarcinoma de mama murina trasplantada de forma ortotópica, 66c14 (Aslakson y Miller, Cancer Res 52, 1399-1405 (1992)) y la línea de glioblastoma de rata trasplantada de forma heterotópica, C6 (datos no mostrados). También se observó Nrp2 en vasos linfáticos peritumorales e intratumorales (Figura 4D) para varias líneas tumorales incluyendo 66c14, C6 y PC3 (línea de carcinoma de próstata humano). Esta expresión se confirmó por ISH en un subconjunto de tipos tumorales.

Ejemplo 6

El anti Nrp2^B reduce la metástasis pulmonar en modelos tumorales múltiples

Materiales y métodos

Todos los estudios animales fueron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicada por el NIH (Publicación de NIH 85-23, revisada en 1985). Un Comité de Cuidado y Uso Animal Institucional (IACUC) aprobó todos los protocolos animales.

Modelos tumorales

Para 66C14, se recogieron células por tripsinización, se lavaron y se resuspendieron en PBS a una concentración de 2×10^5 en 10 μ l de PBS. Los ratones se anestesiaron usando ketamina 75 mg/kg y xilacina 7,5 mg/kg, y se realizó una incisión por debajo de la extremidad delantera derecha. Se inyectaron 2×10^5 células en 10 μ l de PBS directamente en la 4^a almohadilla adiposa mamaria expuesta de ratones balb-C hembra de 6-8 semanas de edad. Para C6, se inyectaron 2×10^6 células tumorales en 100 μ l de PBS por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos balb-C hembra de 6-8 semanas de edad. Para ambos conjuntos de estudios, el crecimiento tumoral se controló 3 veces por semana. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de 80-120 mm³, los ratones se clasificaron para proporcionar tamaños tumorales medios de grupo casi idénticos y se comenzó el tratamiento. Este se consideró el día 1 de cada estudio. Los animales se trataron con anticuerpo de control (10 mg/kg), Anti Nrp2^B (10 mg/kg) o VEGFR3 ECD 25 mg/kg IP dos veces por semana hasta la terminación del estudio. Todos los estudios se repitieron 3 veces para asegurar la reproducibilidad.

Al final del estudio los animales se anestesiaron y se perfundieron con PFA 4 %. Los tumores se recogieron, se crioprotegieron y se congelaron en OCT (Tissue-Tek). Los pulmones se inflaron mediante una perfusión ventricular derecha de 10 ml de PBS seguido de PFA al 4 %, y se realizaron recuentos visuales de lesiones metastásicas antes de análisis con Micro CT.

Se evaluó la metástasis de SLN por implantación heterotópica de células tumorales C6 en el oído. Brevemente, se pretrató a una cohorte de animales con anticuerpo de control (10 mg/kg) o Anti Nrp2^B (10 mg/kg), un día antes de la implantación de células tumorales, y dos veces por semana a continuación. Se inyectaron 1×10^5 Células C6 lacZ por vía subdérmica en el oído de 70 ratones desnudos balb/c hembra. Los ratones se sacrificaron el día 3, 6, 9, 13 y 15, y se identificaron ganglios linfáticos centinelas por linfangiografía cutánea y posteriormente se diseccionaron. Los ganglios linfáticos se homogeneizaron y el lisado se ensayó con respecto a actividad β -galactosidasa (Pierce).

Se realizó linfangiografía intradérmica en ratones de control y portadores de tumores de la siguiente manera. Se inyectaron 2 μ l de colorante azul de Evans (3 % en peso) que contenía microperlas fluorescentes de poliestireno de 20 nm 1 % (Molecular Probes) por vía intradérmica en la parte superior del tumor. Se permitió que los animales se recuperaran durante 2 horas y después se sacrificaron. Los tumores se diseccionaron con cuidado de no incluir el tejido peritumoral. Se fijaron y después se analizaron de forma histoquímica o se incubaron en formamida para extraer el azul de evans y se cuantificaron con una medición de DO600 por espectrofotómetro.

Análisis de micro CT de los pulmones

Los pulmones se sumergieron en NBF 10 % durante 24 horas, después se sumergieron en una solución al 20 % de un agente de contraste de tomografía computarizada por rayos x basado en yodo, Isovue370 (Bracco Diagnostics Inc, Princeton, NJ), se diluyó con PBS durante 24 horas. Después los pulmones se sumergieron en y se perfundieron mediante la cánula de la tráquea con 20 ml de aceite de soja (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a una velocidad de 0,25 ml/minuto. El aceite de soja se usó para retirar el exceso de agente de contraste y proporcionar un medio de fondo para la captura de imágenes.

Se capturaron imágenes de los pulmones de ratones *ex vivo* con un sistema de microtomografía computarizada

(micro CT) de rayos x VivaCT (SCANCO Medical, Basserdorf, Suiza). Se obtuvo una imagen de exploración sagital, comparable con un rayo x planar convencional, para definir el punto de comienzo y final para la adquisición axial de una serie de cortes de imágenes de micro CT. La localización y el número de imágenes axiales se seleccionaron para proporcionar cobertura completa del pulmón. Los pulmones se sumergieron en aceite de soja como el medio de fondo. Las imágenes de micro CT se generaron manejando el tubo de rayos x a un nivel de energía de 45 kV, una corriente de 160 μ A y un tiempo de integración de 450 milisegundos. Se obtuvieron imágenes axiales a una resolución isotópica de 21 μ m. Los estimados tumorales pulmonares (número y volumen) se obtuvieron por un algoritmo de análisis de imágenes semiautomático que incluye una etapa de inspección por un lector entrenado. Los tumores pulmonares aparecen como masas sólidas hiperintensas en relación con estructuras de tipo malla, porosas del pulmón normal. Esto se debe a la absorción del agente de contraste de yodo por estructuras sólidas (paredes bronquiales y alveolares, tumores, tráquea, mediastino) contenidas dentro del pulmón. El exceso de agente de contraste se eliminó de los espacios aéreos llenos por la etapa de perfusión de aceite. Se extrajeron masas tumorales potenciales por una serie de etapas de procesamiento de imágenes. El software de análisis de imágenes se desarrolló de forma interna. Se escribió en C++ y empleó las bibliotecas de función de software de análisis de imágenes Analyze (AnalyzeDirect Inc., Lenexa, KS, Estados Unidos). El algoritmo emplea determinación de umbrales de intensidad, filtración morfológica y crecimiento de regiones para extraer todas las masas tumorales potenciales. Se determinó un umbral de intensidad (1480 Unidades Hounsfield) por análisis de histogramas de 5 pulmones arbitrarios empleados para el desarrollo de algoritmos y se seleccionó el umbral óptimo para incluir vóxeles tumorales y excluir cualquier señal de fondo. Se aplicaron operaciones morfológicas (erosión, dilatación) y crecimiento de región para conectar regiones hiperintensas de vóxeles y para retirar cualquier vóxel de densidad similar hallado en las paredes finas de los bronquiolos y alvéolos. La etapa de crecimiento de región requiere un volumen mínimo de 2300 vóxeles conectados (más de 0,0231 mm³) para aceptarse como un objeto (masa). Los objetos identificados se valoraron después por un lector entrenado con el software de visualización Analyze 3D. Se aceptaron o rechazaron objetos individuales como posibles tumores basándose en la apariencia del objeto y su localización dentro del pulmón. Los objetos se rechazaron si residían fuera del pulmón (por ejemplo, mediastino, residuos tisulares extraños) o se asemejaban a un vaso lleno de sangre. El recuento tumoral, volumen tumoral individual y volumen tumoral total se determinó para cada pulmón. Esta técnica analítica se validó con un modelo de metástasis tumoral bien establecido. Se evaluaron once animales con trasplante ortotópico de células tumorales de adenocarcinoma mamario 4T1 con respecto a metástasis pulmonar por esta técnica de micro CT seguida de análisis histológico en serie de los pulmones. Las estimaciones de volumen tumoral de pulmón estaban altamente correlacionadas ($r = 0,9$, $p = 0,0002$) con estimaciones histológicas del tamaño tumoral (recuento de píxeles; Figura Complementaria 5).

Resultados

Un enfoque principal para inhibir la metástasis ha sido mediante inhibición del eje de VEGFC (Chen *et al.*, Cancer Res 65, 9004-9011 (2005); He *et al.*, J Natl Cancer Inst 94, 819-825 (2002); Krishnan *et al.*, Cancer Res 63, 713-722 (2003); Lin *et al.*, Cancer Res 65, 6901-6909 (2005)). Para determinar si el bloqueo de la función de Nrp2 también podría modular el desarrollo de metástasis, se ensayaron los efectos del tratamiento con Anti Nrp2^B en la formación de metástasis pulmonar en dos modelos tumorales diferentes, el modelo de cáncer de mama, 66c14, y el modelo de glioblastoma C6. 66c14 es una línea de adenocarcinoma mamario murino derivada de un tumor mamario espontáneo en un ratón Balb/c (Aslakson y Miller, Cancer Res 52, 1399-1405 (1992)). Estas células expresan VEGFC y metastatizan mediante el sistema linfático a los pulmones (Aslakson y Miller, 1992, mencionado anteriormente). El trasplante ortotópico de estas células en ratones Balb/c dio como resultado el desarrollo reproducible de tumores y metástasis pulmonar. El tratamiento con Anti Nrp2^B no afectó a la velocidad de crecimiento primaria de los tumores (Figura 5A). Dado que VEGFR3 ECD redujo drásticamente la velocidad de crecimiento de tumores primarios se excluyó de cualquier análisis posterior de metástasis. Se sacrificó una cohorte de animales (N=6 de cada grupo) con tumores de tamaño similar de ambas ramas del tratamiento simultáneamente, y los pulmones se diseccionaron y se inflaron para facilitar el análisis con respecto a nódulos metastásicos. El anti Nrp2^B provocó una reducción drástica del número medio de nódulos metastásicos detectados visualmente por pulmón en comparación con animales tratados con IgG de control (Figura 5B, C), de una media de 3,5 a 0,8 ($P = 0,03$). Para confirmar este resultado y extender la evaluación de los inventores a la metástasis dentro del parénquima de pulmón que no era susceptible a examen visual, los inventores realizaron un análisis de micro CT (Li *et al.*, Technol Cancer Res Treat 5, 147-155 (2006)) de los pulmones después de la necropsia. Este análisis confirmó que los animales tratados con Anti Nrp2^B tuvieron una reducción del número de metástasis pulmonares en comparación con animales tratados con control (Figura 5D-F). Sin embargo, el análisis de micro CT fue más sensible que el análisis visual dando como resultado un número absoluto mayor de nódulos metastásicos en ambos grupos. El micro CT también permitió a los inventores determinar la carga metastásica total dentro del pulmón. El tratamiento con Anti Nrp2^B también dio como resultado una reducción del volumen metastásico total (0,74 cm³) en comparación con el tratamiento de control (1,78 cm³). Adicionalmente, este análisis verificó que la amplia mayoría de las lesiones estaban en la superficie de pulmones tanto en animales de control como los tratados con Anti Nrp2^B. Por lo tanto, el Anti Nrp2^B no provocó una reducción en la metástasis desplazando los nódulos de la superficie al parénquima del pulmón.

El análisis de FACS, realizado como se ha descrito en el Ejemplo 4, indicó que Nrp2, pero no VEGFR2 o VEGFR3, se expresaba en células tumorales 66c14. Esto planteó la posibilidad de que el tratamiento con Anti Nrp2^B estaba afectando al comportamiento de las células tumorales directamente para influir en la metástasis. Esto era poco

probable dada la falta de efecto en el crecimiento tumoral primario con tratamiento con Anti Nrp2^B. Adicionalmente, el Anti Nrp2^B no tuvo ningún efecto en la proliferación de células tumorales, apoptosis o migración *in vitro*. Sin embargo, para abordar la posibilidad de que la reducción de la metástasis se debiera a los efectos del Anti Nrp2^B en células tumorales, los inventores también evaluaron el efecto del Anti Nrp2^B en el modelo de glioblastoma de rata C6. Estas células no expresan Nrp2 en su superficie en un grado apreciable (Figura 6E), expresan VEGFC y se cree que metastatizan al pulmón mediante el sistema linfático (Bernstein y Woodard, 1995). Adicionalmente, se han modificado por ingeniería genética para expresar beta galactosidasa, lo que puede usarse como un marcador para facilitar la detección de células tumorales.

- 10 El trasplante subcutáneo de estas células en ratones desnudos dio como resultado el desarrollo uniforme de tumores y metástasis pulmonar. El tratamiento con Anti Nrp2^B no afectó a la velocidad de crecimiento primaria de estos tumores (Figura 6A). Adicionalmente, el VEGFR3 ECD no redujo drásticamente la velocidad de crecimiento tumoral primario en este modelo tumoral. Esto permitió comparar los efectos antimetastásicos de VEGFR3 ECD y Anti Nrp2. De nuevo, se sacrificó una cohorte de animales (N=10) con tumores de tamaño similar de todas las ramas de tratamiento y los pulmones se diseccionaron y se inflaron para facilitar el análisis con respecto a nódulos metastásicos. El tratamiento tanto con Anti Nrp2^B como con VEGFR3 ECD, provocó una reducción en el número medio de nódulos metastásicos detectados visualmente por pulmón (Figura 6B, C). La reducción observada con Anti Nrp2^B fue comparable a la vista con VEGFR3 ECD. El análisis de micro CT de los pulmones confirmó estos hallazgos (Figura 6D) y verificó que la amplia mayoría de la metástasis se localizaba en la superficie de los pulmones en todas las ramas del tratamiento. Se confirmó que los nódulos eran lesiones metastásicas por histología en ambos modelos tumorales (Figura 5H y 6G). Adicionalmente, la necropsia general no reveló nódulos en la superficie de otros órganos en ninguno de los modelos tumorales.

- 25 Aunque en la descripción anterior la invención se ha ilustrado con referencia a ciertas realizaciones, no se limita de este modo. De hecho, diversas modificaciones además de las mostradas y descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y pueden quedar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo anti Nrp2B biológicamente activo, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende:

(a) la secuencia de región variable de cadena ligera:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKL
LIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYT
TPPTFGQGGTKVEIK**

y la secuencia de región variable de cadena pesada:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTITSSGIHWVRQAPGKGLE
WVARITPYDGDSTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCARYRGTLFLFDYWGGGTLTVSS**

del anticuerpo YW68.4.2 cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 10A; o

(b) la secuencia de región variable de cadena ligera:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKL
LIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYT
TPPTFGQGGTKVEIK**

y la secuencia de dominio variable de cadena pesada:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTITSSGIHWVRQAPGKGLE
WVARITPYDGDSTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCARYRGRLFLFDYWGGGTLTVSS**

del anticuerpo YW68.4.2.36 cuya secuencia de aminoácidos se muestran en la Figura 10B.

2. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende las secuencias de región variable de cadenas pesada y ligera del anticuerpo YW68.4.2.36 cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 10B.

3. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, que:

- (i) comprende el anticuerpo YW68.4.2 cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 10A o el anticuerpo YW68.4.2.36 cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 10B; o
- (ii) es un fragmento anti Nrp2B biológicamente activo del anticuerpo de (i).

4. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 3, que:

- (i) comprende el anticuerpo YW68.4.2.36 cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 10B; o
- (ii) es un fragmento anti Nrp2B biológicamente activo del anticuerpo de (i).

5. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 4, que es el anticuerpo YW68.4.2.36 cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 10B, o un fragmento del mismo.

6. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es biespecífico.

7. El fragmento de anticuerpo anti Nrp2B de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fab, F(ab')₂ y scFv.

8. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo de cualquier reivindicación anterior, que es quimérico o humanizado.
- 5 9. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 10. Una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de metástasis tumoral que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para uso en un método de tratamiento médico en un sujeto mamífero.
- 15 12. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el sujeto mamífero es un paciente humano.
13. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 12 en donde se ha diagnosticado cáncer a dicho paciente humano.
- 20 14. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para uso en un método para inhibir la linfangiogénesis tumoral en un sujeto mamífero portador de tumor.
- 25 15. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde sujeto mamífero es un paciente de cáncer humano.
16. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 15, en donde dicho paciente humano ha desarrollado o está en riesgo de desarrollar metástasis tumoral.
- 30 17. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para uso en un método de tratamiento terapéutico, profiláctico o preventivo de metástasis tumoral en un paciente de cáncer humano.
- 35 18. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 15 a 17, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino,
- 40 carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, linfoma de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de tricoleucitos; y leucemia mieloblástica crónica.
- 45 19. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde dicha metástasis está en el sistema linfático o en un órgano distante.
20. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, en donde dicho uso comprende además la administración de un anticuerpo antagonista
- 50 anti VEGF.
21. El anticuerpo anti Nrp2B o fragmento de anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicho anticuerpo anti VEGF es bevacizumab.

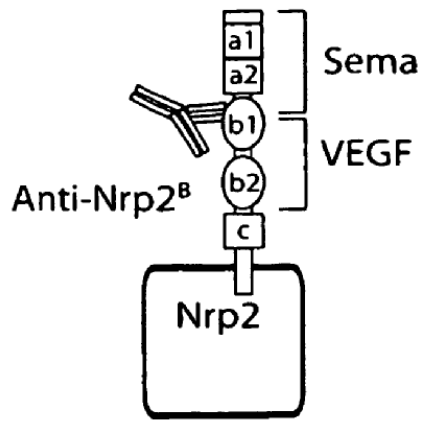


Figura 1A

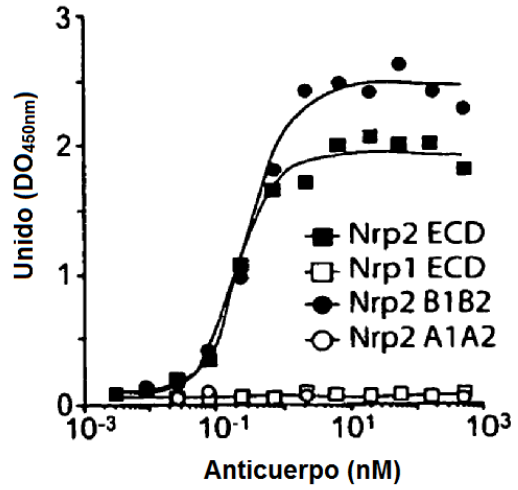


Figura 1B

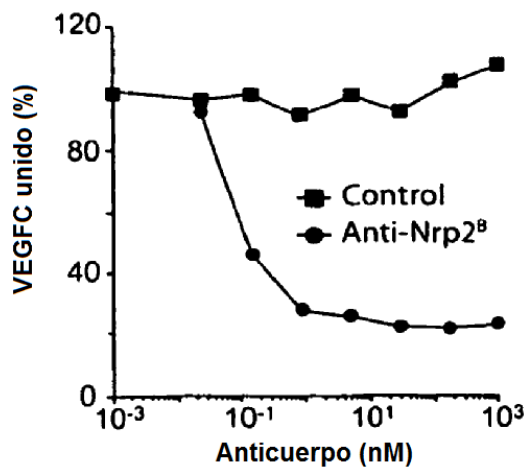


Figura 1C

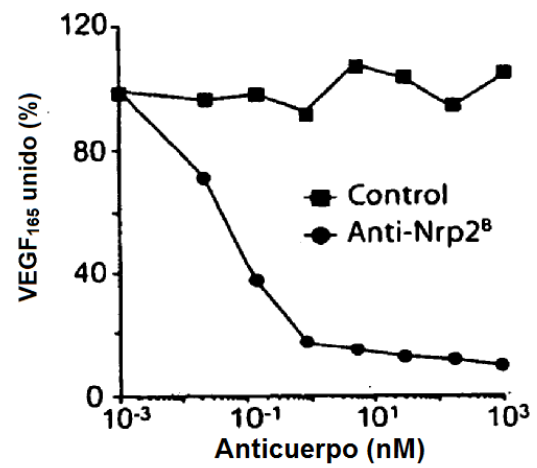


Figura 1D

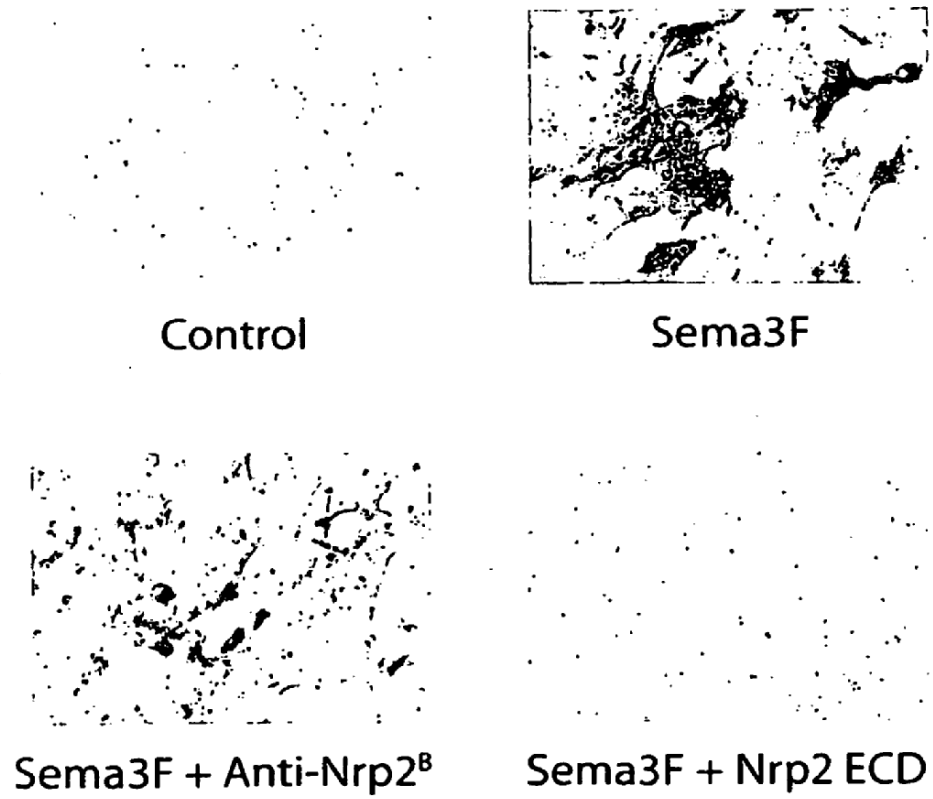


Figura 1E

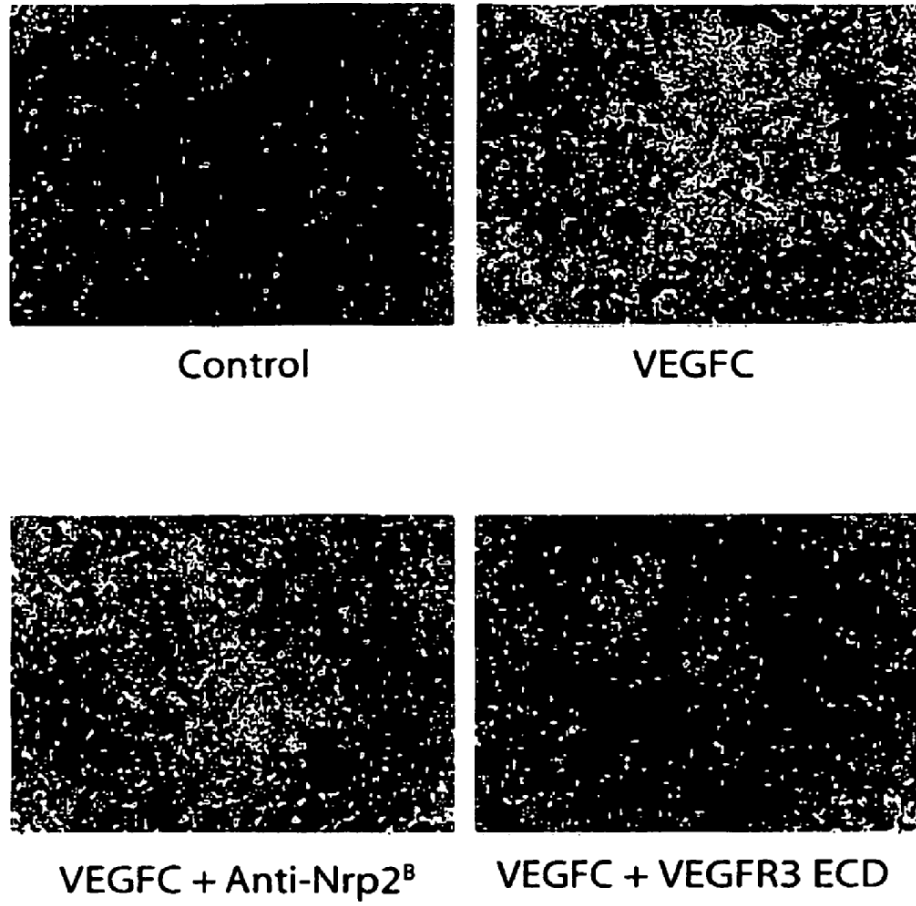


Figura 2A

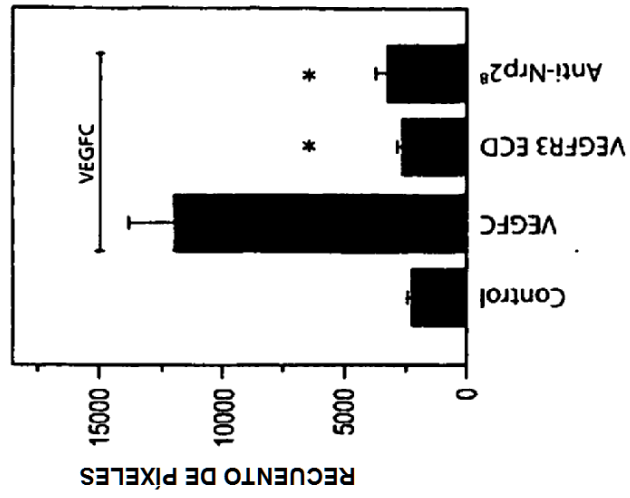


Figura 2D

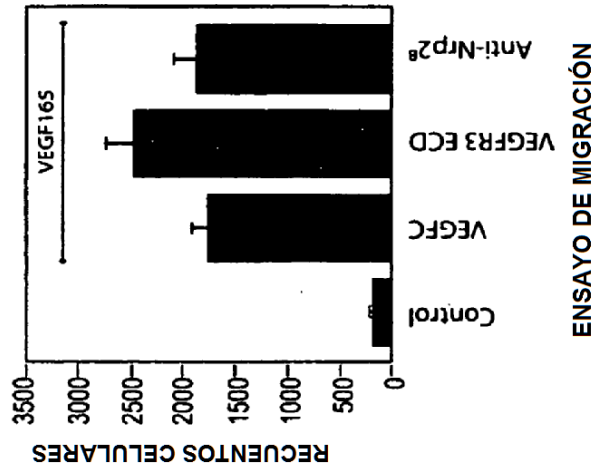


Figura 2C

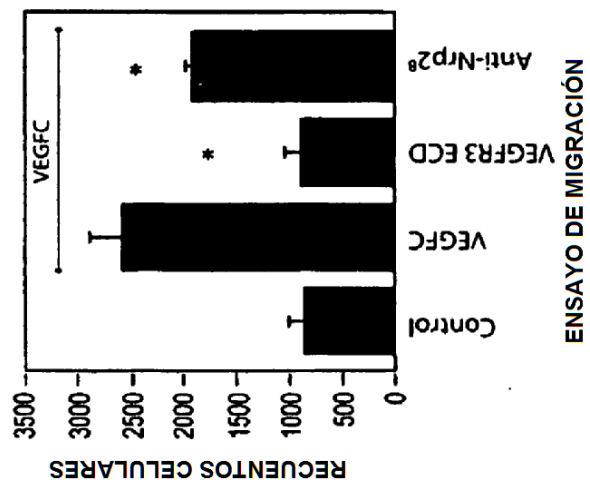


Figura 2B

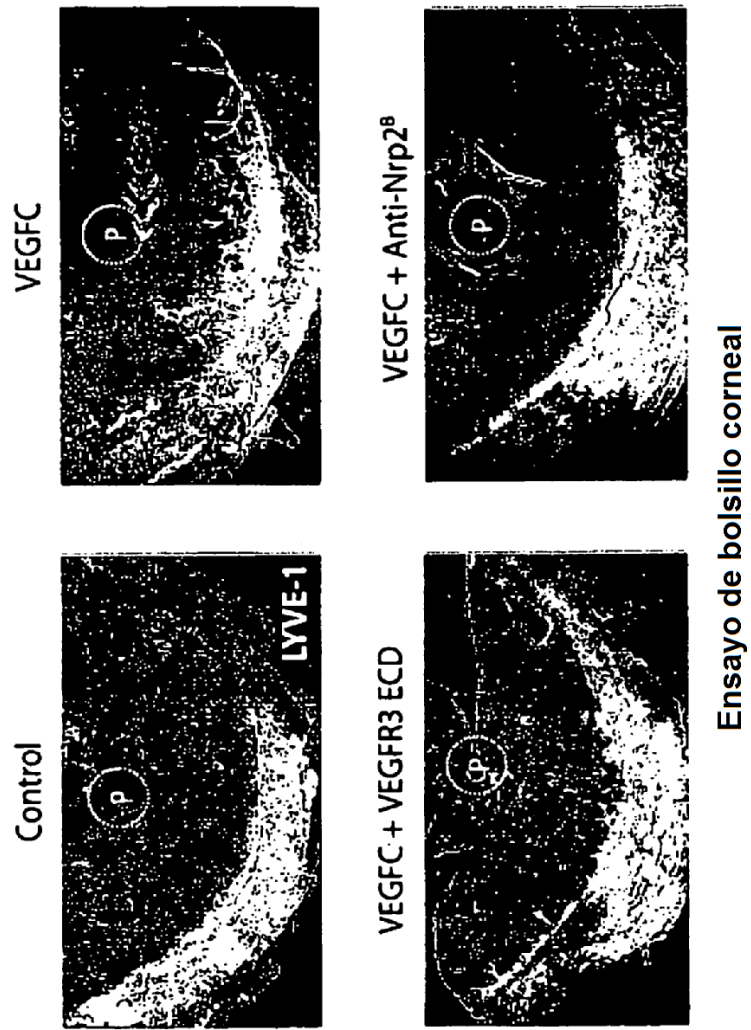


Figura 2E

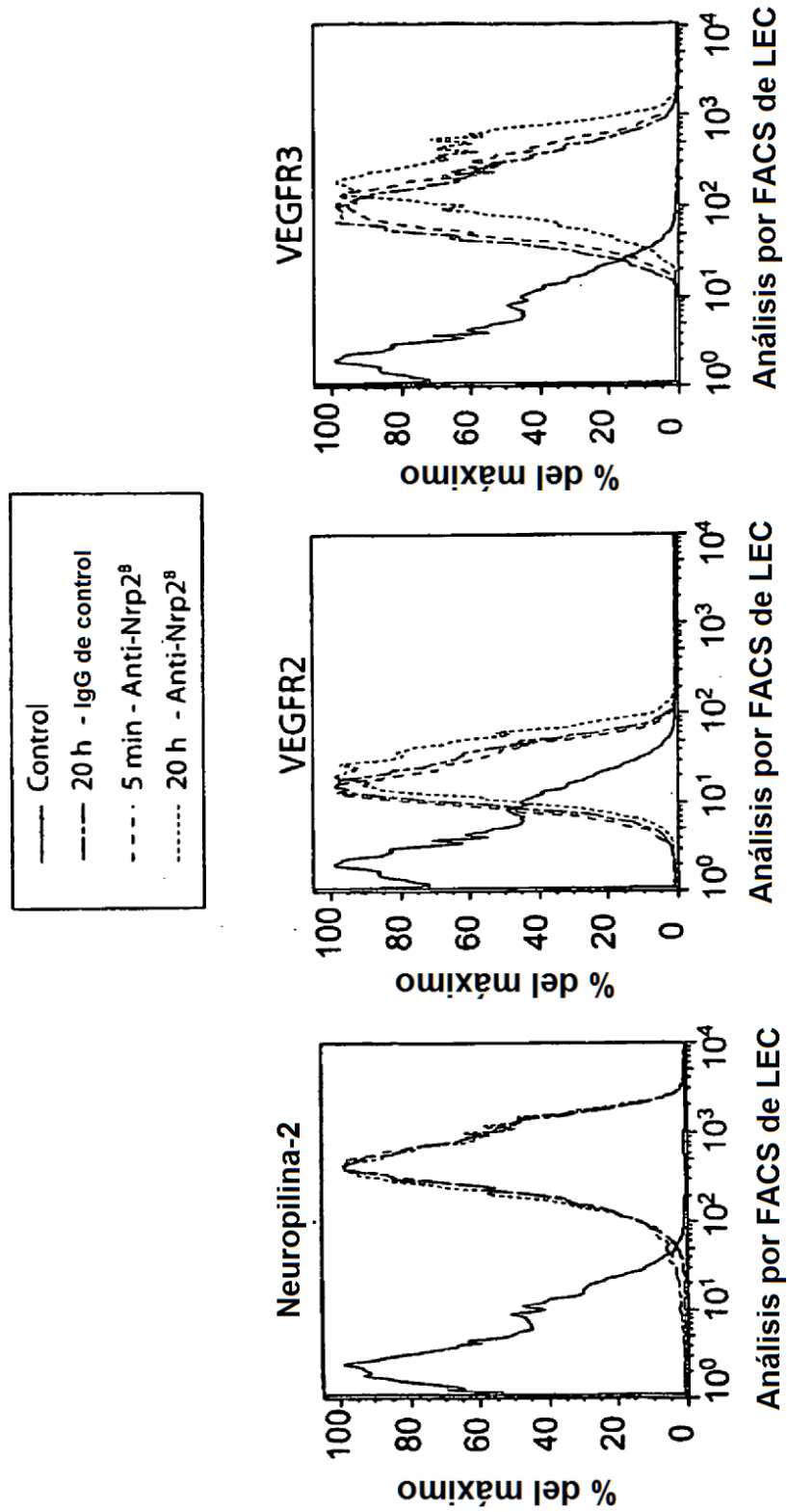


Figura 3A

Figura 3B

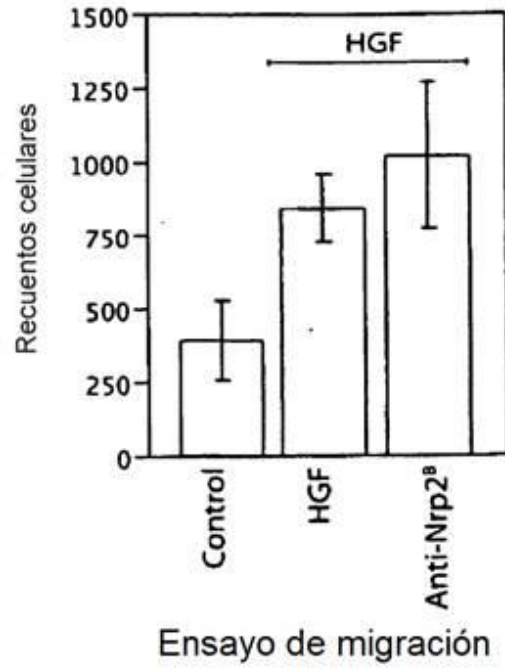


Figura 3C

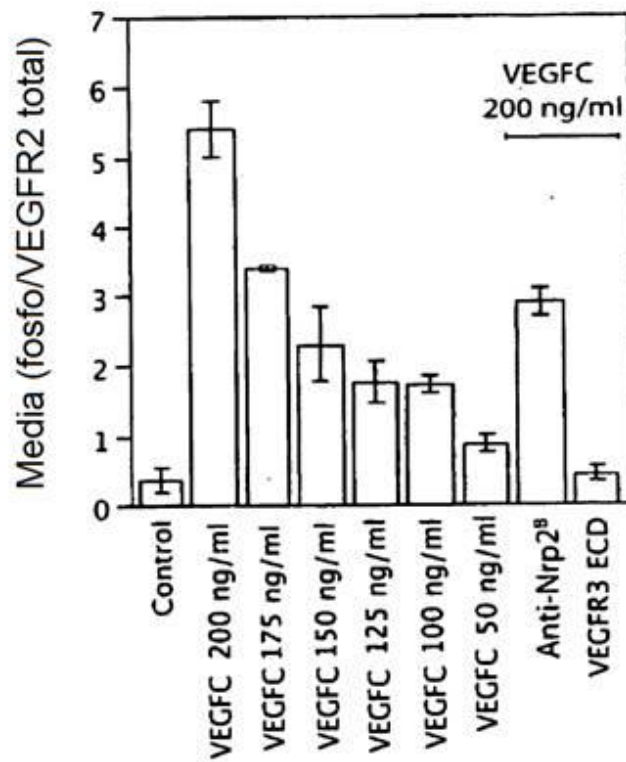
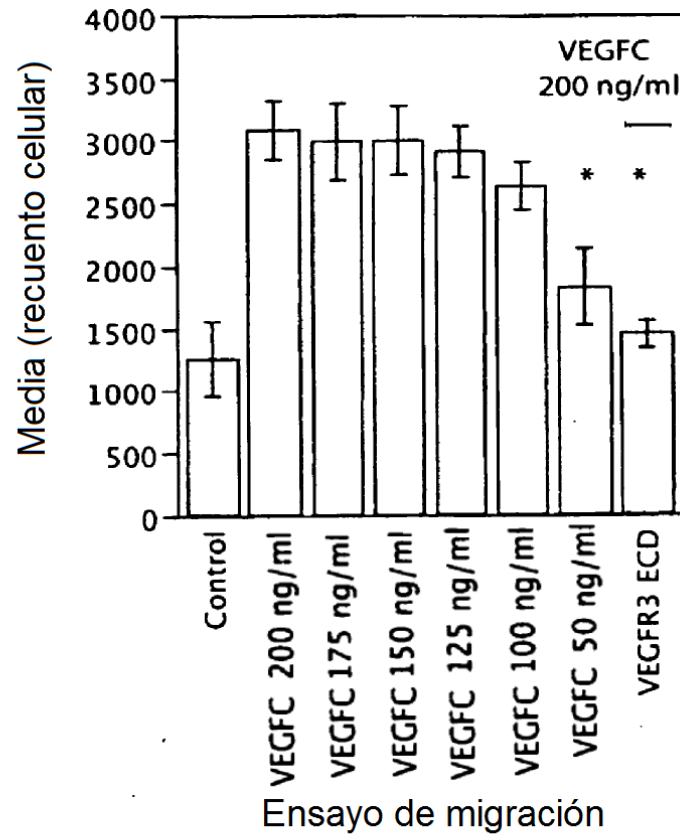


Figura 3D



datos de ensayo de unión Nrp2/VEGFR3
 IP con nrp-2
 transferencia con R3

 Interacción bloqueada por α -Nrp2^AB

Figura 3E

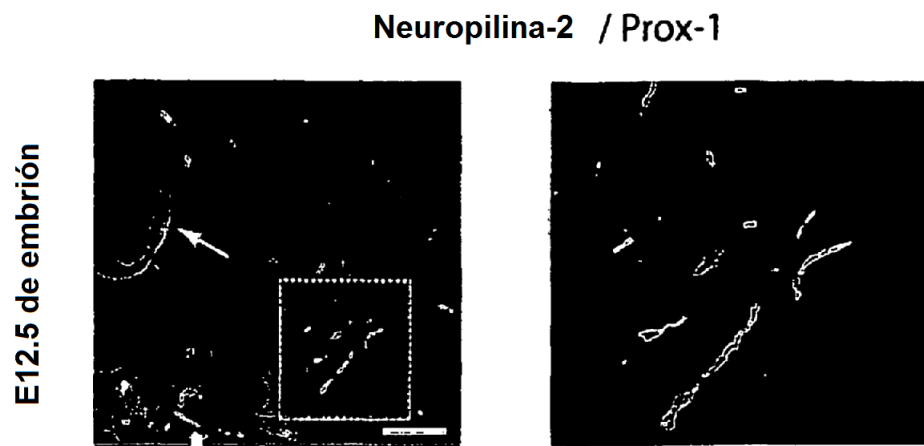
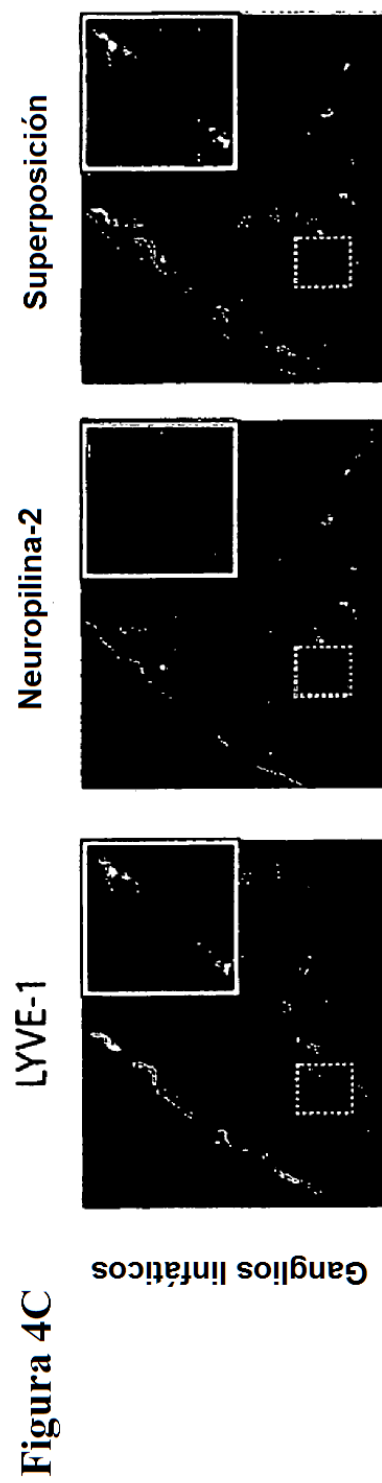
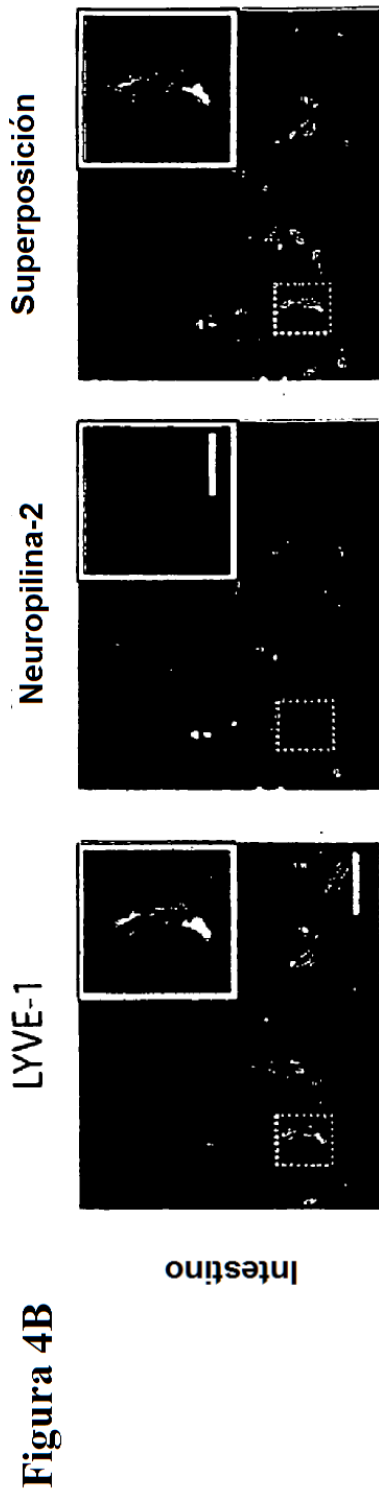
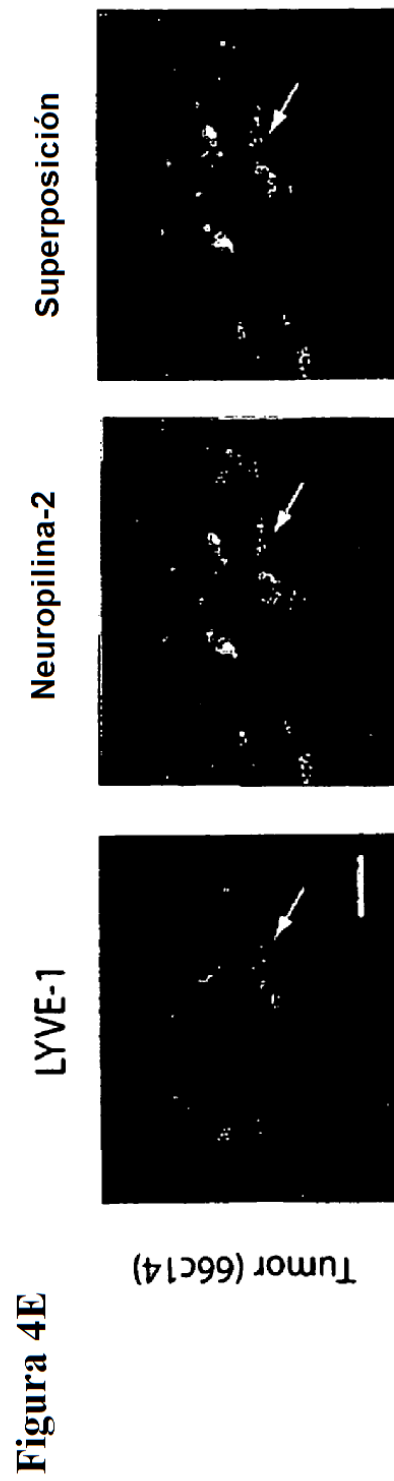
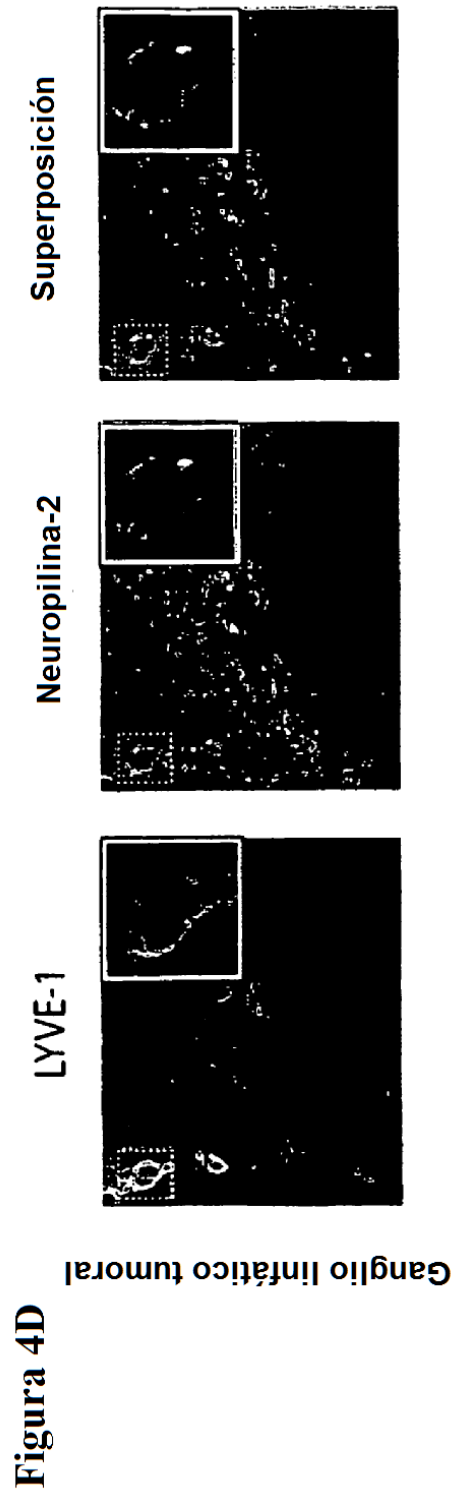


Figura 4A





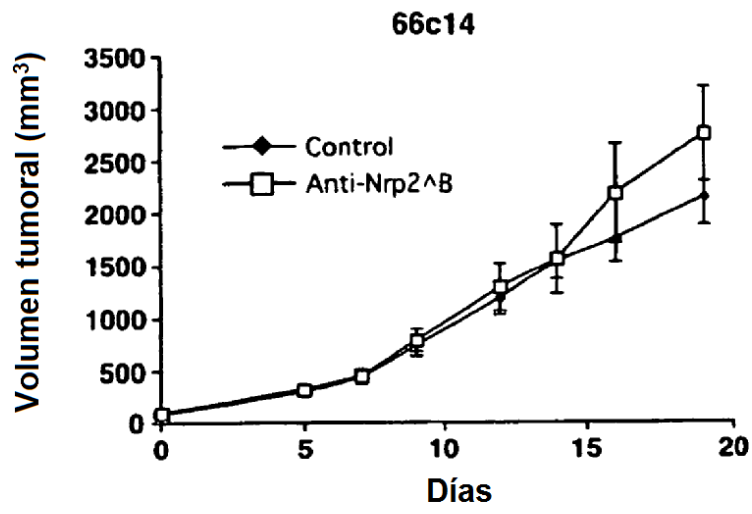


Figura 5A

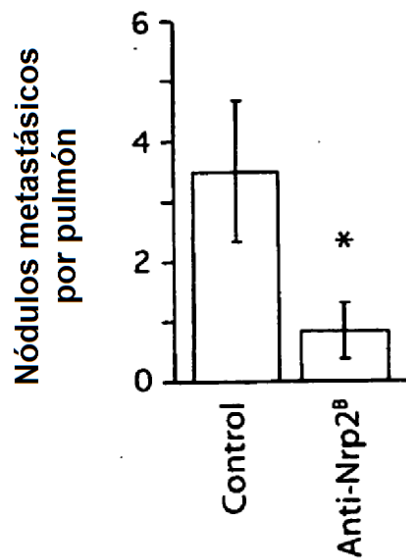


Figura 5B



Figura 5C

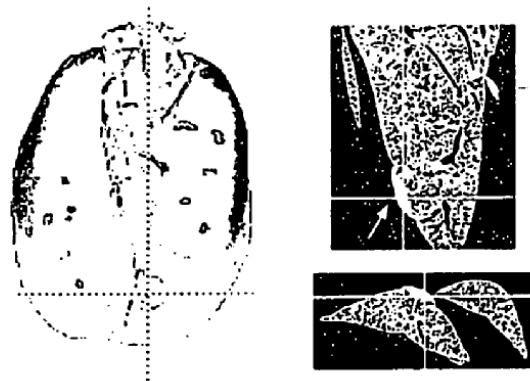


Figura 5D

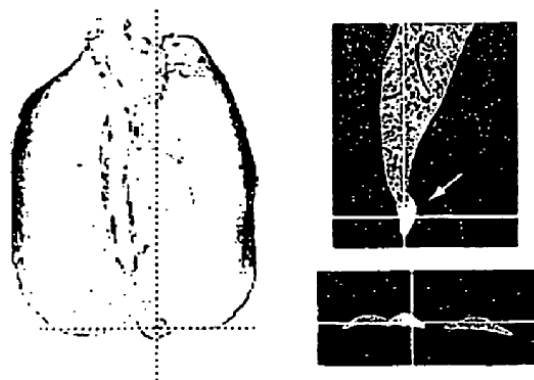


Figura 5E

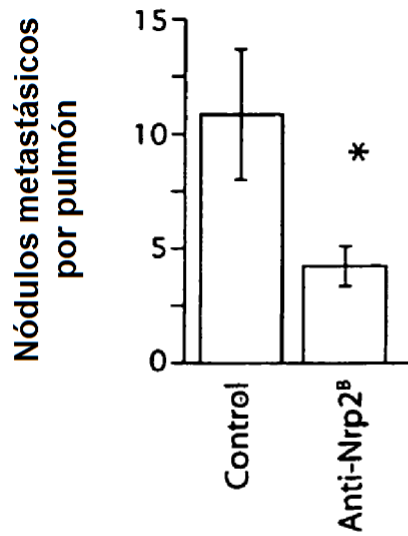


Figura 5F

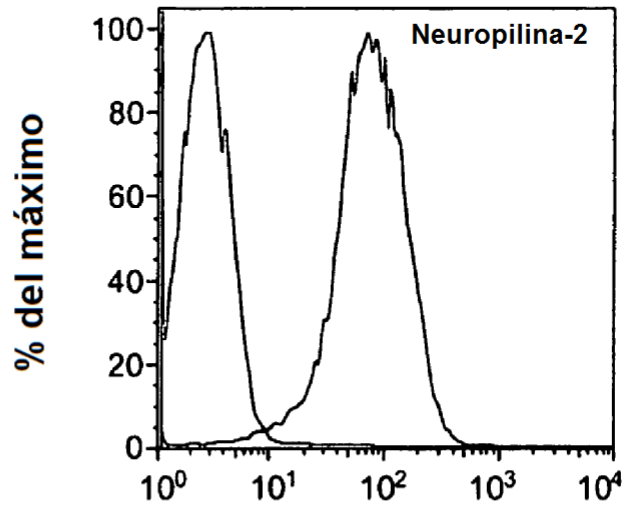


Figura 5G

Análisis por FACS de células tumorales 66c14



Figura 5H

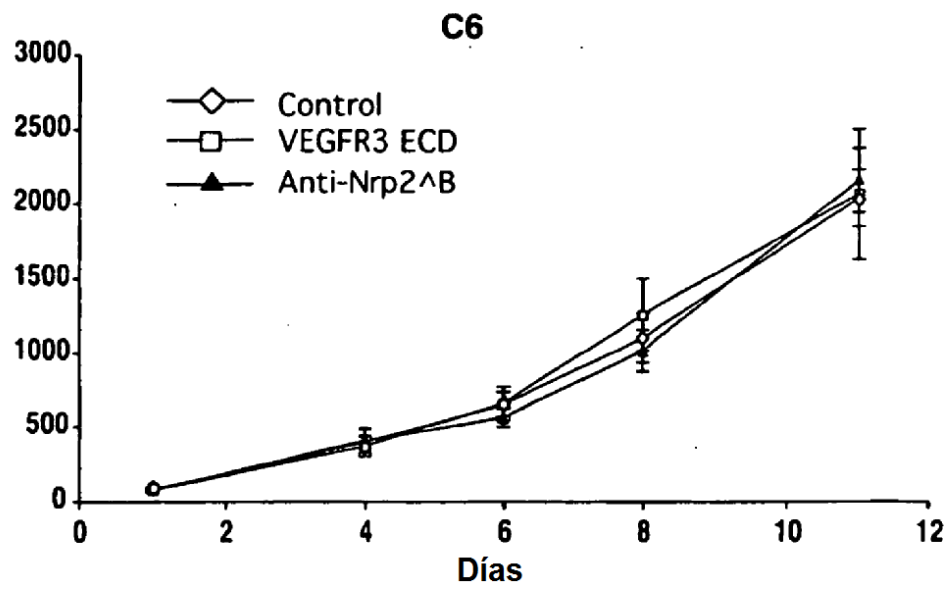


Figura 6A

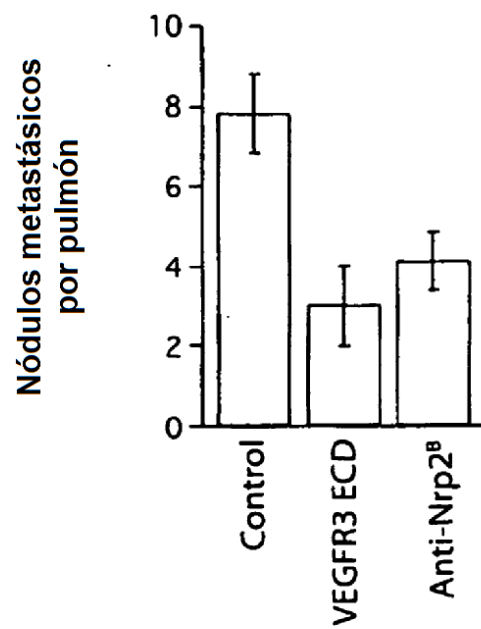


Figura 6B



Figura 6C

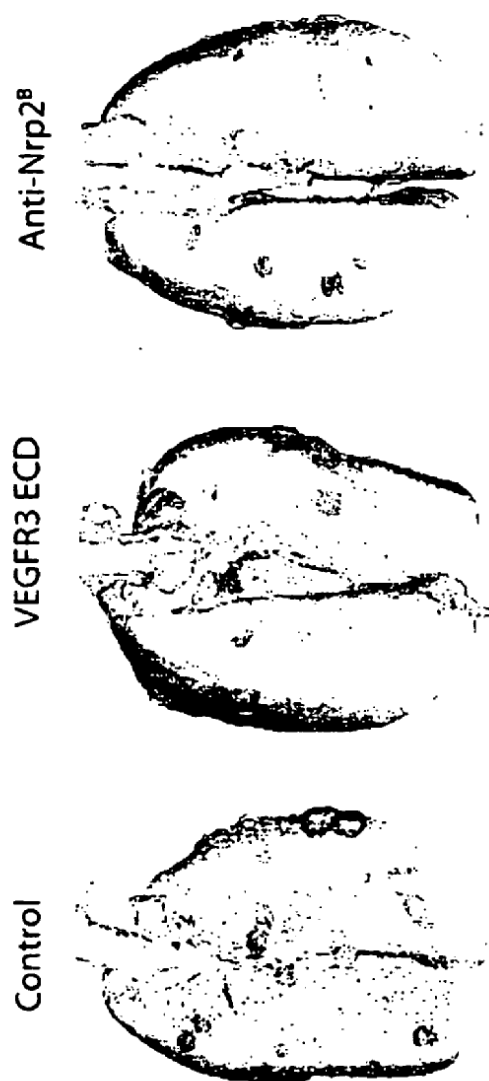


Figura 6D

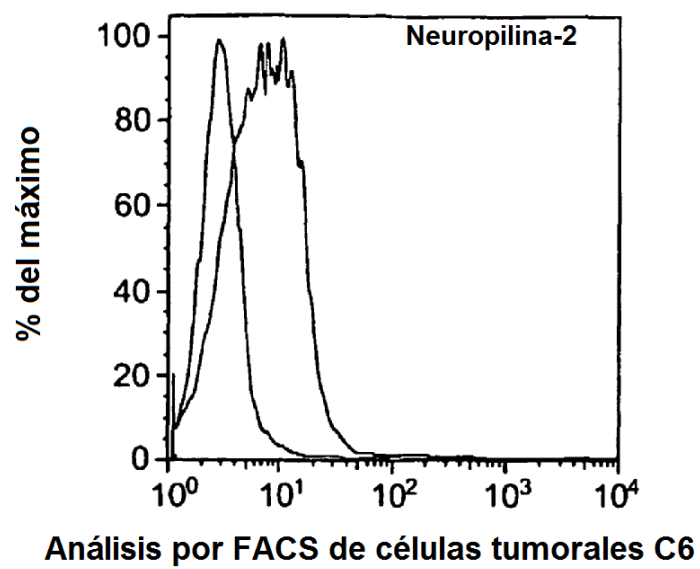


Figura 6E

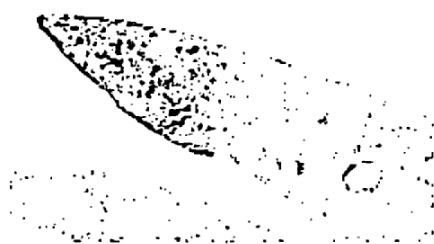
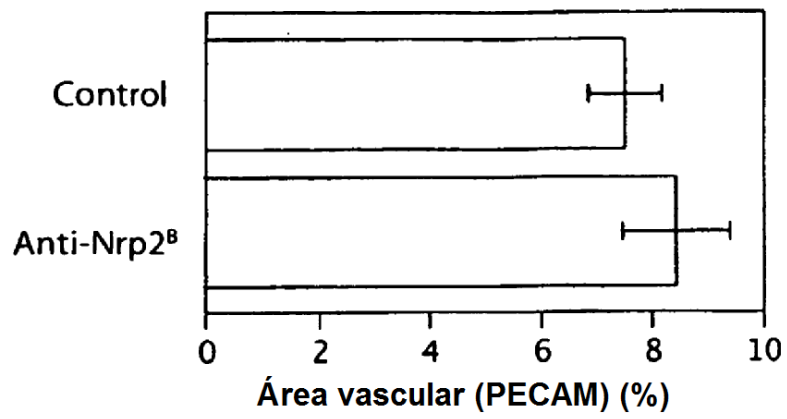
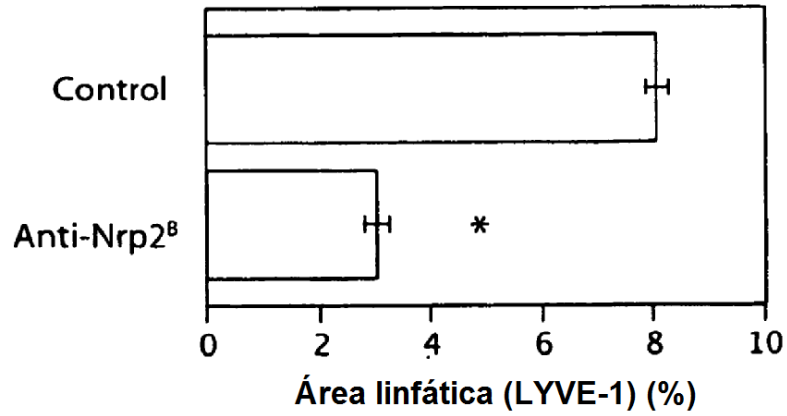


Figura 6F



66c14 - Densidad vascular

Figura 7A



66c14- Densidad linfática

Figura 7B

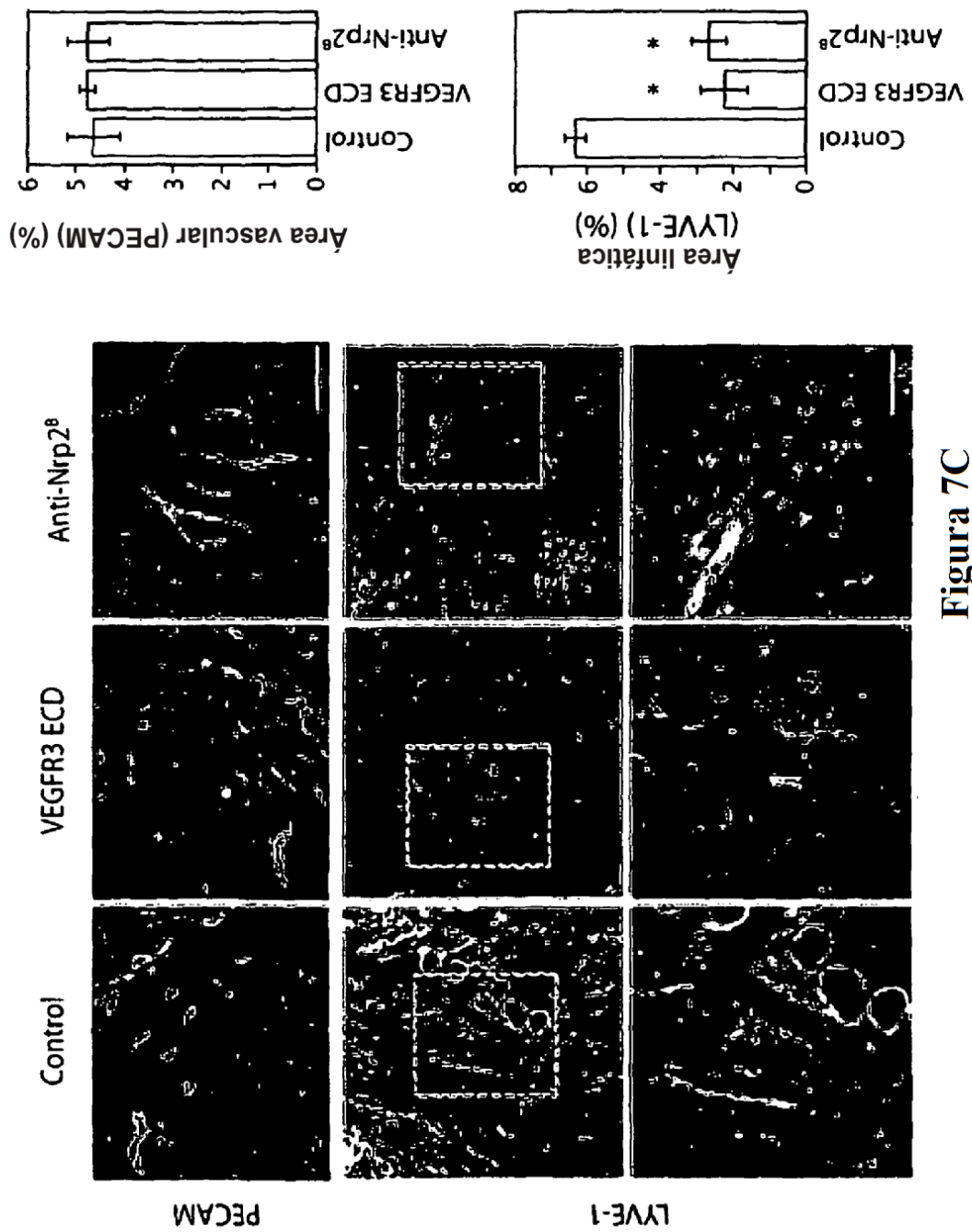


Figura 7C

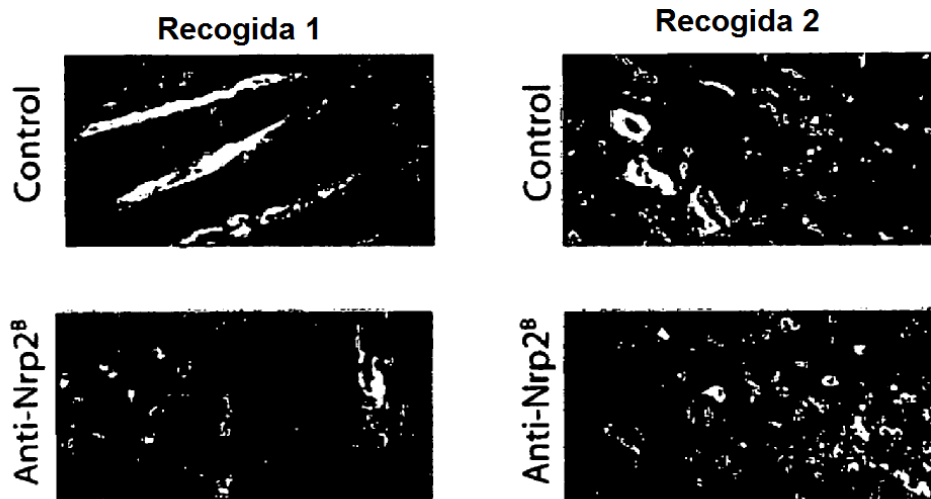
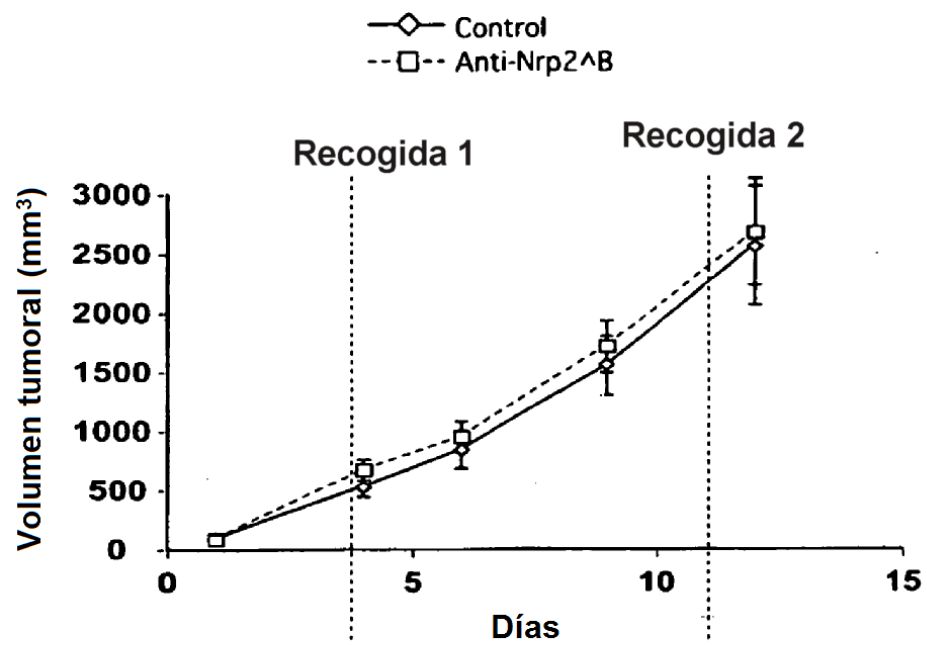


Figura 7D

Figura 8A

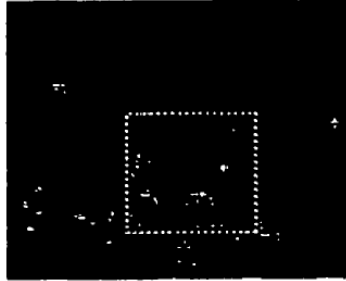


Figura 8B



Figura 8C

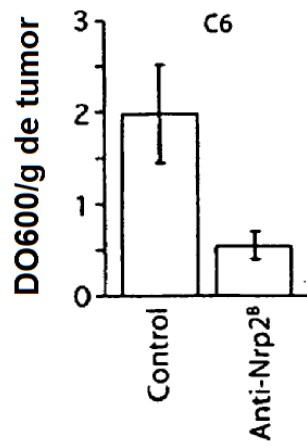


Figura 8D

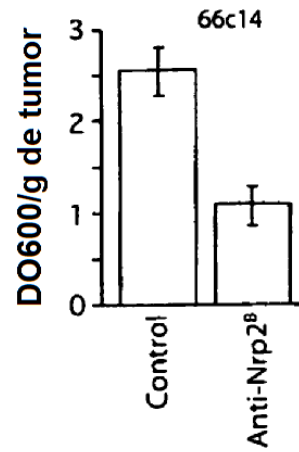
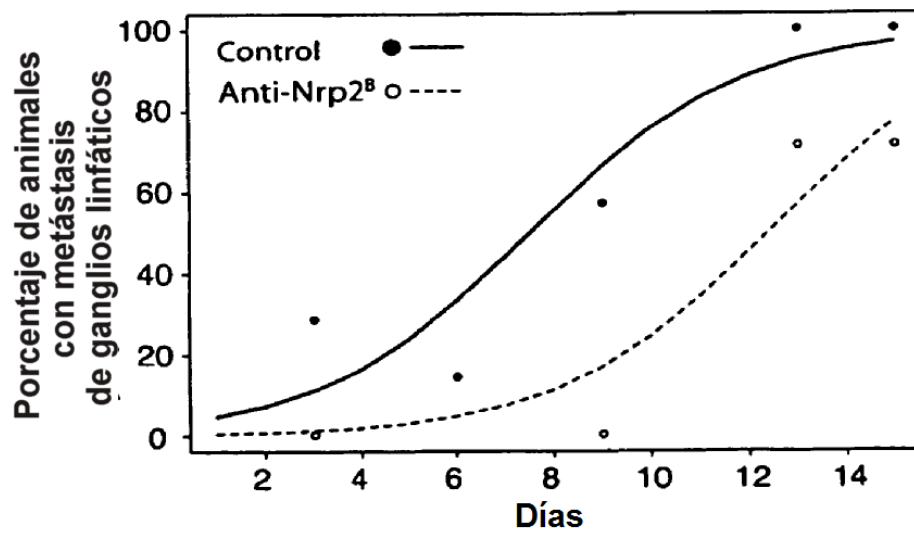


Figura 8E



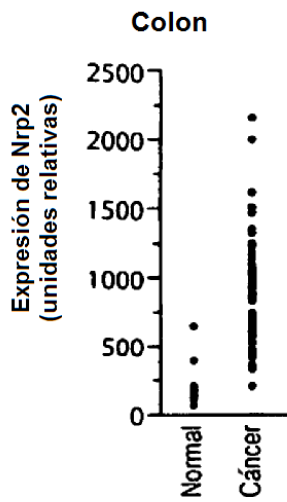


Figura 9A

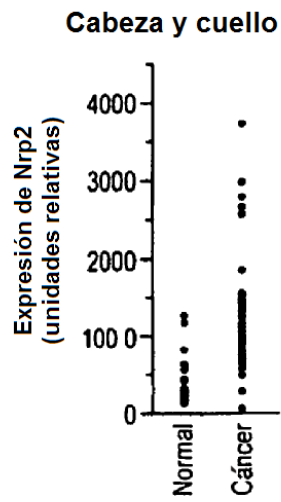


Figura 9B

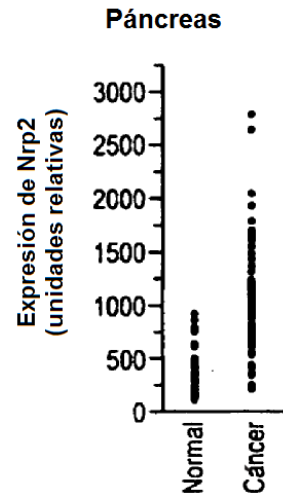


Figura 9C

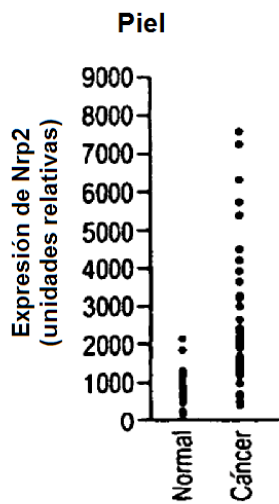


Figura 9D

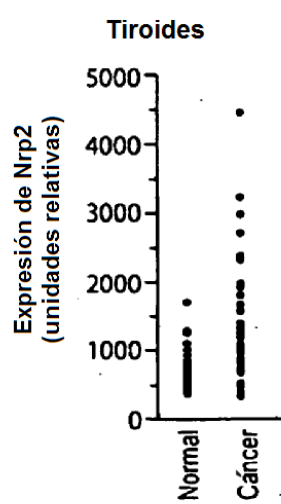


Figura 9E

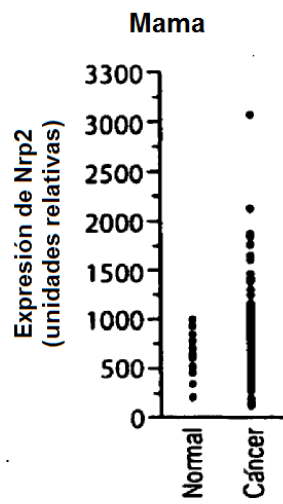


Figura 9F

Archivo de anti-NRP2B YW68.4.2 hlgI PI

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSA
SFLYS¹GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS²SLQPEDFATYYCQOSY³TTFP⁴TFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDS⁵TYSLSS⁶TLT⁷LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGECEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS⁸CAASGFTITSSGIHWVRQAPG
KGLEWVARITPYDGSTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCAR⁹YRG¹⁰TLLFDYWGQGT¹¹LVT¹²VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVT¹³VS¹⁴WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV¹⁵FC¹⁶SVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

Figura 10A

Archivo de anti-NRP2B YW68.4.2.36hlgI PI

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSA
SFLYS¹GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS²SLQPEDFATYYCQOHY³TTFP⁴TFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDS⁵TYSLSS⁶TLT⁷LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGECEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS⁸CAASGFTITSSGIHWVRQAPG
KGLEWVARITPYDGSTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCAR⁹YGR¹⁰LLEFDYWGQGT¹¹LVT¹²VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVT¹³VS¹⁴WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV¹⁵FC¹⁶SVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

Figura 10B

Archivo de anti-NRP2AYW 126.20 hlgGl PI

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLAWYQOKPGKAPKLLIYGAS
 SRASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQORYSYPITFGQGTKV
 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 KSFNRGECEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSRRMSWVRQAPG
 KGLEWVSINPYNGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
 VYYCARSGPGQFGSTGYFDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
 GGTAAAGCLVKLYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
 TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTREVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK

Figura 11

[illegible]

Figura 12

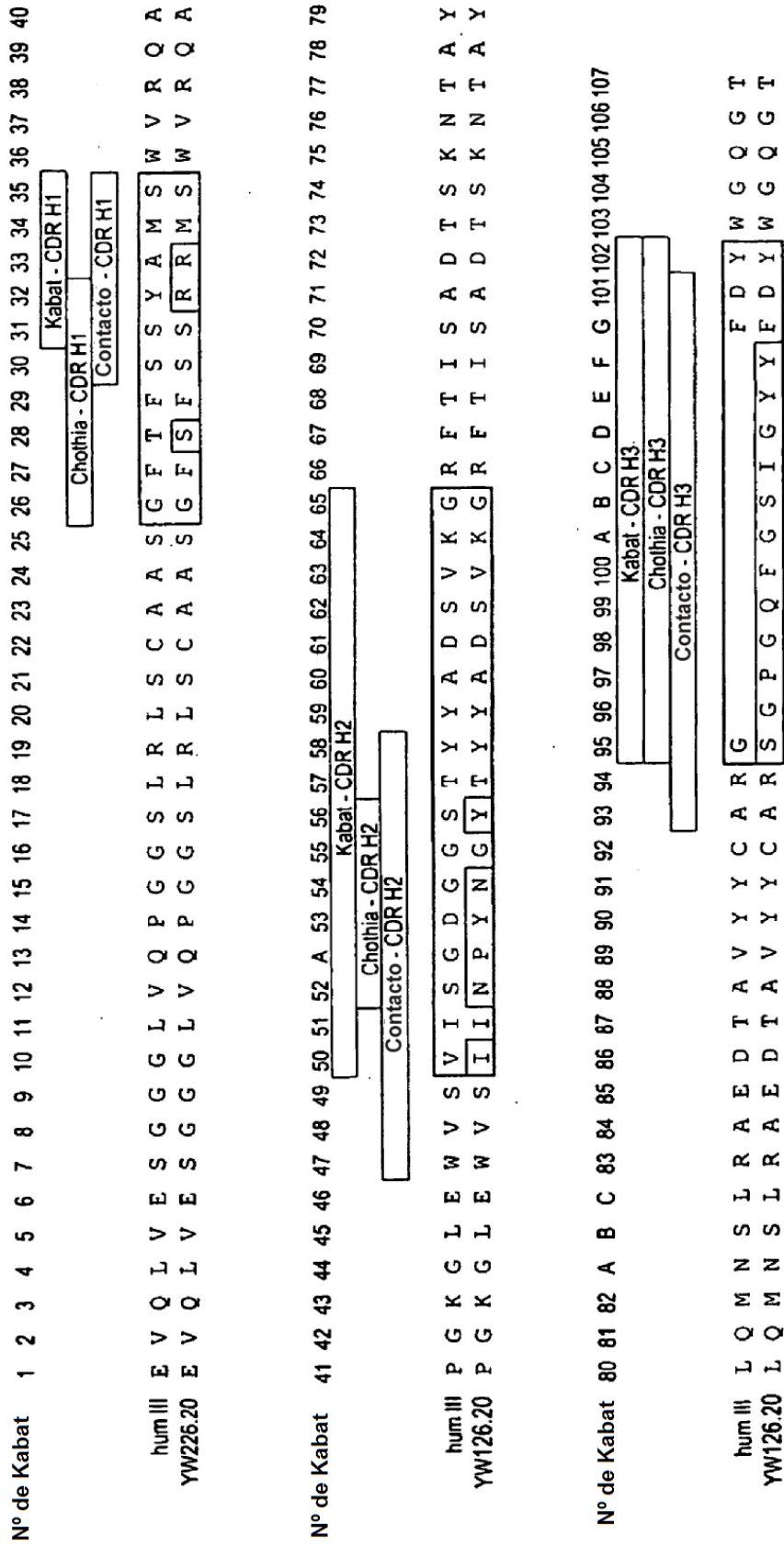
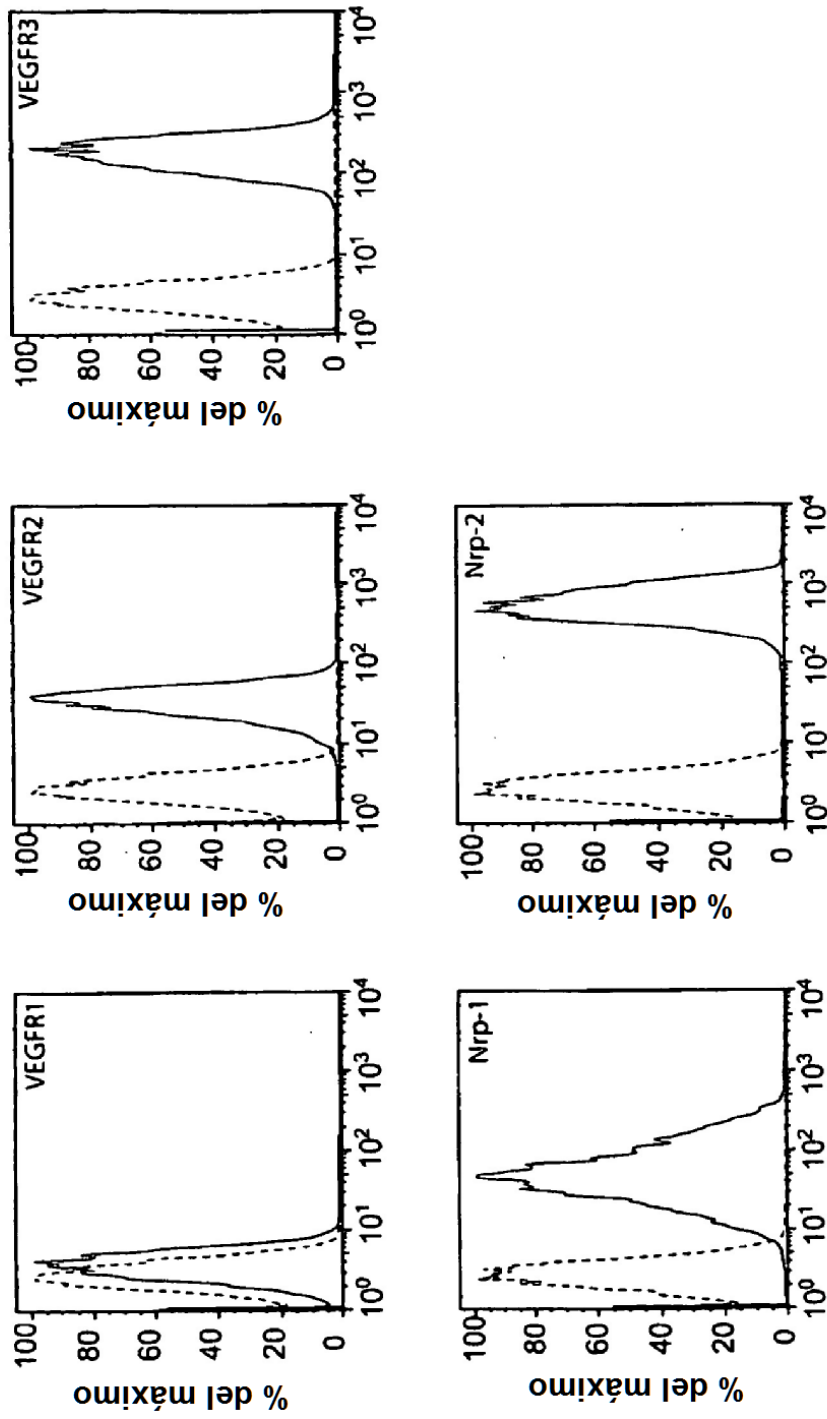


Figura 13



Análisis por FACS de células endoteliales linfáticas

Figura complementaria 1

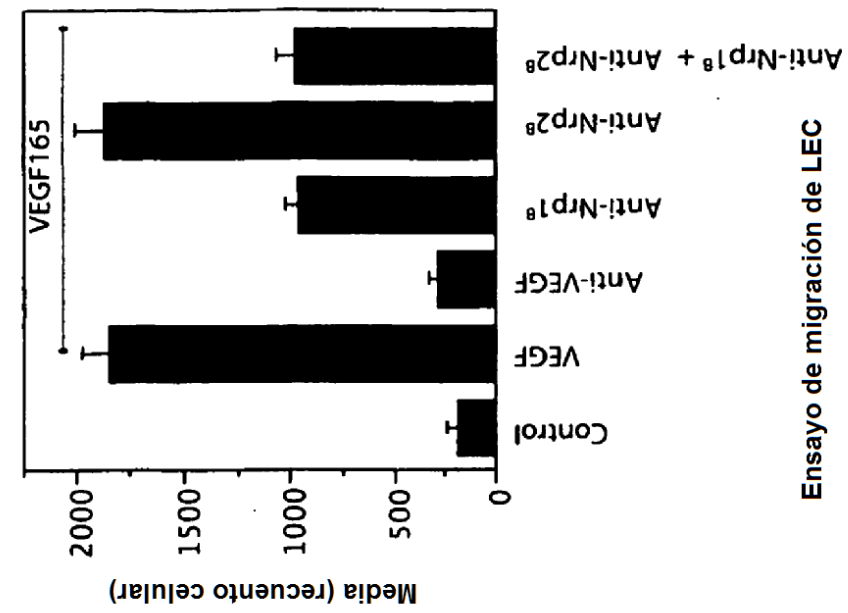


Figura complementaria 2B

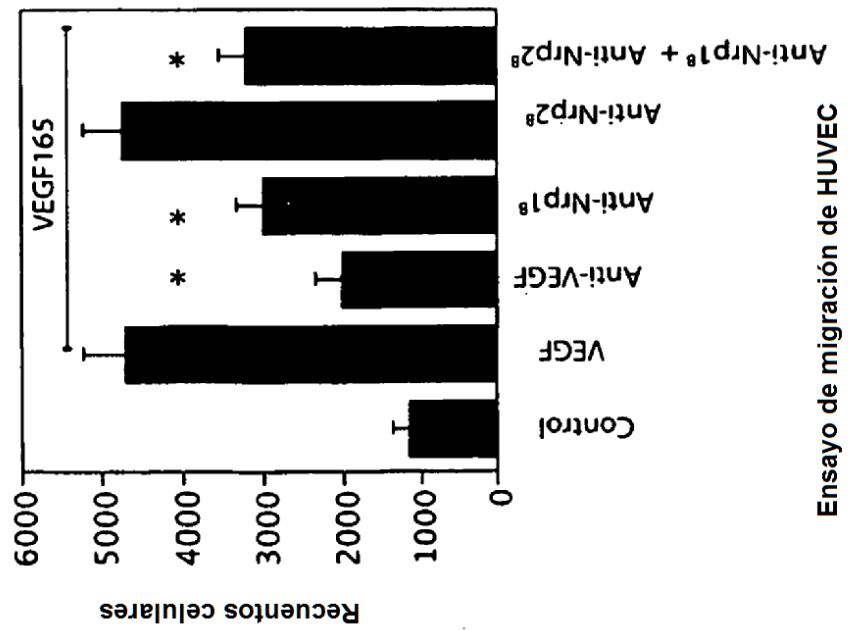


Figura complementaria 2A

Figura complementaria 3A

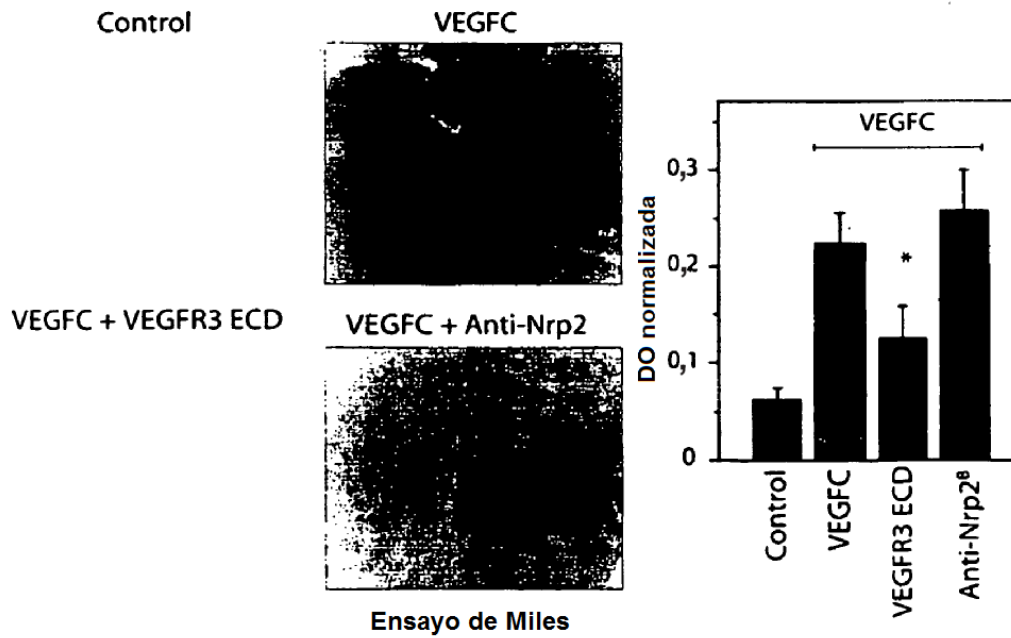
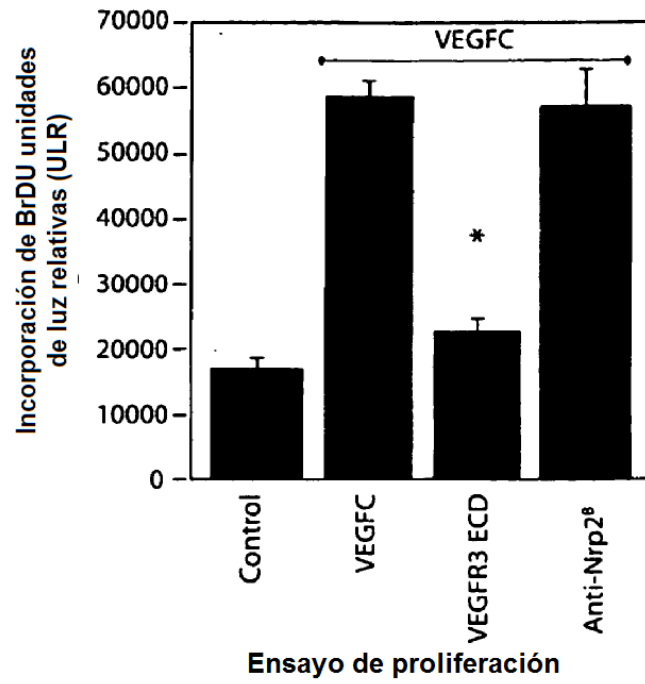


Figura complementaria 3B

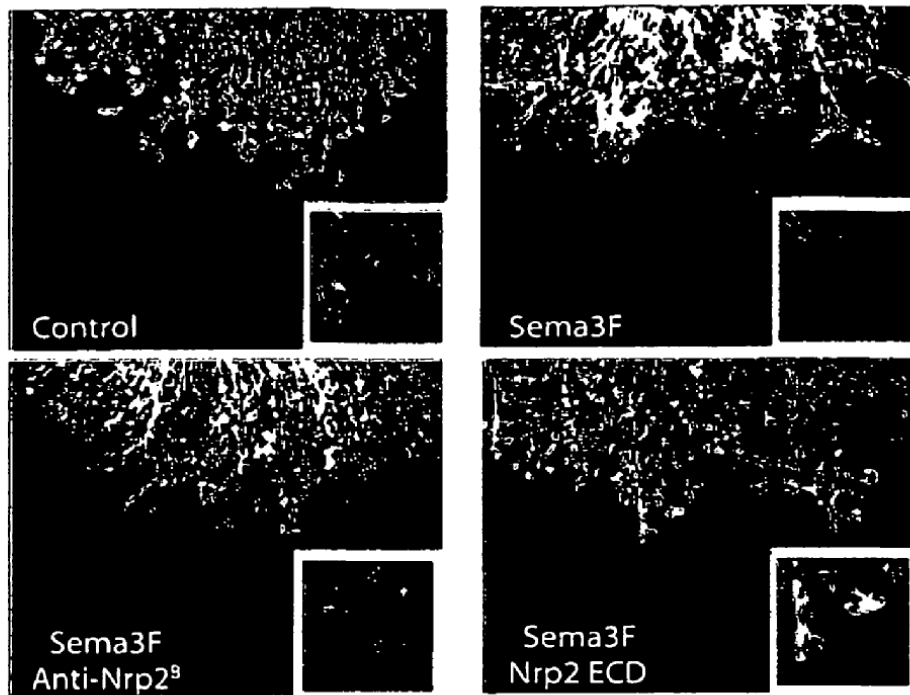


Figura complementaria 4A



Figura complementaria 4B

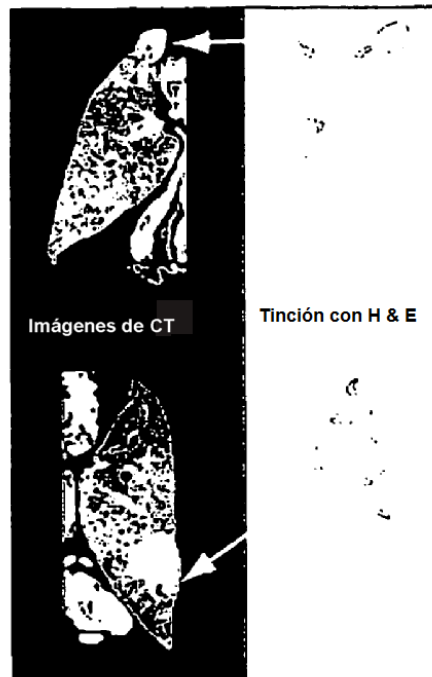


Figura complementaria 5A

Comparación de estimaciones de tumor de pulmón

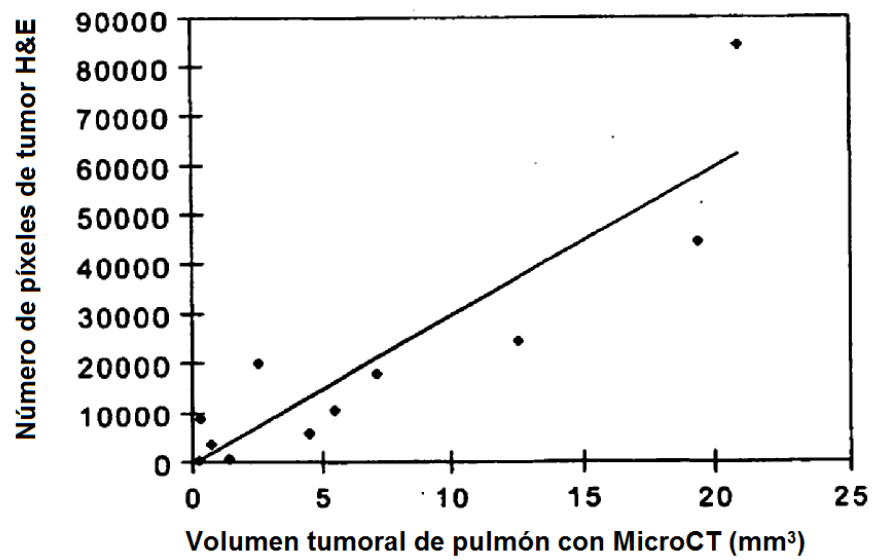


Figura complementaria 5B