

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 051**

51 Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2007 E 07762242 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2158215**

54 Título: **Estructuras cristalinas de fragmentos de neuropilina y complejos neuropilina-anticuerpo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.07.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**APPLETON, BRENT A.;
WIESMANN, CHRISTIAN y
WU, YAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 541 051 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

Estructuras cristalinas de fragmentos de neuropilina y complejos neuropilina-anticuerpo

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona cristales de fragmentos de neuropilina 2 (Nrp2) en complejo con anticuerpos anti-neuropilina. La invención proporciona adicionalmente anticuerpos que se unen a Nrp1 y/o Nrp2 y métodos para su uso.

10

Antecedentes de la invención

El desarrollo de un sistema vascular es un requisito fundamental para muchos procesos fisiológicos y patológicos. Los tejidos de crecimiento activo tales como embriones y tumores requieren un adecuado suministro de sangre. Satisfacen esta necesidad produciendo factores pro-angiogénicos, que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos y el mantenimiento mediante un proceso generalmente mencionado como angiogénesis. La formación vascular es un evento biológico complejo pero metódico que implica todas o muchas de las siguientes etapas: a) proliferan células endoteliales (EC) a partir de EC existentes o se diferencian desde células progenitoras; b) las EC migran y confluyen para formar estructuras tipo cordón; c) los cordones vasculares después experimentan tubulogénesis para formar vasos con un lumen central; d) los cordones o vasos existentes emiten brotes para formar vasos secundarios; e) el plexo vascular primitivo experimenta remodelado y reconformado adicional; y f) se reclutan células peri-endoteliales para revestir los tubos endoteliales, proporcionando mantenimiento y funciones moduladoras a los vasos; incluyendo dichas células pericitos para capilares pequeños, células de músculo liso para vasos más grandes, y células miocárdicas en el corazón. Hanahan, D. *Science* 277:48-50 (1997); Hogan, B. L. y Kolodziej, P. A. *Nature Reviews Genetics*. 3:513-23 (2002); Lubarsky, B. y Krasnow, M. A. *Cell*. 112:19-28 (2003).

Ahora está bien establecido que la angiogénesis está implicada en la patogénesis de una diversidad de 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 inmune de tejido trasplantado de córnea 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), pág. 1625-1710.

En el caso de crecimiento tumoral, la angiogénesis parece ser crucial para la transición de hiperplasia a neoplasia, y para proporcionar nutrición para el crecimiento y 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 desde los lechos capilares disponibles, y puede permanecer "latente" sin crecimiento adicional y diseminación durante un largo periodo de tiempo. Algunas células tumorales después cambian al fenotipo angiogénico para activar las células endoteliales, que proliferan y maduran en nuevos vasos sanguíneos capilares. Estos vasos sanguíneos recién formados no solamente permiten un crecimiento continuado del tumor primario, sino también la diseminación y recolonización de células tumorales metastásicas. Por consiguiente, se ha observado una co-relación entre la densidad de microvasos en secciones tumorales y supervivencia del paciente en cáncer de mama así como en otros tumores varios. 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 están bien comprendidos, pero se cree que la neovascularización de la masa tumoral resulta del balance neto de una multitud de estimuladores e inhibidores de angiogénesis (Folkman, 1995, *Nat Med* 1(1):27-31).

El proceso de desarrollo vascular está estrictamente regulado. Hasta la fecha, una cantidad significativa de moléculas, principalmente factores secretados producidos por células adyacentes, han demostrado regular la diferenciación, proliferación, migración y coalescencia de EC en estructuras tipo cordón. Por ejemplo, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se ha identificado como el factor clave implicado en la estimulación de la angiogénesis y en la inducción de la permeabilidad vascular. Ferrara et al., *Endocr. Rev.* 18:4-25 (1997). El hallazgo de que la pérdida de incluso un único alelo de VEGF provoca letalidad embrionaria apunta hacia un papel irremplazable desempeñado por este factor en el desarrollo y diferenciación del sistema vascular. Además, el VEGF ha demostrado ser un mediador clave de la neovascularización asociada con tumores y trastornos intraoculares. Ferrara et al., *Endocr. Rev. supra*. El ARNm de VEGF se sobreexpresa por la mayoría de los tumores humanos examinados. Berkman et al., *J. Clin. Invest.* 91:153-159 (1993); Brown et al., *Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown et al., *Cancer Res.* 53:4727-4735 (1993); Mattern et al., *Brit. J. Cancer* 73:931-934 (1996); Dvorak et al., *Am. J. Pathol.* 146:1029-1039 (1995).

Además, los niveles de concentración de VEGF en fluidos oculares están altamente correlacionados con la presencia de proliferación activa de vasos sanguíneos en pacientes con retinopatías diabéticas y otras retinopatías

relacionadas con isquemia. Aiello et al., N. Engl. J. Med 331:1480-1487 (1994). Además, estudios han demostrado la localización de VEGF en membranas neovasculares coroideas en pacientes afectados por AMD. Lopez et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:855-868 (1996).

5 Anticuerpos neutralizantes anti-VEGF suprimen el crecimiento de una diversidad de líneas celulares de tumor humano 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 isquémicos de la retina. Adamis et al., Arch. Ophthalmol. 114:66-71 (1996). Por lo tanto, anticuerpos monoclonales anti-VEGF u otros inhibidores de la acción de
10 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 el documento WO98/45331 y el documento 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 quimioterapéutico para tratar cáncer colorrectal metastásico (CRC) y cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC). Y bevacizumab se está investigando en muchos ensayos clínicos en curso para tratar diversas
15 indicaciones cancerosas.

Durante el desarrollo del sistema nervioso, las neuronas envían axones tipo cable que migran sobre largas distancias para alcanzar sus dianas. Véase la revisión de Carmeliet y Tessier-Lavigne (2005) Nature 436:193-200.
20 En la punta principal de un axón en crecimiento está una estructura sensorial de alta motilidad llamada cono de crecimiento. A través de ciclos dinámicos de extensión y retracción de extensiones filopodiales, el cono de crecimiento detecta y evalúa de forma continua una miríada de señales de guía en su entorno espacial, y selecciona de forma precisa una vía correcta para la extensión hacia su diana final.

25 En la pasada década, se han hecho considerables progresos en la comprensión de los mecanismos de guía de axones. Véase la revisión de Dickson (2002) Science 298:1959-64. Las señales de guía se presentan en cuatro variedades: atrayentes y repelentes; que pueden actuar en corto alcance (es decir, asociadas a células o matriz) o en largo alcance (es decir, difusible). Hasta ahora, se han identificado cuatro familias principales de moléculas guía de axones: las netrinas, semaforinas, efrinas y slits. Véase la revisión de Huber et al (2003) Annu Rev Neurosci
30 26:509-63.

Las semaforinas (Sema) también llamadas colapsinas, pertenecen una gran familia de proteínas secretadas filogenéticamente conservadas y asociadas a membrana. Los miembros de la familia de semaforina son capaces de mediar eventos de guía de axones tanto repulsivos como atrayentes durante el desarrollo neural. Raper (2000) Curr Opin Neurobiol 10:88-94. Las más de treinta semaforinas identificadas hasta la fecha comparten todas un dominio Sema N-terminal conservado de aproximadamente 500 aminoácidos. Los miembros de semaforina se clasifican en ocho subfamilias dependiendo de sus similitudes estructurales y especie de origen. Para más detalles sobre la nomenclatura unificada para las semaforinas, véase Semaphorin Nomenclature Committee (1999) Cell 97:551-552.
35

40 La familia de neuropilina (NRP) está compuesta por dos proteínas homólogas, neuropilina-1 (NRP1) y neuropilina-2 (NRP2). La NRP1 se identificó por primera vez como una glucoproteína transmembrana de 130 kDa de tipo I expresada en conos de crecimiento de axones en crecimiento. La NRP2 se identificó posteriormente por clonación de expresión. Fujisawa y Kitsukawa (1998) Curr Opin Neurobiol 8:587-592. Se descubrió que las NRP son receptores para un subconjunto de semaforinas, las semaforinas de clase 3. Se sugirió que las NRP funcionan como
45 co-receptores no de señalización junto con otra familia de receptores de semaforina, las plexinas.

Aunque se describieron inicialmente como un mediador de la guía de axones, también se ha descubierto que las NRP desempeñan papeles críticos en el desarrollo vascular. Carmeliet y Tessier-Lavigne (2005). Se identifica como un receptor de VEGF específico de isoforma expresado en células tumorales y endoteliales, provocando esfuerzos considerables para comprender el papel de las NRP en biología vascular y tumoral. Soker et al (1998) Cell 92:735-745; Klagsbrun et al (2002) Adv Exp Med Biol 515:33-48. Estudios genéticos han proporcionado fuertes evidencias de que *Nrp1* es necesaria para la morfogénesis vascular. La pérdida de función *Nrp1* provoca remodelado vascular y defectos de ramificación, un fenotipo que puede potenciarse adicionalmente por la pérdida de función *Nrp2*. Kawasaki et al. (1999) Development 126:4895-4902; Takashima et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:3657-3662.
50 Estos resultados sugieren que de forma prematura en el desarrollo *Nrp1* y *Nrp2* pueden tener funciones solapantes. Sin embargo, la expresión de cada *Nrp* se reparte posteriormente en el desarrollo, expresándose *Nrp1* principalmente en arterias, y *Nrp2* en venas y vasos linfáticos. Yuan et al (2002) Development 129:4797-4806; Herzog et al. (2001) Mech Dev 109:115-119. De forma notable, la pérdida de función *Nrp2* en solitario altera específicamente el desarrollo linfático.
55

60 Como *Nrp1* se expresa en muchos otros tipos celulares durante el desarrollo, se abordó el papel de *Nrp1* vascular a través de la generación de un knock-out específico de EC, que provocó defectos vasculares similares a los observados en el alelo nulo. Gu et al. (2003) Dev Cell 5:45-57. De forma interesante, este estudio también demostró que la unión de Sema3A a NRP1 no es necesaria para el desarrollo vascular. En otro estudio, se observaron defectos en la guía de célula de la punta endotelial en el desarrollo del rombencéfalo en embriones *Nrp1* KO. Gerhardt et al. (2004) Dev Dyn 231:503-509.
65

A pesar de los estudios extensivos en el papel de NRP1 en el desarrollo vascular, sigue sin estar claro si NRP1 ejerce su función vascular exclusivamente mediante la vía VEGF-receptor de VEGF (VEGFR2), como un potenciador para la unión de VEGF a VEGFR2 y de ese modo para la señalización de VEGFR2, o mediante una vía de señalización independiente de VEGFR2, o una combinación de ambas.

5 Pueden fabricarse anticuerpos monoclonales usando tecnología de ADN recombinante. Se ha hecho un uso extensivo de los anticuerpos monoclonales, particularmente aquellos derivados de roedores, sin embargo los anticuerpos no humanos son frecuentemente antigénicos en seres humanos. La técnica ha intentado superar este problema construyendo anticuerpos "quiméricos" en que se acopla un dominio de unión a antígeno no humano a un dominio constante humano (Cabilly et al., patente de Estados Unidos N° 4.816.567). El isotipo del dominio constante humano puede seleccionarse para adaptar el anticuerpo quimérico para su participación en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento. En un esfuerzo adicional por resolver las funciones de unión a antígeno de los anticuerpos y minimizar el uso de secuencias heterólogas en anticuerpos humanos, se han generado anticuerpos humanizados para diversos antígenos en que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto en regiones por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Por ejemplo, se ha sustituido restos de roedor por los segmentos correspondientes de un anticuerpo humano. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en que algunos restos de la región determinante de complementariedad (CDR) y posible algunos restos de la región flanqueante (FR) están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536.

Antes de la administración de un anticuerpo terapéutico a un ser humano, generalmente se desean estudios preclínicos en mamíferos no humanos para evaluar la eficacia y/o toxicidad del anticuerpo. De forma ideal, los anticuerpos objeto para estos estudios son capaces de reconocer y reaccionar con alta potencia con un antígeno diana endógeno al animal hospedador tal como ratón o primate no humano.

La tecnología de presentación en fagos ha proporcionado una herramienta poderosa para generar y seleccionar nuevas proteínas que se unen a un ligando, tal como un antígeno. Usando la técnica de presentación en fagos, pueden generarse grandes bibliotecas de variantes proteicas y clasificarse rápidamente para aquellas secuencias que se unen a un antígeno diana con alta afinidad. Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos variantes se fusionan con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de envuelta vírica, tal como la proteína del gen III o la proteína del gen VIII. Se han desarrollado sistemas de presentación en fagos monovalentes donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o polipéptido se fusiona a una secuencia de ácido nucleico que codifica una parte de la proteína del gen III. (Bass, S. (1990) Proteins 8:309; Lowman y Wells (1991) Methods: A Companion to Methods in Enzymology 3:205). En un sistema de presentación en fagos monovalente, la fusión génica se expresa a bajos niveles y también se expresan proteínas del gen III de tipo silvestre de modo que se retiene la infectividad de las partículas. Se han descritos los métodos para generar bibliotecas de péptidos y explorar esas bibliotecas en muchas patentes (por ejemplo, patente de Estados Unidos N° 5.723.286, patente de Estados Unidos N° 5.432.018, patente de Estados Unidos N° 5.580.717, patente de Estados Unidos N° 5.427.908 y patente de Estados Unidos N° 5.498.530).

La demostración de la expresión de péptidos sobre la superficie de fagos filamentosos y la expresión de fragmentos de anticuerpos funcionales en el periplasma de *E. coli* fue importante en el desarrollo de bibliotecas de presentación de anticuerpos en fagos. (Smith et al. (1985) Science 228:1315; Skerra y Pluckthun (1988) Science 240:1038). Las bibliotecas de anticuerpos o polipéptidos de unión a antígeno se han preparado de varios modos incluyendo alteración de un único gen insertando secuencias de ADN aleatorias o clonando una familia de genes relacionados. Se han descrito métodos para presentar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno usando presentación en fagos en las patentes de Estados Unidos N° 5.750.373, 5.733.743, 5.837.242, 5.969.108, 6.172.197, 5.580.717, y 5.658.727. La biblioteca después se explora para la expresión de anticuerpos o proteínas de unión a antígeno con características deseadas.

La tecnología de presentación en fagos tiene varias ventajas sobre los métodos convencionales de hibridoma y recombinantes para preparar anticuerpos con las características deseadas. Esta tecnología permite el desarrollo de grandes bibliotecas de anticuerpos con diversas secuencias en menos tiempo y sin el uso de animales. La preparación de hibridomas o la preparación de anticuerpos humanizados pueden requerir fácilmente varios meses de preparación. Además, como no se requiere inmunización, pueden generarse bibliotecas de anticuerpos en fagos para antígenos que son tóxicos o tienen baja antigenicidad (Hogenboom (1988) Immunotechniques 4:1-20). Las bibliotecas de anticuerpos en fagos también pueden usarse para generar e identificar nuevos anticuerpos terapéuticos.

Las bibliotecas de presentación en fagos se han usado para generar anticuerpos humanos a partir de seres humanos inmunizados, no inmunizados, secuencias de la línea germinal, o repertorios de Ig de células B vírgenes (Barbas y Burton(1996) Trends Biotech 14:230; Griffiths et al. (1994) EMBO J. 13:3245; Vaughan et al. (1996) Nat. Biotech. 14:309; Winter documento EP 0368 684 B1). Se han generado bibliotecas de unión a antígeno virgen, o no inmune, usando una diversidad de tejidos linfoides. Algunas de estas bibliotecas están disponibles en el mercado, tales como las desarrolladas por Cambridge Antibody Technology and Morphosys (Vaughan et al., (1996) Nature

Biotech 14:309; Knappik et al. (1999) J. Mol. Biol. 296:57). Sin embargo, muchas de estas bibliotecas tienen diversidad limitada.

La capacidad de identificar y aislar anticuerpos de alta afinidad de una biblioteca de presentación en fagos es importante en el aislamiento de nuevos anticuerpos para uso terapéuticos. El aislamiento de anticuerpos de alta afinidad de una biblioteca depende del tamaño de la biblioteca, la eficacia de producción en células bacterianas y la diversidad de la biblioteca. Véase, por ejemplo, Knappik et al. (1999) J. Mol. Biol. 296:57. El tamaño de la biblioteca se disminuye por la ineficacia de producción debido al plegamiento inapropiado del anticuerpo o proteína de unión a antígeno y la presencia de codones de parada. La expresión en células bacterianas puede inhibirse si el anticuerpo o dominio de unión a antígeno no está apropiadamente plegado. La expresión puede mejorarse mutando restos en giros en la superficie de la interfaz variable/constante, o en restos CDR seleccionados. (Deng et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9533, Ulrich et al. (1995) PNAS, 92:11907-11911; Forsberg et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:12430). La secuencia de la región flanqueante es un factor a la hora de proporcionar plegamiento apropiado cuando se producen bibliotecas de anticuerpos en fagos en células bacterianas.

La generación de una biblioteca diversa de anticuerpos o proteínas de unión a antígeno también es importante para el aislamiento de anticuerpos de alta afinidad. Se han generado bibliotecas con diversificación en CDR limitadas usando una diversidad de enfoques. Véase, por ejemplo, Tomlinson (2000) Nature Biotech. 18:989-994. Las regiones CDR3 son de interés en parte debido a que a menudo se ha descubierto que participan en la unión a antígeno. Las regiones CDR3 sobre la cadena pesada varían enormemente en tamaño, secuencia y conformación estructural.

Otros también han generado diversidad aleatorizando las regiones CDR de las cadenas pesada y ligera variables usando los 20 aminoácidos en cada posición. Se creyó que usando los 20 aminoácidos se produciría una gran diversidad de secuencias de anticuerpos variantes y se aumentaría la probabilidad de identificar nuevos anticuerpos. (Barbas (1994) PNAS 91:3809; Yelton, DE (1995) J. Immunology 155:1994; Jackson, J.R. (1995) J. Immunology 154:3310 y Hawkins, RE (1992) J. Mol. Biology 226:889).

Sumario de la invención

La presente descripción proporciona estructuras cristalinas de neuropilina-1 y cristales de fragmentos de neuropilina-2 (Nrp1 y Nrp2) solos y en complejo con anticuerpos que bloquean selectivamente la unión a semaforina o VEGF. Las Nrp adoptan una disposición inesperada de dominios en que los dominios a2, b1, y b2 forman un núcleo muy compactado. Las localizaciones de los epítomos de anticuerpo junto con experimentos *in vitro* muestran que VEGF y la semaforinas no compiten directamente por la unión a Nrp. Basándose en un dímero Nrp cristalográfico mediado por el dominio a1, la presente invención proporciona adicionalmente modelos para la dimerización del receptor y Union del ligando.

Basándose en estos resultados, en un aspecto, la presente descripción proporciona un cristal formado por un fragmento Nrp1_{b1b2} que difracta radiación de rayos X para producir un patrón de difracción que representa la estructura tridimensional de dicho fragmento, que tiene aproximadamente las siguientes constantes de celda $a=65,9$ Å, $b=66,7$ Å, $c=74,7$ Å, y un grupo espacial de P2₁2₁2₁.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un cristal formado por un fragmento Nrp1_{a2b1b2} que difracta radiación de rayos X para producir un patrón de difracción que representa la estructura tridimensional de dicho fragmento, que tiene aproximadamente las siguientes constantes de celda $a=53,2$ Å, $b=68,2$ Å, $c=66,6$ Å, y un grupo espacial de P2₁.

En otro aspecto más, la descripción se refiere a un cristal de un complejo formado entre un fragmento Nrp1_{b1} y un fragmento Fab de anticuerpo anti-Nrp1^B (YW107.4.87) que inhibe la union del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) a Nrp1, donde dicho cristal difracta radiación de rayos X para producir un patrón de difracción que representa la estructura tridimensional de dicho complejo, que tiene aproximadamente las constantes de celda $a=213$ Å, $b=213$ Å, $c=45,3$ Å, y un grupo especial de H3.

En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un cristal formado por un fragmento Nrp2_{b1b2} que difracta radiación de rayos X para producir un patrón de difracción que representa la estructura tridimensional de dicho fragmento, que tiene aproximadamente las siguientes constantes de celda $a=36,5$ Å, $b=70,5$ Å, $c=122$ Å, y un grupo espacial de P2₁2₁2₁.

En un aspecto adicional más, la descripción se refiere a un cristal formado por un fragmento Nrp2_{a2b1b2} que difracta radiación de rayos X para producir un patrón de difracción que representa la estructura tridimensional de dicho fragmento, que tiene aproximadamente las siguientes constantes de celda $a=50,1$ Å, $b=193$ Å, $c=66,2$ Å, y un grupo espacial de P2₁.

En un aspecto, la invención se refiere a un cristal de un complejo formado entre un fragmento Nrp2_{a1a2b1b2} y un fragmento Fab de anticuerpo anti-panNrp^A que inhibe la Union de semaforina a Nrp2, donde dicho cristal difracta

radiación de rayos X para producir un patrón de difracción que representa la estructura tridimensional de dicho fragmento, que tiene aproximadamente las siguientes constantes de celda $a=148,1 \text{ \AA}$, $b=106 \text{ \AA}$, $c=92,4 \text{ \AA}$, y un grupo espacial de C2.

5 La invención se refiere adicionalmente a un cristal de un complejo formado entre un fragmento Nrp2_{a1a2b1b2} y un fragmento Fab de anticuerpo anti-panNrp^A que inhibe la Unión de semaforina a Nrp2, donde dicho cristal difracta radiación de rayos X para producir un patrón de difracción que representa la estructura tridimensional de dicho fragmento, que tiene aproximadamente las siguientes constantes de celda $a=121,1 \text{ \AA}$, $b=121 \text{ \AA}$, $c=203 \text{ \AA}$, y un grupo espacial de P3₂21.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-panNrp^A que comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera mostrada en la Figura 7 y/o una secuencia de dominio variable de cadena pesada mostrada en la Figura 8, o un fragmento de las mismas, como se define en las reivindicaciones.

15 En otro aspecto más, la invención se refiere a un fragmento Fab de anticuerpo anti-panNrp^A YW68.11 que comprende la secuencia mostrada en la Figura 9A.

20 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un fragmento Fab de anticuerpo anti-panNrp^A YW68.11.26 que comprende la secuencia mostrada en la Figura 9B.

En un aspecto adicional más, la invención se refiere a un anticuerpo anti-Nrp que compite por la unión a Nrp con el anticuerpo anti-panNrp^A.

25 En una realización, el anticuerpo anti-Nrp se une esencialmente al mismo epítipo que el anticuerpo anti-panNrp^A.

En otra realización, el anticuerpo anti-Nrp se une a un epítipo que comprende al menos parte de una interfaz definida por los restos de aminoácido Y39, Y45, P46, Q47, F72, N73 P74, H75, F76, A133, y R138 de la secuencia de aminoácidos de Nrp2_{a1a2b1b2}.

30 En otra realización más, el anticuerpo anti-Nrp se une tanto a Nrp1 como a Nrp2.

En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-Nrp tiene una afinidad de unión de al menos aproximadamente 0,10 nM tanto por Nrp1 como por Nrp2, o al menos aproximadamente 0,15 nM tanto para Nrp1 como para Nrp2, o al menos aproximadamente 0,20 nM tanto para Nrp1 como para Nrp2, o al menos aproximadamente 0,25 nM tanto para Nrp1 como para Nrp2, o al menos aproximadamente 0,30 nM tanto para Nrp1 como para Nrp2.

35 En otra realización, el anticuerpo anti-Nrp bloquea la unión de Sema3 tanto a Nrp1 como a Nrp2.

40 En otra realización más, el anticuerpo anti-Nrp no bloquea la unión de VEGF a Nrp1 o a Nrp2.

En una realización diferente, el anticuerpo anti-Nrp inhibe la actividad biológica de semaforina *in vitro*.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-Nrp inhibe la actividad biológica de semaforina *in vivo*.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para preparar un antagonista de semaforina, que comprende diseñar una molécula que se une a un sitio que comprende al menos parte de una interfaz definida por los restos de aminoácido Y39, Y45, P46, Q47, F72, N73 P74, H75, F76, A133, y R138 de la secuencia de aminoácidos de Nrp2_{a1a2b1b2}, sintetizar el compuesto, y confirmar que el compuesto bloquea la unión de semaforina a Nrp1 y a Nrp2.

50 En una realización, el antagonista no interfiere con la unión de VEGF a Nrp1 o a Nrp2, y el método puede comprender una etapa adicional de confirmar que dicho antagonista no interfiere con la unión de VEGF a Nrp1 o a Nrp2.

55 En otra realización, el método comprende adicionalmente la etapa de confirmar que el antagonista no interfiere con la actividad biológica de VEGF.

60 El antagonista puede, por ejemplo, seleccionarse entre el grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, polipéptidos de unión, péptidos, y moléculas pequeñas no peptídicas, y preferiblemente es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, donde los fragmentos de anticuerpo incluyen, sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, dAb, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, minicuerpos, diacuerpos, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

También se describe un método para preparar un antagonista de VEGF, que comprende usar una estructura tridimensional obtenida de un cristal de un complejo formado entre un fragmento en Nrp1_{b1} y un fragmento Fab de anticuerpo anti-Nrp1^B (YW107.4.87), donde el cristal difracta radiación de rayos X para producir un patrón de difracción que representa la estructura tridimensional de dicho complejo, que tiene aproximadamente las siguientes

constantes de celda $a=213 \text{ \AA}$, $b=213 \text{ \AA}$, $c=45,3 \text{ \AA}$, y un grupo espacial de H3, para diseñar una molécula de unión a un sitio que comprende al menos parte del epítipo unido por dicho anticuerpo en Nrp1^B, sintetizar el compuesto, y confirmar que el compuesto inhibe la unión de VEGF a Nrp1.

- 5 En una realización, el antagonista no interfiere con la unión de semaforina a Nrp1, y el método puede incluir adicionalmente una etapa que confirma esto.

En otra realización, el antagonista inhibe la actividad biológica de VEGF.

- 10 En otra realización más, el método comprende adicionalmente la etapa de confirmar que el antagonista inhibe una actividad biológica de VEGF.

En una realización adicional, el antagonista inhibe el remodelado vascular.

- 15 En una realización adicional más, el antagonista se selecciona entre el grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, polipéptidos de unión, péptidos, y moléculas pequeñas no peptídicas, y preferiblemente es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, donde el fragmento de anticuerpo puede, por ejemplo, ser un Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, dAb, anticuerpo lineal, molécula de anticuerpo de cadena sencilla, minicuerpo, diacuerpo, o anticuerpo multiespecífico formado a partir de fragmentos de anticuerpo.

- 20 También se describe un método para el tratamiento del cáncer que comprende administrar a un sujeto mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de un antagonista de VEGF preparado por el método anterior de la presente invención. El cáncer puede, por ejemplo, seleccionarse entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer pulmonar no microcítico, linfoma no Hodgkin (NHL), cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, mesotelioma, y mieloma múltiple.

- 25 En otra realización, el tratamiento comprende adicionalmente un segundo agente terapéutico, donde el segundo agente terapéutico puede ser, sin limitación, un agente seleccionado entre el grupo que consiste en un agente anti-angiogénico, una composición antineoplásica, un agente quimioterapéutico y un agente citotóxico, tal como un antagonista adicional de VEGF.

En una realización adicional, el antagonista adicional de VEGF es un anticuerpo anti-hVEGF o un fragmento del mismo.

- 35 El anticuerpo anti-hVEGF puede ser capaz, por ejemplo, de unirse al mismo epítipo de VEGF que el anticuerpo A4.6.1, y específicamente bevacizumab o ranibizumab.

En otras realizaciones, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de receptor tirosina quinasa seleccionado entre el grupo que consiste en 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.

Breve descripción de los dibujos

45

Tabla 1- Recogida de datos y estadística de refinamiento

- 50 **Figura 1- VEGF no bloquea el colapso del cono de crecimiento inducido por Sema3A de de neuronas DRG.** A) Imágenes de conos de crecimiento de axones. Los DRG no tratados tienen grandes conos de crecimiento ricos en actina (punta de flecha) que se reducen significativamente tras la adición de Sema3A. Se añadieron anticuerpos anti-Nrp a 50 µg/ml. B) Cuantificación de colapso inducido por Sema3A del cono de crecimiento. El porcentaje de conos de crecimiento colapsados se calculó contando los conos de crecimiento colapsados y no colapsados (N=4 explantes por condición). Las barras de error representan el error típico de la media.

- 55 **Figura 2- Sumario de las estructuras cristalinas de neuropilina.** A) El ectodominio de Nrp está compuesto por CUB en tándem (a1a2), factor V/VIII de coagulación en tándem (b1b2) y un dominio MAM (c1). Representación en dibujos de las siete estructuras cristalinas presentadas en este informe con los límites de resolución enumerados a continuación. Las esferas naranjas indican un ión de calcio unido en el dominio a2. B) Alineación de secuencia de los dominios a1a2b1b2 de Nrp1 y Nrp2 humana. Los elementos de estructura secundaria se refieren a la estructura Nrp2 a1a2b1b2 (azul, a1; verde, a2; amarillo, b1; rojo, b2) y se nombran de acuerdo con las convenciones adoptadas para el dominio CUB de espermedesina (Romero, A. et al., Nat Struct Biol 4, 783-8 (1997)) y el dominio C2 del factor V de coagulación (Macedo-Ribeiro, S. et al., Nature 402, 434-9 (1999)). Los restos recuadrados en azul y amarillo delinean los epítipos de anticuerpo para anti-panNrp^A y anti-Nrp1^B, respectivamente. Los aminoácidos resaltados en naranja indican el sitio de unión de Ca²⁺ en a2, mientras que los restos en rojo representan un sitio de unión a Ca²⁺ putativo en el dominio a1. Los restos sombreados en verde destacan las posiciones de sustituciones de aminoácido que alteran interacciones entre Sema3A y Nrp1

(Gu, C. et al., J Biol Chem 277, 18069-76 (2002)). Esta alineación se produjo con EsPript (Gouet, P. et al., Nuclei Acids Res 31, 3320-3 (2003)).

Figura 3- Arquitectura global de dominios de neuropilinas. A) Organización de dominios de Nrp2 (azul, a1; verde, a2; amarillo, b1: rojo, b2) en complejo con el fragmento Fab de anti-panNrp^A (naranja claro, cadena pesada; gris, cadena ligera). Los restos N-glicosilados se indican en magenta. B) Representación en cintas de las estructuras a2b1b2 de Nrp1 y Nrp2; las esferas naranjas destacan un ión de calcio unido. C) Superposición del complejo Nrp2/Fab de dos formas cristalinas diferentes basadas en los dominios a2b1b2. Obsérvese la mala superposición de los dominios a1 en comparación con la región a2b1b2. Todas las figuras de estructura se produjeron con PyMol (<http://www.pymol.org>).

Figura 4- Detalles moleculares de los dominios CUB de neuropilina. A) En las estructuras a2b1b2, el dominio a2 incluye un ión de calcio unido (naranja). Los dominios a1 (véase panel C) y a2 de Nrp carecen de la hebra b1 encontrada en espermedesina (Romero *et al, supra*). B) El ión de calcio del dominio a2 de Nrp1 está coordinado por tres aminoácidos cargados negativamente, dos oxígenos de carbonilo de cadena principal, y una molécula de agua. Estas interacciones están altamente conservadas entre las Nrp (véase la Fig. S2-S3). C) (*panel de la izquierda*) Los aminoácidos están coloreados de acuerdo con el porcentaje de superficie accesible a disolvente que está enterrado en la interfaz Nrp2/Fab (rojo, 75-100 %; naranja, 50-74 %; amarillo, 25-49 %). Anti-panNrp^A tiene reactividad cruzada para Nrp1 y Nrp2, y once de los catorce restos en el epítipo estructural son idénticos (texto en negro, idéntico; texto en blanco, no conservado; los asteriscos indican restos en los que la cadena lateral apunta hacia el núcleo proteico a1). Los restos perfilados en verde representan las posiciones de sustitución de aminoácido que son necesarias para interacciones entre Nrp1 y Sema3A²³. (*panel de la derecha*) Los átomos C α de estas sustituciones de aminoácidos se indican como esferas verdes. Los átomos C α sombreados en morado representan un sitio de unión a calcio putativo. D) La interfaz anti-panNrp^A/Nrp2. Nrp2 se muestra como una superficie molecular de acuerdo con el potencial electrostático (rojo, ácido; azul, básico). Los restos de contacto del anticuerpo están dominados por restos aromáticos de las CDR H2, H3, y L3.

Figura 5- Características de los dominios de unión a VEGF y heparina de Nrp. A) Superposición de las estructuras cristalinas de Nrp b1b2 (Nrp1, amarillo (b) y rojo (b2); Nrp2, gris). Los restos azules (Nrp1) y verdes (Nrp2) destacan diferencias conformacionales en las "puntas" de b2, pero no de b1. B) La superficie molecular de las estructuras cristalinas de b1b2 de rata (n^o de acceso PDB 2ORZ) (Vancer Kooi, C.W., et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. (2007)) y humano están coloreadas por potencial electrostático. Las flechas amarillas indican un surco ácido que está formado por las "puntas" del dominio b1 y que representa el sitio de unión a Tuftsin en la estructura de rata (Vander Kooi et al., *supra*). Las flechas verdes indican la localización aproximada del parche de unión a heparina. C) La conservación relativa de secuencia (verde, 100 %; amarillo, ≥ 75 %) de los dominios b1b2 entre doce Nrp (Fig. S3) se mapeó sobre la superficie de la estructura b1b2 de Nrp1 humana. Dos parches altamente conservados están delineados en naranja. Los restos perfilados en cian indican aquellos restos que contactan con el Fab en el complejo anti-Nrp1^B-Fab/b1. El dominio a2 (trigo) se muestra usando una superposición de las estructuras b1b2b y a2b1b2 de Nrp1. D) Representación en cintas del complejo anti-Nrp1^B-Fab/b1 (amarillo, b1; naranja, cadena pesada; gris, cadena ligera). E) La interfaz anti-Nrp1^B/b1. El dominio b1 se representó en dibujo como una superficie molecular de acuerdo con el potencial electrostático; la flecha amarilla indica el surco de unión a la cola de VEGF. Solamente las CDR H3 y L1 contactan con b1.

Figura 6- Un dímero cristalográfico de Nrp2 sugiere modelos para la unión de VEGF y semaforina. A) Nrp2 forma un dímero con forma de silla de montar en ambas formas cristalinas del complejo Nrp2/Fab. Esta figura destaca los dominios a1a2b1b2 de Nrp2 de la forma monoclinica del complejo Fab. Los sitios putativos de unión a cola de VEGF, heparina, y semaforina están indicados. B) Modelos potenciales de complejos VEGF/Nrp y semaforina/Nrp basados en el dímero mediado por a1 de Nrp en las estructuras cristalinas.

Figura 7- Alineación de secuencia de dominio variable de cadena ligera de los clones Anti-panNrp^A YW68.11 e YW68.11.26.

Figura 8- Alineación de secuencia de dominio variable de cadena pesada de los clones Anti-panNrp^A YW68.11 e YW68.11.26.

Figura 9A- Secuencia completa del anticuerpo IgG1 humano Anti-panNrp^A YW68.11.

Figura 9B- Secuencia completa del anticuerpo IgG1 humano Anti-panNrp^A YW68.11.26.

Tabla S1 - Condiciones usadas para la cristalización y crioprotección.

Figura S1 - Análisis de cinética de unión a anticuerpo anti-Nrp. Análisis cinético BIAcore de anticuerpo anti-panNrp^A. Los sensogramas para la inyección de 500 nM de cada proteína NRP humana a 25 °C sobre IgG inmovilizada en chip sensor BIAcore demuestran la especificidad de unión. Anti-panNrp^A se une a a1a2b1b2 de Nrp1 y de Nrp2, pero no a los dominios b1b2 de Nrp2.

Figura S2 - Los dominios CUB de Nrp incluyen un sitio de unión a calcio conservado. A) Densidad electrónica alrededor del ión de calcio en la estructura a2b1b2 de Nrp1 (mapa final 2F_o-F_c contorneado a 1,5 σ). B) El ión de calcio del dominio a2 de Nrp2 C) Tres aminoácidos cargados negativamente (sombreados en naranja), que delinean el sitio de unión a calcio, están conservados en los dominios CUB de Nrp1 y Nrp2.

Figura S3 – Alineación de secuencia de las neuropilinas. Alineación de secuencia de longitud completa de los dominios a1a2b1b2 de Nrp1 y Nrp2 humana, de ratón, de rata, de pez cebrá (BRARE), rana (XENLA), y pollo. Esta figura está coloreada usando el mismo esquema que la Fig. 2B y se produjo con EsPript (Gouet P. et al., *supra*).

Figura S4 - Comparación entre las estructuras Nrp1/Tuftsina y b1/Fab. A) En el complejo nrp1-b1/anti-Nrp1^B-Fab, la cola C-terminal (morado) de la cadena pesada de la molécula de simetría relacionada ocupa el sitio de unión a Tuftsina (Nrp2, superficie molecular por potencial electrostático; naranja, cadena pesada de anticuerpo; gris, cadena ligera de anticuerpo). B) Localización de tuftsina (verde) en complejo con Nrp1 b1b2 de rata (n^o de acceso PDB 2ORZ) (Vander Kooi, et al., *supra*). C) Superposición de las dos estructuras destacadas en el panel A. El anticuerpo y el péptido tuftsina están coloreados como en los paneles previos con Nrp1 b1 coloreado en amarillo y Nrp1 b1b2 de rata coloreado en cian.

Figura S5 - La interfaz del dímero Nrp2. A) Representación en cintas del dímero Nrp2-a1a2b1b2/Fab observado en la forma monoclinica de la estructura. B) Superposición de la estructura Nrp1-b1/anti-Nrp1^B-Fab en la estructura cristalina de Nrp2/Fab. C) Los aminoácidos enterrados en la interfaz a1/a1 están coloreados de acuerdo con el porcentaje de superficie accesible al disolvente que está enterrada tras la dimerización (rojo, 75-100 %; naranja, 50-74 %; amarillo, 25-49 %).

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a nuevas estructuras cristalinas, composiciones, métodos para modular las actividades biológicas mediadas por NRP, y ensayos de selección para identificar candidatos capaces de modular las actividades biológicas mediadas por NRP, como se define en las reivindicaciones.

20 Definiciones

"Neuropilina" o NRP se refiere colectivamente a neuropilina-1 (NRP1), neuropilina-2 (NRP2) y sus isoformas y variantes, como se describe en Rossignol et al. (2000) *Genomics* 70:211-222. Las neuropilinas son receptores no tirosina quinasa de 120 a 130 kDa. Hay múltiples variantes de corte y ajuste de NRP-1 y NRP-2 e isoformas solubles. 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 a los componentes del complemento C1r y C1s (CUB), que generalmente contiene cuatro restos de cisteína que forman dos puentes disulfuro. El dominio b1b2 es homólogo a los factores de coagulación V y VIII. La parte central del dominio c se denomina como MAM debido a su homología con meprina, A5 y proteínas μ de receptores tirosina fosfatasa. Los dominios a1a2 y b1b2 son responsables de la unión de 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.

"Actividad biológica mediada por neuropilina" se refiere en general a eventos fisiológicos o patológicos en que la neuropilina-1 y/o neuropilina-2 desempeña un papel sustancial. Ejemplos no limitantes de dichas actividades son guía de axones durante el desarrollo del sistema nervioso embrionario o regeneración de neuronas, angiogénesis (incluyendo modelado vascular), tumorigénesis y metástasis tumoral.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente 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 este documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones convencionales (policlonales) de anticuerpos que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe entenderse como que se requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N^o 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en 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 este documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico a u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos N^o 4.816.567; y Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81:6851-6855).

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que restos de una región hipervariable del receptor están reemplazados 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 la región flanqueante Fv (FR) 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 hacen para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas 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. 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 que la que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie "se une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (K_d) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} M y mucho más preferiblemente 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 al menos aproximadamente 50 veces, o 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 definidos anteriormente, pero preferiblemente es un anticuerpo humanizado o humano.

Como se usa en este documento, "mutante de anticuerpo" o "variante de anticuerpo" se refiere a una secuencia de aminoácidos variante del anticuerpo dependiente de especie donde uno o más de los restos de aminoácido del anticuerpo dependiente de especie se han modificado. Dichos mutantes necesariamente tienen 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 un 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 preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, y mucho más preferiblemente al menos el 95 %. La identidad o similitud con respecto a estas secuencias se define en este documento como el porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, mismo resto) o similares (es decir, resto de aminoácido del mismo grupo basado en las propiedades comunes de cadena lateral, véase a continuación) con los restos del anticuerpo dependiente de especie, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas en la secuencia de anticuerpo fuera del dominio variable se entenderán como que afectan a la identidad o similitud de la secuencia.

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

Como se usa en este documento, "dominio variable de anticuerpo" se refiere a las partes de las cadenas ligera y pesada de moléculas de anticuerpo que incluyen secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2, y CDR3), y regiones flanqueantes (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 esta invención, las posiciones de aminoácido asignadas a las 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 los aminoácidos de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno también es de acuerdo con la de Kabat.

Como se usa en este documento, la expresión "regiones determinantes de complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2, y CDR3)" se refiere a los restos de aminoácido 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 aminoácido 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 aquellos 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 96-101 (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 de un bucle hipervariable. Por ejemplo, la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo 4D5 incluye los aminoácidos 26 a 35.

"Regiones flanqueantes" (a partir de ahora en este documento FR) son aquellos restos del dominio variable diferentes a los restos 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 FR de cadena ligera están posicionados en aproximadamente los restos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3), y 98-107 (LCFR4) y los restos FR de cadena pesada están posicionados 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 aminoácido de bucles hipervariables, los restos FR de cadena ligera están posicionados aproximadamente en los restos 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3), y 97-107 (LCFR4) en la cadena ligera y los restos FR de cadena pesada están posicionados 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 definida por Kabat como aquellos de un bucle hipervariable, los restos FR se ajustarán en consecuencia. Por ejemplo, cuando la CDRH1 incluye los aminoácidos H26-H35, los restos FR1 de cadena pesada están en las posiciones 1-25 y los restos FR2 están en las posiciones 36-49.

Como se usa en este documento, "serie de codones" se refiere a una serie de diferentes secuencias de tripletes de nucleótidos usadas para codificar aminoácidos variantes deseados. Una serie de oligonucleótidos puede sintetizarse, por ejemplo, por síntesis en fase sólida, incluyendo secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionadas por la serie de codones y que codificará el grupo deseado de aminoácidos. Una forma convencional de denominación de codones es la del código IUB, que es conocida en la técnica y se describe en este documento. Una serie de codones normalmente está representada por tres letras mayúsculas en cursiva, por ejemplo, *NNK*, *NNS*, *XYZ*, *DVK* y similares. Una "serie de codones no aleatoria", como se usa en este documento, por tanto se refiere a una serie de codones que codifica aminoácidos seleccionados que cumplen parcialmente, preferiblemente completamente, los criterios para selección de aminoácidos como se describe en este documento. La síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" seleccionada de nucleótidos en ciertas posiciones es bien conocida en la técnica, por ejemplo, el enfoque TRIM (Knappek et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 296:57-86); Garrard y Henner (1993) *Gene* 128:103). Dichas series de oligonucleótidos que tienen ciertas series de codones pueden sintetizarse usando sintetizadores comerciales de ácido nucleico (disponibles en, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA), o pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo, de Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, una serie de oligonucleótidos sintetizada que tiene una serie particular de codones normalmente incluirá una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, estando establecidas las diferencias por la serie de codones dentro de la secuencia global. 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 necesariamente, incluir sitios para enzimas de restricción útiles para, por ejemplo, propósitos de clonación.

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

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 están generalmente unidos covalentemente cerca de sus extremos carboxi por cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen en la técnica otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L , que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of*

Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a 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 apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dos dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404,097; documento WO 93/11161; y Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:6444-6448.

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata et al. (1995 Protein Eng, 8(10):1057-1062). En resumen, 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 monoespecíficos.

Como se usa en este 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 en fagos" es una técnica mediante la cual se presentan polipéptidos variantes como proteínas de fusión a al menos una parte de proteína de cubierta sobre la superficie del fago, por ejemplo, fago filamentoso, partículas. Una utilidad de la presentación en fagos radica en el hecho de que pueden clasificarse rápidamente y de forma eficaz grandes bibliotecas de variantes proteicas aleatorizadas para aquellas secuencias que se unan a un antígeno diana con alta afinidad. La presentación de bibliotecas de péptidos y proteínas en fagos se ha usado para seleccionar millones de polipéptidos para aquellos con propiedades específicas de unión. Se han usado métodos de presentación en fagos polivalentes para presentar pequeños péptidos aleatorios y pequeñas proteínas a través de fusiones con el gen III o gen VIII de fago filamentoso. Wells y Lowman (1992) Curr. Opin. Struct. Biol. 3:355-362, y referencias citadas en ese documento. En una presentación en fago monovalente, se fusiona una biblioteca de proteínas o péptidos a un gen III o una parte del mismo, y se expresa a bajos niveles en presencia de proteína de gen III de tipo silvestre de modo que las partículas fágicas presentan una copia o ninguna de las proteínas de fusión. Los efectos de avididad se reducen respecto al fago polivalente de modo que la clasificación se basa en la afinidad intrínseca por ligando, y se usan vectores fagómidos, que simplifican las manipulaciones de ADN. Lowman y Wells (1991) Methods: A companion to Methods in Enzymology 3:205-0216.

Un "fagómido" es un vector plasmídico que tiene un origen bacteriano de replicación, por ejemplo, Co1E1, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagómido puede usarse sobre cualquier bacteriófago conocido, incluyendo bacteriófago filamentoso o bacteriófago lamboide. El plásmido también contendrá generalmente un marcador de selección para resistencia a antibióticos. Los segmentos de ADN clonados en estos vectores pueden propagarse como plásmidos. Cuando a las células que albergan estos vectores se les proporciona todos los genes necesarios para la producción de partículas fágicas, el modo de replicación del plásmido cambia a replicación por círculo rodante para generar copias de una hebra del ADN plasmídico y empaquetar las partículas fágicas. El fagómido puede formar partículas fágicas infecciosas o no infecciosas. Este término incluye fagómidos que contienen un gen de proteína de cubierta fágica o fragmento del mismo unido a un gen de polipéptido heterólogo como una fusión génica de modo que el polipéptido heterólogo se presente sobre la superficie de la partícula fágica.

La expresión "vector fágico" significa una forma replicativa de doble hebra de un bacteriófago que contiene un gen heterólogo y tiene capacidad de replicación. El vector fágico tiene un origen fágico de replicación que permite la replicación del fago y la formación de partículas fágicas. El fago es preferiblemente un bacteriófago filamentoso, tal como un fago M13, f1, fd, Pf3 o un derivado de los mismos, o un fago lamboide, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc., o un derivado de los mismos.

Como se usa en este documento, "posición accesible a 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 está determinada, basado en la estructura, el ensamblaje de estructuras y/o la estructura modelada del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno, como potencialmente disponible para el acceso y/o contacto de disolvente con una molécula, tal como un antígeno específico de anticuerpo. Estas posiciones se encuentran normalmente en las CDR y en el exterior de la proteína. Las posiciones accesibles a disolvente de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, como se define en este documento, pueden determinarse usando cualquiera de varios algoritmos conocidos en la técnica. Preferiblemente, las posiciones accesibles a disolvente se determinan usando coordenadas de un modelo tridimensional de un anticuerpo, preferiblemente usando un programa informático tal como el programa InsightII (Accelrys, San Diego, CA). Las posiciones accesibles a disolvente también pueden determinarse 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 las posiciones accesibles a disolvente puede realizarse usando software adecuado para el modelado de proteínas e información estructural tridimensional

obtenida de un anticuerpo. El software que puede utilizarse para estos propósitos incluye el software SYBYL Biopolymer Module (Tripos Associates). General y preferiblemente, cuando un algoritmo (programa) requiere que un usuario introduzca parámetros de tamaño, el "tamaño" de una sonda que se usa en el cálculo se establece a aproximadamente 1,4 Angstrom o más pequeño en radio. Además, se han descrito métodos de determinación de regiones y áreas accesibles a disolventes usando software para ordenadores personales 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 vasos sanguíneos, y/o vasculogénesis, etc. Por ejemplo, los factores angiogénicos incluyen, aunque sin limitación, por ejemplo, VEGF y miembros de la familia de VEGF, PIGF, la familia PDGF, la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), ligados TIE (Angiopoyetinas), efrinas, Del-1, factores de crecimiento de fibroblastos: ácido (aFGF) y básico (bFGF), Folistatina, factor estimulador de colonias de Granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de Hepatocitos (HGF) /factor de dispersión (SF), Interleuquina-8 (IL-8), Leptina, Midquina, 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 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 anti-angiogénesis" o "inhibidor de angiogénesis" se refiere a una sustancia de pequeño peso molecular, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhibe la angiogénesis, vasculogénesis, o permeabilidad vascular indeseada, de forma directa o indirecta. Debe entenderse que el agente anti-angiogénesis incluye aquellos agentes que se unen a y bloquean la actividad angiogénica del factor angiogénico o su receptor. Por ejemplo, un agente anti-angiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista para un agente angiogénico como se ha definido anteriormente, por ejemplo, anticuerpos contra VEGF-A o contra el receptor de VEGF-A (por ejemplo, receptor KDR o receptor Flt-1), inhibidores anti-PDGFR tales como Gleevec™ (Mesilato de Imatinib). Los agentes anti-angiogénesis también incluyen inhibidores nativos de angiogénesis, por ejemplo, angioestatina, 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 terapia anti-angiogénica 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 anti-angiogénicos conocidos); y, Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206 (por ejemplo, la Tabla 1 que enumera agentes anti-angiogénicos usados en ensayos clínicos).

El término "VEGF" o "VEGF-A" como se usa en este documento se refiere al factor de crecimiento de células del endotelio vascular humano de 165 aminoácidos y factores relacionados del crecimiento de células del endotelio vascular humano de 121, 189, y 206 aminoácidos, como se describe por Leung et al. (1989) *Science* 246:1306, y Houch 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. Algunas veces el VEGF de una especie específica se indica por términos tales como hVEGF para VEGF humano, mVEGF para VEGF murino, y etc. El término "VEGF" también se usa para hacer referencia a formas truncadas del polipéptido que comprende los aminoácidos 8 a 109 ó 1 a 109 del factor de crecimiento de células del endotelio vascular humano de 165 aminoácidos. Las referencias a cualquiera de estas formas de VEGF pueden identificarse en la presente solicitud, por ejemplo, por "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)", o "VEGF₁₆₅". Las posiciones de aminoácido para un VEGF nativo "truncado" se numeran como se indica en la secuencia nativa de VEGF. Por ejemplo, la posición de aminoácido 17 (metionina) en VEGF nativo truncado es también la posición 17 (metionina) en VEGF nativo. El VEGF nativo truncado tiene afinidad de unión por los receptores KDR y Flt-1 comparable con VEGF nativo.

Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une a VEGF con suficiente afinidad y especificidad. Preferiblemente, el anticuerpo anti-VEGF puede usarse como agente terapéutico en el abordaje e interferencia con enfermedades o afecciones donde está implicada la actividad VEGF. Un anticuerpo anti-VEGF habitualmente no se unirá a otros homólogos de VEGF tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como PIGF, PDGF o bFGF. Un anticuerpo anti-VEGF preferido es un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A.4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709. Más preferiblemente, el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante anti-VEGF generado de acuerdo con Presta et al. (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599, incluyendo aunque sin limitación el anticuerpo conocido como bevacizumab (BV; Avastin™).

El anticuerpo anti-VEGF "Bevacizumab (BV)", también conocido como "rhuMAb VEGF" o "Avastin®", es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante anti-VEGF generado de acuerdo con Presta et al. (1997) *Cancer Res.*

57:4593-4599. Comprende regiones flanqueantes mutadas de IgG1 humana 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 a sus receptores. Aproximadamente el 93 % de la secuencia de aminoácidos de Bevacizumab, incluyendo la mayoría de las regiones flanqueantes, se obtiene de IgG1 humana, y aproximadamente el 7 % de las secuencias se obtiene del anticuerpo murino A.4.6.1. Bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149.000 dalton y está glucosilado.

Un "antagonista de VEGF" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF incluyendo, aunque sin limitación, su unión a uno o más receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-VEGF y fragmentos de unión a antígenos de los mismos, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a VEGF secuestrando de ese modo su unión a uno o más receptores, anticuerpos anti-receptor de VEGF y antagonistas del receptor de VEGF tales como inhibidores de molécula pequeña de las tirosina quinasa VEGFR. La expresión "antagonista de VEGF", como se usa en este documento, incluye específicamente moléculas, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, otros polipéptidos de unión, péptidos, y moléculas pequeñas no peptídicas, que se unen a neuropilina-1 y/o neuropilina-2 (Nrp-1 y/o Nrp-2) y son capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos anti-Nrp1 y anti-Nrp2 y anticuerpos con reactividad cruzada con Nrp1 y Nrp2, con la condición de que sean capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF. Por tanto, la expresión "actividades de VEGF" incluye específicamente actividades biológicas mediadas por neuropilina (como se ha definido anteriormente en este 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, aunque sin limitación, su unión a 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 a semaforina secuestrando de ese modo su unión a uno o más receptores, anticuerpos anti-receptor de semaforina y antagonistas del receptor de semaforina tales como inhibidores de molécula pequeña de semaforinas. La expresión "antagonista de semaforina", como se usa en este documento, incluye específicamente moléculas, incluyendo anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, otros polipéptidos de unión, péptidos, y moléculas pequeñas no peptídicas, que se unen a neuropilina-1 y/o neuropilina-2 (Nrp-1 y/o Nrp-2) y son capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de semaforina incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos anti-Nrp1 y anti-Nrp2 y anticuerpos con reactividad cruzada con Nrp1 y Nrp2, con la condición de que sean capaces de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de semaforina. Por tanto, la expresión "actividades de semaforina" incluye específicamente actividades biológicas mediadas por neuropilina (como se ha definido anteriormente en este documento) de semaforinas de clase 3. Dichas actividades biológicas incluyen, por ejemplo, el efecto inhibitor del crecimiento de neuritas durante el desarrollo del sistema nervioso embrionario y la regeneración de neuronas.

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

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría de tratamiento. Por ejemplo, los mamíferos que padecen o necesitan profilaxis contra angiogénesis anormal (angiogénesis excesiva, inapropiada o incontrolada) o permeabilidad vascular. Esto incluye trastorno o enfermedades crónicas y agudas incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en este documento incluyen tumores malignos y benignos; neoplasias no leucémicas y linfoides; trastornos neuronales, de la glía, astrocíticos, hipotalámicos y otros glandulares, de macrófagos, epiteliales, estromáticos y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

La angiogénesis anormal sucede cuando nuevos vasos sanguíneos crecen excesivamente, insuficientemente o inapropiadamente (por ejemplo, la localización, cronología o inicio de la angiogénesis es indeseada desde un punto de vista médico) en un estado patológico o de modo que cause un estado patológico. La angiogénesis excesiva, inapropiada o incontrolada sucede cuando existe crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que contribuye al empeoramiento del estado patológico o causa un estado patológico, tal como en cáncer, especialmente tumores sólidos vascularizados y tumores metastásicos (incluyendo cáncer de colon, de pulmón (especialmente cáncer pulmonar microcítico), o cáncer de próstata), enfermedades causadas por neovascularización ocular, especialmente ceguera diabética, retinopatías, principalmente retinopatía diabética o degeneración macular relacionada con la edad (AMD), psoriasis, artritis psoriásica, hemangioblastoma tal como hemangioma; enfermedades renales inflamatorias, tales como glomerulonefritis, especialmente glomerulonefritis mesangioproliferativa, síndrome urémico hemolítico, nefropatía diabética o nefrosclerosis hipertensiva; diversas enfermedades inflamatorias, tales como artritis, especialmente artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, sarcoidosis, arteriosclerosis arterial y enfermedades que suceden después de trasplantes, endometriosis o asma crónico y más de otras 70 afecciones. Los nuevos vasos sanguíneos pueden alimentar tejidos afectados, destruir tejidos normales, y en el caso de cáncer, los nuevos vasos pueden permitir que las células tumorales escapen en la circulación y se alojen en otros órganos (metástasis tumorales). La angiogénesis insuficiente sucede cuando hay crecimiento inadecuado de vasos

sanguíneos que contribuye al empeoramiento de un estado patológico, por ejemplo, en enfermedades tales como arteriopatía coronaria, apoplejía, y curación de heridas retardada. Además, pueden producirse úlceras, apoplejías, y ataques al corazón por la ausencia de angiogénesis que se requiere normalmente para curación natural. La presente invención contempla tratar a aquellos pacientes que están en riesgo de desarrollar las enfermedades mencionadas anteriormente.

Otros pacientes que son candidatos para recibir los anticuerpos u otras moléculas de esta invención tienen, o están en riesgo de desarrollar, proliferación anormal de tejido fibrovascular, acné rosácea, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, oclusión arterial, queratitis atópica, úlceras bacterianas, enfermedad de Behcet, tumores transmitidos por la sangre, enfermedad obstructiva de la carótida, neovascularización coroidea, inflamación crónica, desprendimiento crónico de la retina, uveítis crónica, vitritis crónica, exceso de uso de lentes de contacto, rechazo de injerto de córnea, neovascularización corneal, neovascularización de injerto de córnea, enfermedad de Crohn, enfermedad de Eales, queratoconjuntivitis epidémica, úlceras fúngicas, infecciones por Herpes simplex, infecciones por Herpes zoster, síndromes de hiperviscosidad, sarcoma de Kaposi, leucemia, degeneración lipídica, enfermedad de Lyme, queratólisis marginal, úlcera de Mooren, infecciones por Micobacterias diferentes de lepra, miopía, enfermedad neovascular ocular, fisuras ópticas, síndrome de Osler-Weber (Osler-Weber-Rendu, osteoartritis, enfermedad de Paget, pars planitis, penfigoide, filctenulosis, poliartritis, complicaciones post-láser, infecciones por protozoos, pseudoxantoma elástico, pterigión, queratitis sicca, queratotomía radial, neovascularización de la retina, retinopatía del prematuro, fibroplasias retrolentales, sarcoidosis, escleritis, anemia falciforme, síndrome de Sjogren, tumores sólidos, enfermedad de Stargart, enfermedad de Stevens Johnson, queratitis límbica superior, sífilis, lupus sistémico, degeneración marginal de Terrien, toxoplasmosis, traumatismo, tumores de sarcoma de Ewing, tumores de neuroblastoma, tumores de osteosarcoma, tumores de retinoblastoma, tumores de rabdomiosarcoma, colitis ulcerosa, oclusión venosa, deficiencia de vitamina A y sarcoidosis de Wegener, angiogénesis indeseada asociada con diabetes, enfermedades parasitarias, curación anormal de heridas, hipertrofia después de cirugía, lesión o traumatismo, inhibición del crecimiento capilar, inhibición de ovulación y formación del cuerpo lúteo, inhibición de implante e inhibición del desarrollo de embriones en el útero.

Las terapias anti-angiogénesis son útiles en el tratamiento general del rechazo de injertos, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, preeclampsia, efusión pericárdica, tal como la asociada con pericarditis, y efusión pleural, enfermedades y trastornos caracterizados por permeabilidad vascular indeseable, por ejemplo, edema asociado con tumores cerebrales, ascitis asociada con neoplasias, síndrome de Meigs, inflamación pulmonar, síndrome nefrótico, efusión pericárdica, efusión pleural, permeabilidad asociada con enfermedades cardiovasculares tales como la afección después de infartos de miocardio y apoplejías y similares.

Otras enfermedades dependientes de angiogénesis de acuerdo con esta invención incluyen angiofibroma (sangrado anormal de vasos que son propensos a sangrar), glaucoma neovascular (crecimiento de vasos sanguíneos en el ojo), malformaciones arteriovenosas (comunicación anormal entre arterias y venas), fracturas sin soldar (fracturas que no curarán), placas ateroscleróticas (endurecimiento de las arterias), granuloma piogénico (lesión cutánea común compuesta por vasos sanguíneos), esclerodermia (una forma de enfermedad de tejido conectivo), hemangioma (tumor compuesto por vasos sanguíneos), tracoma (causa principal de ceguera en el tercer mundo), articulaciones hemofílicas, adhesiones vasculares y cicatrices hipertróficas (formación anormal de cicatrices).

Las expresiones "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar (incluyendo cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, y carcinoma escamoso del pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o útero, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de células B (incluyendo linfoma no 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 pequeño de alto grado; 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 células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD), así como proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), y síndrome de Meigs.

La expresión "composición anti-neoplásica" se refiere a una composición útil en el tratamiento del cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo, por ejemplo, "agente anti-cáncer." Ejemplos de agentes terapéuticos (agentes anti-cáncer) incluyen, aunque sin limitación, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en radioterapia, agentes anti-angiogénesis, 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 del 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 derivado de plaquetas (por ejemplo, Gleevec™ (Imatinib Mesilato)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citoquinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a 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 bioactivos y orgánicos, etc. También se incluyen combinaciones de los mismos en la invención.

La expresión "agentes citotóxico" como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de células y/o causa destrucción de células. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y y ^{186}Re), 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 del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. 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, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); 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; espongiatrina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimnustina; antibióticos tales como antibióticos enediinos (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma11 y calicheamicina omega11 (véase, por ejemplo, Agnew (1994) Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de antibiótico cromoproteína enediino relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, 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, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, 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; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoxantrona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermano; ácido tenuazónico; triaziuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), Cremofor-libre ABRAXANE™, formulación de nanopartículas modificada por ingeniería con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), y doxetaxel TAXOTERE® (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; 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; irinotecano (Camptosar, CPT-11) (incluyendo el régimen de tratamiento de irinotecano 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 con oxaliplatino (FOLFOX); inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™)) y VEGF-A que reduce la proliferación celular y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre tumores tales como anti-estrogénos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno FARESTON; inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestanie, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo nucleosídico

de 1,3-dioxolano citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como inhibidor de 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 la 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 esta solicitud se refiere a un precursor o derivado de una sustancia farmacéuticamente activa que es menor tóxico para las células tumorales en comparación con el fármaco precursor y es capaz de activarse o convertirse enzimáticamente en la forma precursora más activa. Véase, por ejemplo, Wilman (1986) "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pág. 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.), pág. 247-267, Humana Press. Los profármacos de esta invención incluyen, aunque sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados con D-aminoácido, profármacos glucosilados, profármacos que contienen β -lactama, opcionalmente profármacos que contienen fenoxiacetamida sustituida u opcionalmente profármacos que contienen fenilacetamida sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco para su uso en esta invención incluyen, aunque sin limitación, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Las enfermedades y afecciones que pueden tratarse con antagonistas de semaforina incluyen, sin limitación, enfermedades neurológicas y enfermedades que requieren o se benefician de neuro-regeneración.

Una "molécula pequeña" se define en este documento por tener un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Dalton.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con que está asociada habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico de anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente en forma o entorno del que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas por lo tanto se distinguen de la molécula de ácido nucleico como existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan habitualmente el anticuerpo donde, 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 de forma funcional 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 al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

El ácido nucleico está "unido de forma funcional" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder de secreción está unido de forma funcional a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido de forma funcional a una secuencia codificante si está posicionado para facilitar la traducción. Generalmente, "unido de forma funcional" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se consigue por ligamiento en sitios convenientes de restricción. Si no existen dichos sitios, se usan adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Como se usa en este documento, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se usan de forma intercambiable y todas estas denominaciones incluyen descendencia. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de la misma independientemente de la cantidad de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica seleccionada en la célula originalmente transformada. Cuando se pretenden distintas denominaciones, estará claro a partir del contexto.

Modos para realizar la invención

Basándose en la arquitectura de dominios y las propiedades funcionales, los dominios extracelulares de las Nrp se dividen normalmente en tres unidades funcionales: a1a2, b1b2, y c, que representan sus regiones principales de unión a semaforina, de unión a VEGF, y dimerización, respectivamente (Ellis, L.M., Mol Cencer Ther 5, 1099-107

(2006)). Aunque los estudios de estructura-función delimitan las necesidades globales de dominios para la función neuropilina, los detalles moleculares de estos complejos receptor/ligando siguen estando mal comprendidos. Hasta la fecha, la información estructural de las Nrp se limita al dominio b1b2 de Nrp1 (Vander Kooi et al., *supra*; Lee, C. et al., J Biol Chem 281, 5702-10 (2006)). La estructura cristalina de Nrp1 b1b2 en complejo con tuftsin, un tetrapéptido homólogo al extremo C-terminal de VEGF₁₆₅, proporcionó la primera información estructural sobre la interacción de Nrp con su compañero de unión VEGF (Vander Kooi, et al., *supra*; von Wronski, M.A., et al., J. Biol Chem 281, 5702-10 (2006)).

La presente descripción proporciona la estructura cristalina de Nrp2 a1a2b1b2 en complejo con un fragmento Fab de un anticuerpo que puede bloquear la unión de Sema3 tanto a Nrp1 como a Nrp2 *in vitro*. Las estructuras de los fragmentos a2b1b2 y b1b2 de ambas isoformas de Nrp también están comparadas y contrastadas. Además, la estructura del dominio b1 de Nrp1 combinado con el fragmento Fab de un anticuerpo derivado de fago recientemente descrito que inhibe específicamente la unión de VEGF₁₆₅ a Nrp1 *in vivo* (Liang, W.C., et al., J Mol Biol 366, 815-29 (2007); Pan, Q et al., Cancer Cell 11, 53-67 (2007) también está proporcionada y evaluada. En conjunto, estas estructuras presentan una imagen detallada de una gran parte del dominio extracelular de Nrp y sugiere modelos para la unión de VEGF y semaforina. Basándose en el dímero de Nrp2 presente en dos diferentes formas cristalinas, se propone un nuevo mecanismo para la dimerización de Nrp y unión del ligando.

Se proporcionan detalles de los estudios cristalográficos en los siguientes Ejemplos. Se describen métodos generales para la producción de anticuerpos anti-NRP en este documento y en el Ejemplo 1.

Producción de anticuerpos anti-NRP

La invención en este documento incluye la producción y uso de anticuerpos anti-NRP. Se describen en más detalle métodos ejemplares para generar anticuerpos en las siguientes secciones.

Los anticuerpos anti-NRP se seleccionan usando un antígeno de NRP (por ejemplo, NRP1 y/o NRP2) derivado de una especie de mamífero. Preferiblemente el antígeno es NRP humana (hNRP). Sin embargo, también pueden usarse las NRP de otras especies tales como NRP murina (mNRP) como el antígeno diana. Los antígenos de NRP de diversas especies de mamífero pueden aislarse de fuentes naturales. En otras realizaciones, el antígeno se produce de forma recombinante o se prepara usando otros métodos sintéticos conocidos en la técnica.

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

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

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

Generación de anticuerpos anti-NRP a partir de bibliotecas de anticuerpos sintéticos en fagos

En una realización preferida, los anticuerpos anti-NRP se seleccionan usando un enfoque de presentación en fagos único. El enfoque implica la generación de bibliotecas de anticuerpos sintéticos en fagos basadas en un único molde flanqueante, el diseño de suficientes diversidades dentro de los dominios variables, la presentación de polipéptidos que tienen los dominios variables diversificados, la selección de anticuerpos candidato con alta afinidad por el antígeno de NRP diana, y el aislamiento de los anticuerpos seleccionados.

Pueden encontrarse detalles de los métodos de presentación en fagos, por ejemplo, en el documento WO03/102157 publicado el 11 de diciembre de 2003.

En un aspecto, las bibliotecas de anticuerpos pueden generarse mutando las posiciones accesibles a disolvente y/o altamente diversas en al menos una CDR de un dominio variable de anticuerpo. Algunas o todas las CDR pueden

mutarse usando los métodos proporcionados en este documento. En algunas realizaciones, puede ser preferible generar diversas bibliotecas de anticuerpos mutando posiciones en CDRH1, CDRH2 y CDRH3 para formar una única biblioteca o mutando posiciones en CDRL3 y CDRH3 para formar una única biblioteca o mutando posiciones en CDRL3 y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 para formar una única biblioteca.

5 Puede generarse una biblioteca de dominios variables de anticuerpo, por ejemplo, que tenga mutaciones en las posiciones accesibles a disolvente y/o altamente diversas de CDRH1, CDRH2 y CDRH3. Puede generarse otra biblioteca que tenga mutaciones en CDRL1, CDRL2 y CDRL3. Estas bibliotecas también pueden usarse de forma conjunta entre sí para generar agentes de unión de afinidades deseadas. Por ejemplo, después de una o más rondas de selección de las bibliotecas de cadenas pesadas para la unión a un antígeno diana, puede remplazarse una biblioteca de cadenas ligeras en la población de agentes de unión de cadena pesada para rondas adicionales de selección para aumentar la afinidad de los agentes de unión.

15 Preferiblemente, se crea una biblioteca por sustitución de aminoácidos originales con aminoácidos variantes en la región CDRH3 de la región variable de la secuencia de cadena pesada. La biblioteca resultante puede contener una pluralidad de secuencias de anticuerpo, donde la diversidad de secuencia está principalmente en la región CDRH3 de la secuencia de cadena pesada.

20 En un aspecto, la biblioteca se crea en el contexto de la secuencia del anticuerpo humanizado 4D5, o la secuencia de los aminoácidos flanqueantes de la secuencia del anticuerpo humanizado 4D5. Preferiblemente, la biblioteca se crea por sustitución de al menos los restos 95-100a de la cadena pesada con aminoácidos codificados por la serie de codones *DVK*, donde la serie de codones *DVK* se usa para codificar una serie de aminoácidos variante para cada una de estas posiciones. Un ejemplo de una serie de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia $(DVK)_7$. En algunas realizaciones, se crea una biblioteca por sustitución de los restos 95-100a con aminoácidos codificados por las series de codones tanto *DVK* como *NNK*. Un ejemplo de una serie de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia $(DVK)_6$ (*NNK*). En otra realización, se crea una biblioteca por sustitución de al menos los restos 95-100a con aminoácidos codificados por las series de codones tanto *DVK* como *NNK*. Un ejemplo de una serie de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia $(DVK)_5$ (*NNK*). Otro ejemplo de una serie de oligonucleótidos que es útil para crear estas sustituciones comprende la secuencia $(NNK)_6$. Los especialistas en la técnica pueden determinar otros ejemplos de secuencias oligonucleotídicas adecuadas de acuerdo con los criterios descritos en este documento.

35 En otra realización, se utilizan diferentes diseños de CDRH3 para aislar agentes de unión de alta afinidad y para aislar agentes de unión para una diversidad de epítopos. El intervalo de longitudes de la CDRH3 generada en esta biblioteca es de 11 a 13 aminoácidos, aunque también pueden generarse longitudes diferentes de ésta. La diversidad de H3 puede expandirse usando las series de codones *NNK*, *DVK* y *NVK*, así como diversidad más limitada en el extremo N y/o C-terminal.

40 También puede generarse diversidad en CDRH1 y CDRH2. Los diseños de diversidades de CDR-H1 y H2 siguen la estrategia dirigida a imitar repertorios de anticuerpos naturales como se ha descrito, con la modificación de enfocar la diversidad mucho más coincidente a la diversidad natural que el diseño previo.

45 Para diversidad en CDRH3, pueden construirse por separado múltiples bibliotecas con diferentes longitudes de H3 y después combinarse para seleccionar agentes de unión a antígenos diana. Las múltiples bibliotecas pueden combinarse y clasificarse usando selección en soporte sólido y métodos de clasificación en solución como se ha descrito previamente y en este documento a continuación. Pueden emplearse múltiples estrategias de clasificación. Por ejemplo, una variación implica clasificación sobre diana unida a un sólido, seguido de clasificación para una marca que puede estar presente en el polipéptido de fusión (por ejemplo, marca anti-gD) y seguido de otra clasificación sobre diana unida a un sólido. Como alternativa, las bibliotecas pueden clasificarse primero sobre la diana unida a una superficie sólida, los agentes de unión eluidos después se clasifican usando unión en fase de solución con concentraciones decrecientes de antígeno diana. Utilizar combinaciones de diferentes métodos de clasificación proporciona minimización de selección de solamente secuencias altamente expresadas y proporciona selección de varios clones diferentes de alta afinidad.

55 Los agentes de unión de alta afinidad para el antígeno de NRP diana pueden aislarse de las bibliotecas. Limitar la diversidad en la región H1/H2 disminuye la degeneración aproximadamente 10^4 a 10^5 veces y permitir más diversidad H3 proporciona más agentes de unión de alta afinidad. Utilizar bibliotecas con diferentes tipos de diversidad en CDRH3 (por ejemplo, utilizando *DVK* o *NVT*) proporciona aislamiento de agentes de unión que pueden unirse a diferentes epítopos de un antígeno diana.

60 De los agentes de unión aislados de las bibliotecas combinadas como se ha descrito anteriormente, se ha descubierto que la afinidad puede mejorarse adicionalmente proporcionando diversidad limitada en la cadena ligera. La diversidad de cadena ligera se genera en esta realización del siguiente modo en CDRL1: la posición de aminoácido 28 está codificada por *RDT*; la posición de aminoácido 29 está codificada por *RKT*; la posición de aminoácido 30 está codificada por *RVW*; la posición de aminoácido 31 está codificada por *ANW*; la posición de

aminoácido 32 está codificada por THT; opcionalmente, la posición de aminoácido 33 está codificada por CTG; en CDRL2: la posición de aminoácido 50 está codificada por KBG; la posición de aminoácido 53 está codificada por AVC; y opcionalmente, la posición de aminoácido 55 está codificada por GMA; en CDRL3: la posición de aminoácido 91 está codificada por TMT o SRT o ambas; la posición de aminoácido 92 está codificada por DMC; la posición de aminoácido 93 está codificada por RVT; la posición de aminoácido 94 está codificada por NHT; y la posición de aminoácido 96 está codificada por TWT o YKG o ambas.

En otra realización, se genera una biblioteca o bibliotecas con diversidad en CDRH1, CDRH2 y CDRH3. En esta realización, la diversidad en CDRH3 se genera usando una diversidad de longitudes de regiones H3 y usando principalmente series de codones XYZ y NNK o NNS. Las bibliotecas pueden formarse usando oligonucleótidos individuales y combinarse o los oligonucleótidos pueden combinarse para formar un subconjunto de bibliotecas. Las bibliotecas de esta realización pueden clasificarse frente a la diana unida a un sólido. Los clones aislados de múltiples clasificaciones pueden seleccionarse para la especificidad y afinidad usando ensayos ELISA. Para la especificidad, los clones pueden seleccionarse frente a los antígenos diana deseados así como otros antígenos no diana. Aquellos agentes de unión para el antígeno de NRP1 diana, después pueden seleccionarse para la afinidad en ensayo ELISA competitivo de unión en solución o ensayo de competición en aplicaciones puntuales. Los agentes de unión de alta afinidad pueden aislarse de la biblioteca utilizando series de codones XYZ preparadas como se ha descrito anteriormente. Estos agentes de unión pueden producirse fácilmente como anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno en alto rendimiento en cultivo celular.

En algunas realizaciones, puede ser deseable generar bibliotecas con una mayor diversidad en las longitudes de la región CDRH3. Por ejemplo, puede ser deseable generar bibliotecas con regiones CDRH3 que varían de aproximadamente 7 a 19 aminoácidos.

Los agentes de unión de alta afinidad aislados de las bibliotecas de estas realizaciones se producen fácilmente en cultivo de células bacterianas y eucariotas en alto rendimiento. Los vectores pueden diseñarse para retirar fácilmente secuencias tales como marcas gD, secuencia del componente proteico de cubierta viral, y/o para añadir en la región constante secuencias para proporcionar producción de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión a antígeno en alto rendimiento.

Una biblioteca con mutaciones en CDRH3 puede combinarse con una biblioteca que contiene versiones variantes de otras CDR, por ejemplo CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1 y/o CDRH2. Por tanto, por ejemplo, en una realización, una biblioteca de CDRH3 se combina con una biblioteca de CDRL3 creadas en el contexto de la secuencia del anticuerpo humanizado 4D5 con aminoácidos variantes en las posiciones 28, 29, 30, 31, y/o 32 usando series de codones predeterminadas. En otra realización, una biblioteca con mutaciones en la CDRH3 puede combinarse con una biblioteca que comprende dominios variables de cadena pesada CDRH1 y/o CDRH2 variantes. En una realización, la biblioteca de CDRH1 se crea con la secuencia del anticuerpo humanizado 4D5 con aminoácidos variantes en las posiciones 28, 30, 31, 32 y 33. Una biblioteca de CDRH2 puede crearse con la secuencia del anticuerpo humanizado 4D5 con aminoácidos variantes en las posiciones 50, 52, 53, 54, 56 y 58 usando las series de codones predeterminadas.

Mutantes de anticuerpo anti-NRP

El anticuerpo anti-NRP generado a partir de bibliotecas en fagos puede modificarse adicionalmente para generar mutantes de anticuerpo con propiedades físicas, químicas y/o biológicas mejoradas sobre el anticuerpo precursor. Cuando el ensayo usado es un ensayo de actividad biológica, el mutante de anticuerpo preferiblemente tiene una actividad biológica en el ensayo de elección que es al menos aproximadamente 10 veces mejor, preferiblemente al menos aproximadamente 20 veces mejor, más preferiblemente al menos aproximadamente 50 veces mejor, y a veces al menos aproximadamente 100 veces o 200 veces mejor, que la actividad biológica del anticuerpo precursor en ese ensayo. Por ejemplo, un mutante de anticuerpo anti-NRP1 preferiblemente tiene una afinidad de unión para NRP que es al menos aproximadamente 10 veces más fuerte, preferiblemente al menos aproximadamente 20 veces más fuerte, más preferiblemente al menos aproximadamente 50 veces más fuerte, y a veces aproximadamente 100 veces o 200 veces más fuerte, que la afinidad de unión del anticuerpo anti-NRP precursor.

Para generar el mutante de anticuerpo, se introducen una o más alteraciones de aminoácido (por ejemplo, sustituciones) en una o más de las regiones hipervariables del anticuerpo precursor. Como alternativa, o adicionalmente, pueden introducirse una o más alteraciones (por ejemplo, sustituciones) de restos de la región flanqueante en el anticuerpo precursor donde éstas producen una mejora en la afinidad de unión del mutante de anticuerpo por el antígeno de la segunda especie de mamífero. Ejemplos de restos de la región flanqueante a modificar incluyen aquellos que no se unen covalentemente al antígeno directamente (Amit et al. (1986) Science 233:747-753); interactúan con/afectan a la conformación de una CDR (Chotia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917); y/o participan en la interfaz $V_L - V_H$ (documento EP 239 400B1). En ciertas realizaciones, la modificación de uno o más de dichos restos de la región flanqueante provoca una potenciación de la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno de la segunda especie de mamífero. Por ejemplo, puede alterarse de aproximadamente uno a aproximadamente cinco restos flanqueantes en esta realización de la invención. A veces, esto puede ser suficiente para producir un mutante de anticuerpo adecuado para su uso en ensayos preclínicos, incluso cuando no se ha

alterado ninguno de los restos de la región hipervariable. Normalmente, sin embargo, el mutante de anticuerpo comprenderá una o más alteraciones adicionales en la región hipervariable.

5 Los restos de la región hipervariable que se alteran pueden cambiarse aleatoriamente, especialmente cuando la afinidad de unión de partida del anticuerpo precursor es tal que dichos mutantes de anticuerpo de forma aleatoria pueden seleccionarse fácilmente.

10 Un procedimiento útil para generar dichos mutantes de anticuerpo se llama "mutagénesis por barrido con alanina" (Cunningham y Wells (1989) Science 244:1081-1085). Aquí, se reemplaza uno o más de los restos de la región hipervariable por restos de alanina o polialanina para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno de la segunda especie de mamífero. Ese resto o restos de la región hipervariable que muestran sensibilidad funcional a las sustituciones entonces se refinan introduciendo mutaciones adicionales u otras mutaciones en o por lo sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no tiene que estar predeterminada. Los mutantes ala
15 producidos de este modo se seleccionan para su actividad biológica como se describe en este documento.

20 Normalmente se empezaría con una sustitución conservativa tal como las mostradas a continuación bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones producen un cambio en la actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión), entonces se introducen cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la siguiente tabla, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y se seleccionan los productos.

Sustituciones preferidas:

Resto original	Sustituciones ejemplares	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

25 Se consiguen modificaciones incluso más sustanciales en las propiedades biológicas de los anticuerpos seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoide,
30 (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 basados en propiedades comunes de la cadena lateral:

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

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

35 (3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: his, lys, arg;

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

5 (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

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

10 En otra realización, los sitios seleccionados para modificación son se maduran en afinidad usando presentación en fagos (véase anteriormente).

15 Las moléculas de ácido nucleico que codifican mutantes de secuencia de aminoácidos se preparan por una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque sin limitación, mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis por casete de un mutante preparado previamente o una versión no mutante del anticuerpo precursor. El método preferido para preparar mutantes es mutagénesis dirigida al sitio (véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488).

20 En ciertas realizaciones, el mutante de anticuerpo solamente tendrá un único resto de la región hipervariable sustituido. En otras realizaciones, se habrán sustituido dos o más de los restos de la región hipervariable del anticuerpo precursor, por ejemplo de aproximadamente dos a aproximadamente diez sustituciones en la región hipervariable.

25 Normalmente, el mutante de anticuerpo con propiedades biológicas mejoradas tendrá una secuencia de aminoácidos que tendrá al menos un 75 % de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo precursor, más preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 %, y mucho más preferiblemente al menos un 95 %. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en este documento como el porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo resto) o similares (es decir, un resto de aminoácido del mismo grupo basado en propiedades comunes de la cadena lateral, véase anteriormente) a los restos del anticuerpo precursor, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, deleciones, o inserciones N-terminales, C-terminales, o internas en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable se entenderá que afecta a la identidad o similitud de secuencia.

35 Después de la producción del mutante de anticuerpo, se determina la actividad biológica de esa molécula respecto al anticuerpo precursor. Como se ha indicado anteriormente, esto puede implicar la determinación de la afinidad de unión y/u otras actividades biológicas del anticuerpo. En una realización preferida de la invención, se prepara un panel de mutantes de anticuerpo y se selecciona para la afinidad de unión por el antígeno tal como NRP1 o un fragmento de la misma. Uno o más de los mutantes de anticuerpo seleccionados de esta criba inicial se someten opcionalmente a uno o más ensayos adicionales de actividad biológica para confirmar que el mutante o mutantes de anticuerpo con afinidad de unión potenciada son de hecho útiles, por ejemplo para estudios preclínicos.

45 El mutante o mutantes de anticuerpo así seleccionados pueden someterse a modificaciones adicionales, muchas veces dependiendo del uso pretendido del anticuerpo. Dichas modificaciones pueden implicar alteración adicional de la secuencia de aminoácidos, fusión a uno o más polipéptidos heterólogos y/o modificaciones covalentes tales como las detalladas a continuación. Con respecto a alteraciones de la secuencia de aminoácidos, se han detallado anteriormente modificaciones ejemplares. Por ejemplo, también puede sustituirse 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 prevenir entrecruzamiento aberrante. A la inversa, pueden añadirse uno o más enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv). Otro tipo de mutante de aminoácidos tiene un patrón alterado de glucosilación. Esto puede conseguirse delecionando uno o más restos de carbohidrato encontrados 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 a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La glucosilación O-ligada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiamino ácido, 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 descritas anteriormente (para sitios de glucosilación N-ligada). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación O-ligada).

Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

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

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-NRP, se aísla el ácido nucleico que lo codifica y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente o sintetiza usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a ADN que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector generalmente incluyen, aunque 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.

(i) Componente de secuencia señal

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

El ADN para dicha región precursora se liga en fase de lectura con el ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Componente de origen de replicación

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que posibilita que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Generalmente, en vectores de clonación esta secuencia es una que posibilita que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del hospedador, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una diversidad de bacterias, levaduras, y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras, 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 mamíferos (el origen de SV40 puede usarse normalmente sólo porque contiene el promotor temprano).

(iii) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también llamado un marcador de selección. 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 deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Aquellas células que se transforman satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y por tanto sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otros ejemplo de marcadores adecuados de selección para células de mamífero son aquellos que posibilitan la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico del anticuerpo, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína-I y -II, preferiblemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero 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 DHFR.

Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo silvestre que contienen DHFR endógena) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican anticuerpo, proteína DHFR de tipo silvestre, y otros marcador de selección tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la patente de Estados Unidos N° 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras 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 de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1. Jones (1977) Genetics 85:12. La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura entonces proporciona un entorno eficaz para detectar transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. Asimismo, las cepas de levadura *Leu2*-deficientes (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan por plásmidos conocidos que albergan el gen *Leu2*.

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

(iv) Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y está unido de forma funcional al ácido nucleico del anticuerpo. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor *phoA*, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, 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 de Shine-Dalgarno (S.D.) unida de forma funcional al ADN que codifica el anticuerpo.

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

Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para la 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 las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Se describen adicionalmente vectores y promotores adecuados para su uso en expresión en levadura en el documento EP 73.657. También se usan ventajosamente potenciadores de levadura con promotores de levadura.

La transcripción del anticuerpo desde vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como polioma virus, virus de viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis-B y más preferiblemente 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, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de 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 de replicación del virus SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Se describe un sistema para expresar ADN en hospedadores de mamífero usando el virus de papiloma bovino como un vector en la patente de Estados Unidos N° 4.419.446. Se describe una modificación de este sistema en la patente de Estados Unidos N° 4.601.978. Véase también Reyes et al. (1982) Nature 297:598-601 sobre la expresión de ADNc de interferón- β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa de virus del herpes simple. Como alternativa, puede usarse la repetición terminal larga del virus de sarcoma de rous como promotor.

(v) Componente de elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo de esta invención por eucariotas superiores a menudo se aumenta insertando una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras son ahora conocidas de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. 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 polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv (1982) Nature 297:17-18 sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede sufrir corte y ajuste en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia codificante del anticuerpo, pero se localiza preferiblemente en un sitio 5' desde el promotor.

(vi) Componente de terminación de transcripción

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están habitualmente disponibles de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o virales. 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 el documento WO94/11026 y el vector de expresión descrito en el mismo.

(vii) Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de este documento son las células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilli tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales 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 los procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores adecuados de clonación o expresión para vectores que codifican anticuerpo. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadería, es la más habitualmente usada entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, varios otros géneros, especies, y cepas están habitualmente disponibles y son útiles en este documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedadores *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo glucosilado se obtienen de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrado incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Está disponible al público una diversidad de cepas virales para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden usarse como el virus de este documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También pueden utilizarse cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, y tabaco como hospedadores.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas útiles de células hospedadoras de mamífero son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al. (1977) J. Gen Virol. 36:59); células renales 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 renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442);

células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario humano (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (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).

- 5 Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según lo apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivos de las células hospedadoras

- 10 Las células hospedadoras usadas para producir el anticuerpo de esta invención pueden cultivarse en una diversidad de medios. Los 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) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, 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 N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; o patente de Estados Unidos Re. 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según lo necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tal como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMYCIN™), elementos traza (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 suplemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas para los especialistas en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son aquellas previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para los especialistas en la técnica.

(ix) Purificación de anticuerpo

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

- 45 La composición de anticuerpo preparada de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (Lindmark et al. (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al. (1986) *EMBO J.* 5:15671575). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es muy a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos más cortos de procesamiento que 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 la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poliácido aspártico), cromatografía en SDS-PAGE, y precipitación en sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

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

Formulaciones farmacéuticas

- 65 Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo se preparan para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables

(Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los destinatarios 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 benzalkonio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, 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 que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación de este documento también puede contener más de un compuesto activo según lo necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquellas actividades complementarias que no afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente un agente inmunosupresor. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metil-metacilato), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a usarse para administración *in vivo* deben ser estéril. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas estériles de filtración.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, dichas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsula. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros degradables ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Cuando polímeros tales como acetato de etileno-vinil y ácido láctico-ácido glicólico posibilita liberar moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos más cortos de tiempo. Cuando permanecen anticuerpos encapsulados en el organismo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, provocando una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlace S-S intermolecular a través de intercambio tiodisulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando restos de sulfhidrilo, liofilizando en soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones específicas de matriz polimérica.

Usos terapéuticos

Se contempla que el anticuerpo de la presente invención puede usarse para tratar a un mamífero. En una realización, el anticuerpo se administra a un mamífero no humano con el fin de obtener datos preclínicos, por ejemplo. Los mamíferos no humanos ejemplares a tratarse incluyen primates no humanos, perros, gatos, roedores y otros mamíferos en que se realizan estudios preclínicos. Dichos mamíferos pueden ser modelos animales establecidos para una enfermedad a tratarse con el anticuerpo o puede usarse para estudiar la toxicidad del anticuerpo de interés. En cada una de estas realizaciones, pueden realizarse estudios de escala de dosis en el mamífero. Cuando el anticuerpo es un anticuerpo anti-NRP1, puede administrarse 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 terapia antiangiogénica del cáncer, una nueva estrategia de tratamiento del cáncer dirigida a inhibir el desarrollo de vasos sanguíneos tumorales necesarios para proporcionar nutrientes para dar soporte al crecimiento del tumor. Como la angiogénesis está implicada tanto en crecimiento de tumores primarios como como metástasis, el tratamiento antiangiogénico proporcionado por la invención es capaz de inhibir el crecimiento neoplásico de tumor en los sitios primarios así como prevenir la metástasis de tumores en los sitios secundarios, permitiendo por lo tanto el ataque de los tumores por otros agentes terapéuticos. Ejemplos de cáncer a

tratarse en este documento incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, y carcinoma escamoso del pulmón), cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma del endometrio o el útero, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de células B (incluyendo linfoma no 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 pequeño de alto grado; 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 células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD), así como proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), y síndrome de Meigs. Más particularmente, los cánceres que son susceptibles a tratamiento por los anticuerpos de la invención incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer pulmonar no microcítico, linfoma no 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 de ovario, mesotelioma, y mieloma múltiple.

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

En ciertos aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia de combinación para el cáncer con el anticuerpo de la invención incluyen otros agentes anti-angiogénicos. Se han identificado muchos agentes anti-angiogénicos y son conocidos en la técnicas, incluyendo los enumerados por 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, fragmento solubles del receptor de VEGF, aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos anti-VEGFR neutralizantes, inhibidores de VEGFR tirosina quinasas y cualquier combinación de los mismos. Como alternativa, o adicionalmente, pueden coadministrarse uno o más anticuerpos anti-NRP1 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 anti-VEGF preferidos incluyen aquellos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpos anti-hVEGF A4.6.1. Más preferiblemente el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab o ranibizumab.

En algunos otros aspectos, otros agentes terapéuticos útiles para la terapia de combinación de tumores 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. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NRP1 de la invención puede usarse en combinación con inhibidores de molécula pequeña de receptores tirosina quinasa (RTKI) dirigidos a uno o más receptores tirosina tales como receptores de VEGF, receptores de FGF, receptores de EGF y receptores de PDGF. Muchos RTKI terapéuticos de molécula pequeña son conocidos en la técnica, incluyendo, aunque 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, solo o en combinación con un segundo agente terapéutico (tal como un anticuerpo anti-VEGF) puede usarse adicionalmente en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos. Puede usarse una diversidad de agentes quimioterapéuticos en los métodos de tratamiento combinado de la invención. Se proporciona una lista ejemplar y no limitante de agentes quimioterapéuticos contemplados en este documento bajo "Definición".

Cuando el anticuerpo anti-Nrp se co-administra con un segundo agente terapéutico, el segundo agente terapéutico puede administrarse primero, seguido del anticuerpo anti-Nrp. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o administración del anticuerpo anti-Nrp primero. Las dosificaciones adecuadas para el segundo agente terapéutico son aquellas actualmente usadas y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el anticuerpo anti-Nrp.

Para la prevención o tratamiento de enfermedades, la dosificación apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico que atiende. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente en una vez o sobre una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, sea, por ejemplo, por una o más administraciones diferentes, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas sobre varios días o más, dependiendo del estado, el tratamiento se sostiene hasta que sucede una supresión deseada de los síntomas de la 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 variada de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. Más preferiblemente, dicho régimen de dosificación se usa en combinación con un régimen quimioterapéutico como la terapia de primera línea para tratar cáncer colorrectal metastásico. En algunos aspectos, el régimen quimioterapéutico implica la administración tradicional intermitente de alta dosis. En algunos otros aspectos, los agentes quimioterapéuticos se administran usando dosis más pequeñas y más frecuentes sin pausas programadas ("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 un modo coherente con la buena práctica médica. Factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la programación de administración, y otros factores conocidos para los facultativos médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo a administrarse estará regida por dichas consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar, o tratar una enfermedad o trastorno. El anticuerpo no lo necesita, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes actualmente usados 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 vías de administración como las usadas anteriormente en este documento o aproximadamente del 1 al 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora. Generalmente, el alivio o tratamiento de una enfermedad o trastorno implica la reducción de uno o más síntomas o problemas médicos asociados con la enfermedad o trastorno. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede conseguir uno o una combinación de los siguientes: reducir la cantidad de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, disminuir en alguna medida y/o detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir metástasis tumoral; inhibir, en alguna medida, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en alguna medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o eliminar células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. En algunas realizaciones, puede usarse una composición de esta invención para prevenir la aparición o reaparición de la enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero.

Usos no terapéuticos

Los anticuerpos de la invención pueden usarse como agentes de purificación de afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida tal como resina Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno a purificarse, y después de ello el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra excepto el antígeno a purificar, que está unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón glicina, pH 5,0, que liberará el antígeno del anticuerpo.

Los anticuerpos de esta invención también pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células específicas, tejidos o suero.

Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo normalmente se marcará con un resto detectable. Están disponibles numerosos marcadores que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos, tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I . El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, Coligen et al. (1991) Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, Nueva York, Pubs. por ejemplo y la radiactividad puede medirse usando recuento de centelleo.

(b) Están disponibles marcadores fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lissamina, ficoeritrina y Texas Red. Los marcadores fluorescentes pueden conjugarse al anticuerpo usando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, *supra*, por ejemplo. La fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro.

(c) Están disponibles diversos marcadores de sustrato enzimático y la patente de Estados Unidos N° 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de éstos. La enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente. Como alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Anteriormente se han descrito técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia. El sustrato quimioluminiscente llega a excitarse electrónicamente por

una reacción química y después puede emitir luz que puede medirse (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de Estados Unidos N° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano rusticano (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasas, microperoxidasa, y similares. Se describen técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos en O'Sullivan et al. (1981) Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, en Methods in Enzym. (ed J. Langone y H. Van Vunakis), Academic press, Nueva York 73:147-166.

Ejemplos de combinaciones enzima sustrato incluyen, por ejemplo:

- (i) Peroxidasa de rábano rusticano (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, donde la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor colorante (por ejemplo, ortofenileno diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMB));
- (ii) fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y
- (iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

Están disponibles para los especialistas en la técnica otras numerosas combinaciones enzima-sustrato. Para una revisión general de éstas, véanse las patentes de Estados Unidos N 4.275.149 y 4.318.980.

A veces, el marcador se conjuga indirectamente con el anticuerpo. Los especialistas en la técnica serán conscientes de las diversas técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcadores mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y por tanto, el marcador puede conjugarse con el anticuerpo de esta forma indirecta. Como alternativa, para conseguir conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Por tanto, puede conseguirse la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.

En otra realización de la invención, el anticuerpo no tiene que marcarse, y la presencia del mismo puede detectarse usando un anticuerpo marcador que se une al anticuerpo.

Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos tipo sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pág.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón marcador de competir con el analito de la muestra de ensayo por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de antígeno en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que queda unida a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que queda unida, los anticuerpos generalmente se insolubilizan antes o después de la competición, de modo que el patrón y el analito que están unidos a los anticuerpos puedan separarse convenientemente del patrón y el analito que permanecen sin unir.

Los ensayos tipo sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una diferentes parte inmunogénica, o epítipo, de la proteína a detectar. En un ensayo tipo sándwich, el analito de la muestra de ensayo se une por un primer anticuerpo que está inmovilizado en un soporte sólido, y después de ello un segundo anticuerpo se une al analito, formado de este modo un completo de tres partes insoluble. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.376.110. El segundo anticuerpo puede en sí mismo estar marcado con un resto detectable (ensayos tipo sándwich directos) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un resto detectable (ensayo tipo sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo tipo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

Para inmunohistoquímica, la muestra de tumor puede ser fresca o congelada o puede estar incrustada en parafina y fijada con un conservante tal como formalina, por ejemplo.

Los anticuerpos también pueden usarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, el anticuerpo se marca con un radionúclido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) o un colorante de modo que el tumor puede localizarse usando inmuno-centelleografía.

En una realización, un método para detectar NRP1 en una muestra biológica (por ejemplo, tejido, sangre, suero, líquido cefalorraquídeo) o una muestra biológica preparada puede comprender la etapa de poner en contacto un anticuerpo de esta invención con la muestra y observar el anticuerpo anti-NRP1 unido a la NRP1 en la muestra o determinar la cantidad de anticuerpo anti-NRP1 unido a NRP1 en la muestra. En otra realización, un método para

detectar NRP1 en un sujeto comprende la etapa de administrar un anticuerpo de esta invención al sujeto y observar el anticuerpo anti-NRP1 unido a la NRP1 en el sujeto o determinar la cantidad del anticuerpo anti-NRP1 unido a NRP1 en el sujeto (por ejemplo, ser humano, ratón, conejo, rata, etc.).

5 Kits de diagnóstico

Por razones de conveniencia, el anticuerpo de la presente invención puede proporcionarse en un kit, es decir, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo se marca con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un sustrato precursor que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, habitualmente liofilizados, incluyendo excipientes que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tendrá la concentración apropiada.

Artículos de fabricación

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente aloja una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el anticuerpo. La etiqueta en, o asociada con, el recipiente indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y el usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos con instrucciones de uso.

Los siguientes ejemplos pretenden simplemente ilustrar la práctica de la presente invención y no se proporcionan a modo de limitación.

35 Ejemplos

Ejemplo 1

Construcciones y función de anticuerpos anti-Nrp1^B y anti-panNrp^A

Se ha informado de una estrategia para desarrollar anticuerpos derivados de fagos que bloquean selectivamente la unión de semaforina o VEGF a Nrp1 por Liang et al., J Mol Biol 366, 815-29 (2007) y Pan et al., Cancer Cell 11, 53-67 (2007). Estos anticuerpos monoclonales se diseñaron como herramientas para discriminar entre respuestas mediadas por Nrp1 para cualquier ligando y para evaluar su potencial como agentes terapéuticos en modelos murinos de tumor.

En resumen, se diseñó una biblioteca de anticuerpos sintéticos humanos en fagos que se construyó sobre un único esqueleto consenso con diversidad VH/VL. Se describen detalles del diseño y selección de esta biblioteca de anticuerpos en Liang et al., *supra*, y también pueden encontrarse en el documento WO 03/102157 publicado el 11 de diciembre de 2003. A partir de esta biblioteca, se generaron anticuerpos bloqueantes funcionales contra NRP1 humana y murina. Los anticuerpos que mapean al dominio b1b2 de NRP1 podrían bloquear la unión de VEGF y NRP1, y la migración de células HUVEC inducida por VEGF. Los anticuerpos identificados incluían un anticuerpo bloqueante de VEGF (clon YW107.4.87; anti-Nrp1^B) que se une a Nrp1 con una afinidad de 0,2 nM (Liang et al., *supra*; Pan et al., *supra*). Aunque este anticuerpo bloquea la interacción entre VEGF y Nrp1, no antagoniza la función Sema3A. *In vivo*, anti-Nrp1^B no solamente reduce el remodelado vascular en la retina de ratón, pero también trabaja de forma aditiva con terapia anti-VEGF para ralentizar el crecimiento del tumor (Liang et al., *supra* y Pan et al., *supra*).

Siguiendo el mismo enfoque, usando una biblioteca de anticuerpos sintéticos humanos en fagos construida sobre una única región flanqueante consenso, se ha desarrollado un anticuerpo (clon YW68.11.26, anti-panNrp^A), que reacciona de forma cruzada tanto con Nrp1 como con Nrp2 con afinidades de 0,21 y 0,15 nM, respectivamente (Fig. S1). Las secuencias de dominio variable de cadena ligera y pesada variable de YW68.11.26 y YW68.11 relacionado se muestran en las Figuras 7 y 8, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los fragmentos Fab de anticuerpos IgG1 anti-panNrp^A YW68.11 e YW68.11.26 se muestran en las Figuras 9A y 9B, respectivamente.

65

En contraste con anti-Nrp1^B, anti-panNrp^A no afecta a la unión de VEGF₁₆₅ o VEGF-C (datos no mostrados). La evaluación de la capacidad de ambos anticuerpos de inhibir el colapso mediado por Sema3A de los conos de crecimiento de axones a partir de ganglios de la raíz dorsal murina (DRG) (Fig. 1). La adición de Sema3A provoca la retracción de los procesos de actina con los conos de crecimiento de DRG; esta acción se antagoniza completamente por anti-panNrp^A, pero no por anti-Nrp1^B.

Ejemplo 2

Estudios estructurales de complejos neuropilina/anticuerpo

Materiales y métodos

Ensayos funcionales y afinidades de unión de anticuerpo

Los ensayos de colapso y determinación de las afinidades de unión de anticuerpo anti-Nrp se realizaron como se ha descrito previamente (He, Z y Tessier-Lavigne, M., Cell 90, 739-51 (1997); Liang et al., *supra* y Pan et al., *supra*).

Expresión proteica y purificación para estudios cristalográficos

Se clonaron Nrp1-b1, Nrp1-b1b2, y Nrp2-b1b2 (véase Tabla S1 para límites de dominio) en pET15b (Novagen) y se expresaron en *E. coli* después de inducción a 37 °C (Nrp1-b1 y -b1b2) o 16 °C (Nrp2-b1b2). Todos los fragmentos de neuropilina tipo b se expresan como proteínas solubles sin la necesidad de un protocolo de re-plegamiento. Después de lisis celular, las proteínas se purificaron usando resina de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) en Tris 50 mM (pH 8,0), NaCl 300-500 mM, e imidazol 20 mM, y se eluyeron en el mismo tampón más imidazol 250 mM. Las marcas his₆ se retiraron con trombina, y las muestras se purificaron adicionalmente por cromatografía de filtración en gel usando una columna Superdex-75 equilibrada en Tris 25 mM (pH 8,0) y NaCl 150 mM.

Se generaron baculovirus recombinantes para facilitar la secreción de Nrp1-a2b1b2, Nrp2-a2b1b2, Nrp2-a1a2b1b2, y la Nrp2-ECD de longitud completa (Tabla S1) de células Hi5. Nrp2-a1a2b1b2 y la Nrp2-ECD de longitud completa se subclonaron con la señal de secreción nativa de Nrp2 y una marca His₆ C-terminal en pENTR/D-TOPO (Invitrogen) y se recombinaron en pDEST8 (Invitrogen) para generar un báculo viral. Nrp1-a2b1b2 y Nrp2-a2b1b2 se clonaron en pAcGP67B (Clontech). Después de infección, el medio de cultivo se recogió y se suplementó con Tris 50 mM (pH 8,0), CaCl₂ 5 mM, y NiCl₂ 1 mM; las proteínas se purificaron con Ni-NTA y cromatografía de filtración en gel como se describe para construcciones de neuropilina expresadas en bacterias.

Los fragmentos Fab para anti-Nrp1^B (YW107.4.87) y anti-panNrp^A (YW68.11.26) se expresaron en *E. coli*, se capturaron en una columna de proteína G equilibrada en PBS, y se eluyó con ácido acético al 0,58 %. Las fracciones proteicas se purificaron adicionalmente por cromatografía de intercambio iónico (SP-sepharose) en MES 20 mM (pH 5,5) y se eluyeron con un gradiente de 0 a 250 mM de NaCl. Los complejos Fab/Nrp estaban normalmente mezclados a proporción molar 1:1 y se purificaron adicionalmente usando una columna Superdex-200 equilibrada en Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) y NaCl 200 mM. Para la cristalización, se concentraron todas las muestras de neuropilina no unida y complejos Nrp/Fab como se detalla en la Tabla S1.

Cristalización, determinación de estructura, y refinamiento

Todos los cristales se obtuvieron por el método de difusión de vapor a 19 °C mezclando volúmenes iguales de proteína más solución de pocillo (véase la Tabla 1 suplementaria para los detalles). Para la crioprotección, los cristales generalmente se transfirieron a una solución de aguas madre más glicerol o etilenglicol al 20 % (Tabla S1). Los cristales de complejo Nrp1-b1/Fab se transfirieron a Hepes 10 mM (pH 7,2), PEG 1.500 al 25 %, y etilenglicol al 10 %; se dejaron deshidratar durante una noche frente a Hepes 10 mM (pH 7,2), PEG 1.500 al 25 %, y etilenglicol al 20 %; y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se recogieron conjuntos de datos en la Advanced Light Source (líneas de luz 5.0.1 o 5.0.2) o el Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (líneas de luz 9-2 o 11-1). Los datos se procesaron usando Denzo y Scalepack del HKL Suite (Otwinowski, Z y Minor, W., Methods in Enzymology 276,307-326 (1997)). Los parámetros de celda y estadística de datos se resumen en la Tabla 1.

Todas las estructuras cristalinas se resolvieron por remplazo molecular usando Phaser (McCoy et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 61, 458-64 (2005)). La estructura de Nrp1-b1b2 se resolvió usando la estructura cristalina de Nrp1-b1 (nº de acceso pdb 1KEX) (Lee, et al., Structure 11, 99-108 (2003)) como un modelo de búsqueda para cada dominio de factor de coagulación. Las coordenadas refinadas de la estructura de Nrp1-b1b2 sirvieron como sonda de búsqueda para la estructura de Nrp2-b1b2. La forma monoclinica del complejo Nrp2 a1a2b1b2/anti-panNrp^A-Fab se resolvió usando la estructura de Nrp2-b1b2 y fragmentos de Fab que contenían los dominios variables (V_H/V_L) o los dominios constantes (C_{H1}/C_L) del complejo B20-4/VEGF (nº de acceso pdb 2FJH). El dominio a2 se identificó por remplazo molecular usando el dominio CUB N-terminal de MASP-2; el dominio a1 no pudo localizarse por remplazo molecular y se puso manualmente dentro de la densidad electrónica. El complejo Nrp1-b1/Fab se resolvió usando la estructura cristalina de Nrp1-b1 y los fragmentos B20-4 descritos anteriormente. Todas las estructuras restantes se resolvieron usando las coordenadas refinadas de las estructuras b1b2 y el

dominio CUB a2 del complejo Nrp2-a1a2b1b2/Fab. Se construyeron modelos atómicos usando Coot (Emsley, P. y Cowtan, K. Coot, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-32 (2004)) y se refinaron con Refmac (Murshudov, et al., *Acta Crystallographica D53*, 240-255 (1997)).

5 Cristalización de Nrp1, Nrp2, y complejos neuropilina/Fab

Se usaron dos estrategias diferentes para producir proteína para estudios estructurales. Los fragmentos más pequeños de neuropilina que solamente incluyen los dominios tipo b se expresaron en *E. coli* mientras que las construcciones más grandes de Nrp requerían producción como proteínas secretadas de células de insecto infectadas por baculovirus. Se presenta una visión global de las siete estructuras en la Fig. 2. En resumen, los cristales de la parte de unión a VEGF (b1b2) de Nrp1 y Nrp2 difractaban a una resolución máxima de 1,8 y 1,95 Å, respectivamente. Los cristales de los dominios a2b1b2 de Nrp1 y Nrp2 se refinaron a 2,0 y 2,3 Å de resolución, respectivamente y el dominio b1 de Nrp1 en complejo con el Fab de bloqueo de VEGF, anti-Nrp1^B, difractaba a 2,2 Å de resolución. Finalmente, la estructura cristalina de los dominios Nrp2 ala2b1b2 se resolvió en complejo con el Fab de bloqueo de semaforina, anti-panNrp^A; se identificaron dos formas cristalinas de este complejo que difractaban a 2,75 y 3,1 Å. Todas las estructuras se resolvieron por remplazo molecular y se presentan con valores $R_{\text{trabajo}}/R_{\text{libre}}$ finales por debajo del 20/25 % con buena estequiometría (Tabla 1). Las estructuras de Nrp1 a2b1b2 tienen dos sitios de glucosilación N-ligada en lados opuestos del dominio a2 (Fig. 3B). La forma monoclinica del complejo Nrp2/Fab también muestra dos sitios de glucosilación dentro del dominio a2 (Fig. 3A); sin embargo, estos restos de azúcar no están bien definidos en la densidad de electrones de la estructura de Nrp2-a2b1b2 y por lo tanto no están modelados (Fig. 3B).

La arquitectura global de dominio del ectodominio de neuropilina

25 La región extracelular de neuropilina a menudo se divide en tres unidades que describen los dominios principales de unión a semaforina (a1a2), unión a VEGF (b1b2), y dimerización (c), respectivamente (Ellis, L.M., *Mol Cancer Ther* 5, 1099-107 (2006)). De hecho, la reciente estructura cristalina de Nrp1 b1b2 de rata (Vander Kooi, C.W., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 6152-6157 (2007)), identificó una gran interfaz entre los dominios b1 y b2 y como los restos enterrados entre los dominios están conservados en secuencia, esta disposición de dominio b1b2 se reconoció como características general de la familia de Nrp. Aquí, se han resuelto cuatro estructuras cristalinas de Nrp que incluyen los dominios a2, b1, y b2 (Fig. 2,3) a partir de una diversidad de condiciones de cristalización (Tabla S1). Dos modelos incluyen los dominios a1 unidos a fragmentos Fab mientras que otros dos incluyen iones de calcio en los dominios a2. A pesar de estas diferencias, los tres dominios (a2, b1, and, b2) comparten la misma disposición en todas las estructuras cristalinas y se compactan estrechamente alrededor de un pseudoeje de 3 factores (Fig. 3). Las estructuras de Nrp1 y Nrp2 a2b1b2 son muy similares y se superponen con una r.m.s.d. (desviación de la raíz cuadrática media) de 1,2 Å sobre 317 átomos C α . La interfaz entre b1 y b2 está conservada entre ambas neuropilinas, enterrando aproximadamente 1200-1500 Å² de superficie accesible al disolvente. De forma interesante, la interfaz entre el dominio a2 y el b1b2 está conservada en todas las estructuras también y entierra más de 2000 Å² de superficie accesible a disolvente, los que indica que los tres dominios forman una unidad estructural rígida (Fig. 3).

45 En contraste, la disposición de dominios entre a1 y a2b1b2 no está conservada entre las dos formas cristalinas del complejo Nrp2/anti-panNrp^A-Fab. Cuando se superponen los núcleos a2b1b2 de los receptores, los dominios a1 están desplazados en aproximadamente 7 Å con respecto uno del otro. La interfaz entre a1 y a2b1b2 es pequeña (~800 Å² de área superficial enterrada) y no está conservada. La ausencia de fuertes interacciones identifica la flexibilidad del dominio a1, lo que sugiere que puede experimentar cambios conformacional con respecto al resto de Nrp en solución o tras la unión al receptor (Fig. 3C).

Los dominios CUB de Nrp incluyen sitios de unión a calcio y semaforina

50 Los dominios a1 y a2 de Nrp1 y Nrp2 son dominios CUB (Ellis, L.M, *Mol Cencer Ther* 5, 1099-107 (2006)). En el prototipo de dominio CUB, espermadhesina (Romero, A., et al., *Nat Struct Biol* 4, 783-8 (1997)), el plegamiento comprende dos láminas β de 5 hebras que forman un sándwich β . Las hebras β 2, β 4, β 9, β 6 y β 7 forman una lámina β con la otra lámina que contiene hebras β 1, β 3, β 10, β 5 y β 8; sin embargo, las hebras β 1 y β 2 están frecuentemente ausentes en dominios CUB de varias proteínas de la familia del complemento (Feinberg, H. et al., *EMBOJ22*, 2348-59 (2003); Gregory, L.A. et al., *J Biol Chem* 278, 32157-64 (2003); Gregory, L.A. et al., *J Bol Chem* 279, 29391-7 (2004)). Similar a estas proteínas, los dominios a1 y a2 de Nrp carecen de la hebra β 1 (Fig. 4). Globalmente, los dominios CUB presentan un alto grado de similitud. Por ejemplo, el dominio Nrp a2 es estructuralmente similar al dominio Nrp1 a2 (r.m.s.d. de 0,9 Å), el dominio Nrp2 a1 (r.m.s.d. de 0,9 Å), y el dominio CUB de espermadhesina (Romero, A. et al., *supra*) (r.m.s.d. de 1,4 Å).

65 Las estructuras cristalinas de dominios CUB de las proteínas de la familia del complemento C1s y MASP-2^{36,37} contienen un sitio de unión a calcio en un extremo del sándwich. Las estructuras Nrp1 y Nrp2 a2b1b2 también contienen un ión unido en esta localización dentro del dominio a2 (Fig. 3B, 4A). En la estructura Nrp1, el ión se observa claramente en la densidad electrónica (Fig. S2) incluso aunque no se incluyan cationes divalentes durante

la cristalización (Tabla S1). En Nrp1, el ión del calcio se coordina por tres cadenas laterales cargadas negativamente (Glu¹⁹⁵, Asp²⁰⁹, y Asp²⁵⁰), dos oxígenos de carbonilo (Ala²⁵² y Ile²⁵³), y una molécula de agua (Fig. 4B). Asimismo, la coordinación de calcio implica tres aminoácidos cargados negativamente en Nrp2 (Glu¹⁹⁷, Asp²¹¹, y Asp²⁵²; véase la Fig. S2); estos tres restos están absolutamente conservados en los dominios a2 de doce especies relacionadas de forma distante (Fig. S3).

Una alineación de secuencia entre los dominios a1 y a2 de Nrp (Fig. S2) muestran que esta triada de restos cargados también está estrictamente conservada dentro del dominio a1 de las Nrp. Sin embargo, en el complejo Nrp2/anti-Nrp^A-Fab, no hay indicios de un ión unido en el dominio a1. Los bucles que aportan los restos que definen el putativo sitio de unión a Ca²⁺ de a1 están mal ordenados, lo que sugiere que Ca²⁺ desempeña un papel en la estabilización del plegamiento del dominio. Basándose en el alto grado de conservación de secuencia, es probable que la unión de calcio represente una característica compartida de dominio CUB de Nrp.

Las neuropilinas funcionan como co-receptores para seleccionar miembros de la familia de clase 3 de semaforinas. El extremo N-terminal contiene la firma de dominio "Sema", un propulsor β de 7 hojas (Antipenko, A., et al., *Neuron* 39, 589-98 (2003)) que es necesario para la unión de los dominios a1a2 de neuropilinas. Anti-panNrp^A bloquea la unión de Sema3 tanto a Nrp1 como a Nrp2 (Figura 1), pero no afecta a la unión de VEGF (datos no mostrados). En la estructura del complejo Nrp2/anti-panNrp^A-Fab (Fig. 4C), el fragmento Fab contacta solamente con el dominio a1 de Nrp2 sobre la cara p8-5-10-3 del sándwich que entierra aproximadamente 1400 Å² de superficie accesible a disolvente. La interfaz reconocida por este anticuerpo está bien conservada entre Nrp1 y Nrp2 ya que 11 de los 14 restos de Nrp2 que tienen más del 25 % de su superficie accesible enterrada en la interfaz son idénticos entre los dos receptores (Fig. 4C). El reconocimiento de un epítipo que está conservado entre Nrp1 y Nrp2 explica la capacidad del anticuerpo de unirse a ambos receptores con afinidades en el intervalo sub-nanomolar (Fig. S1).

En el lado del anticuerpo, 11 cadenas laterales contactan con Nrp2 de CDR L3, H2 y H3, 7 de las cuales son de carácter aromático (Fig. 4D). Estudios previos delinearon el sitio de unión a semaforina de Nrp1 usando mutagénesis dirigida al sitio (Gu, C. et al., *J Biol Chem* 277, 18069-76 (2002)). Basándose en el un modelo de espermadhesina, se seleccionaron restos putativamente expuestos a disolvente sobre la superficie del dominio a1 para sustituciones de aminoácidos. Usando este enfoque, se identificaron varios mutantes que alteran las interacciones entre Sema3A y Nrp1 (Gu et al., *supra*) y cuando se mapean en un modelo de Nrp1 a1, se localizan en los bucles en un polo del sándwich β a1 (Fig. 4C). Sustituciones en el otro extremo del dominio no tuvieron efecto sobre la unión de Sema3A (Gu et al., *supra*). Las mutaciones que alteran la unión de Sema3A están adyacentes al epítipo reconocido por el Fab de bloqueo de Sema3A (Fig. 4C), lo que sugiere fuertemente que el dominio sema se une a los bucles y la cara 8-5-10-3 del sándwich dentro del dominio Nrp2 a1. La localización del sitio de unión a semaforina también está adyacente al sitio putativo de unión a calcio del dominio a1 (Fig. 4C), lo que sugiere que la unión de calcio puede desempeñar un papel en las interacciones entre el ligando y el receptor.

Los dominios de Nrp tipo b contienen los sitios de unión a heparina y VEGF

Los dominios b de las estructuras de neuropilina b1b2 humana (Fig. 5A y Vander Koo et al., *supra*, Lee et al., *supra*) comparten homología significativa con los módulos de unión a fosfolípidos (tipo C2) de los factores de coagulación V y VIII (F5/8) (Macedo-Ribeiro et al., *Nature* 402, 434-9 (1999); Pratt, K.P., et al., *Nature* 402, 439-42 (1999)) y con el dominio de unión a galactosa de sialidasa bacteriana (Gaskell, A. et al., *Structure* 3, 1197-205 (1995)). De forma colectiva, estos dominios definen el plegamiento de discoidina que se clasifica topológicamente como un barril β tipo remolino distorsionado compuesto por ocho hebras β centrales. Un polo del dominio contiene tres "puntas" extendidas o bucles que normalmente constituyen el sitio de unión a ligando para miembros de la familia de discoidina (Macedo-Ribeiro et al., *supra*; Pratt et al., *supra*; Gaskell et al., *supra*). El fragmento b1b2 de Nrp1 y Nrp2 comparte el 50 % de identidad de secuencia y se superpone con una r.m.s.d. de 2,3 Å sobre 307 átomos de C α (Fig. 5A). Aunque los dominios b1 de Nrp1 y Nrp2 son casi indistinguibles (r.m.s.d = 0,6 Å), los dominios b2 se superponen no tan bien (r.m.s.d. = 2,7 Å) con derivando las diferencias en gran medida de diferentes conformaciones de las "puntas" (Fig. 5A). Como estas puntas frecuentemente definen sitios de unión dentro de la familia de discoidina (Vander Kooi et al., *supra*; Lee et al., *supra*; Macedo-Ribeiro et al., *supra*; Pratt et al., *supra*; Gaskell et al., *supra*), la disparidad entre Nrp1 y Nrp2 puede representar un modo para que las Nrp reconozcan distintos compañeros de unión.

A pesar de las diferencias entre los dominios b2 de la Nrp1 y Nrp2, los dominios b están fuertemente compactados y forman un esqueleto rígido (Fig. 5). La unión interdominios forma una profunda hendidura que discurre casi perpendicular al eje largo de los dos dominios b (Fig. 5). Esta hendidura, creada por el bucle p4:p5 de b1 y el bucle p5:p6 de b2, está rodeada por varios restos cargados positivamente, que basado en experimentos de mutagénesis sobre Nrp1 de rata (Vander Koo et al., *supra*), representa el sitio de unión a heparina de Nrp. El parche electropositivo está presente en la estructura de ambas Nrp humanas también (Fig. 5B). El dominio C-terminal de VEGF₁₆₅ (también conocido como VEGF₅₅) (Fairbrother et al., *Structure* 6, 637-48 (1998)) también contiene un sitio de unión a heparina. Como la heparina aumenta la afinidad de b1b2 por VEGF₁₆₅ hasta 100 veces (Mamluk, R. et al., *J Biol Chem* 277, 24818-25 (2002); Fuh, G. et al., *J Biol Chem* 275, 26690-5 (2000)), es factible que las Nrp usen heparina para reclutar VEGF₁₆₅ a esta región.

Además de esta interacción mediada por heparina entre el exón 7 de VEGF₁₆₅, la cola C-terminal de VEGF (CD-KPRR_{COOH}) codificada por el exón 8 puede unirse directamente a Nrp. En la estructura cristalina de Nrp1-b1b2 de rata en complejo con Tuftsina (Vander Kooi et al., *supra*), un mimético tetrapeptídico (TKPR_{COOH}) de la cola de VEGF (von Wronski, M.A. et al., J Biol Chem 281, 5702-10 (2006)), la arginina C-terminal está plegada fuertemente en un surco ácido creado por restos de las "puntas" conservadas del dominio b1. En varias de nuestras estructuras, incluyendo los tres complejos Fab, el resto C-terminal (una histidina) de una molécula de simetría relacionada ocupa el mismo bolsillo ácido del péptido Tuftsina (Fig. S4).

Para detallada adicionalmente los restos potenciales implicados en la unión de VEGF, se examinó la conservación superficial de restos de Nrp sobre la superficie b1b2 (Fig. 5C). Dos parches contiguos están conservados entre doce proteínas Nrp1 y Nrp2 (Fig. S3). Uno de estos sitios mapea directamente en el sitio de unión a Tuftsina, mientras que el segundo sitio incluye restos en el borde del parche de unión a heparina, lo que sugiere área adicional para las interacciones entre Nrp y VEGF.

En la estructura cristalina del complejo Nrp1-b1/anti-Nrp1^B-Fab (Fig. 5D), el Fab contacta con un epítipo localizado entre estos dos sitios putativos de unión a VEGF y solapa parcialmente con la hendidura de unión a Tuftsina. El epítipo de este anticuerpo de bloqueo de VEGF es inusual, implicando solamente los restos de las CDR L1 y H3. De promedio, las interfaces Fab/antígeno entierran 1680 Å² de la superficie expuesta a disolvente (Lo Conte et al., J Mol Biol 285,2177-98 (1999)), sin embargo solamente 900 Å² están protegidos en la interfaz Nrp1-b1/Fab. A pesar de la pequeña interfaz, anti-Nrp1^B se une estrechamente a Nrp1 con una afinidad de 0,2 nM (Liang et al., *supra*; Pan et al., *supra*).

VEGF y Sema3A no compiten por la unión a Nrp

En las estructuras cristalinas de Nrp/Fab de la presente invención, los epítopos de unión que bloquean la unión de VEGF y Semaforina están separados por 65 Å y localizados en lados opuestos de la Nrp (Fig. S5). Varios estudios han informado de que los VEGF y semaforinas compiten por la unión sobre la superficie celular y que esta competición implica un sitio de unión parcialmente solapante en el dominio b1 (Gu et al., *supra*; Miao, H.Q. et al., J Cell Biol 146, 2177-98 (1999); Narazaki, M. y Tosato, G., Blood 107, 3892-901 (2006)). Como la cola carboxilo de VEGF₁₆₅ y las semaforinas de clase 3 son ambas ricas en restos básicos, se sugirió que estas colas podrían competir por el surco electronegativo creado por las "puntas" en el dominio b1 (Vander Kooi et al., *supra*; Lee et al., *supra*). La reciente estructura cristalina de b1b2/Tuftsina identificó que la cola VEGF₁₆₅ probablemente ocupa este sitio de unión. Hemos demostrado previamente que anti-NRP1^B no antagoniza el colapso mediado por Sema3A de axones de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) (Liang et al., *supra*; Pan et al., *supra*) lo que sugiere que las colas C-terminales de Sema3 no se unen al mismo surco.

Experimentos previos de competición (Gu et al., *supra*; Miao et al., *supra*; Narazaki et al., *supra*) emplearon VEGF y semaforinas que contenían marca heteróloga (tal como fosfatasa alcalina) en el extremo C-terminal de la proteína. Es posible que la competición observada sea un resultado de choques estéricos de las marcas en lugar de competición directa entre la cola de VEGF y Sema3. Se examinó la capacidad de VEGF₁₆₅ de antagonizar el colapso mediado por Sema3 del crecimiento axonal desde DRG. Incluso a concentraciones de 100 mM, VEGF₁₆₅ no afectó a la capacidad de Sema3A de causar la retracción de los procesos de actina (Fig. 1). Estos datos demuestran que Sema3 no compite con VEGF por la unión al dominio b1 y que la cola de semaforinas contacta con un sitio diferente dentro de este dominio.

Modelos para la dimerización de neuropilina

Nrp1 y Nrp2 pueden formar homo- o hetero-multímeros incluso en ausencia de ligando (Takahashi, L. et al., Cell 99, 59-69 (1999); Chen, H. et al., Neuron 21, 1283-90 (1998); Giger, R.J. et al., Neuron 21, 1079-92 (1998); Takahashi et al., Nat Neurosci 1, 487-93 (1998)) y aunque la estequiometría exacta de los complejos de neuropilina aún no se ha establecido, se presume ampliamente que las Nrp forman homodímeros tras unión de ligando. Los datos actuales muestran que el dominio c es necesario pero no suficiente para la oligomerización de Nrp ya que mutantes de truncamiento que carecen de este dominio presentan mutimerización reducida respecto al ECD de longitud completa (Takahashi et al., Cell 99, 59-69 (1999); Chen et al., *supra*; Giger et al., *supra*; Nakamura et al., Neuron 21, 1093-100 (1998)). Las construcciones de neuropilina que incluyen los dominios a1a2 y b1b2 tienen mayor afinidad por algunas isoformas de VEGF que construcciones que abarcan solamente los dominio b1b2 (Mamluk, R. et al., J. Biol. Chem. 277, 24818-25 (2002); Karpanen, T. et al., FASEB J 20, 1462-72 (2006); Giger, R.J. et al., Neuron 25, 29-41 (2000)) aunque los dominios a1a2 no se unen a VEGF. Por lo tanto es factible que los dominios a1a2 contribuyan directamente a la dimerización de Nrp y por tanto fortalezcan las interacciones entre Nrp y el dímero de VEGF estabilizando el complejo 2:2. De forma interesante, las estructuras cristalinas de Nrp2-a1a2b1b2 de dos diferentes formas cristalinas (Tabla 1) contienen una interfaz cristalográfica conservada que está mediada por a1. En este dímero, los dominios a1 se alinean en una disposición casi anti-paralela a lo largo de las hebras β7 y β8. La interfaz entierra aproximadamente 1200 Å² de área superficial accesible a disolvente y está dominada por interacciones hidrófobas (Fig. S5). De forma interesante, se han observado dímeros similares para otros miembros de la familia del dominio CUB (Romero et al., *supra*). Sin embargo, el examen de las masas moleculares de tres construcciones de Nrp2 (a2b1b2, a1a2b1b2, y a1a2b1b2c) por dispersión de luz multi-ángulo reveló que las tres construcciones de

Nrp2 son monoméricas en solución (datos no mostrados). Estos datos implican que la homo-dimerización de Nrp es muy débil en solución, incluso en presencia del dominio MAM, y que la dimerización del receptor puede suceder solamente tras la unión de ligando. La orientación del dímero Nrp2 cristalográfico sugiere un modelo para la unión de VEGF. La interfaz a1 crea un dímero con forma de silla de montar con una anchura de aproximadamente 70 Å (Fig. 6), suficientemente grande para acomodar un dímero VEGF₁₀₉ con dimensiones de aproximadamente 35x60 Å. De forma importante, los sitios de unión a Tuftsin y los parches de unión a heparina se encuentran en la superficie interior de la silla de montar. La heparina podría estabilizar las interacciones entre los sitios de unión a heparina de Nrp y VEGF y facilitar adicionalmente la asociación de la cola VEGF con las "puntas" de b1. Esta disposición también sería capaz de acomodar la unión de VEGFR mediante el dominio de unión a receptor de VEGF para señalización corriente abajo. Por lo tanto, aunque los dominios a1 no interactúan directamente con VEGF, podrían potenciar la unión a VEGF de las Nrp ya que facilitan la dimerización de Nrp. Este dímero podría acomodar adicionalmente la unión a Sema3 (Fig. 6). En la estructura cristalina de Sema3A (Antipenko, A. et al., *Neuron* 39, 589-98 (2003)), dos dominios "sema" se compactan estrechamente juntos en una interfaz. Tras la unión a Nrp, los dominios sema de Sema3A se disocian para permitir interacciones con el sitio de unión principal en a1a2 (Antipenko, et al., *supra*). En el modelo del dímero Nrp mediado por a1 presentado aquí, los dos sitios putativos de unión a Sema3A están localizados en lados opuestos, y suficientemente distantes para acomodar los propulsores β grandes de dos moléculas Sema3 unidas (Fig. 6 y S5).

El presente análisis estructural proporciona la primera imagen detallada de partes de unión a VEGF (b1b2) y unión a semaforina (a1a2) del Nrp ECD. Los complejos de anticuerpo (Fig. 3-5) junto con previos estudios de mutagénesis (Gu et al., *supra*; Vander Kooi et al., *supra*) delinean los sitios de unión de Nrp para el dominio Sema de Semaforinas, y el dominio de unión a heparina de VEGF. Estas estructuras proporcionan una base para futuros experimentos de mutagénesis y proporcionan estrategias para dilucidar las estructuras de Nrp en complejo con sus ligandos y receptores de señalización de VEGF, VEGFR, semaforinas, y plexinas. Además, las estructuras cristalinas y otra información proporcionada por la presente invención posibilitan el diseño de antagonistas y agonistas de VEGF y/o semaforina, y pueden usarse en ensayo de selección para identificar dichos antagonistas o agonistas.

Aunque en la anterior descripción la invención se ilustra con referencia a ciertas realizaciones, no está limitada. De hecho, llegarán a ser evidentes para los especialistas en la técnica diversas modificaciones además de las mostradas y descritas en este documento a partir de la descripción previa y pueden estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

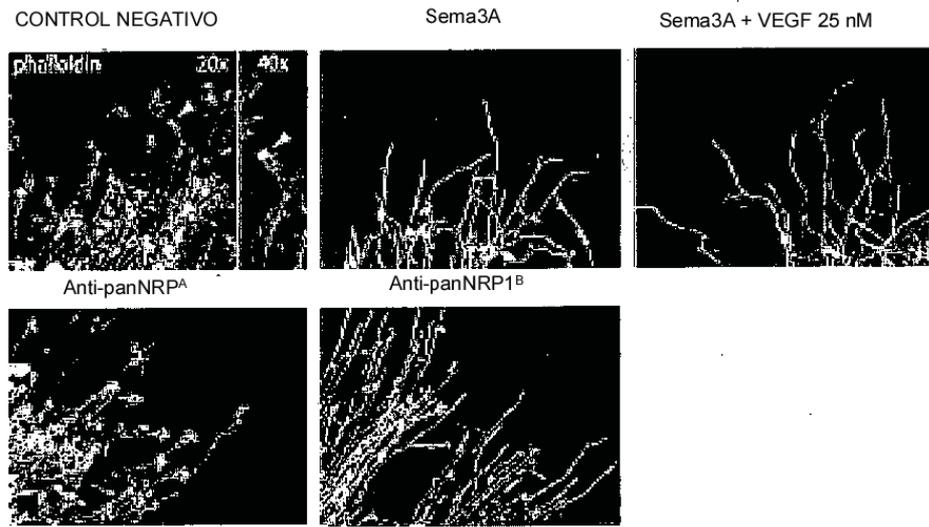
- 5 1. Un cristal de un complejo formado entre un fragmento Nrp_{2a1a2b1b2}^A y un fragmento Fab de anticuerpo anti-panNrp^A que inhibe la unión de semaforina a Nrp2, en donde dicho cristal difracta radiación de rayos X para producir un patrón de difracción que representa la estructura tridimensional de dicho complejo, que tiene aproximadamente las siguientes constantes de celda:
- 10 $a=148 \text{ \AA}$, $b=106 \text{ \AA}$, $c=92,4 \text{ \AA}$, y un grupo espacial de C2; o
 $a=121 \text{ \AA}$, $b=121 \text{ \AA}$, $c=203 \text{ \AA}$, y un grupo espacial de P3₂21.
- 15 2. Un anticuerpo anti-panNrp^A o un fragmento de anticuerpo que comprende:
- (a) una secuencia de dominio variable de cadena ligera mostrada en la Figura 7 y/o una secuencia de dominio variable de cadena pesada mostrada en la Figura 8; o
- (b) las secuencias CDRL1, CDRL2 y CDRL3 mostradas en la Figura 7 y las secuencias CDRH1, CDRH2 y CDRH3 mostradas en la Figura 8.
- 20 3. Un anticuerpo anti-panNrp^A YW68.11, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende la secuencia mostrada en la Figura 9A.
4. Un anticuerpo anti-panNrp^A YW68.11.26, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende la secuencia mostrada en la Figura 9B.
- 25 5. El fragmento de anticuerpo de unión a antígeno anti-panNrp^A de las reivindicaciones 3 o 4, que se selecciona entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, dAb, anticuerpo lineal, molécula de anticuerpo de cadena sencilla, minicuerpo, diacuerpo y anticuerpo multiespecífico.
- 30 6. El fragmento de anticuerpo de unión a antígeno anti-panNrp^A de la reivindicación 5, en donde el fragmento de unión a antígeno es biespecífico.
7. El anticuerpo anti-panNrp^A de las reivindicaciones 3 o 4, en donde el fragmento de unión a antígeno es un fragmento Fab.
- 35 8. Un anticuerpo anti-Nrp que compite por la unión a Nrp con el anticuerpo anti-panNrp^A de acuerdo con la reivindicación 2.
9. El anticuerpo anti-Nrp de la reivindicación 8 que se une esencialmente al mismo epítipo que el anticuerpo anti-panNrp^A.
- 40 10. El anticuerpo anti-Nrp de la reivindicación 8 que se une a un epítipo que comprende al menos parte de una interfaz definida por los restos de aminoácido Y39, Y45, P46, Q47, F72, N73 P74, H75, F76, A133 y R138 de la secuencia de aminoácidos de Nrp_{2a1a2b1b2}.
- 45 11. El anticuerpo anti-Nrp de la reivindicación 8 que se une tanto a Nrp 1 como a Nrp2.
12. El anticuerpo anti-Nrp de la reivindicación 11 que tiene una afinidad de unión de al menos aproximadamente 0,10 nM, 0,15 nM, 0,20 nM, 0,25 nM o 0,30 nM tanto para Nrp1 como para Nrp2.
- 50 13. El anticuerpo anti-Nrp de la reivindicación 11 que bloquea la unión de Sema3 tanto a Nrp1 como a Nrp2.
14. El anticuerpo anti-Nrp de la reivindicación 13 que no bloquea la unión de VEGF a Nrp1 o Nrp2.
- 55 15. El anticuerpo anti-Nrp de la reivindicación 13 o de la reivindicación 14 que inhibe la actividad biológica de semaforina *in vitro* o *in vivo*.
16. El anticuerpo anti-Nrp de una cualquiera de las reivindicaciones 8-15, que es un anticuerpo multiespecífico.
17. El anticuerpo anti-Nrp de la reivindicación 16, que es biespecífico.
- 60 18. El anticuerpo anti-Nrp de una cualquiera de las reivindicaciones 8-15, que es un anticuerpo monoclonal de longitud completa.
19. El anticuerpo anti-Nrp de una cualquiera de las reivindicaciones 8-15, que es un fragmento de anticuerpo.
- 65 20. El fragmento de anticuerpo anti-Nrp de la reivindicación 19, que es un Fv, Fab, F(ab')₂ o scFv.

21. Un método para preparar un antagonista de semaforina, que comprende diseñar una molécula de unión a un sitio que comprende al menos parte de una interfaz definida por los restos de aminoácido Y39, Y45, P46, Q47, F72, N73, P74, H75, F76, A133 y R138 de la secuencia de aminoácidos de Nrp2_{a1a2b1b2}, sintetizar dicho compuesto y confirmar que dicho compuesto bloquea la unión de semaforina a Nrp1 y Nrp2.
- 5 22. El método de la reivindicación 21 en el que dicho antagonista no interfiere con la unión de VEGF a Nrp1 o Nrp2.
23. El método de la reivindicación 22 que comprende adicionalmente la etapa de confirmar que dicho antagonista no interfiere con la unión de VEGF a Nrp1 o Nrp2.
- 10 24. El método de la reivindicación 22 que comprende adicionalmente la etapa de confirmar que dicho antagonista no interfiere con la actividad biológica de VEGF.
- 15 25. El método de la reivindicación 21 en el que dicho antagonista se selecciona entre el grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, polipéptidos de unión, péptidos y moléculas pequeñas no peptídicas.
26. El método de la reivindicación 25 en el que dicho antagonista es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
- 20 27. El método de la reivindicación 26 en el que dicho fragmento de anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, dAb, anticuerpo lineal, molécula de anticuerpo de cadena sencilla, minicuerpo, diacuerpo y anticuerpo multiespecífico formado a partir de fragmentos de anticuerpo.

TABLA 1

	Nrp1 _{1b1b2}	Nrp1 _{a2b1b2}	Nrp1 _{1b1/Fab}	Nrp2 _{b1b2}	Nrp2 _{a2b1b2}	Nrp2 _{a1a2b1b2/Fab}	Nrp2 _{a1a2b1b2/Fab}
Recogida de datos							
Grupo espacial	P2 _{1,2,2,1}	P2 ₁	H3	P2 _{1,2,1,2,1}	P2 ₁	C2	P3 _{2,2,1}
Dimensiones de celda	65,9, 66,7 74,7	53,2, 68,2, 66,6	213, 213, 45,3	36,5, 70,5, 122	50, 1, 193, 66,2	148, 106, 92,4	121, 121, 203
<i>a, b, c, (Å)</i>	90, 90, 90	90, 102, 90	90, 90, 120	90, 90, 90	90, 90, 1,90	90, 98, 8,90	90, 90, 120
$\alpha\beta\gamma$ (°)	0,979	0,979	0,979	1,00	1,00	1,00	1,00
Longitud de onda (Å)	50-1,8	50-2,0	50-2,2	50-1,95	50-2,3	50-2,75	50-3,1
Resolución (Å)	5,0 (51,5)	8,6 (32,2)	9,6 (48,5)	8,9 (53,0)	5,6 (34,4)	10,4 (52,7)	6,1 (51,5)
Combinación R	26,9 (3,2)	13,8 (2,4)	14,3 (2,2)	16,8 (3,1)	20,7 (3,7)	10,9 (3,3)	18,3 (2,6)
<i>I</i> / <i>o</i>	97,6 (99,3)	97,5 (88,7)	99,0 (98,0)	99,8 (99,9)	94,5 (85,6)	99,6 (100)	99,6 (98,9)
Integridad (%)	4,6 (4,6)	3,5 (3,0)	4,4 (3,6)	5,3 (5,2)	4,2 (4,1)	4,2 (4,2)	3,8 (3,6)
Redundancia							
Refinamiento							
Resolución (Å)	20-1,8	20-2,0	20-2,2	20-1,95	20-2,3	20-2,75	20-3,1
Nº Reflejos	29,017	29, 213	37,085	22,404	49,667	34,437	30, 187
<i>R</i> trabajo / <i>R</i> libre	0,160 / 0,1,999	0,186 / 0,245	0,163 / 0,208	0,175 / 0,233	0,193 / 0,236	0,194 / 0,245	0,202 / 0,241
Nº átomos							
Proteína	2,552	3,480	4,540	2,495	6,768	7,568	7,681
Ligando/ion	6	101	8	6	2	28	0
Agua	267	187	234	234	233	0	0
Factores B (Å)	27,3	35,9	39,4	25,8	18,3	89,6	111
Desviaciones r.m.s							
Longitudes de enlace (Å)	0,012	0,012	0,011	0,011	0,012	0,010	0,008
Ángulos de enlace (°)	1,5	1,5	1,3	1,3	1,4	1,2	1,2

Figura 1A



Ensayo de colapso de DRG

Figura 1B

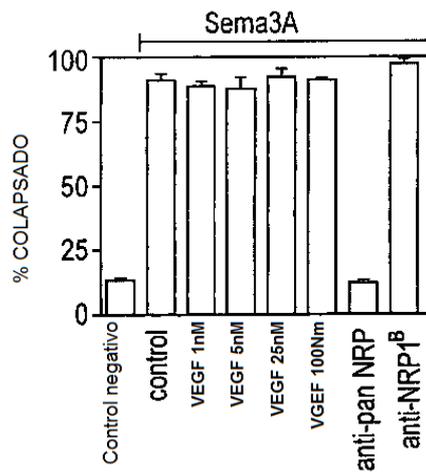
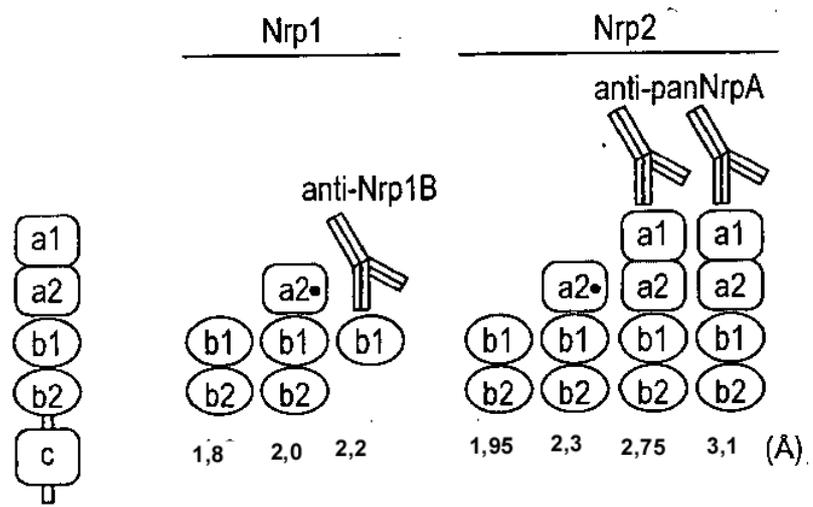


Figura 2A



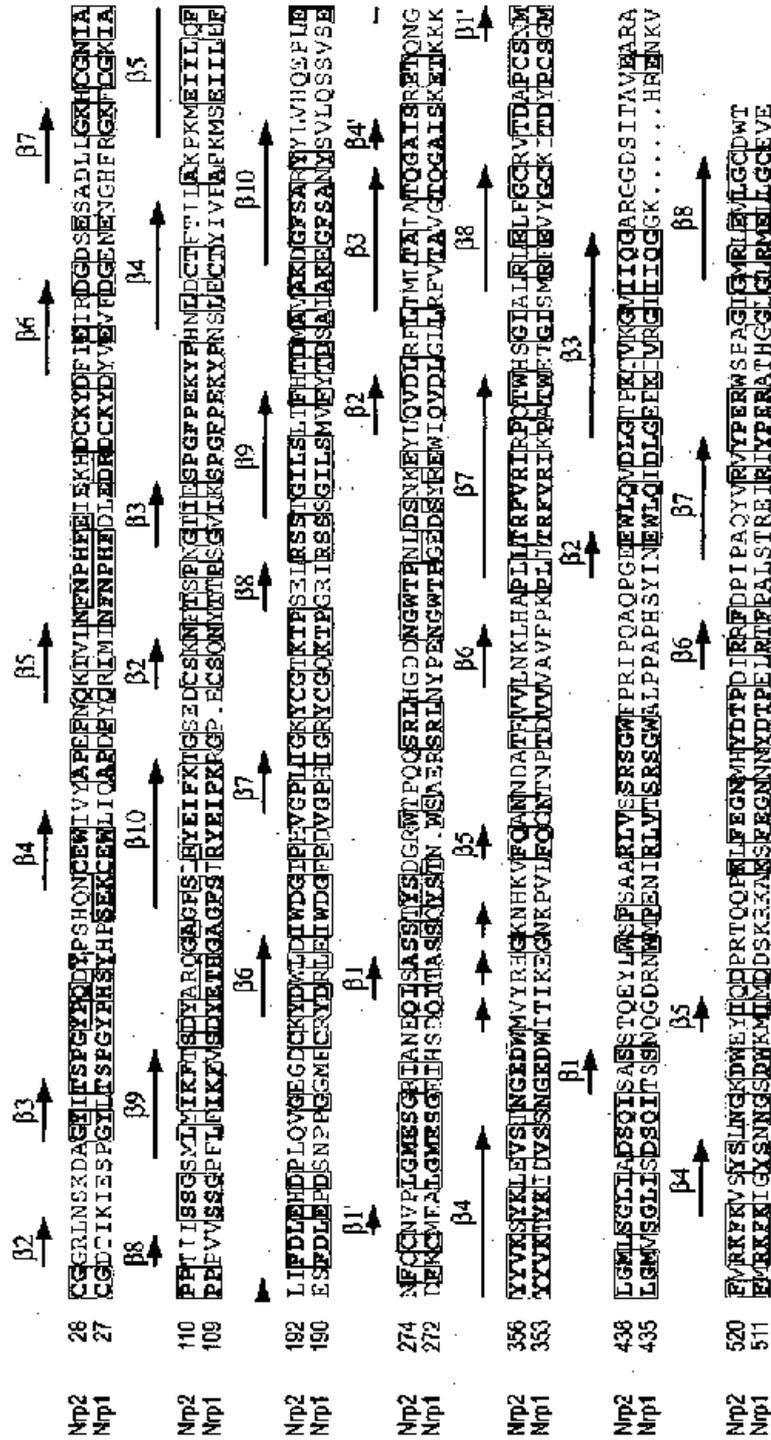


Figura 2B

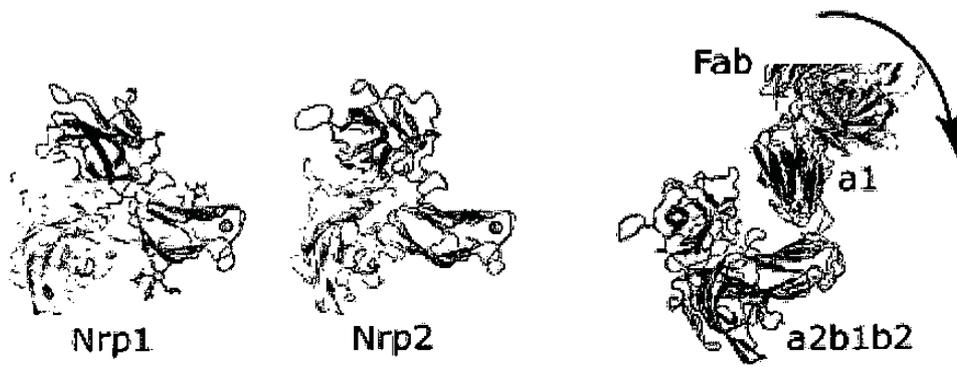
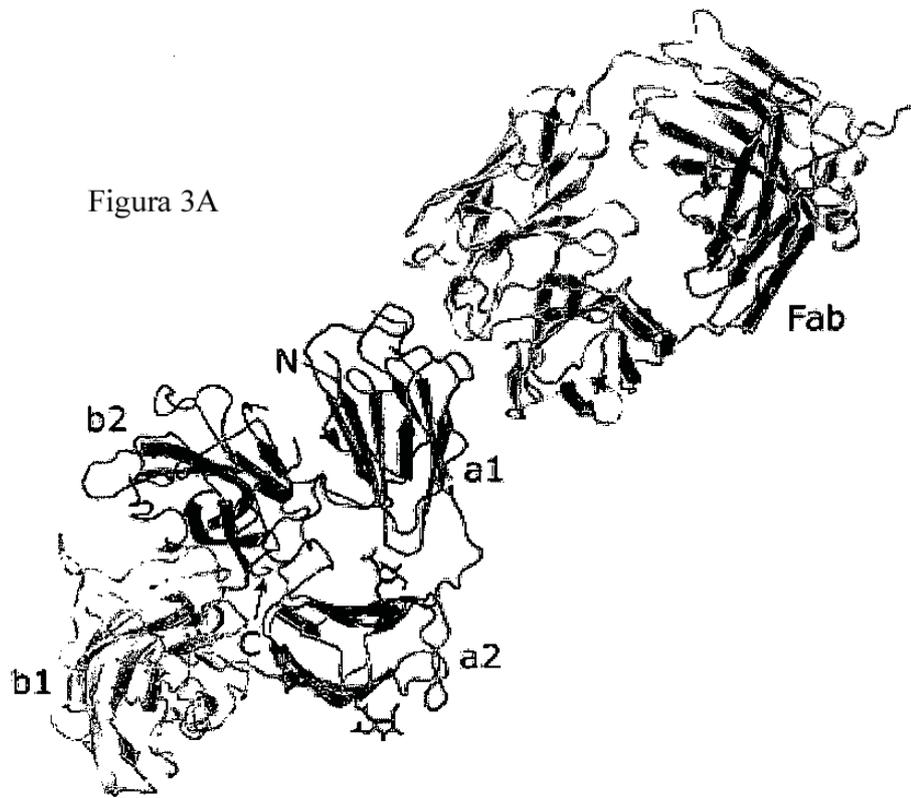
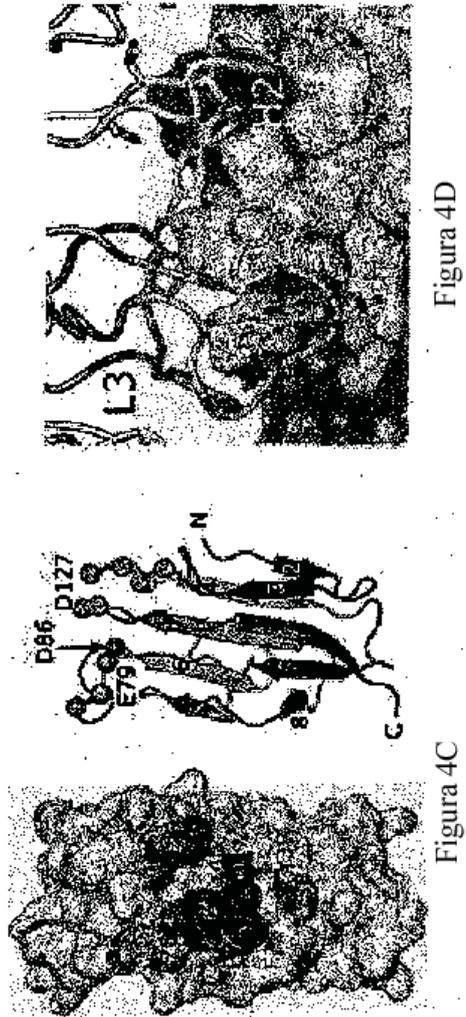
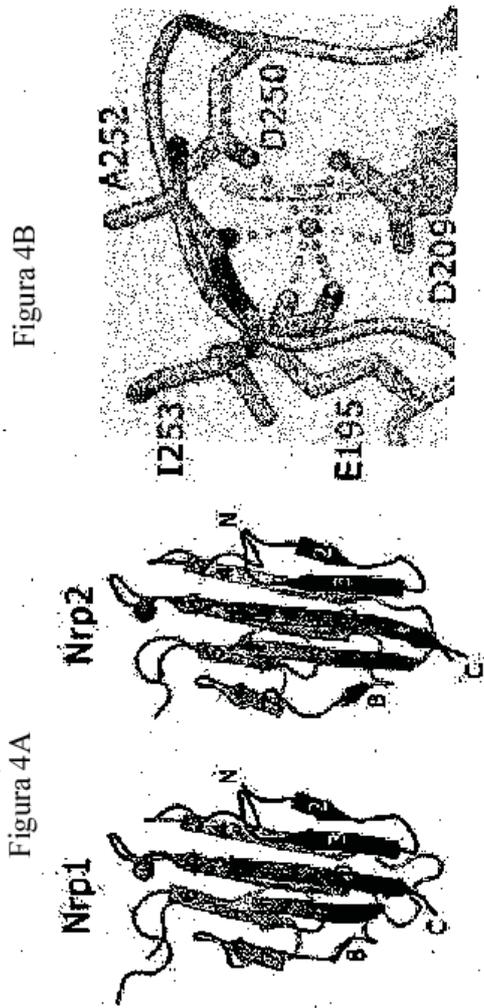


Figura 3B

Figura 3C



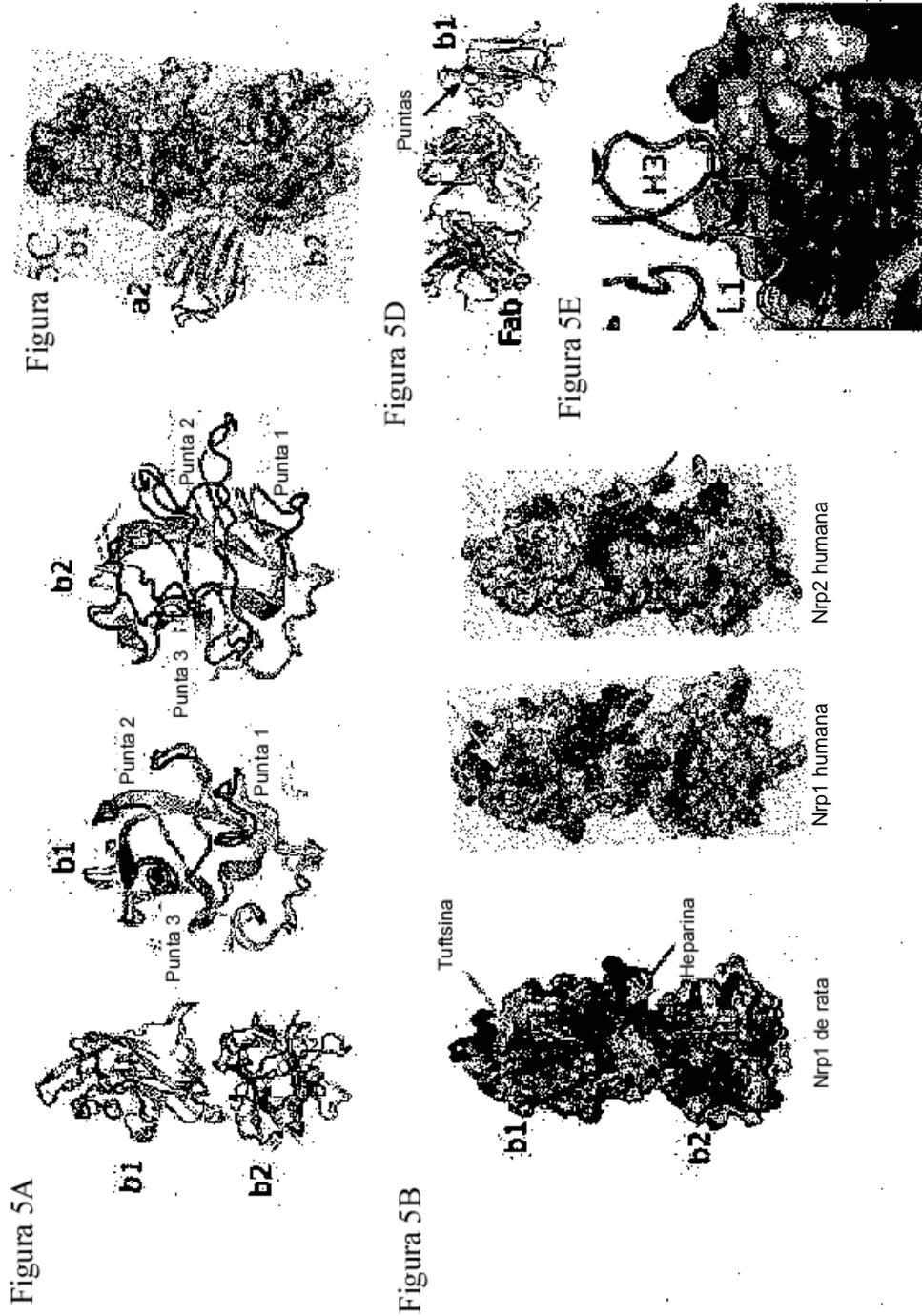


Figura 6A

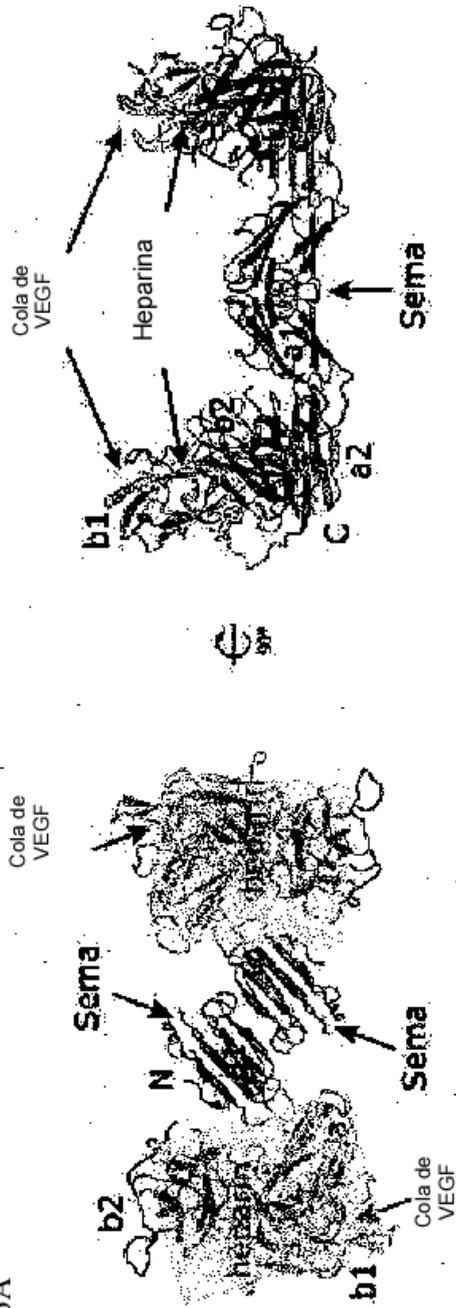
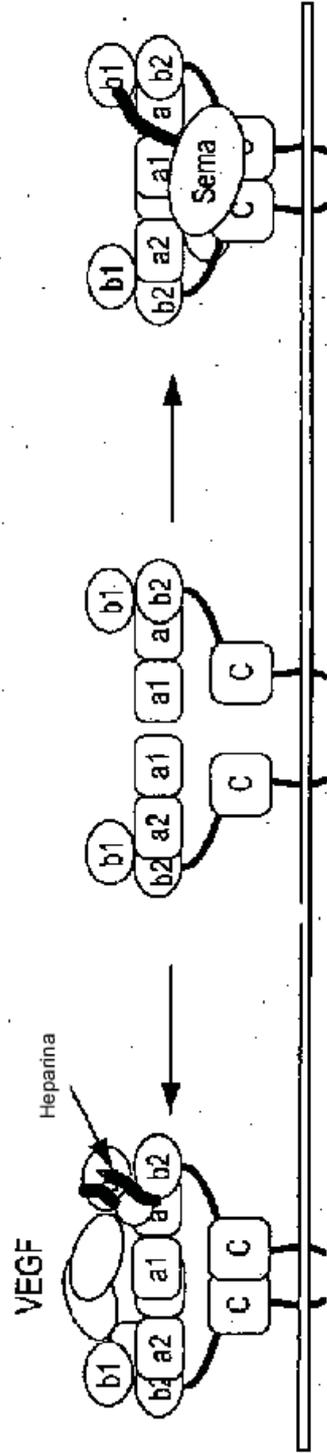


Figura 6B



Alineación de secuencia de dominio variable de cadena ligera de clones anti-panNRP2A

Kabat n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
huKI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	N	Y	Q
YW68.11	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	I	A	V	A	N	Y	Q
YW68.11.26	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	I	A	V	A	N	Y	Q
Kabat n°	38	39	40	41	41	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
huKI	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
YW68.11	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
YW68.11.26	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
Kabat n°	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108			
huKI	D	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	R	I	K	R			
YW68.11	D	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	T	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R			
YW68.11.26	D	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	A	W	A	Y	L	T	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R			

Figura 7

Alineación de secuencia de dominio variable de cadena pesada de clones anti-panNRP2A

Kabat n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	I	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	
YW68.11	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	I	I	S	G	Y	G	I	I	W	V	R	Q	A	
YW68.11.26	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	C	F	I	I	S	G	Y	C	I	H	W	V	R	Q	A	

Kabat n°	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	
hum III	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	S	T	Y	A	D	S	V	K	G	R	E	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y		
YW68.11	P	G	K	G	L	E	W	V	A	Y	I	Y	P	D	S	G	Y	T	D	Y	A	C	S	V	K	G	R	E	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y
YW68.11.26	P	G	K	G	L	E	W	V	A	Y	I	Y	P	D	S	G	Y	T	D	Y	A	C	S	V	K	G	R	E	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y

Kabat n°	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	101	102	103	104	105	106	107
hum III	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T												
YW68.11	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	E	D	F	R	N	R	R	L	W	Y	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T		
YW68.11.26	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	E	D	F	R	N	R	R	L	W	Y	V	M	D	Y	W	G	Q	G	T		

Figura 8

Archivo de hlgG1 P1 anti-panNRP2 YW68.11

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQOKPGKAPKLLIYSA
 SFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
 QSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
 TKSFNRRGECEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYGIHWVRQAPG
 KGLEWVAIYIPDSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
 VYYCARDEFNRRRLWYVMDYWGQGLVTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
 TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK

Figura 9A

Archivo de hlgG1 P1 anti-panNRP2 YW68.11.26

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQOKPGKAPKLLIYSA
 SFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAWAYLPTFGQGT
 KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
 VTKSFNRRGECEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISGYGIHWVRQAP
 GKLEWVAIYIPDSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT
 AVYYCARDEFNRRRLWYVMDYWGQGLVTVVSSASTKGPSVFPLAPSSK
 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGK

Figura 9B

Tabla S1

	Intervalo de restos de Nrp	Conc. final (mg/ml)	Tampón de proteína	Tampón de cristalización	Crioprotector
Nrp1_{b1b2}	Phe ²⁷³ -Glu ⁵⁸⁶	15	Tris-HC1 10 mM (pH 7,5) 50 mM NaCl	PEG 3,350 al 20% Fluoruro sódico 0,2 M	Solución de pocillo + glicerol al 20%
Nrp1_{a2b1b2}	Phe ¹⁴¹ -Glu ⁵⁸⁶	11	Tris-HC1 10 mM (pH 7,5) 50 mM NaCl	MES 0,1 M (pH 6,5) PEG 20,000 al 12%	Solución de pocillo + etilenglicol al 20%
Nrp1_{b1}/Fab (anti-Nrp1^B)	Phe ²⁷³ -Thr ⁴²⁷	15	Hepes 10 mM (pH 7,2) 100 mM NaCl	PEG 1,500 al 25% terc-butariol al 4%	Hepes 10 mM (pH 7,2) PEG 1,500 al 25% etilenglicol al 10%
Nrp2_{a1b1b2}	Phe ²⁷⁵ -Thr ⁵⁹⁵	12	Tris-HC1 25 mM (pH 7,5) 150 mM NaCl	Bis-Tris 0,1 M (pH 6,5) PEG 5,000 al 20% MME	Solución de pocillo + glicerol al 20%
Nrp2_{a2b1b2}	Gly ¹⁴⁵ -Thr ⁵⁹⁵	15	Tris-HC1 20 mM (pH 7,5) 300 mM NaCl 1 mM CaCl ₂	Hepes 0,1 M (pH 7,5) PEG 8,000 al 10%	Solución de pocillo + etilenglicol al 20%
Nrp2_{a1a2b1b2}/Fab (anti-panNrp^A) Forma monoclónica	Met ¹ -Thr ⁵⁹⁵	13	Tris-HC1 25 mM (pH 7,5) 200 mM NaCl	Hepes 0,1 M (pH 7,5) Ácido poliacrílico 5100 al 22% MgCl ₂ 0,02 M	Solución de pocillo + glicerol al 20%
Nrp2_{a1a2b1b2}/Fab (anti-panNrp^A) Forma trigonal	Met ¹ -Thr ⁵⁹⁵	13	Tris-HC1 25 mM (pH 7,5) 200 mM NaCl	PEG 1,000 al 10% PEG 8,000 al 10%	Solución de pocillo + glicerol al 20%

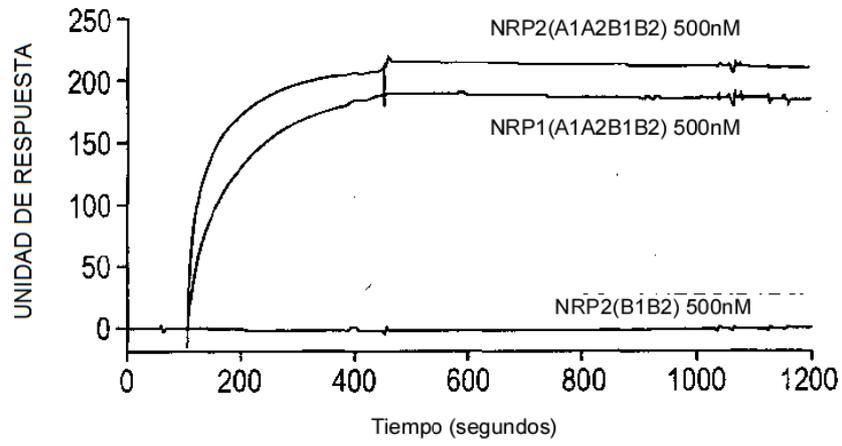


Figura S1

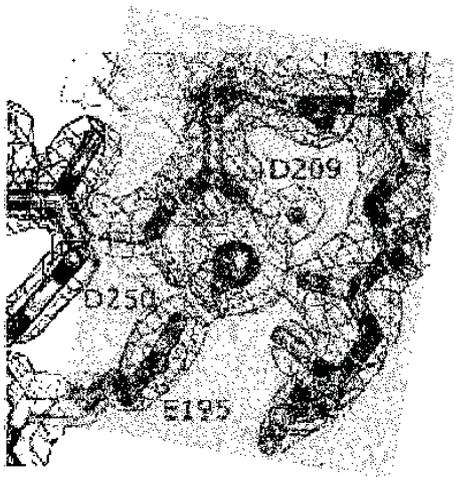


Figura S2-A

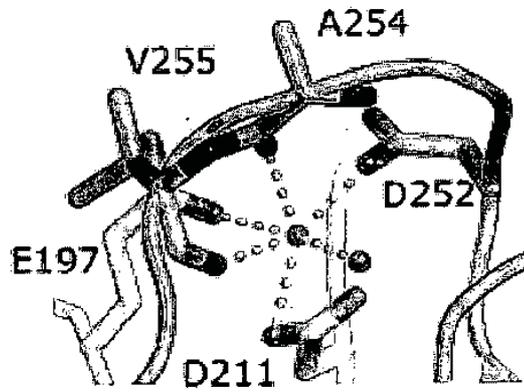


Figura S2-B

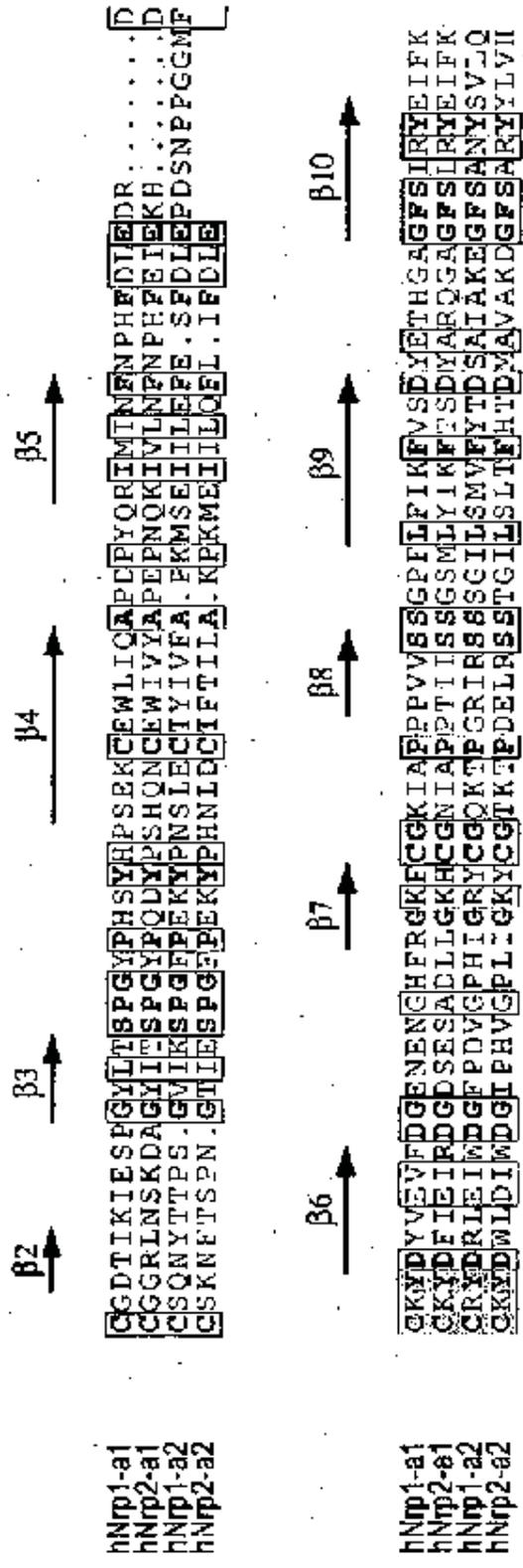


Figura S2-C

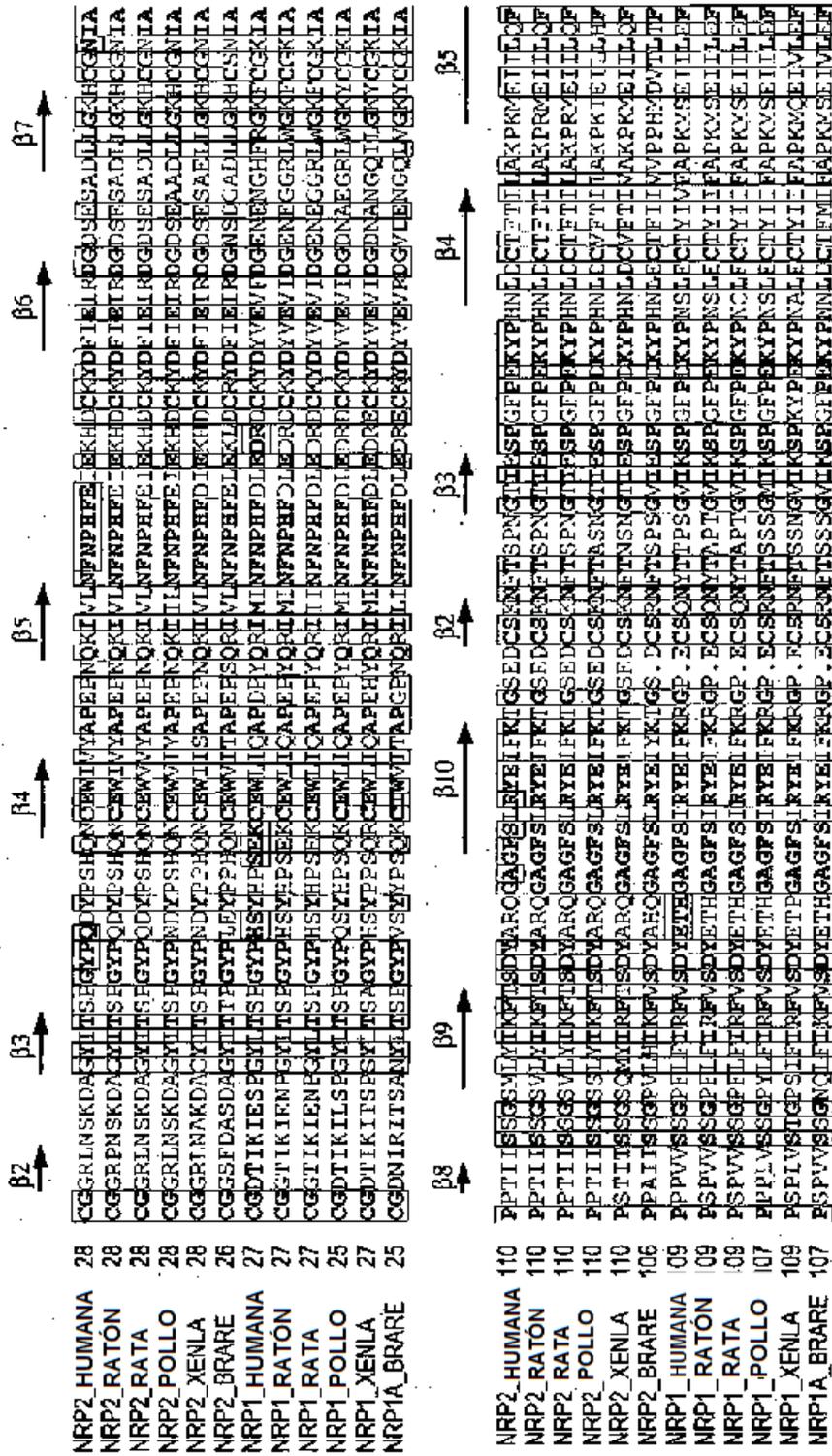


Figura S3 (PARTE 1)

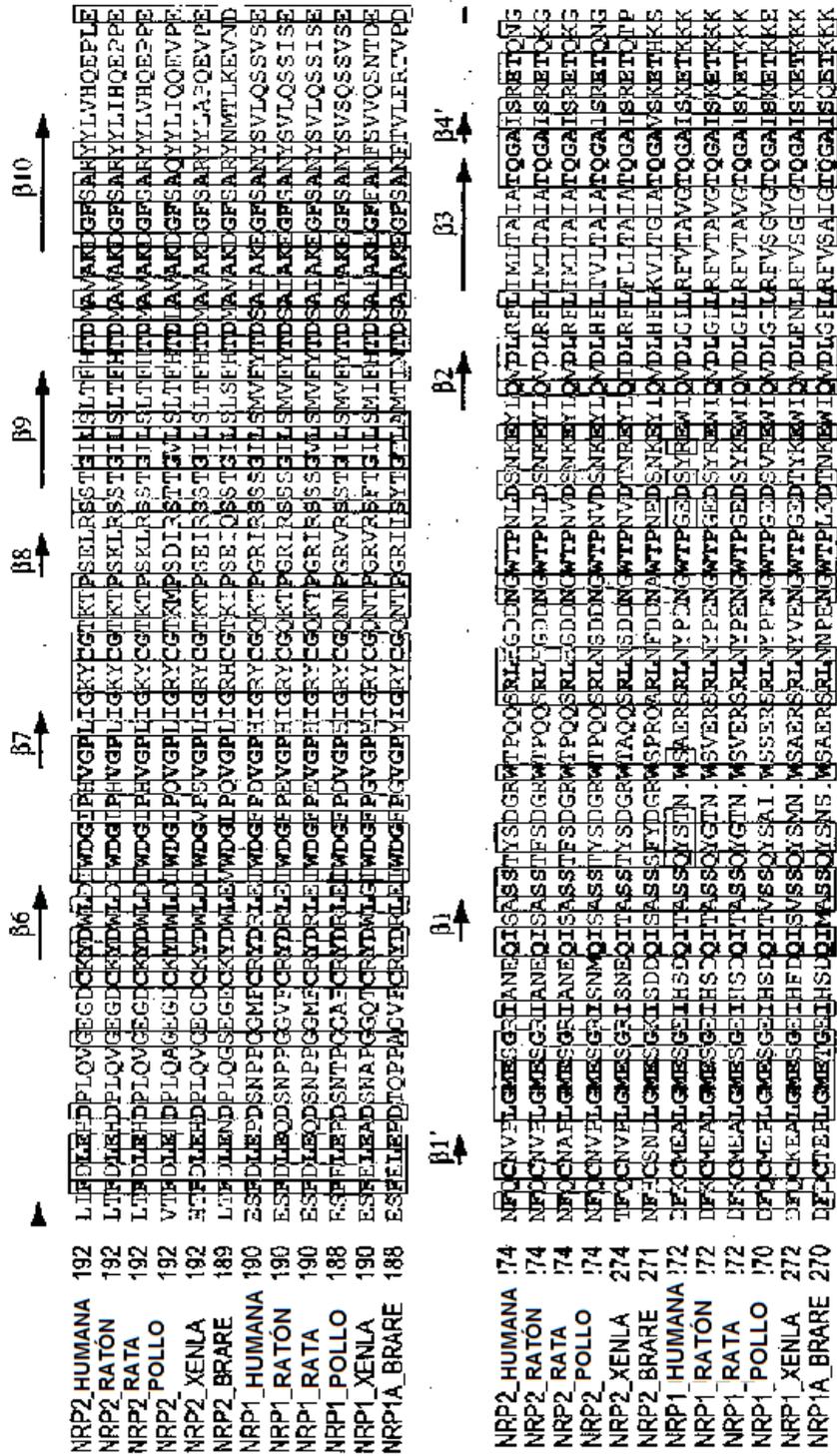


Figura S3 (PARTE 2)

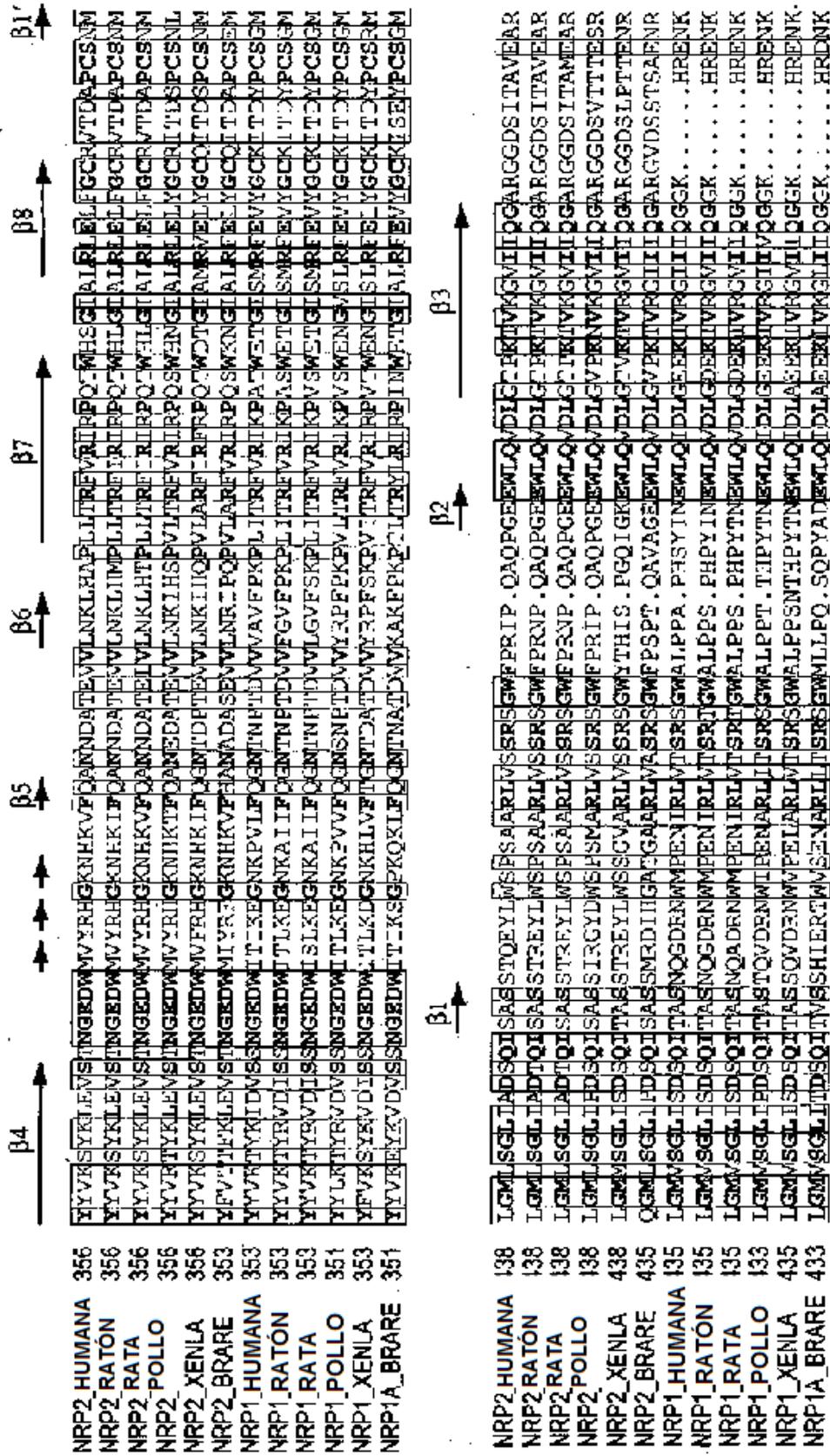


Figura S3 (PARTE 3)

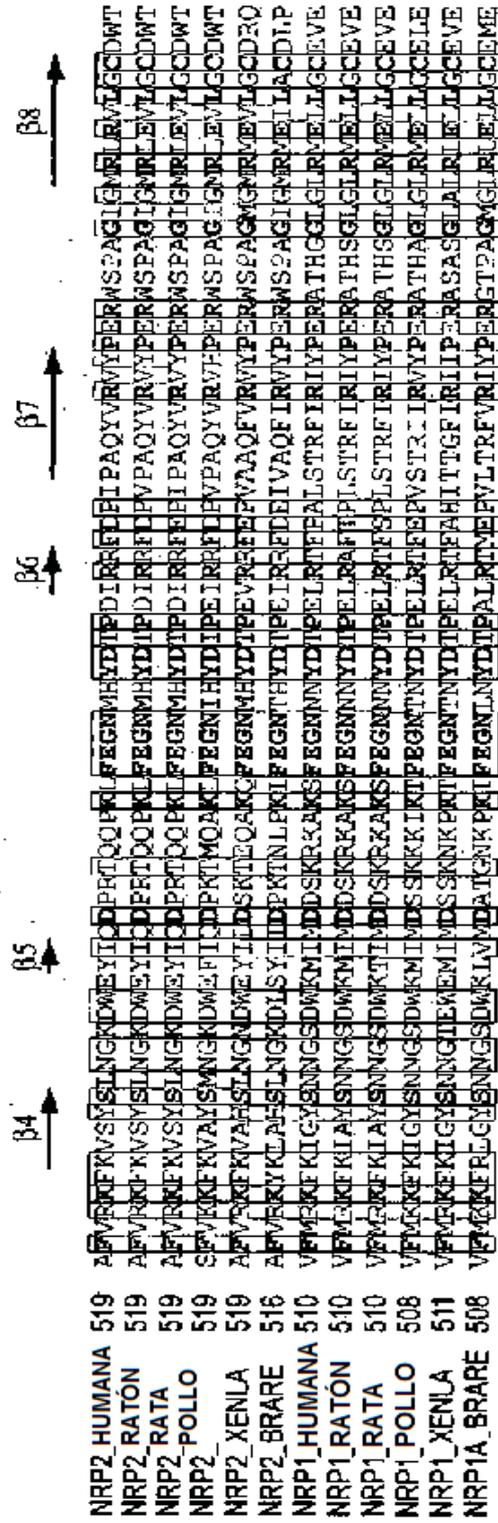


Figura S3 (PARTE 4)

Figura S4-A

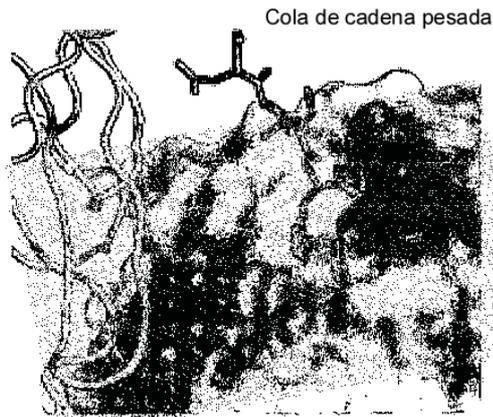
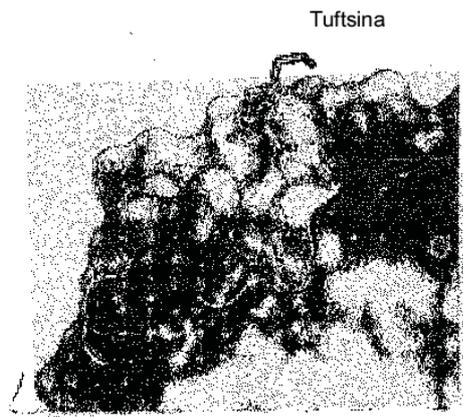


Figura S4-B



Cadena ligera

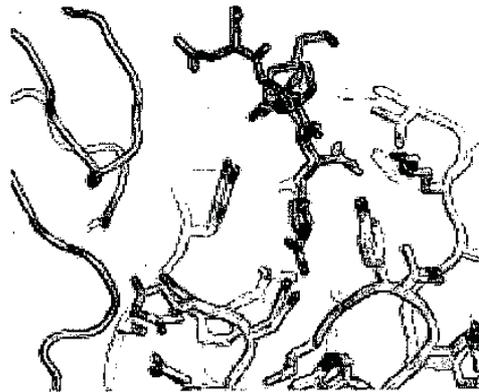


Figura S4-C

Figura S5-A

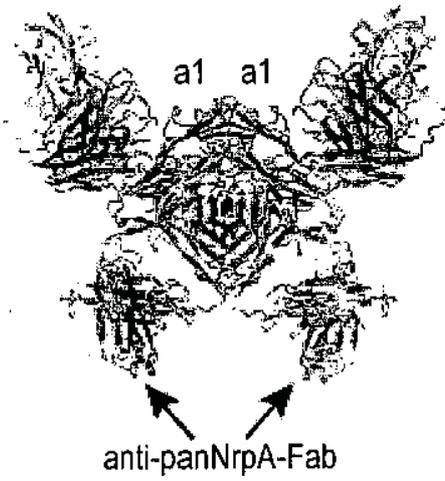


Figura S5-B

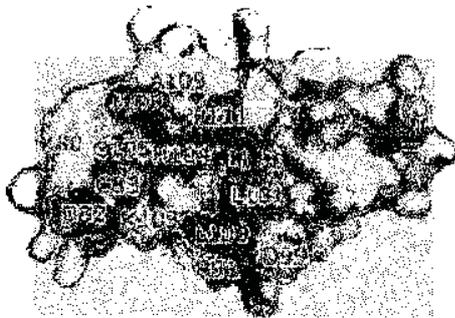
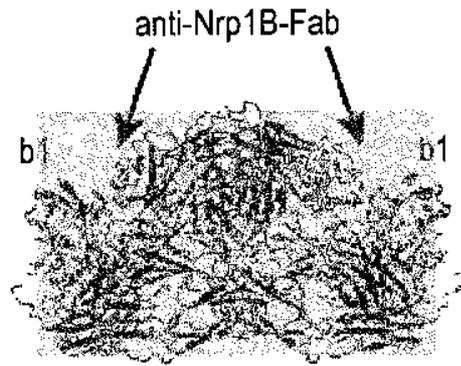


Figura S5-C