

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 360**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2006 PCT/EP2006/007241**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.01.2007 WO07009816**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2006 E 06776353 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 1907420**

54 Título: **Plexina D1 como diana para el diagnóstico y terapia de tumores**

30 Prioridad:

**21.07.2005 EP 05076675**

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

**12.09.2017**

73 Titular/es:

**MODIQUEST B.V. (100.0%)  
Kloosterstraat 9  
5349 AB Oss, NL**

72 Inventor/es:

**LEENDERS, WILHELMUS, PETRUS, JOHANNES;  
ROODINK, ILSE y  
RAATS, JOZEF, MARIA, HENDRIK**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 632 360 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**

Plexina D1 como diana para el diagnóstico y terapia de tumores

**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente descripción se refiere a la identificación de una nueva proteína seleccionable como diana que se puede usar en el tratamiento y diagnóstico de tumores, en particular tumores sólidos, y trastornos que implican inflamación, en particular artritis reumatoide, aterosclerosis y esclerosis múltiple.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10 Para que crezcan más allá de un tamaño de 2-3 mm<sup>3</sup>, los tumores tienen que reclutar una neovasculatura vía angiogénesis. Los tumores logran esto vía la expresión del factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A), ya sea inducido por hipoxia en el centro del tumor o como resultado de productos génicos supresores de tumores que diana la ruta de señalización de VEGF-A con el objetivo de inhibir la angiogénesis y, en consecuencia, el crecimiento tumoral. Aunque tales terapias antiangiogénicas han sido eficaces en modelos de tumores de animales, la traducción al nivel clínico hasta ahora ha demostrado ser menos exitosa (Eichhorn, ME et al., Drug Resist Update 7:125-138 (2004)).

15 Para esto, hay un número de posibles explicaciones. En situaciones clínicamente relevantes, los tumores pueden haber estado creciendo durante meses o incluso años en el momento del diagnóstico, y una proporción significativa de la vasculatura puede ser más o menos madura y de este modo insensible a la inhibición de la angiogénesis. Esta situación contrasta fuertemente con aquella en la mayoría de los modelos de animales en la que, como regla, se estudian tumores agresivos que crecen rápidamente. Además, los pacientes que son candidatos para la terapia antiangiogénica son típicamente pacientes con cáncer diseminado incontrolable, y el crecimiento de las metástasis puede no depender siempre estrictamente de la angiogénesis. Debido a que la mayoría de las metástasis son portadas por la sangre, crecen en órganos con densidades de vasos intrínsecamente elevadas como el hígado, pulmón y cerebro, donde pueden crecer de una manera independiente de la angiogénesis mediante coopción de vasos preexistentes.

20 De hecho, un inhibidor de la angiogénesis que inhibe muy eficazmente el crecimiento tumoral en un número de modelos de tumor subcutáneo (Wedge, SR et al., Cancer Res 62:4645-4655 (2002)) no inhibe el crecimiento de tumores infiltrativos en cerebro de ratón. Además, al tratar ratones que portan tumores cerebrales muy angiogénicos, la inhibición de la angiogénesis no dio como resultado una detención de la progresión tumoral posterior, sino más bien dio como resultado una progresión tras un desplazamiento fenotípico hacia coopción e infiltración (Leenders, WP et al., Clin Cancer Res 10:6222-6230 (2004)). Estos resultados implican que la terapia antiangiogénica debería suplementarse con terapias dirigidas vasculares en las que se ataca el lecho vascular del tumor existente, dando como resultado la muerte indirecta de las células tumorales debido a la interrupción del suministro sanguíneo de los tumores.

25 Para lograr una terapia dirigida vascular eficaz, se han identificado marcadores que tienen especificidad por la vasculatura tumoral. Ya se ha puesto mucho esfuerzo en esto, pero con éxito variable. La selección como diana de tumores vasculares eficaz se ha logrado usando anticuerpos monocatenarios, dirigidos contra el dominio de fibronectina ED-B, que se expresa selectivamente y se deposita en la matriz extracelular de vasos recientemente formados en tumores angiogénicos (Santimaria, M et al., Clin Cancer Res 9:571-579 (2003)). La selección como diana de α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>-integrina (cuya expresión está restringida a vasos inmaduros) usando péptidos RGD o Vitexina produjo un resultado decepcionante, mientras que la expresión de endoglina no fue específica para vasos sanguíneos tumorales (Posey, JA et al., Cancer Biother Radiopharm 16:125-132 (2001); Balza, E et al., Int J Cancer 94:579-585 (2001)).

30 En enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoide (RA) o aterosclerosis, la angiogénesis y la activación de la vasculatura es también a menudo parte de la patología. La vasculatura allana aquí el camino para que las células inflamatorias se extravasen y ejerzan su acción destructora. Tales enfermedades pueden de este modo beneficiarse también de la selección de vasos sanguíneos como dianas.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

35 Por lo tanto, es el objeto de la presente descripción proporcionar una proteína seleccionable como diana que se puede usar en el tratamiento y diagnóstico de cáncer y enfermedades inflamatorias o enfermedades que impliquen inflamación.

En la investigación que condujo a la presente descripción, se encontró que plexina D1 es expresada en el lado luminal de células endoteliales en vasos sanguíneos tumorales, en las propias células tumorales, y en macrófagos activados que se encuentran en tumores, en inflamación y en placas ateroscleróticas.

55 De este modo, la descripción se refiere a plexina D1 para uso como una proteína seleccionable como diana en el

tratamiento o diagnóstico de trastornos que implican expresión de plexina D1.

La familia de receptores de plexinas consiste en cuatro clases (PLXNA-D) y nueve miembros en mamíferos. Las plexinas comprenden una familia de proteínas grandes, que pasan una sola vez la membrana, con homología con receptores del factor de dispersión, codificadas por la familia del gen MET. Los miembros de la familia de plexinas comparten los dominios Sema, secuencias relacionadas con Met (MRS), una región transmembránica y motivos intracelulares que son predictivos de la señalización de Rac/Rho-GTPasas (Figura 1).

Puesto que la señalización vía GTPasas da como resultado reorganizaciones citoesqueléticas, sucesos que están críticamente implicados en la formación de filopodios y lamelipodios y migración celular, las plexinas se pueden considerar como reguladores de la migración.

Las plexinas son receptores para las semaforinas, una familia de proteínas segregadas, ancladas a GPI o transmembránicas que se subdivide en siete subclases. Cada plexina tiene su propio (conjunto de) parejas de unión a semaforina, y cada combinación de plexina-semaforina da como resultado una respuesta específica. Las semaforinas de clase 3 son potentes repelentes de axones, y como tal están implicadas en la morfogénesis del sistema nervioso (para un repaso, véase RJ et al., *Curr Opin Neurobiol* 13:79-89 (2003); Fujisawa, H, *J Neurobiol* 59:24-33 (2004)). Para activar plexinas mediante las semaforinas, se pueden necesitar parejas de unión a plexinas adicionales. Estas parejas de unión, neuropilina-1 y -2 (NP-1 y NP-2), no tienen motivos de señalización en el dominio intracelular, y se piensa que son correceptores pasivos, permitiendo la interacción entre semaforinas y plexinas.

Algunas plexinas forman incluso complejos de membrana más grandes con, y activan, receptores de señalización como Off Track (Otk) y los receptores del factor de dispersión Met y Ron. También se ha demostrado una interacción directa entre plexina A1 y el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2) angiogénico (Toyofuku, T et al., E-publication in *Genes Dev* 18:435-447 (2004)). Debido a que NP-1 se une a la familia de plexinas, pero también a VEGFR2, es concebible que existan complejos de proteínas de membrana multicomponentes que engloben VEGFR2, NP-1 y plexinas, estableciendo una conexión entre las plexinas y la angiogénesis (véase también Weinstein, BM, *Cell*, 120:299-302 (2005)).

Las neuropilinas también son correceptores para el potente factor angiogénico factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A165), y potencian su afinidad por VEGFR2. De forma interesante, el sitio de unión a VEGF-A165 en NP-1 se solapa con aquél para semaforina 3A (Miao, H Q et al., *J Cell Biol* 146:233-242 (1999)). Se ha postulado que la unión de VEGF-A a NP-1 promueve la migración de células endoteliales al competir por la unión de semaforinas de clase 3, lo que es seguido generalmente por la despolimerización de la F-actina y la repulsión de extensiones celulares (Bachelder, RE, *Cancer Res* 63:5230-5233 (2003)). Se ha descrito un comportamiento antagonista similar de VEGF-A y semaforinas de clase 3 en una estirpe celular progenitora neuronal (Bagnard, D et al., *J Neurosci* 21:3332-3341 (2001)) y células tumorales (Bachelder (2003), más arriba). Puesto que se observaron efectos antagonistas en células tumorales que están desprovistas de receptores de VEGF, es concebible que el mecanismo subyacente implique miembros de la familia de plexinas, estableciendo una conexión adicional entre plexinas y la señalización de VEGF-A.

Los presentes inventores han encontrado previamente que el miembro de la familia plexina D1 (*plxnd1*) no solo es expresado en células neuronales, sino también en células endoteliales de la vasculatura durante etapas tempranas del desarrollo (van der Zwaag, B et al., *Dev Dyn* 225:336-343 (2002)), una observación que fue confirmada por otros dos grupos (Gitler, AD et al., *Dev Cell* 7:107-116 (2004); Torres-Vazquez, J et al., *Dev Cell* 7:117-123 (2004)). En la vasculatura adulta, *plxnd1* está ausente. Los ratones carentes de *Plxnd1* y el pez cebra que porta mutaciones en el gen *plxnd1* se caracterizan por un mal desarrollo del sistema cardiovascular (Gitler, AD et al. (2004), más arriba; Torres-Vazquez, J et al., (2004), más arriba). Los ratones carentes de neuropilina-1 (NP-1) y doblemente de NP-1/neuropilina-2 (NP-2) también sufren defectos letales en la vascularización, y malformaciones del arco aórtico durante el desarrollo embrionario (Kawasaki, T et al., *Development* 126:4895-4902 (1999); Takashima, S et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3657-3662 (2002); Gu, C et al., *Dev Cell* 5:45-57 (2003)).

Además, la atenuación de NP-1 mediada por morfolino en el pez cebra conduce a un mal desarrollo de los vasos intersegmentarios, y en este modelo se ha establecido una conexión clara entre NP-1 y VEGF-A165 (Lee, P et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10470-10475 (2002)). La semejanza de los fenotipos de ratones carentes de *plxnd1*, *neuropilina-1* y *semaforina 3C* (Feiner, L et al., *Development* 128:3061-3070 (2001)) es consistente con el hallazgo de que plexina D1 es un receptor dependiente de neuropilina-1 para semaforina 3C (Gitler, AD et al. (2004), más arriba). Sin embargo, *PlxnD1* es también un receptor para semaforina 3E, y esta interacción no requiere neuropilinas para la señalización mediada por Semaforina 3E (Gu, C et al., *Science* 307:265-268 (2005)).

Según la descripción, ahora se encontró que plexina D1 también está implicada en la angiogénesis durante el crecimiento tumoral, y es expresada en el lado luminal de células endoteliales en vasos sanguíneos tumorales. Además, se encontró que plexina D1 es expresada por macrófagos activados. También se encontró que plexina D1 es expresada en células tumorales en una amplia variedad de tipos de tumores.

De este modo, la presente descripción se refiere a plexina D1 para uso como una proteína seleccionable como diana

en el tratamiento o diagnóstico de trastornos que implican expresión de plexina D1.

El diagnóstico se efectúa detectando en el cuerpo o en un tejido o fluido corporal la presencia de plexina D1 o un ácido nucleico que codifica plexina D1.

5 El tratamiento se efectúa seleccionando como diana plexina D1 para el suministro de sustancias terapéuticas al sitio en el que se necesite el tratamiento, interfiriendo en la interacción entre plexina D1 y su ligando, interfiriendo en la expresión del gen de plexina D1, o capturando ligandos de plexina D1 para inhibir la interacción con plexina D1.

10 La descripción se refiere así además al uso de moléculas que se unen a plexina D1, a un ácido nucleico que codifica plexina D1, o a un ligando de plexina D1 para la preparación de una composición terapéutica para el tratamiento o diagnóstico de trastornos que implican la expresión de plexina D1. Todas estas moléculas se identificarán aquí como "moléculas de unión" o "entidades de unión".

Los trastornos comprenden, en particular, trastornos en los que plexina D1 es expresada en células tumorales, vasos sanguíneos tumorales, o en macrófagos activados.

15 Las células tumorales en las que se expresa plexina D1 comprenden tumores cerebrales, en particular astrocitomas, oligodendrogliomas y hemangioblastomas, carcinomas de colon, en particular carcinoma ductal del colon, carcinomas de próstata, carcinomas de células renales, en particular carcinomas de células renales claras, carcinomas de mama, en particular carcinomas ductales de la mama, carcinomas de ovario, carcinomas de células escamosas, melanomas, carcinomas de pulmón, en particular carcinomas de pulmón microcíticos y carcinomas de pulmón no microcíticos, sarcomas de tejidos blandos, etc.

20 Cuando los trastornos que se tratan según la descripción son enfermedades inflamatorias, en particular son enfermedades autoinmunitarias, más en particular artritis reumatoide, o son aterosclerosis o esclerosis múltiple.

Las moléculas que se unen a plexina D1 se seleccionan por ejemplo de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas, dominios proteicos, péptidos, pequeñas moléculas. Estas moléculas se pueden usar para seleccionar a plexina como diana.

25 Las moléculas que se unen al ácido nucleico que codifica plexina D1 son, por ejemplo, oligonucleótidos, tales como aptámeros de ARN o ADN, por ejemplo seleccionados de ARN<sub>pi</sub>, ARN antisentido, fosfotio-oligonucleótidos antisentido. Estas moléculas pueden ser usadas para interferir con la expresión de plexina D1.

30 Las moléculas que se unen a un ligando de plexina D1 se seleccionan, por ejemplo, de anticuerpos contra ligandos, el ectodominio soluble de plexina D1, o pequeñas moléculas, tales como péptidos, que se unen a ligandos de plexina D1. Estas moléculas se pueden usar para capturar al ligando de plexina D1 circulante, para prevenir la unión del ligando a plexina D1 en células de vasos tumorales, células tumorales o macrófagos activados, y para interferir con la función de plexina D1 en estas células.

35 Para el diagnóstico, la molécula de unión se marca adecuadamente con un marcador detectable. Tal marcador detectable se selecciona, por ejemplo, de un marcador radioactivo, un marcador paramagnético, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente. El diagnóstico se puede llevar a cabo en una muestra de un fluido o tejido corporal *in vivo*, *in situ* o *ex vivo*. Los ejemplos de técnicas de diagnóstico son la hibridación *in situ* de, por ejemplo, ARNm de plexina D1, o inmunohistoquímica en biopsias o células tumorales.

40 Para el tratamiento, la molécula de unión se proporciona, por ejemplo, con una entidad que daña o extermina la célula tumoral y/o la célula endotelial tumoral, en particular una entidad citotóxica, tal como un radionúclido, una toxina, boro para terapia por captura neutrónica en boro (BNCT), o un profármaco que se acopla a la entidad de unión vía un enlazado escindible, que se activa en respuesta a la escisión de ese enlazador, o péptidos inductores de la apoptosis, un ejemplo de los cuales es la secuencia (KLAKLAK)<sub>2</sub>. Tales péptidos se añaden a la entidad de unión mediante técnicas de ingeniería genética molecular. Las entidades descritas anteriormente se pueden conjugar directamente a la entidad de unión, o pueden estar presentes en nanodispositivos, tales como liposomas o polimerosomas, que se conjugan a la entidad de unión.

45 La terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) comprende irradiar un área enferma, tal como un tumor o una inflamación, en la que se ha acumulado boro tras la inyección intravenosa del conjugado liposómico, con neutrones, tras lo cual los átomos de boro se desintegrarán hasta litio bajo emisión de partículas alfa destructivas.

Como alternativa, la terapia se puede efectuar induciendo trombosis local en los vasos tumorales para bloquear el suministro de sangre al tumor e inducir la muerte celular. Un ejemplo de tal molécula es el factor tisular (TF).

50 Ventajosamente, la plexina D1 se puede seleccionar como diana con moléculas de unión específicas con la administración intravenosa, puesto que plexina D1 se expresa en el lado luminal de células endoteliales en vasos sanguíneos tumorales. Los compuestos terapéuticos para dañar o exterminar células tumorales que se acoplan a la molécula de unión pueden alcanzar el tumor desde dentro, y los compuestos que inducen la trombosis se suministran fácilmente a su sitio de acción.

La interferencia con la función de plexina D1 representa una forma para inhibir la angiogénesis, para inhibir la migración de células tumorales, y para inhibir la migración de macrófagos. De este modo, la descripción proporciona métodos para tratar o suprimir trastornos en los que está implicada la plexina D1, usando la presencia específica de plexina D1 para suministrar sustancias terapéuticas localmente a tejidos enfermos, y/o mediante interferencia en la función de plexina D1 o en la interacción entre plexina D1 y sus ligandos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De este modo, la descripción se basa en el hecho de que plexina D1 se puede usar como un marcador seleccionable como diana en vasos sanguíneos tumorales, como una proteína seleccionable como diana implicada en la angiogénesis tumoral, como un marcador seleccionable como diana en células tumorales, y como una proteína seleccionable como diana implicada en la migración celular.

La descripción también se refiere así al uso de moléculas que se unen a plexina D1, su gen o ARNm, o sus ligandos en el diagnóstico y la terapia. En los métodos como se describen aquí se pueden usar todos los tipos de moléculas de unión específicas, y sus derivados, en particular compuestos proteínicos tales como, pero sin limitarse a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de un solo dominio, otros dominios de unión proteínicos, tales como, pero sin limitarse a, lipocalinas, y pequeñas moléculas que se unen específicamente a plexina D1 o a sus ligandos. Para la unión a la plexina D1, se puede usar el gen o el ARNm transcrito a partir de las moléculas de ácido nucleico del gen de plexina D1, tales como aptámeros de ADN o de ARN.

Como se describe aquí adicionalmente, las moléculas que se unen a plexina D1 o al ligando de plexina D1 son anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales, más en particular anticuerpos humanos o humanizados en los que las regiones constantes del anticuerpo original se sustituyen por las regiones constantes de anticuerpos humanos, o sus fragmentos, que todavía se unen a plexina D1 o a su ligando.

El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo IgG1 humano. Sin embargo, otros isotipos del anticuerpo humano también están englobados por la presente descripción, incluyendo IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE. En los métodos como se describen aquí se pueden usar también todos los anticuerpos derivados de animales de diversos isotipos.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos de tamaño completo o fragmentos de anticuerpos que se unen al antígeno, incluyendo Fab, F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv monocatenarios, o VHH de dominio simple, dominios simples VH o VL.

Preferiblemente, los anticuerpos frente a plexina D1 son anticuerpos monoclonales humanos producidos mediante una célula de hibridoma que incluye una célula B obtenida a partir de un animal transgénico inmunizado que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana, fusionada a una célula inmortalizada, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo derivado de animal producido mediante una célula de hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal inmunizado, fusionada a una célula inmortalizada, o anticuerpos humanos y animales producidos mediante una célula eucariota transfectada con el ADNc o el ADN genómico codificado por dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Como se describe aquí, se proporcionan anticuerpos de llama de un solo dominio (VHH) con afinidad por plexina D1, más específicamente anticuerpos de un solo dominio de llama A12 (SEC ID NO:1) y F8 (SEC ID NO:2), ya sea que se presenten o no en bacteriófagos M13, también conocidos por aquellos con pericia en la técnica como anticuerpos VHH de presentación de fagos.

Un anticuerpo monocatenario preferido deriva del anticuerpo 11F5H6 y 17E9C12. La secuencia del anticuerpo monocatenario se muestra en SEC ID NO:3 y SEC ID NO:4.

Los anticuerpos para uso como se describe aquí pueden ser anticuerpos de alta afinidad que son provocados en animales de laboratorio no transgénicos, o en animales transgénicos en los que el locus de globulina endógeno se ha sustituido por el locus de globulina humano, permitiendo así la producción de anticuerpos humanos en tales animales (Jakobovits, A. Curr Opin Biotechnol 6:561-566 (1995)).

La descripción proporciona además un método para producir los anticuerpos como se describen aquí, que comprende inmunizar un animal con plexina D1, o una célula que expresa plexina D1, o un ácido nucleico que codifica plexina D1, o partes del dominio extracelular de plexina D1, de manera que los anticuerpos frente a plexina D1 son producidos por las células B del animal, aislar las células B del animal y fusionar las células B a una estirpe celular de mieloma para obtener células inmortalizadas que segregan el anticuerpo. El animal es preferiblemente un animal transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana, de manera que el anticuerpo resultante está humanizado.

Como se describe aquí, el método incluye inmunizar un animal de laboratorio con un péptido sintético, escogido del dominio extracelular de plexina D1, por ejemplo el péptido 47-63 que corresponde al término amino de la secuencia de aminoácidos de plexina D1 madura. Sin embargo, las inmunizaciones se realizan preferiblemente con dominios extracelulares recombinantes, preferiblemente una región con baja similitud con otros miembros de la familia de las plexinas, por ejemplo una región que comprende los aminoácidos 47-546, que carece de las secuencias

relacionadas con Met. Dichos dominios extracelulares de plexina D1 recombinantes se pueden producir en células de *E. coli* insertando los ácidos nucleicos codificantes en un vector de expresión procariota adecuado, por ejemplo bajo el control del promotor de  $\beta$ -galactosidasa, transformando células de *E. coli* con dicho vector, y aislando las proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión purificados. Sin embargo, se prefiere que los anticuerpos se provoquen mediante inmunización con dicho dominio extracelular de plexina D1 recombinante que se produce mediante células eucariotas, que contienen por lo tanto modificaciones post-traduccionales que son muy similares a aquellas presentes en plexina D1 nativa, por ejemplo mediante células de ovario de hámster chino (CHO), tras la transfección con un vector que contiene los ácidos nucleicos codificantes para dichos dominios extracelulares bajo el control de un promotor de citomegalovirus. Los fragmentos de plexina D1 extracelulares recombinantes se pueden fusionar o no a etiquetas que facilitan la purificación, por ejemplo una etiqueta de VSV o una región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina.

El método para producir el anticuerpo también puede comprender clonar en un vector de expresión las regiones codificantes del anticuerpo a partir de dichas células B específicas para plexina D1, y expresar la secuencia codificante. Se prefiere que el vector de expresión sea pHENIXHISVSV, que permite la expresión del anticuerpo mediante células hospedantes de *E. coli*, flanqueado en el extremo carboxiterminal por un virus de la estomatitis vesicular (etiqueta de VSV) y una etiqueta de His\*8. La etiqueta de VSV pretende facilitar la detección inmunohistoquímica, usando anticuerpos específicos. La etiqueta de His\*8 pretende facilitar la purificación a base de cromatografía de afinidad con níquel. Igualmente, se pueden usar otros vectores de expresión.

Más específicamente, la presente descripción proporciona un anticuerpo de un solo dominio A12 aislado, que tiene una constante de disociación menor que  $2 \times 10^{-8}$  M, que se une al término amino de plexina D1, y que detecta plexina D1 en tinciones inmunohistoquímicas y que se dirige hacia vasos sanguíneos tumorales que expresan plexina D1; y también un anticuerpo de un solo dominio F8 aislado, que tiene una constante de disociación menor que  $3 \times 10^{-8}$  M, que se une al término amino de plexina D1, y que detecta plexina D1 en tinciones inmunohistoquímicas, y que se dirige a vasos sanguíneos tumorales que expresan plexina D1. Ambos anticuerpos de un solo dominio aislados se pueden fusionar a la región constante de una cadena pesada de IgG1 humana, o a la región constante de una cadena pesada de IgG1 de ratón.

Preferiblemente, con los métodos como se describen aquí se usan anticuerpos completamente humanos. También, se pueden usar anticuerpos humanizados o derivados de animales de laboratorio.

La descripción proporciona además anticuerpos biespecíficos que tienen una especificidad de unión por plexina D1, y una especificidad de unión por una célula presentadora de antígenos humana, o por un receptor de Fc, en el que el receptor de Fc es un Fc (gamma) R1 o un receptor de Fc(alfa) humano.

La descripción proporciona también moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos preferidos, o porciones de unión al antígeno. También se describen vectores de expresión recombinantes que incluyen ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos como se describen aquí, así como células hospedantes transfectadas con tales vectores.

Otras moléculas de unión como se describen aquí son pequeñas moléculas que se unen específicamente a plexina D1. La expresión "pequeña molécula" se refiere a menudo a moléculas con pesos moleculares de 500 o menor. La expresión se usa normalmente estos días, y de este modo está clara para la persona experta. Además, existen ya bibliotecas de pequeñas moléculas, o se están desarrollando. Un ejemplo de tal biblioteca es la NIH Molecular Libraries Small Molecule Repository (MLSMR). Tales bibliotecas se someten a cribado de alto rendimiento (HTS) para identificar moléculas que se unen a plexina D1. La descripción también proporciona pequeñas moléculas que resultan de un cribado de tales bibliotecas.

Otros compuestos que se pueden usar en los métodos como se describen aquí comprenden péptidos o aptámeros (Ulrich, *Med. Chem.* 1(2):199-208 (2005)) que se unen a dominios extracelulares de plexina D1 e interfieren de ese modo con la unión de los ligandos de plexina D1 a plexina D1. Por el contrario, tales péptidos o aptámeros también se pueden unir a los sitios de unión a plexina D1 de los ligandos de plexina D1 e interferir de ese modo con la unión del ligando a plexina D1.

Para interferir con la expresión del gen de plexina D1 se usa otro tipo de molécula de unión, en particular ARNpi, ARN antisentido o fosfotriucleótidos antisentido. El ARN pequeño de interferencia (ARNpi) comprende pequeñas hebras de ARN que interfieren con la traducción del ARN mensajero. El ARNpi se une a la porción complementaria del ARN mensajero diana y la etiqueta para la degradación, inhibiendo así la expresión del gen. Esto se conoce normalmente como "silenciamiento" génico. El ARNpi tiene habitualmente una longitud de 21 a 23 nucleótidos. El ARN antisentido es una molécula de ARN transcrita a partir de la hebra codificante, en vez de la del molde, de ADN, de manera que es complementario al ARNm sentido. La formación de un dúplex entre las moléculas de ARN sentido y antisentido bloquea la traducción y también puede someter a ambas moléculas a nucleasas específicas de dobles cadenas, inhibiendo así la expresión del gen. La inhibición de la expresión del gen se puede usar para bloquear la angiogénesis y la migración de células tumorales y macrófagos.

Preferiblemente, las moléculas de unión descritas anteriormente se unen a plexina D1, a su gen o a su ligando en

células eucariotas. Dichas moléculas se acumulan específicamente en tumores tras la inyección intravenosa, o se acumulan específicamente en vasos sanguíneos tumorales con la inyección intravenosa.

Los anticuerpos, sus fragmentos, las pequeñas moléculas u otros compuestos proteínicos que se unen todos ellos a plexina D1 se pueden usar de diversas maneras.

- 5 También se describen aquí compuestos que se unen a la parte extracelular de plexina D1 y cuya unión da como resultado la interferencia de la función de plexina D1. Como alternativa, la descripción proporciona compuestos que se unen al dominio intracelular de plexina D1 y que previenen la señalización por plexina D1.

10 Tales moléculas de unión se unen a plexina D1 para interferir con la formación de complejos de membrana multicomponentes al inhibir la unión de ligandos de plexina D1, en particular neuropilina-1, neuropilina-2, semaforina 3C, semaforina 3E, receptor 1 de VEGF, receptor 2 de VEGF o VEGF-A, a plexina D1. Tales moléculas de unión conducen a la inhibición de la señalización de GTPasas inducida por ligandos mediante plexina D1, o a la inhibición de la migración de células que expresan plexina D1, en particular células endoteliales asociadas al tumor, células tumorales o macrófagos.

15 También se proporciona aquí un método para inducir la lisis de una célula que expresa plexina D1, que comprende poner en contacto una célula que expresa plexina D1 con las moléculas de unión, en particular los anticuerpos como se describen aquí, en presencia de células efectoras humanas, de manera que se produce la lisis de la célula que expresa plexina D1.

20 Como se describe aquí, la molécula de unión se combina con o se acopla a un compuesto efector que puede detectar la presencia de plexina D1 para fines de diagnóstico, o que puede realizar un efecto sobre la célula que expresa plexina D1. El compuesto efector de diagnóstico o terapéutico se puede acoplar directamente a la molécula de unión, o puede estar presente en un vehículo de transporte, tal como un nanodispositivo, en particular un liposoma o polimerosoma, que se acopla a la molécula de unión. Como alternativa, la molécula de unión puede ser un anticuerpo biespecífico que se une tanto a plexina D1 como al compuesto efector, dirigiendo así el compuesto efector a un sitio o célula en el que se expresa plexina D1.

25 La descripción proporciona así el uso de tales moléculas de unión en un método para diagnosticar una enfermedad mediada por la expresión de plexina D1, método el cual comprende el suministro intravenoso de las moléculas de unión a plexina D1 proteínicas, aptaméricas o de pequeña molécula, conjugadas a un compuesto efector que permite la detección *in vivo* de las moléculas de unión.

30 Los compuestos efectores de diagnóstico son, por ejemplo, radioisótopos o agentes de contraste para formación de imágenes mediante resonancia magnética (MRI), tales como gadolinio-DTPA, o colorantes fluorescentes.

35 Los ejemplos de sustancia radioactiva comprenden, pero no se limitan a, tecnecio<sup>99m</sup> (<sup>99m</sup>Tc), yodo-123 (<sup>123</sup>I), yodo-131 (<sup>131</sup>I), renio-186 o -188 (<sup>186/188</sup>Re), galio-67 (<sup>67</sup>Ga), las sustancias emisoras de radiación beta itrio-90 (<sup>90</sup>Y) o lutecio-177 (<sup>177</sup>Lu), los isótopos emisores de positrones flúor-18 (<sup>18</sup>F) y carbono-11 (<sup>11</sup>C). Tales radioisótopos se pueden usar para detectar o dañar o exterminar células que expresan plexina D1. Habitualmente se usan isótopos diferentes para el diagnóstico y la terapia. La persona experta en la técnica está bien al tanto de cuál isótopo usar para qué tejido y para qué tipo de uso.

Las moléculas de unión proteínicas, aptaméricas y de pequeñas moléculas para uso como se describe aquí se pueden combinar con o acoplar a un agente tóxico, tal como un agente quimioterapéutico, ya sea directamente o en un vehículo de transporte, en particular un nanodispositivo, tal como un liposoma o un polimerosoma.

40 Una entidad que se une a plexina D1 como se describe aquí se acopla a uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados del grupo que consiste en mostazas de nitrógeno (por ejemplo, ciclofosfamida e ifosfamida), aziridinas (por ejemplo, tiotepa), alquilsulfonatos (por ejemplo, busulfán), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina y estreptozocina), complejos de platino (por ejemplo, carboplatino y cisplatino), agentes alquilantes no clásicos (por ejemplo, dacarbazina y temozolamida), análogos de folato (por ejemplo, metotrexato), análogos de purina (por ejemplo, fludarabina y mercaptopurina), análogos de adenosina (por ejemplo, cladribina y pentostatina), análogos de pirimidina (por ejemplo, fluorouracilo (solo o en combinación con leucovorina) y gemcitabina), ureas sustituidas (por ejemplo, hidroxurea), antibióticos antitumorales (por ejemplo, bleomicina y doxorubicina), epipodofilotoxinas (por ejemplo, etopósido y tenipósido), agentes de microtúbulos (por ejemplo, docetaxel y paclitaxel), análogos de camptotecina (por ejemplo, irinotecán y topotecán), enzimas (por ejemplo, asparaginasa), citocinas (por ejemplo, interleucina-2 y interferón-[alfa]), anticuerpos monoclonales (por ejemplo, trastuzumab y bevacizumab), toxinas e inmunotoxinas recombinantes (por ejemplo, toxina B del cólera recombinante y TP-38), terapias génicas contra el cáncer, y vacunas contra el cáncer (por ejemplo, vacuna frente a telomerasa).

55 Los agentes quimioterapéuticos se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en doxorubicina, cisplatino, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo y ciclofosfamida hidroxurea. Otros compuestos son conocidos por la persona experta en la técnica.

Un tumor también se puede tratar bloqueando su suministro de sangre al inducir trombosis local en la vasculatura

del tumor. Las moléculas de unión como se describen aquí se pueden usar para dirigir moléculas inductoras de la trombosis, tales como el cofactor de la coagulación de la sangre TF (factor tisular), una entidad radioactiva o una toxina, tal como ricina, al sitio del tumor. Los compuestos efectores se pueden acoplar a la molécula de unión, en particular una molécula que se une a plexina D1, o pueden estar presentes en un nanodispositivo, tal como un liposoma o polimerosoma, que se acopla a la molécula que se une a plexina D1.

Un método alternativo para tratar cáncer o un trastorno inflamatorio como se describe aquí es con boro, las moléculas de unión como se describen aquí se pueden conjugar a vehículos de transporte, en particular nanodispositivos, tales como liposomas o polimerosomas, que se llenan con boro para obtener una composición terapéutica. Tras el suministro y la acumulación de esta composición en el área enferma, este área se irradia con neutrones, dando como resultado la emisión de partículas alfa radioactivas y citotóxicas que dañan o exterminan las células endoteliales tumorales, las células tumorales y/o los macrófagos activados.

Es deseable que los anticuerpos dirigidos a los vasos sanguíneos tumorales tengan afinidades elevadas frente a plexina D1, por ejemplo mayores que  $10^{-8}$ , preferiblemente mayores que  $10^{-9}$ , más preferiblemente mayores que  $10^{-10}$  M. La afinidad elevada y el peso molecular elevado de los anticuerpos restringirán sin embargo la penetración en el tejido tumoral. Por lo tanto, los ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos monoclonales, obtenidos vía clonación mediante RT-PCR, se pueden usar para generar derivados de anticuerpos, por ejemplo anticuerpos que carecen de la región constante y son monovalentes, o fragmentos de anticuerpos que se adaptan a afinidades óptimas para seleccionar como dianas a vasos sanguíneos o para la penetración en el tumor mediante procedimientos mutagénicos. Estos derivados de anticuerpos tendrán menores afinidades y menores pesos moleculares, y tendrán propiedades mejoradas de selección de células tumorales como dianas.

Las moléculas de unión diferentes como se describen aquí se pueden combinar en una mezcla. Específicamente, los miembros de la mezcla tienen una afinidad variable. Un ejemplo de tal combinación es una mezcla de anticuerpos monoclonales y/o fragmentos de anticuerpos, o una mezcla de anticuerpos con pequeñas moléculas. Los anticuerpos monoclonales que tienen afinidad elevada se pueden usar para seleccionar como dianas a los vasos, mientras que los fragmentos más pequeños que tienen una menor afinidad son más capaces de penetrar y alcanzar las células tumorales. Como alternativa, se puede usar una mezcla de moléculas que se unen a plexina D1 junto con moléculas que se unen al ligando de plexina D1, y/o con moléculas que se unen a ácidos nucleicos que codifican plexina D1. O moléculas que se unen al ligando de plexina D1 se pueden combinar con moléculas que se unen a ácidos nucleicos que codifican plexina D1.

Las moléculas que se unen a plexina D1 como se describen aquí se pueden usar en un método para tratar una enfermedad mediada por la expresión de plexina D1, que comprende el suministro intravenoso de las moléculas de unión como se describen aquí a una dosis eficaz para tratar esa enfermedad.

Las moléculas de unión también se pueden usar en un método para diagnosticar una enfermedad mediada por la expresión de plexina D1, que comprende el suministro intravenoso de conjugados de moléculas que se unen a plexina D1 con un trazador paramagnético, fluorescente o radioactivo, seguido de la formación de imágenes mediante resonancia magnética, formación de imágenes ópticas, SPECT o PET.

Las moléculas de unión se pueden usar además en un método para tratar o suprimir una enfermedad mediada por la expresión de plexina D1, que comprende el suministro intravenoso de las moléculas de unión proteínicas y de pequeñas moléculas como se describen aquí, o una composición de moléculas de unión proteínicas y de pequeñas moléculas.

La enfermedad a tratar o diagnosticar puede ser cáncer, una enfermedad inflamatoria, en particular una enfermedad autoinmunitaria, tal como artritis reumatoide, o aterosclerosis, o esclerosis múltiple.

El diagnóstico se puede realizar *in vivo* e *in vitro*. Un método *in vivo* se describe anteriormente, y se puede llevar a cabo con formación de imágenes mediante resonancia magnética (MRI) o con cámaras de SPECT o PET tras la acumulación de la molécula de unión marcada radioactivamente en el tejido enfermo.

Otro método de diagnóstico comprende detectar la presencia de plexina D1 en una muestra *in vitro* o *ex vivo*. Tal método comprende poner en contacto la muestra con moléculas de unión de plexina D1, o ácidos nucleicos que se unen al gen de plexina D1 o a su ARNm o un ADN copia derivado de este ARNm, todos ellos unidos a un marcador detectable, en condiciones que forman un complejo entre el anticuerpo y plexina D1, y detectar la formación del complejo. El complejo se puede detectar visualizando el marcador detectable. Las muestras pueden ser fluidos corporales, tales como sangre, suero, plasma, saliva, orina, semen, heces, o tejidos, tales como biopsias de células tumorales.

La descripción proporciona además un vector de expresión, que comprende la secuencia codificante para el anticuerpo de llama F8 o A12, o para el anticuerpo monocatenario derivado del anticuerpo 11F5H6, y secuencias reguladoras adecuadas. La descripción también proporciona una célula transfectada con el mencionado vector de expresión. La descripción se refiere además a la proteína recombinante obtenible expresando el vector de expresión.

La descripción también proporciona un vector de expresión, que comprende la secuencia codificante para el dominio extracelular de plexina D1, opcionalmente fusionada a una región constante de una cadena pesada humana, y secuencias reguladoras adecuadas. La descripción también proporciona una célula transfectada con el mencionado vector de expresión. La descripción proporciona además la proteína recombinante obtenible expresando el vector de expresión.

La proteína recombinante comprende el dominio extracelular de plexina D1, que se une a ligandos de plexina D1 y previene de este modo la unión de los ligandos a plexina D1 asociada a la célula. Preferiblemente, la secuencia codificante codifica una proteína recombinante que comprende los aminoácidos 47-506 del dominio extracelular de plexina D1, que se une a ligandos de plexina D1 y previene de este modo la unión de los ligandos a plexina D1 asociada a la célula, o los aminoácidos 507-1274 del dominio extracelular de plexina D1, que se une a los ligandos de plexina D1 y previene de este modo la unión de los ligandos a plexina D1 asociada a la célula. Tal proteína recombinante puede portar mutaciones que incrementan la afinidad por ligandos de plexina D1 y que tienen de ese modo una mayor potencia como receptor señuelo. Tales mutaciones se inducen habitualmente realizando cambios en la secuencia codificante usada para producir la proteína recombinante.

La descripción proporciona además el uso de las moléculas de unión como se describen aquí en un método para tratar o suprimir una enfermedad mediada por plexina D1, que comprende suministrar intravenosa o intratumoralmente dominios extracelulares de plexina D1 señuelos como se describen anteriormente, o en un método para tratar o suprimir una enfermedad mediada por plexina D1, que comprende el suministro intravenoso de adenovirus o lentivirus, que contienen los nucleótidos codificantes para los dominios extracelulares recombinantes de plexina D1 o partes de los mismos como se describe anteriormente.

Estos receptores de plexina D1 señuelo antagonistas interfieren con la interacción entre plexina D1 y sus ligandos, en particular neuropilina-1, semaforina 3C y semaforina 3E, e interfieren de ese modo con la función de plexina D1.

Preferiblemente, los receptores de plexina D1 señuelo tienen una mayor afinidad frente a los ligandos de plexina D1, en comparación con plexina D1. Tal mayor afinidad se puede obtener creando una biblioteca de dominios extracelulares de plexina D1, portándolos en mutaciones introducidas al azar, y seleccionando receptores señuelo con un comportamiento antagonista más potente en ensayos de migración celular.

A fin de producir dichas moléculas proteínicas (incluyendo péptidos, polipéptidos y polipéptidos glicosilados o polipéptidos que tienen otras modificaciones post- o peritraduccionales), es deseable insertar en vectores de expresión el ácido nucleico recombinante que codifica fragmentos del dominio extracelular de plexina D1 que comprende los sitios de unión para semaforina 3C, semaforina 3E y NP-1. Los antagonistas como se describen aquí se producen preferiblemente a partir de un ácido nucleico o un vector de expresión como se describe aquí, preferiblemente en una célula hospedante.

Las moléculas como se describen aquí también se pueden usar en una combinación de métodos de tratamiento como se describen anteriormente y/o con terapias convencionales o terapia antiangiogénica para prevenir además la formación de una neovascularización tumoral, o con radioterapia y/o quimioterapia adyuvante.

La descripción proporciona además un método para identificar moléculas que son capaces de unirse a plexina D1, método el cual comprende poner en contacto una colección de moléculas con plexina D1 y seleccionar las moléculas de la colección que muestren unión a plexina D1 como moléculas de unión a plexina D1. La colección de moléculas puede estar presente, por ejemplo, en bibliotecas de pequeñas moléculas, en una matriz de proteínas, etc. Las técnicas para identificar colecciones de moléculas son conocidas en sí mismas. La descripción proporciona la identificación de la diana que se va a unir, que es plexina D1.

En esta solicitud, la expresión "molécula de unión" se usa para todos los tipos de moléculas de unión, es decir, aquellas que se unan a plexina D1, aquellas que se unan a ácido nucleico que codifique el gen de plexina D1, y aquellas que se unan a ligandos de plexina D1. Todos estos tipos de moléculas se pueden acoplar a compuestos efectores como se describe anteriormente.

#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La presente descripción se ilustrará adicionalmente en los Ejemplos que siguen. En los Ejemplos, se hace referencia a las siguientes figuras:

Figura 1: Dominios estructurales de miembros de la familia de plexinas: se han identificado cuatro subfamilias, denominadas plexina A-D. Las cajas rayadas horizontalmente indican dominios Sema, las cajas rayadas en diagonal indican motivos de secuencias relacionadas con Met (MRS), y las cajas en blanco indican el motivo de MRS atípico de PLXND1. Los miembros de la subfamilia de plexina B tienen un sitio proteolítico potencial similar a furina, marcado por una banda gris. La región transmembránica está marcada por una caja sombreada, y es seguida de dos dominios intracelulares conservados, que comprenden juntos el dominio SP, marcado por dos óvalos.

Figura 2: A) Análisis de hibridación *in situ* de lesiones cerebrales de Me157- VEGF-A<sub>165</sub> usando una sonda de

ARN de *plxnd1* específica para ratón marcada con digoxigenina. Los vasos tumorales son muy positivos (flechas), mientras que los capilares cerebrales, distantes de las lesiones, son negativos (compárese el perfil de ISH con la tinción con CD34 en la Figura 2B).

5 Figura 3: Análisis de ISH específica para PLXND1 humana de glioblastoma multiforme (A), metástasis cerebrales de sarcoma (B), melanoma (C) y carcinoma de mama (D). Los recuadros muestran tinciones de secciones en serie mediante CD31. Las ISH de control que usan sondas sentido fueron negativas (no mostradas). Obsérvese que en estos tumores la expresión de *PLXND1* no está confinada a los vasos sanguíneos: también se encuentran en células tumorales niveles elevados del transcrito de *PLXND1*. t = tumor, V = vaso.

10 Figura 4: Análisis de ISH usando una sonda de ARN marcada con digoxigenina específica para ser humano (A) y tinción inmunohistoquímica con CD31 (B) de cerebro normal. Obsérvese que los vasos están presentes abundantemente, pero éstos no expresan el transcrito de plexina D1.

15 Figura 5: Especificidad de los fagos (A) y anticuerpos de un solo dominio (sdabs) correspondientes (B) A12 y F8 para el péptido H<sub>2</sub>N-ALEIQRRFPSPPTNC-CONH<sub>2</sub>. En A, se dejó que 10<sup>10</sup> fagos se uniesen al péptido de PLXND1, BSA, IgG humana o a péptido irrelevante como se describe en el texto. Después de un lavado riguroso, los fagos unidos se detectaron usando un anticuerpo anti-M13. En B, se llevaron a cabo incubaciones similares pero ahora con sdabs solubles. Tras lavar, los sdabs unidos se detectaron y se semicuantificaron vía la etiqueta de VSV-G.

20 Figura 6: Las constantes de disociación (kd) de la unión entre los anticuerpos de un solo dominio A12 y F8 se determinaron usando el biosensor Biacore 2000 (Uppsala, Suecia). El chip sensor y las sustancias químicas que se acoplan a la proteína se adquirieron de Biacore AB. El conjugado PLXND1-péptido-KLH (27 µg/ml en acetato de sodio, pH 4,0) o BSA (1 µg/ml en acetato de sodio, pH 5,0) se acopló a superficies de CM5 activadas usando *N*-etil-*N'*-(dimetilaminopropil)carbodiimida, *N*-hidroxisuccinimida, en condiciones recomendadas por el fabricante. Los grupos sin reaccionar se inactivaron mediante 1 M de etanolamina, pH 8,5.

25 Las medidas cinéticas se llevaron a cabo a 25°C con un caudal de 10 ml/min. en amortiguador de HBS-EP (10 mM de Hepes, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005% de tensioactivo P20). Se usaron seis concentraciones de sdabs purificados mediante afinidad con Ni (en el intervalo de 1 mM a 50 µM) para determinar las constantes de disociación (Kd) de la interacción con el péptido de PLXND1. Después de cada experimento, la regeneración de la superficie del sensor se llevó a cabo con 10 mM de NaOH.

30 La unión específica, definida por la unión a una superficie de PLXND1 menos la unión a una superficie de BSA de control, se analizó usando el software BIAevaluation 4.1 y un modelo de unión de Langmuir 1:1. Las afinidades de los anticuerpos de un solo dominio A12 y F8 fueron 2,1 x 10<sup>-8</sup> M y 3,5 x 10<sup>-8</sup> M.

35 Figura 7: Evaluación de la especificidad de los anticuerpos de un solo dominio por plexina D1. La figura A muestra la tinción inmunohistoquímica de la placa de crecimiento del hueso trabecular de un embrión de ratón (E16.5) con el anticuerpo de un solo dominio A12, utilizando la etiqueta de VSV-G para la detección del anticuerpo. El recuadro muestra una hibridación *in situ* de una estructura embrionaria similar usando una sonda de plexina D1 marcada con digoxigenina específica para ratón. Nótese el solapamiento de la hibridación *in situ* de plexina D1 y la inmunotinción. La figura 7b es un ejemplo representativo de una lesión Mel57-VEGF-A165 en el cerebro de un ratón atímico. La vasculatura que es también positiva en ISH de plexina D1 (véase también la figura 2) es inmunopositiva con el anticuerpo de un solo dominio F8.

40 Figura 8: Inmunotinciones con el anticuerpo de un solo dominio A12 en una selección de tumores cerebrales humanos. Los tumores mostrados son A) glioblastoma multiforme, metástasis de B) melanoma, C) carcinoma de mama, y D) carcinoma de células renales. Los recuadros en A y B consisten en tinciones de control con el anticuerpo anti-VSV solamente, y muestran que la tinción del tumor es específica. Obsérvese que los vasos y las células tumorales son muy reactivos con el anticuerpo.

45 Figura 9: Inmunotinciones con el anticuerpo de un solo dominio A12 en una serie de progresión de melanoma. Las inmunotinciones se llevaron a cabo en un nevo, un nevo displásico, y fases de crecimiento horizontal y vertical de melanoma. Obsérvese que solamente las células neoplásicas expresan plexina D1.

50 Figura 10: Inmunotinciones con el anticuerpo de un solo dominio A12 en secciones de tumores cerebrales Mel57-VEGF-A en ratones, tratados con ZD6474. En ratones no tratados o tratados con placebo, los vasos tumorales se tiñen de forma positiva con este anticuerpo. Sin embargo, en ratones tratados con ZD6474, hay una disminución de la expresión de plexina D1 dependiente de la dosis. ZD6474 se administró oralmente, una vez al día, en la dosis según se indica.

55 Figura 11: Inmunotinciones dobles con el marcador de macrófagos CD68 (que tiñe de azul) y con el anticuerpo de un solo dominio A12 (que tiñe de rojo) en carcinoma de mama. Una subpoblación de macrófagos expresa plexina D1 como se revela mediante una proteína que se tiñe de púrpura.

Figura 12: Migración *in vivo* del fago A12, F8 o de un fago irrelevante hacia lesiones cerebrales Mel57-VEGF<sub>165</sub>. Se inyectaron a ratones que portan tumores 10<sup>12</sup> fagos en la vena de la cola y, después de 5 minutos, los ratones se anestesiaron y se sometieron a perfusión cardíaca con 15 ml de disolución salina amortiguada con fosfato. Los ratones se sacrificaron, se retiraron los cerebros, y las secciones congeladas se analizaron para determinar el contenido y la distribución de los fagos. A) Tinción con M13 de una sección congelada de lesiones Mel57-VEGF<sub>165</sub> cerebrales. Los fagos están claramente asociados a los vasos, como se evidencia por la inmunotinción anti-CD34 en una sección en serie, como se muestra en B). Las flechas apuntan a un vaso positivo para CD34, distante de la lesión, que no está resaltado por la tinción anti-M13. El recuadro en (A) muestra un experimento de control en el que se inyectó un fago irrelevante. C) Distribución de sdab F8 tras la inyección intravenosa en ratones que poseen tumores. Los sdabs se visualizan mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-VSV. Obsérvese que el sdab se detecta en vasos tumorales pero no en capilares cerebrales normales. El recuadro muestra el experimento de control en el que se inyectó un sdab irrelevante. Se observó una localización intersticial, consistente con la naturaleza permeable de los vasos en estos tumores. D) Cuantificación de la migración de fagos. Se diseccionó tejido tumoral a partir de secciones congeladas de 10 μm usando microscopía de disección por captura láser. Se contó el número de fagos formadores de colonias (cfp) tras la infección de células TG1. Se eluyeron veinte veces más fagos F8 a partir de los tumores que de áreas comparables de tejido cerebral no afectado.

Figura 13: El anticuerpo de un solo dominio migra hacia vasos tumorales que se forman recientemente *per se*. Se inocularon ratones atímicos con una suspensión celular de 1,5 x 10<sup>5</sup> células del xenoinjerto de glioma humano E98, que se obtuvo a partir de un tumor E98 subcutáneo. Después de 3 semanas, los fagos que portan el anticuerpo de un solo dominio F8 se inyectaron en la vena de la cola, y después de 5 minutos los ratones se anestesiaron y se sometieron a perfusión cardíaca usando 15 ml de disolución salina amortiguada con fosfato. Los ratones se sacrificaron entonces, se retiraron los cerebros y se fijaron en formalina. Secciones en serie se tiñeron con anticuerpos frente a la proteína p8 del fago M13 (A), frente al marcador endotelial CD34 (B) y frente a glut-1 (C, un marcador para capilares cerebrales preexistentes). La comparación de A, B y C revela que no solo los vasos tumorales recientemente formados acumulan fago F8, sino también vasos cerebrales no dilatados que expresan glut-1 y que por lo tanto son considerados vasos cerebrales preexistentes que se habían incorporado en el tumor.

Figura 14: Efectos de dominios extracelulares de plexina D1 sobre el desarrollo de la vasculatura tumoral. Transfectantes dobles de la estirpe celular de melanoma humano Mel57, que expresan VEGF-A<sub>165</sub> y el dominio extracelular de plexina D1 que comprende los aminoácidos 1-850, se inyectaron en la arteria carótida interna derecha de ratones atímicos. Después de tres semanas, los ratones se sometieron a formación de imágenes mediante resonancia magnética potenciada por gadolinio-DTPA. La figura 14A muestra imágenes de MR de dos ratones de control que portan tumores cerebrales Mel57 que expresan VEGF-A<sub>165</sub> solamente, y la figura 14B muestra imágenes de MR de cerebros de dos ratones que portan el transfectante doble. La permeabilidad vascular, como se ensaya mediante extravasación de Gd-DTPA, tiende a ser menor en los transfectantes dobles, sugiriendo que la permeabilidad vascular inducida por VEGF-A es contrarrestada por el ectodominio de plexina D1. De forma más importante, los vasos sanguíneos en los tumores transfectados doblemente están activados, como se indica por el aumento de CDR34, aunque expresan glut-1, sugiriendo fuertemente que estos vasos son vasos preexistentes que se incorporan en el tumor mediante el fenómeno de la coopción. Obsérvese que los vasos sanguíneos en los tumores que expresan VEGF-A<sub>165</sub> solamente, son negativos para glut-1, y por lo tanto se pueden considerar como recientemente formados.

Figura 15: Se generaron transferencias Western con ectodominios de plexina D1 recombinantes, expresados en *E. coli* y que engloban a los aminoácidos 47-506 (líneas 1) o 225-388 (líneas 2). El suero del ratón 25 se evaluó antes (panel A) y después (panel B) de la inmunización con la región 47-506 de plexina D1. Como se muestra en la figura 15B, el suero inmune de ratón reconoció específicamente la proteína recombinante de *E. coli* 47-506 (52 kDa, línea 1) y la proteína que engloba a los restos 225-388 de plexina D1 (una proteína de 18 kDa que se encuentra completamente dentro de la secuencia que se usó para la inmunización, línea 2). El suero preinmune no mostró tal reactividad (panel A). Cuando se ensayó en tinciones inmunohistoquímicas en una metástasis cerebral de un sarcoma alveolar de tejidos blandos, el suero inmune de ratón (panel D), pero no el suero preinmune (panel C), mostró positividad frente a vasos sanguíneos y células tumorales, un patrón de tinción que fue similar al del anticuerpo de un solo dominio A12.

Figura 16: Inmunohistoquímica con anticuerpos IgM monoclonales, obtenidos mediante linfocitos B procedentes del ratón 25. Los anticuerpos 11F5H6 y 17E9C12 se seleccionaron basándose en la reactividad frente a la proteína 47-506 en ELISA, y se analizaron en busca de su potencial para detectar plexina D1 en secciones congeladas de tumores humanos. Estos anticuerpos mostraron una positividad fuerte en metástasis cerebrales de sarcoma y melanoma, como se ilustra en la figura. Digno de mención, los recuadros en los paneles C-F representan tinciones de control en las que se omitió el anticuerpo primario. Los paneles A y B muestran que estos anticuerpos no reconocen en particular estructuras de vasos en tejido cerebral normal.

Figura 17: Migración del anticuerpo 11F5H6 al tumor.

5 Para evaluar adicionalmente si el anticuerpo monoclonal 11F5H6 es capaz de reconocer vasos sanguíneos tumorales, se hicieron crecer tumores Mel57-VEGF-A angiogénicos en cerebros de ratones atímicos, esencialmente como se describe en el ejemplo 10. El anticuerpo 11F5H6 (1 mg) se inyectó en una vena de la cola lateral, y se dejó circular durante 15 minutos. Después de este período, los ratones se anestesiaron con 1,3% de isoflurano y se abrió el pecho, con lo que se llevó a cabo una perfusión cardíaca con 20 ml de disolución salina amortiguada con fosfato. Después de este procedimiento, los ratones se decapitaron, y los cerebros se retiraron y se congelaron instantáneamente o se fijaron en formalina. Las secciones congeladas de 4  $\mu$ m se tiñeron con el anticuerpo anti-IgM. En la figura 17A se muestra que el anticuerpo 11F5H6 migra hacia y se acumula en vasos tumorales pero no en vasos normales (compárese la tinción anti-IgM en la figura 17A con la tinción anti-CD31 endotelial en la figura 17B). Tal tinción no se observa cuando se lleva a cabo la tinción anti-IgM en ratones no inyectados. De este modo, 11F5H6 es un anticuerpo prometedor que permite la selección de tumores como dianas.

10 Figura 18: Expresión de plexina D1 en macrófagos en un modelo de ratón de artritis reumatoide. Las tinciones se llevaron a cabo con el anticuerpo de un solo dominio A12.

15 Figura 19: Expresión de plexina D1 en aterosclerosis. Un subconjunto de macrófagos en placas ateroscleróticas humanas expresa plexina D1. Se llevaron a cabo tinciones con el anticuerpo de un solo dominio A12. Se llevó a cabo una doble tinción, que presenta a plexina D1 en rojo y al marcador de macrófagos CD68 en azul. Un color púrpura indica coexpresión.

Las tablas muestran lo siguiente:

20 Tabla I: Análisis de diferentes patologías para la expresión de plexina D1.

Tabla II: La expresión de plexina D1 en lesiones melanocíticas aumenta de lesiones benignas a lesiones malignas.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

25 Expresión específica de plexina D1 en vasos sanguíneos asociados a tumores

La plexina D1 se expresa en neuronas, pero también en células endoteliales en vasos angiogénicos durante la embriogénesis. La presente descripción demuestra que plexina D1 se expresa en vasos sanguíneos asociados a tumores, pero no en vasos sanguíneos normales. Esto se ha mostrado mediante hibridación *in situ* de cerebros de ratón, que contienen lesiones de melanoma humano angiogénicas (Figura 2). El modelo de tumor de animal se describe en (Kusters, B et al., Cancer Res 63:5408-5413 (2003)). De forma breve, se inyectan células tumorales vía un procedimiento microquirúrgico en la arteria carótida derecha, que da como resultado el crecimiento tumoral en el parénquima del hemisferio cerebral derecho. Después de tres semanas, al comienzo de los síntomas neurológicos, los ratones se sacrifican y los cerebros se retiran y se fijan en formalina.

30 Secciones de 4  $\mu$ m se sometieron a hibridación *in situ* con fragmentos de ARN sentido y antisentido marcados con digoxigenina. Las sondas de ARN se generaron mediante transcripción usando T3 y T7 ARN polimerasa, respectivamente, de un producto de PCR, que engloba 600 bases en la región no traducida de 3', y que estaba flanqueado por los promotores T7 y T3 (Van der Zwaag et al. (2002), más arriba).

35 Las hibridaciones *in situ* usando sondas de ARN antisentido y sondas de ARN sentido como controles negativos se llevaron a cabo usando protocolos estándar. Las secciones se desparafinaron fundiendo parafina a 60°C y tratamientos subsiguientes con xileno y etanol. Tras la rehidratación en disolución salina amortiguada con fosfato (PBS), se llevó a cabo una digestión con proteinasa K (10  $\mu$ g/ml de PBS en 20 mM de Tris-HCl pH 7,4/5 mM de EDTA) durante 15 minutos a 37°C. Las secciones se post-fijaron en formaldehído amortiguado al 4% durante 10 minutos, y se acetilaron en anhídrido de ácido acético 0,1 M. Los portaobjetos se lavaron subsiguientemente en 2xSSC (citrato de sodio/cloruro de sodio) y milliQ. Tras secar, los portaobjetos se hibridaron con sondas de ARN marcadas con digoxigenina toda la noche a 65°C en formamida al 50%/2xSSC.

40 Se observaron niveles elevados de ARN de plexina D1 en vasos de tumores Mel57 angiogénicos (Figura 2) usando una sonda de ARN de plexina D1 específica para ratón. Las células tumorales también fueron positivas para el transcrito. La homología no perfecta entre plexina D1 de ratón y humana da como resultado una señal más débil en las células tumorales humanas usando la sonda de ratón.

### 50 EJEMPLO 2

Expresión de plexina D1 en tumores

Para investigar la expresión de ARN de plexina D1 en muestras tumorales humanas, se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* con una sonda de ARN de plexina D1 específica para ser humano. Se encontraron niveles

elevados de expresión de ARN de plexina D1 en un gran número de tumores humanos, de ellos (glioblastoma multiforme, metástasis cerebrales de sarcoma, carcinoma de células renales, adenocarcinoma del colon y de la mama), tanto en la vasculatura tumoral como en células tumorales. En la Tabla 1 se da un resumen de los tipos de tumores que expresan plexina D1. La figura 3 muestra algunos ejemplos de hibridaciones *in situ*, por ejemplo un glioblastoma, una metástasis cerebral de melanoma y una metástasis cerebral de carcinoma de colon. El ARN de plexina D1 se encontró no solo en la vasculatura tumoral sino también excesivamente en las propias células tumorales. De forma importante como en la figura 4A, no se observa expresión de ARN de plexina D1 en vasculatura cerebral normal. En la figura 4B se muestra una tinción con CD31, demostrando que existen vasos abundantes en estas secciones.

5

### 10 EJEMPLO 3

Preparación de anticuerpos frente a plexina D1

Para detectar la proteína plexina D1, se seleccionaron anticuerpos con afinidad por plexina D1. Para este fin, se construyó una biblioteca del fago M13 pHENIX que expresa anticuerpos de llama con un solo dominio V-H, construidos mediante RT-PCR a partir de linfocitos B de llama como se describió (van Koningsbruggen, S et al., J Immunol Methods 279:149-161 (2003)). La población de los ADNc resultantes que codifican fragmentos del anticuerpo de un solo dominio (sdab) V-H se ligó en el vector fagómico pHENIXHis8VSV (resultados no mostrados), dando como resultado un producto de fusión con una etiqueta de 8\*His y una etiqueta de VSV-G en el término C. Tras la electroporación en células TG1 de *E. coli*, se recogieron y reunieron colonias resistentes a ampicilina.

15

La biblioteca resultante tuvo una complejidad de  $8 \times 10^8$  clones. El ochenta por ciento de plásmidos contenía el inserto de sdab de longitud completa según se determina mediante análisis de PCR y mediante la detección inmunológica por transferencia de punto de la etiqueta de VSV-G en los sdabs (véase más abajo). La biblioteca del fago se propagó como fagómidos en bacterias TG1 de *E. coli*. Las partículas del fago se rescataron mediante infección con el fago auxiliar sensible a tripsina M13K07 (50). Los fagos se purificaron y concentraron a partir del sobrenadante de cultivo mediante precipitación con 20% de polietilenglicol/2,5 M de NaCl, vía metodología estándar.

20

Para seleccionar fagos, que presentan anticuerpos con afinidad por plexina D1, se revistieron inmunotubos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) toda la noche a 4°C con 5 µg/ml de péptido conjugado con KLH (H<sub>2</sub>N-ALEIQRFPSPPTNC-CONH<sub>2</sub>, que corresponde a los aminoácidos 1-16 de la proteína PLXND1 humana madura (nº de acceso AY116661) en 50 mM de NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,6). De forma importante, el ácido glutámico en la posición 3 en este péptido es una lisina en la secuencia de ratón; los aminoácidos restantes son homólogos a plxnd1 de ratón.

25

Tras el lavado riguroso con PBS/0,05% de Tween 20 (PBST), los sitios de unión no específica se bloquearon con 5% de Marvel (polvo de leche desnatada) en PBST (MPBST, 1 h a temperatura ambiente (RT)), y 10<sup>13</sup> partículas de fagos procedentes del lote de la biblioteca se incubaron durante 90 min. a RT con el péptido inmovilizado. Tras el lavado riguroso con PBST y PBS, los fagos unidos se eluyeron mediante tratamiento con tripsina (10 mg/ml, 30 min. RT).

30

Tras la inactivación de la tripsina con 1% de suero de ternero neonato, el eluato se usó para infectar células TG1 de fase logarítmica para amplificar los fagos que se unen a PLXND1 y calcular el número de ligantes.

35

Para enriquecer a los fagos que se unen, se llevaron a cabo cuatro rondas de selección. Desde la segunda ronda en adelante, las selecciones se llevaron a cabo frente a péptidos no conjugados, inmovilizados en placas de unión a ADN (Costar), para evitar la selección de ligantes a KLH.

40

Los fagos individuales que se unen a PLXND1 con insertos de sdab de longitud completa confirmados mediante PCR se evaluaron para determinar la especificidad por plexina D1. Pocillos de placas o inmunoplaacas que se unen a ADN (Nunc) se revistieron toda la noche a 4°C con el péptido de PLXND1 o con un péptido irrelevante (1 µg/pocillo en PBS/0,5 M de NaCl pH 9,0), seroalbúmina bovina (1 µg/pocillo en 50 mM de NaHCO<sub>3</sub> pH 9,6) o inmunoglobulina G humana (1 µg/pocillo en 50 mM de NaHCO<sub>3</sub> pH 9,6). Después de bloquear los sitios de unión no específica con MPBST, los pocillos se incubaron con fagos en MPBST durante 1 h a RT, y los fagos no unidos se eliminaron mediante lavado riguroso. Los fagos unidos se detectaron usando anti-M13 conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) y tetrametilbencidina (TMB; bioMérieux B.V., Países Bajos). La reacción se terminó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M, y la actividad enzimática se cuantificó midiendo la absorbancia a 450 nm usando un lector de ELISA.

45

Usando este procedimiento de selección, los fagos que presentan anticuerpos de un solo dominio V-H A12 y F8 sobre sus superficies se identificaron como ligantes específicos. La Figura 5A muestra que los anticuerpos A12 y F8 asociados al fago M13 se unen específicamente al péptido de plexina D1, pero no a seroalbúmina bovina, a inmunoglobulinas o a un péptido irrelevante.

50

La expresión de los anticuerpos de un solo dominio solubles se indujo en células TG1 de *E. coli* de fase logarítmica cultivando a 30°C en 2x medio TYA/1 mM de IPTG. Los sdabs se recogieron mediante lisis osmótica usando amortiguador de TES enfriado con hielo (200 mM de Tris-HCl, 0,5 mM de EDTA, 500 mM de sacarosa) que contiene un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche, Basel, Suiza). Las concentraciones de sdab se estimaron vía análisis

55

de transferencia de punto usando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-VSV-G P5D4, el anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Dako, Dinamarca) y tinción con NBT/BCIP. Los sdabs se evaluaron en ELISA para determinar la especificidad por el péptido de PLXND1. Los anticuerpos de un solo dominio A12 y F8 no se unieron al péptido irrelevante, ni a seroalbúmina bovina, ni tampoco a inmunoglobulina G humana (Figura 5B). Las constantes de disociación (kd) de la unión entre los anticuerpos de un solo dominio A12 y F8 se determinaron usando el biosensor de Biacore 2000 (Uppsala, Suecia). El chip sensor y las sustancias químicas que se acoplan a la proteína se adquirieron de Biacore AB. El conjugado de péptido de PLXND1-KLH (27 µg/ml en acetato de sodio, pH 4,0) o la BSA (1 µg/ml en acetato de sodio, pH 5,0) se acopló a las superficies de CM5 activadas, usando *N*-etil-*N'*-(dimetilaminopropil)carbodiimida, *N*-hidroxisuccinimida, en las condiciones recomendadas por el fabricante. Los grupos sin reaccionar se inactivaron mediante 1 M de etanolamina, pH 8,5.

Las medidas cinéticas se llevaron a cabo a 25°C con un caudal de 10 ml/min. en amortiguador de HBS-EP (10 mM de HEPES, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005% de tensioactivo P20).

Para determinar las constantes de disociación (Kd) de la interacción con el péptido de PLXND1 se usaron seis concentraciones de sdabs purificados mediante afinidad con Ni (en el intervalo de 1 mM a 50 µM). Después de cada experimento, la regeneración de la superficie del sensor se llevó a cabo con 10 mM de NaOH. La unión específica, definida por la unión a una superficie de PLXND1 menos la unión a una superficie de BSA de control, se analizó usando el software BIAevaluation 4.1 y un modelo de unión de Langmuir 1:1.

Las afinidades de los anticuerpos de un solo dominio A12 y F8 fueron  $2,1 \times 10^{-8}$  M y  $3,5 \times 10^{-8}$  M, respectivamente (Figura 6).

#### EJEMPLO 4

Tinciones inmunohistoquímicas con anticuerpos de un solo dominio A12 y F8

Los anticuerpos de un solo dominio se etiquetaron en el extremo carboxiterminal con la etiqueta de VSV-His, permitiendo tinciones inmunohistoquímicas usando un anticuerpo anti-VSV. Se siguió el siguiente protocolo para las tinciones inmunohistoquímicas con anticuerpos de un solo dominio A12 y F8. Tras la desparafinización, la actividad de peroxidasa endógena se bloqueó mediante incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,03%. La recuperación del antígeno se llevó a cabo mediante tratamiento con pronasa según protocolos estándar. Subsiguientemente, los portaobjetos se preincubaron con suero normal de caballo o de cabra (para bloquear los sitios de unión no específica en las secciones de tejidos humanos y de ratón, respectivamente), seguido de la incubación con sdabs durante 1 h. Los sdabs se detectaron mediante incubaciones secuenciales durante 1 h con un antisuero de ratón o de conejo anti-VSV-G (Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, Países Bajos), anticuerpo biotinilado anti-ratón o anti-conejo según sea apropiado (Vector, Burlingame, CA), y complejo de avidina-biotina peroxidasa (Vector, Burlingame, CA). Finalmente, la peroxidasa se visualizó mediante reacción de peroxidasa con 3-amino-9-etilcarbazol (ScyTek, Utah, USA), con hematoxilina como contratinción. Todas las etapas se llevaron a cabo a RT.

La especificidad del anticuerpo A12 y F8 por plexina D1 en las tinciones inmunohistoquímicas se examinó en primer lugar tiñendo embriones de ratón en los que los patrones de expresión de plexina D1 a nivel del ARN estaban bien caracterizados (Van der Zwaag et al. (2002), más arriba), y comparando los perfiles con inmunotinciones con el anticuerpo anti-endotelial anti-CD31 (DAKO, Glostrup, Dinamarca). En la placa de crecimiento de hueso trabecular de embriones de ratón en E16.5, se observó inmunotinción en vasos sanguíneos positivos para CD31. El perfil de tinción se correlacionó bien con la hibridación *in situ* para el transcrito de plexina D1 (figura 7A). El origen de la expresión de PLXND1 en los vasos sanguíneos se confirmó adicionalmente llevando a cabo tinciones en secciones en serie con sdabs y anticuerpo anti-CD31 anti-humano (anti-CD31 humano).

#### EJEMPLO 5

Tinción de células tumorales con F8

Secciones de cuatro µm de xenoinjertos de ratón cerebrales de la estirpe celular de melanoma humano Mel57-VEGF-A (Kusters et al. (2003), más arriba) se tiñeron con el anticuerpo de un solo dominio F8, según el protocolo ejemplificado en el Ejemplo 4. El anticuerpo reconoció claramente plexina D1 en los vasos sanguíneos tumorales (Figura 7B). Para investigar adicionalmente la expresión de la proteína plexina D1 en tumores, tejido embebido en parafina de archivo o tumoral de diferente origen (glioblastoma multiforme (Figura 8A), metástasis cerebrales de melanoma (Figura 8B), carcinoma de colon (Figura 8C) y carcinoma de células renales (Figura 8D) se inmunotifieron con sdabs anti-PLXND1. La inmunohistoquímica usando el anticuerpo A12 y la comparación con tinciones anti-CD31 humano en secciones en serie mostraron expresión en todos los tumores examinados, y confirmaron la expresión de plexina D1 a nivel proteico en células tumorales y en vasos sanguíneos tumorales.

#### EJEMPLO 6

Ritmo de expresión de plexina en células malignas

para investigar si la expresión de plexina D1 se produce en células premalignas, teñimos una serie de progresión de

melanoma que consiste en nevos benignos, nevos displásicos, melanoma en fase de crecimiento radial, melanoma invasivo y melanoma diseminado. Los melanocitos en nevos benignos y nevos displásicos no expresan la proteína, mientras que las células transformadas malignamente, tanto en tumores en fase de crecimiento radial como en fase de crecimiento vertical, son positivas para la proteína (Figura 9 y Tabla II).

5 **EJEMPLO 7**

Estado de activación de células que expresan plexina D1

La expresión de plexina D1 está relacionada con el estado de activación de las células endoteliales en vasos sanguíneos tumorales. Se mostró previamente que el tratamiento con ZD6474, un inhibidor de VEGFR2 y de EGFR, bloquea la angiogénesis en un modelo de tumor cerebral de ratón, dando como resultado un desplazamiento fenotípico desde un fenotipo cooptante de vaso angiogénico a no angiogénico (43). El tratamiento con ZD6474 dio como resultado una disminución de la expresión de plexina D1 en vasos sanguíneos asociados a tumor, de una manera dependiente de la dosis (Figura 10). De este modo, la expresión de plexina D1 es una característica de las células endoteliales activadas.

**EJEMPLO 8**

15 Inmunohistoquímica con A12 en tejidos normales

La expresión de plexina D1 en cerebro normal, corazón, piel, riñón, bazo, intestino, endometrio, se examinó mediante inmunohistoquímica usando el anticuerpo A12. Los vasos en miometrio proliferativo expresaron plexina D1, mostrando que la plexina D1 está asociada no solo con angiogénesis patológica, sino también con angiogénesis fisiológica (no mostrado).

20 En algunos casos, se llevaron a cabo coinmunotinciones con el marcador de macrófagos CD68. Estas tinciones revelaron que una subpoblación de macrófagos expresa la proteína (figura 11). También se encontró que algunos fibroblastos en la piel y algunas células epiteliales intestinales proliferantes expresan plexina D1 (no mostrado).

**EJEMPLO 9**

Tinción de macrófagos en enfermedades inflamatorias

25 Para examinar adicionalmente la implicación de plexina D1 en enfermedades con implicación prominente de macrófagos, se llevaron a cabo tinciones inmunohistoquímicas sobre placas ateroscleróticas, esclerosis múltiple y artritis reumatoide. Los macrófagos expresaron plexina D1.

**EJEMPLO 10**

Acceso a plexina D1 en vasos tumorales vía inyección intravenosa

30 La expresión de la proteína plexina D1 en vasos sanguíneos tumorales sugiere que la plexina D1 es accesible vía inyección intravenosa. Para evaluar esto, se inyectaron microquirúrgicamente  $2 \times 10^5$  células Mel57 transfectadas de forma estable, que expresan la isoforma VEGF-A<sub>165</sub>, en la arteria carótida interna derecha de ratones atímicos BALB/C. Después de 18 días, cuando los animales mostraron síntomas neurológicos (Kusters et al., (2003), más arriba), se inyectaron  $10^{12}$  fagos que se unen a *PLXND1* de los clones A12, F8 o fagos no relevantes en la vena de la cola de ratones atímicos, que portan las metástasis cerebrales Mel57-VEGF-A<sub>165</sub> establecidas (n = 2 para A12, n = 4 para F8, n = 3 para fago de control).

35 En otros dos grupos de ratones, se inyectaron intravenosamente 30 µg de sdab F8 o un sdab de control (n = 2 para cada grupo). Después de 5 minutos, los ratones se anestesiaron usando isoflurano, se abrieron los pechos, y los fagos no unidos se lavaron del sistema mediante perfusión cardíaca con 15 ml de disolución salina amortiguada con fosfato (PBS). Después, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical, y partes de los cerebros, corazones, pulmones, hígados, bazos y riñones se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido.

40 Otras partes se fijaron en formalina para ser embebidas en parafina. Después de una tinción corta con hematoxilina, los tumores se disecaron a partir de secciones cerebrales de 10 µm usando microscopía de disección por captura láser (microscopio de disección por láser Leica). Se disecaron áreas equivalentes de cerebro no afectado, contralaterales al tumor.

45 Subsiguientemente, los fagos se eluyeron de las muestras tisulares disecadas usando tratamiento con tripsina, y se usaron para infectar células TG1. Se contaron los números de fagos formadores de colonias, y se usaron como una medida de la migración tumoral. Para evaluar cuantitativamente la migración tumoral por fagos o sdabs, se tiñeron secciones de 4 µm, en serie con las secciones usadas para la disección por láser, con anticuerpo anti-p8 de M13 (Abcam Limited, Cambridge, UK) para detectar los fagos unidos, o anticuerpos anti-VSV-G (Sigma-Aldrich) para detectar anticuerpos de un solo dominio.

50 La inyección intravenosa de fagos M13 que presentan el anticuerpo de un solo dominio F8 anti-*PLXND1*, pero no los

fagos que portan anticuerpos de un solo dominio irrelevantes, en ratones que portan lesiones melanómicas angiogénicas dio como resultado la acumulación de fagos en vasos tumorales pero no la presencia específica detectable de fagos en vasos cerebrales normales, ni vasos sanguíneos en el hígado, bazo, riñón (Figura 12A, D y no mostrado). Esto indica que plexina D1 se expresa en el lado luminal de la célula endotelial específicamente en vasos sanguíneos tumorales, y de este modo se puede usar como un marcador seleccionable como diana.

La inyección del anticuerpo de un solo dominio parcialmente purificado condujo en consecuencia a la localización preferente del tumor (Figura 12C). En esta última situación, se debe considerar que el pequeño peso molecular de 20 kDa de los anticuerpos de un solo dominio permite la extravasación desde los vasos tumorales muy permeables y la acumulación en el intersticio tumoral. Este último efecto es no específico, y también se observa con anticuerpos de un solo dominio no relevantes. Se concibe que los anticuerpos de peso molecular pequeño y afinidades relativamente bajas tienen una mayor penetrabilidad a través de los tumores y son más adecuados para seleccionar como diana el compartimiento de células tumorales.

#### EJEMPLO 11

Acumulación de F8 en vasos sanguíneos tumorales

Se inyectaron transcranealmente ratones con E98, una estirpe de xenoinjerto de glioma. Los tumores E98 se mantienen como tumores subcutáneos. Se eutanasió un ratón atímico Balbc/c nu/nu que porta un tumor E98 subcutáneo, y se retiró el tumor. El tumor se trocó con un escalpelo estéril, y el homogenado se hizo pasar a través de un filtro de nailon estéril de malla de 70  $\mu\text{m}$ . Se inyectaron transcranealmente en el cerebro de ratones atímicos veinte  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular resultante, que contiene 150.000 células. Después de 3 semanas, se inyectaron intravenosamente fagos M13 que presentan el anticuerpo de un solo dominio F8, y después de cinco minutos el ratón se sometió a perfusión cardíaca con 15 ml de disolución salina amortiguada con fosfato.

Los ratones se eutanasiaron, se retiraron los cerebros y se fijaron en formalina. Secciones de cuatro  $\mu\text{m}$  se sometieron a inmunohistoquímica con anticuerpo anti-M13, y secciones en serie se tiñeron inmunohistoquímicamente con anticuerpos frente a CD34 (marcador endotelial) y glut-1 (un marcador para células endoteliales cerebrales preexistentes (Kusters, B et al., Cancer Res 62:341-345 (2002)).

Los fagos que portan anticuerpos de un solo dominio anti-plexina D1 se acumularon específicamente en vasos sanguíneos asociados con el tumor, pero no en vasos normales (Figura 13). De forma importante, los fagos también se acumularon en vasos sanguíneos tumorales que fueron positivos para glut-1, y que por lo tanto se pueden considerar como vasos sanguíneos preexistentes, en lugar de vasos sanguíneos recientemente formados. Esto indica que no solamente los vasos sanguíneos angiogénicos se someten a una selección como dianas con anticuerpos anti-plexina D1, sino también los vasos sanguíneos no angiogénicos aunque activados en tumores.

#### EJEMPLO 12

Ectodominios de plexina D1 recombinantes inhiben la angiogénesis

Células Mel57 de melanoma humano se transfectaron con la secuencia codificante de VEGF-A<sub>165</sub> en el vector pIREShyg. Células transfectadas de forma estable se seleccionaron cultivándolas en 200  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina en medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (FCS) y penicilina/estreptomina. Debido a que la expresión del gen de resistencia a higromicina está enlazada a la del ADNc de VEGF-A vía el sitio de entrada ribosómico interno (IRES), todas las células resistentes a higromicina producirán también la proteína VEGF-A. Células Mel57-VEGF transfectadas de forma estable se transfectaron subsiguientemente con pIRESneo-PlexinD1 ED. El vector contiene el ADNc que codifica el dominio extracelular de nucleótidos 1-2745, enlazado vía el IRES a la expresión del gen de resistencia a neomicina.

Se inyectaron transfectantes dobles en la arteria carótida derecha de ratones atímicos, y se dejaron desarrollar los tumores. Al comienzo de los síntomas neurológicos (aproximadamente 18 días) los ratones se sometieron a formación de imágenes mediante resonancia magnética potenciada por gadolinio-DTPA. Subsiguientemente, los ratones se sacrificaron, los cerebros se fijaron en formalina y se sometieron a tinciones inmunohistoquímicas para examinar la vasculatura tumoral.

Cuando se compara con los controles, que consisten en tumores que expresan solamente VEGF-A, la potenciación por Gd-DTPA en la formación de imágenes mediante resonancia magnética (MRI) potenciada en T1 fue menor (compárese la Figura 14A, que representa dos ejemplos de tumores Mel57-VEGF-A<sub>165</sub>, con 14B, que representa dos ejemplos de tumores Mel57-VEGF-A<sub>165</sub>/PLEXIND1-ED. En los tumores que expresan VEGF-A<sub>165</sub> y el ectodominio de plexina D1, la vasculatura muestra aumento del marcador endotelial CD34 (una marca distintiva de la activación endotelial por VEGF-A<sub>165</sub>). La vasculatura en tumores que expresan solamente VEGF-A<sub>165</sub> es negativa para el marcador de células endoteliales cerebrales glut-1, lo que es consistente con el hecho de que estos vasos están recientemente formados y por lo tanto carecen de marcadores específicos para células endoteliales cerebrales. Como se puede observar en la figura 12B, los vasos que están asociados con tumores que expresan el ectodominio de plexina D1 también, sí expresan glut-1. Esto es una fuerte indicación de que estos vasos están actualmente preexistentes. De este modo, el ectodominio de plexina D1 no previene la activación de células endoteliales por

VEGF-A<sub>165</sub>, pero sí previene la formación de neovasculatura.

### EJEMPLO 13

Anticuerpos de alta afinidad frente a plexina D1

5 Una secuencia proteica, que corresponde a los aminoácidos 47-506 (los 459 aminoácidos más aminotermiales de la proteína madura), se expresó en células de *E. coli* M15 pREP4, usando el vector de expresión pQE16 (Qiagen). La proteína recombinante, que se produjo en las células bacterianas como cuerpos de inclusión, se disolvió en amortiguador desnaturizante, que contiene 4M de urea y 1 mM de ditioneitol (DTT), y posteriormente se dializó gradualmente frente a PBS. La proteína se usó para inmunizar el ratón BALB c/c 25 según procedimientos estándar.

10 La Figura 15 muestra las características del suero de ratón. Como se muestra en la Figura 15B, el suero inmune de ratón reconoció específicamente la proteína recombinante 47-506 de *E. coli* (52 kDa, línea 1), y una segunda secuencia de plexina D1 recombinante de 18 kDa, que comprende los aminoácidos 225-388 (estando así completamente dentro de la secuencia que se usó para la inmunización, línea 2). El suero preinmune no mostró tal reactividad (panel A).

15 Cuando se evaluó en tinciones inmunohistoquímicas en una metástasis cerebral de un sarcoma alveolar de tejidos blandos, el suero inmune de ratón (panel D), pero no el suero preinmune (panel C), mostró positividad para vasos sanguíneos y células tumorales, un patrón de tinción que fue similar al del anticuerpo de un solo dominio A12. De este modo, los linfocitos B de este ratón fueron considerados adecuados para generar hibridomas de linfocitos B de bazo con la estirpe celular de mieloma SP2/0.

20 A partir de estos hibridomas, se seleccionó un número de estirpes celulares productoras de anticuerpos basado en la reactividad frente a la proteína 47-506 en ELISA, y se analizaron en busca de su potencial para detectar plexina D1 en secciones congeladas de tumores humanos. De éstos, 11F5H6 y 17E9C12, ambos anticuerpos del subtipo IgM, mostraron fuerte positividad en metástasis cerebrales de sarcoma y melanoma, como se ilustra en la Figura 16. Los recuadros en los paneles C-F representan tinciones de control en las que se omitió el anticuerpo primario. Los paneles A y B muestran que estos anticuerpos no reconocieron especialmente estructuras de vasos en tejido cerebral normal.

### EJEMPLO 14

El anticuerpo monoclonal 11F5H6 es capaz de reconocer vasos sanguíneos tumorales

30 Para evaluar adicionalmente si el anticuerpo monoclonal 11F5H6 es capaz de reconocer vasos sanguíneos tumorales, se hicieron crecer tumores Mel57-VEGF-A angiogénicos en cerebros de ratones atímicos, esencialmente como se describe en el Ejemplo 10. El anticuerpo 11F5H6 (1 mg) se inyectó en la vena lateral de la cola y se dejó circular durante 15 minutos. Después de este período, los ratones se anestesiaron con isoflurano al 1,3% y se abrió el pecho, con lo que se llevó a cabo una perfusión cardíaca con 20 ml de disolución salina amortiguada con fosfato.

35 Después de este procedimiento, los ratones se decapitaron, y los cerebros se retiraron y se congelaron instantáneamente o se fijaron en formalina. Secciones congeladas de 4 µm se tiñeron con anticuerpo anti-IgM. En la Figura 17A se muestra que el anticuerpo 11F5H6 migra hacia y se acumula en vasos tumorales pero no en vasos normales (compárese la tinción anti-IgM en la Figura 17A con la tinción anti-CD31 endotelial en la Figura 17B). Tal tinción no se observa cuando se lleva a cabo la tinción anti-IgM en ratones no inyectados. De este modo, 11F5H6 es un anticuerpo prometedor que permite la selección de tumores como dianas.

### EJEMPLO 15

40 Expresión de plexina D1 en artritis reumatoide

La plexina D1 se expresa en macrófagos en modelos de ratón de artritis reumatoide (Figura 18). Un subconjunto de macrófagos en placas ateroscleróticas humanas también expresa plexina D1 (Figura 19). Se llevaron a cabo tinciones con el anticuerpo de un solo dominio A12. En la Figura 19, se llevó a cabo una tinción doble, que presenta a la plexina D1 en rojo y al marcador de macrófagos CD68 en azul. Un color púrpura indica coexpresión.

45 SECUENCIAS

A12 (SEC ID NO:1):

ES 2 632 360 T3

ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCCAGCCGGCC  
ATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCAGTATCAGTATCAATAACTGGGGCTGGTACCGC  
CAGGCTCCAGGAAAACAGCGCGAGCGGGTTCGACGTATATCTGGTGGTGGTAAAACAGTC  
TATGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTG  
TATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGATACGGCCGTCTATTACTGTAGAGCAGTC  
CGGAAAAGTACGGGTTGGCTTAGGGGGCTTGACGTCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACC  
GTCTCCGCAGAACCCAAGACACCAAAACCACAACCAGCGGCCGCACATCATCACCATCAT  
CACCATCATTATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGAAAAGGGGGCCGCATAG

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPA  
MAQVQLQESGGGLVQPGGSL  
RLSCAASGSSISINNWGWYR  
QAPGKQRERVAASGGGKTV  
YADSVKGRFTISRDNKNTV  
YMQMNSLKPEDTAVYYCRAV  
RKSTGWLRLDVGQGTQVT  
VSAEPKTPKPQAAAHHHHH  
HHHYTDIEMNRLGKGA@

F8 (SEC ID NO:2):

ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCCAGCCGGCC  
ATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGAGACTCTCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTACTTTGATTATGGCCTGGTTCCGC  
CAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAATTTGTAGCGGCATTAGCCGGGGTGGCGGTAGACA  
AGCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACGCG  
GTGTATCTACAAATGAACAGCCTGAAACCTGATGACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCC  
CGGTACGGTAGCCGAATTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGAACCC  
AAGACACCAAAACCACAACCAGCGGCCGCACATCATCACCATCATCACCATCATTATACA  
GACATAGAGATGAACCGACTTGAAAAGGGGGCCGCATAG

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPA  
MAQVQLQESGGGLVQAGDSL  
RLSCAASGRTFSTLIMAWFR  
QAPGKEREVVAASRGGGST  
SYADSVKGRFTISRDNKNA  
VYMQMNSLKPDDTAVYYCNA  
RYGSRIYWGQGTQVTVSSEP  
KTPKPQAAAHHHHHHHHHYT  
DIEMNRLGKGA@

5

Secuencia de anticuerpo monocatenario, derivado del anticuerpo 11F5H6  
(SEC ID NO:3)

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMADYKDIVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGN  
 TYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVFNRLSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGVYYCFQ  
 GSHVPLTFGAGTKLELKRGGGGSGGGGSRAPGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASKMI  
 SCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY  
 MELLSLTSEDSAVYYCARAITTDGWFAYWGQGLVTVSAAAAHHHHHHHHHYTDIEMNRLG  
 KGAA

Secuencia de anticuerpo monocatenario, derivado de anticuerpo 17E9C12 (SEC ID NO:4)

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMADYKDIQMTQTPSSLA VSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQ  
 KNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVVAEDLAVYYCH  
 QYLSWTFGGGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGAELVKPGASVKLSC  
 TASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQ GKATITADTSSNTAYLQ  
 LSSLTSEDTAVYYCAMDYWGQGTSVTVSAAAHHHHHHHHHYTDIEMNRLGKGAA

5

Tabla 1

Expresión de PLXND1 en tejidos humanos	
Tejido	Expresión de PLXND1
Maligno	
Adenocarcinoma de esófago (n = 1)	Vasos tumorales y células tumorales
Adenocarcinoma de recto (n = 5)	Vasos tumorales, células tumorales y macrófagos
Adenocarcinoma de próstata (n = 1)	Vasos tumorales y células tumorales
Sarcoma alveolar de partes blandas de fémur (n = 1)	Vasos tumorales y células tumorales
Astrocitoma (n = 1)	Vasos tumorales
Tumor carcinoide de pulmón (n = 1)	Vasos tumorales, células tumorales y macrófagos
Carcinoma ductal in situ de mama (n = 5)	Vasos tumorales, células tumorales, macrófagos, fibroblastos
Linfoma folicular (n = 8)	Vasos tumorales
Glioblastoma multiforme (n = 3)	Vasos tumorales y células tumorales
Metástasis cerebral de adenocarcinoma (n = 4) (mama, pulmón, recto)	Vasos tumorales y células tumorales
Metástasis cerebral de sarcoma alveolar de partes blandas (n = 1)	Vasos tumorales y células tumorales
Metástasis cerebral de carcinoma de células renales (n = 1)	Vasos tumorales y células tumorales
Metástasis hepática de adenocarcinoma de colon (n = 2)	Vasos tumorales, células tumorales y macrófagos
Carcinoma lobulillar in situ de mama (n = 3)	Vasos tumorales y células tumorales débilmente positivas, macrófagos y fibroblastos
Metástasis de ganglios linfáticos de carcinoma de mama ductal (n = 1)	Células tumorales y algunos vasos tumorales
Metástasis de ovario de adenocarcinoma de colon (n = 1)	Células tumorales y miofibroblastos
Carcinoma de células renales (n = 1)	Vasculatura tumoral y células tumorales

ES 2 632 360 T3

Carcinoma de células uroteliales de próstata (n = 2)	Vasos tumorales, células tumorales y macrófagos
No maligno	
Vejiga (n = 1)	Macrófagos
Vaso sanguíneo, aterosclerosis (n = 6)	Macrófagos
Médula ósea (n = 2)	
Corteza cerebral (n = 1)	Algunas neuronas perinucleares
Cerebro, Alzheimer + CAA (n = 1)	
Endometrio	
Fase de proliferación (n = 5)	Macrófagos
Fase de secreción (n = 4)	Macrófagos
Fase de secreción/menstruación (n = 1)	Macrófagos
Endometriosis interna (n = 1)	Macrófagos
Corazón (n = 1)	Algunas células musculares perinucleares
Intestino grueso (n = 1)	Cierta tinción luminal de epitelio, macrófagos, fibroblastos
Hígado (n = 1)	Células hepáticas perinucleares granulares, macrófagos
Pulmón (n = 2)	Macrófagos
Mama (n = 2)	Algunas células epiteliales perinucleares
Mama, hiperplasia ductal (n = 1)	Células epiteliales focales perinucleares, macrófagos
Esófago (n = 1)	Macrófagos
Intestino delgado (n = 1)	Cierta tinción luminal de epitelio, macrófagos, fibroblastos
Bazo (n = 1)	Macrófagos

Tabla 2

Expresión de PLXND1 en series de progresión de melanoma			
	Ausente	Moderada	Abundante
Nevos nevocelulares (n = 18)	18		
Nevos atípicos (n = 14)	14		
Melanomas in situ (n = 5)	5		
Melanomas primarios (n = 26)	4	2	20
Metástasis de melanomas			
Ganglios linfáticos (n = 9)	1	2	6
Piel (n = 5)	1	1	3
Cerebro (n = 5)			5
Pulmón (n = 1)			1

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra plexina D1 para uso en el tratamiento de un trastorno que implica la expresión de plexina D1 en células tumorales o en macrófagos activados, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en tumores cerebrales, astrocitomas, oligodendrogliomas, hemangioblastomas, carcinomas de colon, carcinomas ductales del colon, carcinomas de próstata, carcinomas de células renales, carcinomas de células renales claras, carcinomas de ovario, carcinomas de células escamosas, melanomas, carcinomas de pulmón, carcinomas de pulmón microcíticos, carcinomas de pulmón no microcíticos y sarcomas de tejidos blandos.
2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso según la reivindicación 1, acoplado a un compuesto efector.
- 10 3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso según la reivindicación 2, en el que el compuesto efector se selecciona del grupo que consiste en toxina, un compuesto inductor de trombosis, un agente quimioterapéutico, un resto radioactivo, un péptido inductor de apoptosis, un péptido que comprende el péptido KLAKLAKKLAKLAK, ricina, un liposoma, un polimerosoma, un polimerosoma compuesto de copolímeros de bloques, un factor tisular truncado, doxorubicina, cisplatino, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida hidroxurea, tecnecio 99m, yodo-123, yodo-131, renio-186 o -188, galio-67, itrio-90, y lutecio-177.
- 15 4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el trastorno es carcinoma ovárico.
5. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se dirige contra el ectodominio soluble de plexina D1.
- 20 6. Método in vitro para diagnosticar un trastorno en un sujeto, en el que el trastorno implica la expresión de plexina D1 en células tumorales o macrófagos activados, que comprende las etapas de:
  - a) proporcionar una muestra del sujeto que comprende células o macrófagos,
  - b) poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra plexina D1,
  - c) detectar la unión del anticuerpo con las células o macrófagos en la muestra,
- 25 en el que la unión del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo a las células o macrófagos indica la presencia de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en tumores cerebrales, astrocitomas, oligodendrogliomas, hemangioblastomas, carcinomas de colon, carcinomas ductales del colon, carcinomas de próstata, carcinomas de células renales, carcinomas de células renales claras, carcinomas de ovario, carcinomas de células escamosas, melanomas, carcinomas de pulmón, carcinomas de pulmón microcíticos, carcinomas de pulmón no microcíticos y
- 30 sarcomas de tejidos blandos.
7. Método in vitro según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está marcado con un marcador detectable.
8. Método in vitro según la reivindicación 7, en el que el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un marcador radioactivo, un marcador paramagnético, un marcador fluorescente y un marcador quimioluminiscente.
- 35 9. Método in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que la muestra procede de tejido o fluido corporal.
10. Método in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que el trastorno es carcinoma ovárico.

Figura 1

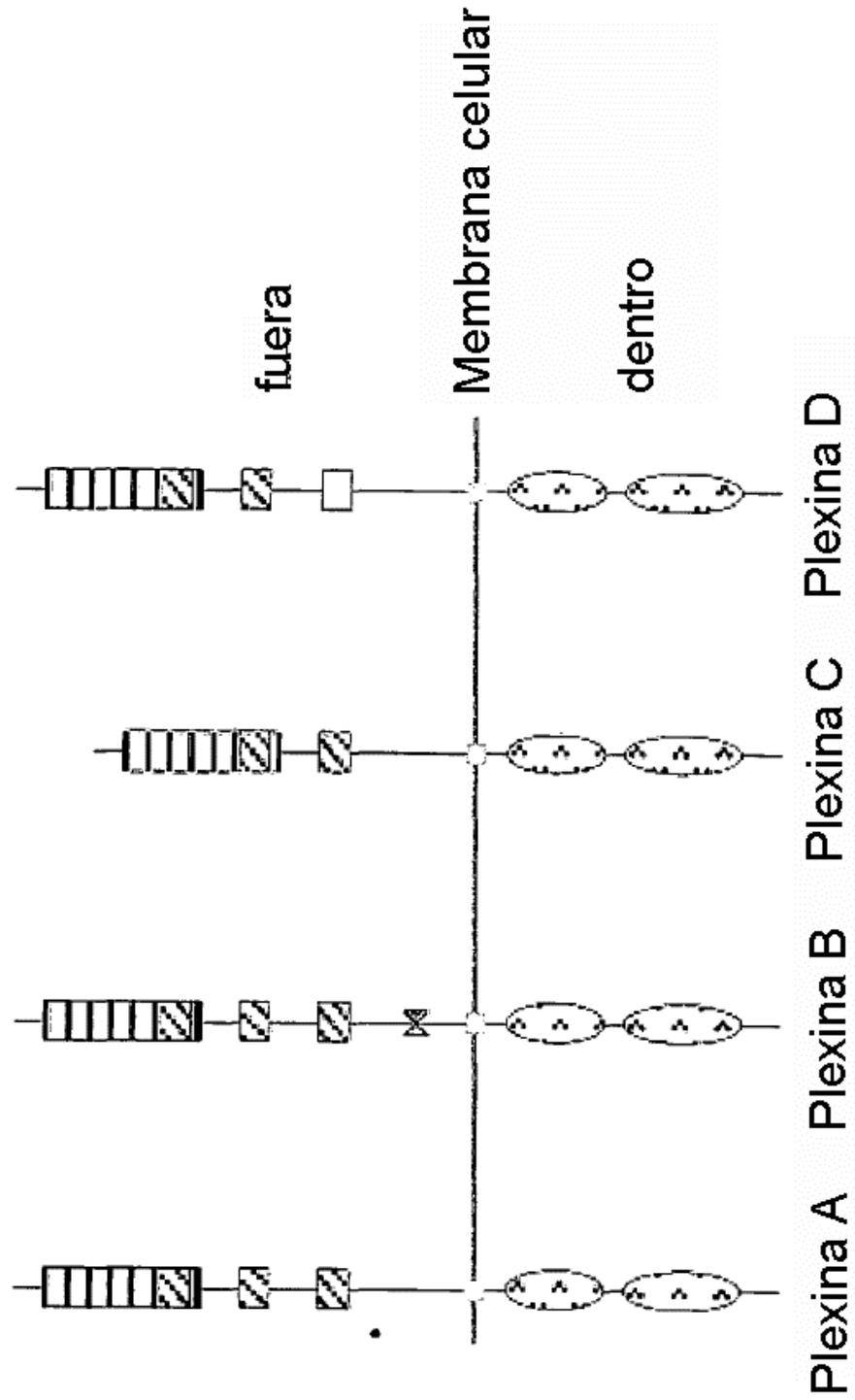


Figura 2

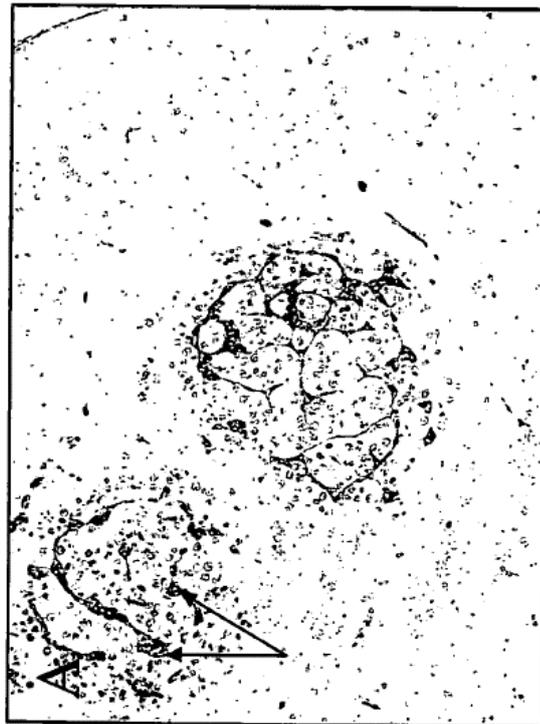


Figura 3

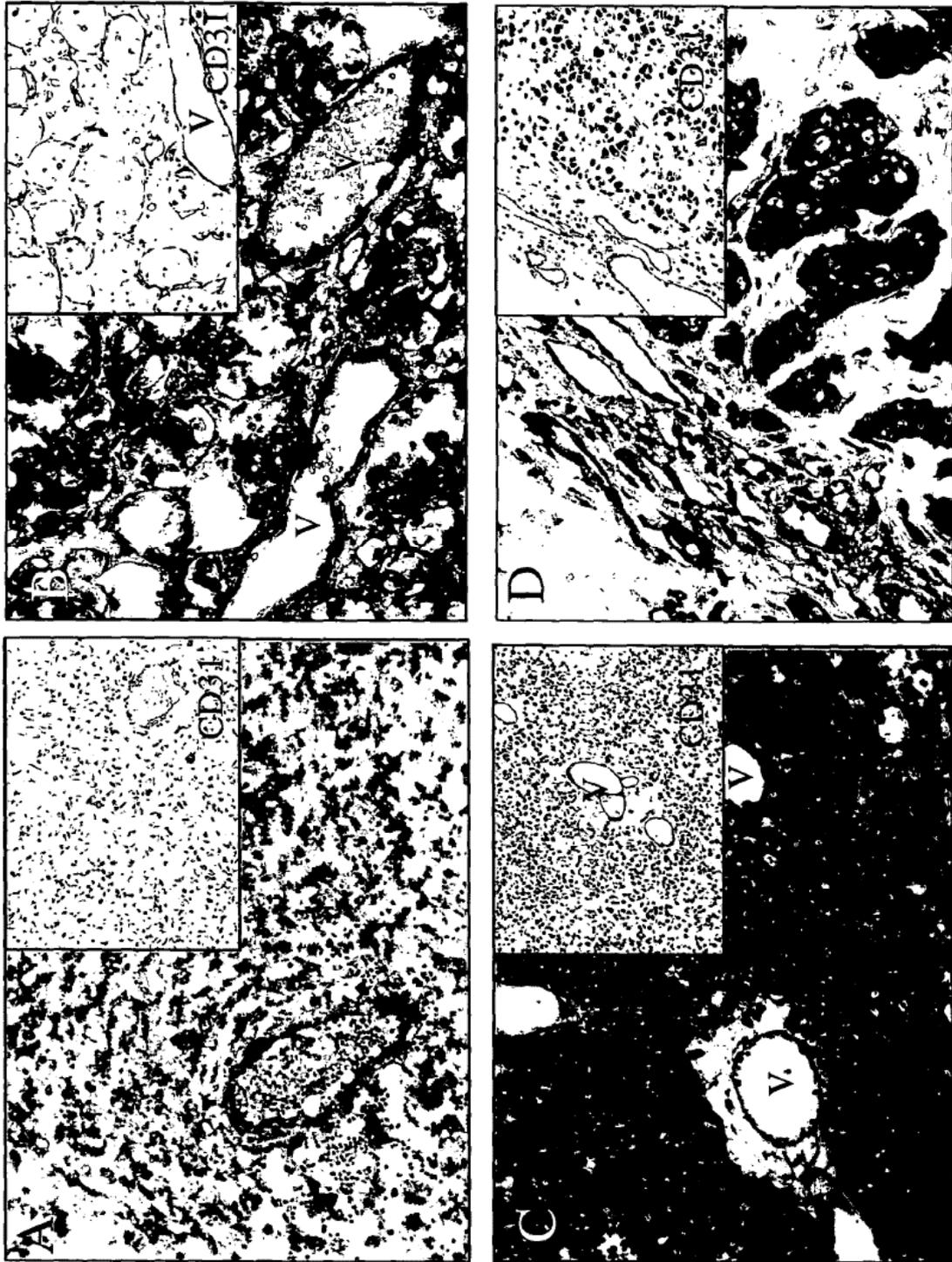


Figura 4

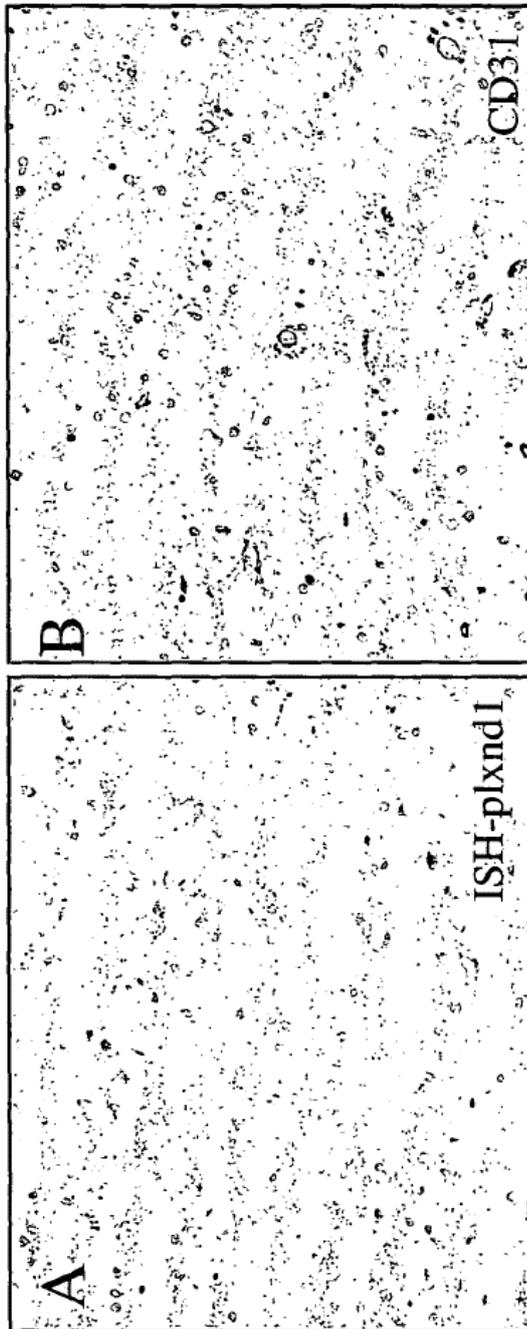


Figura 5

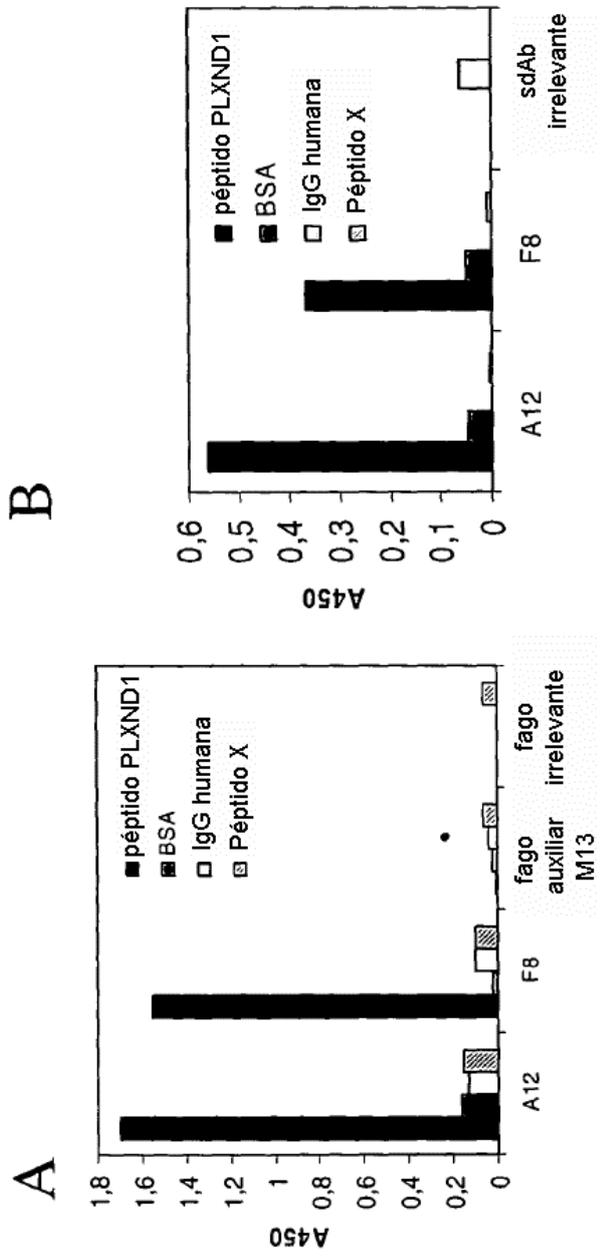


Figura 6

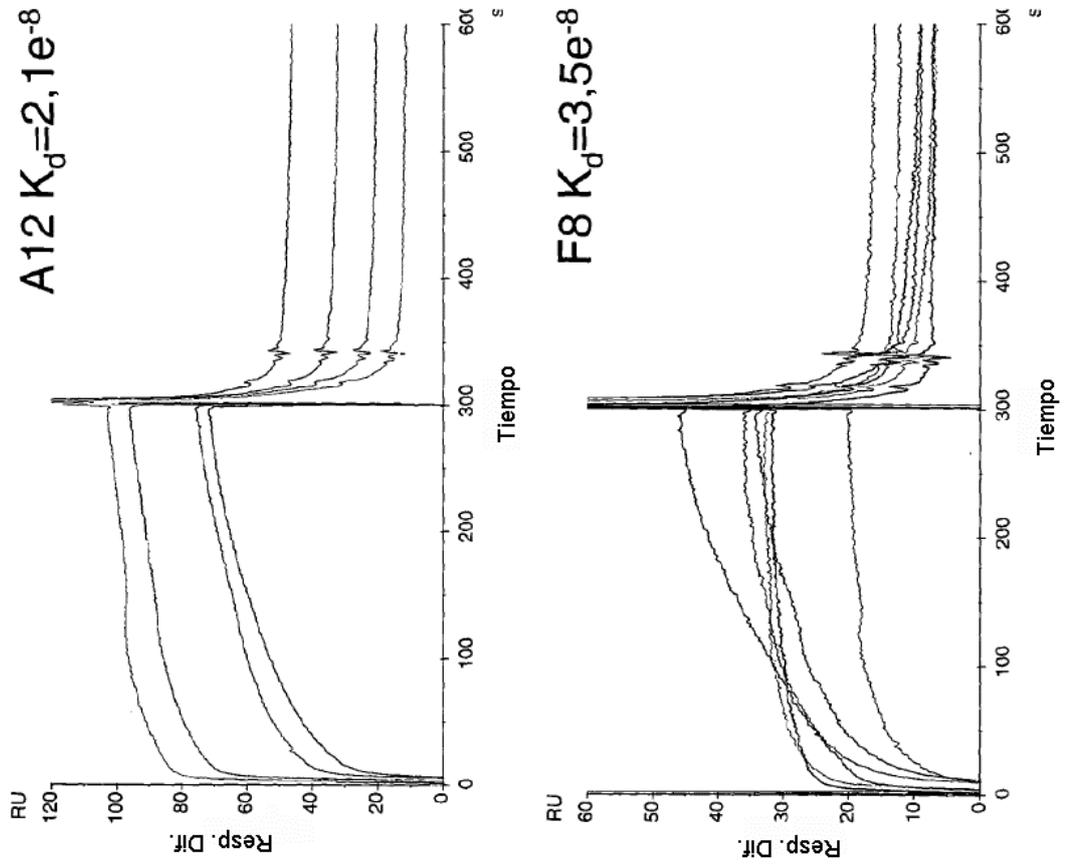


Figura 7

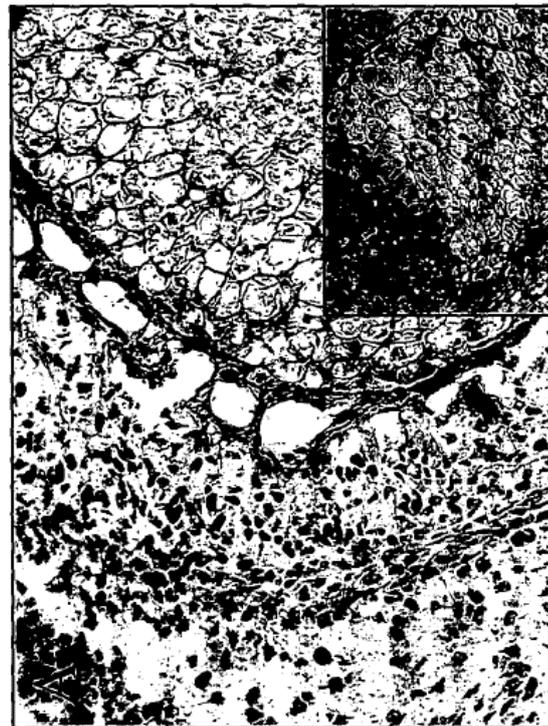
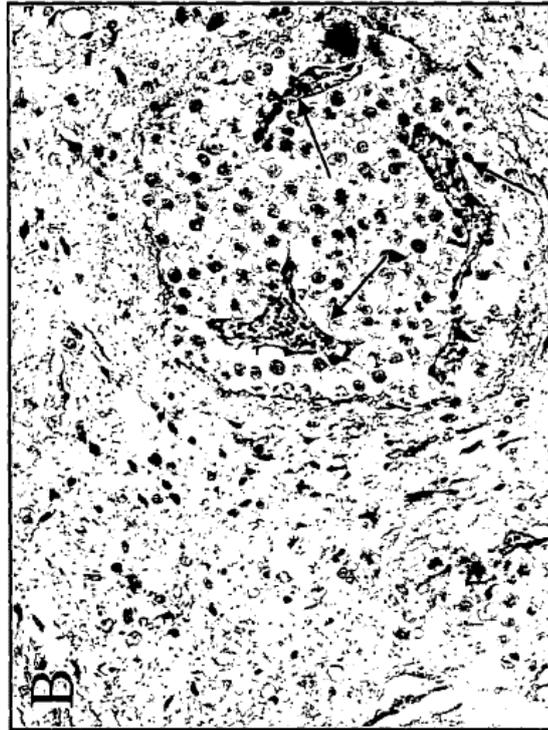


Figura 8

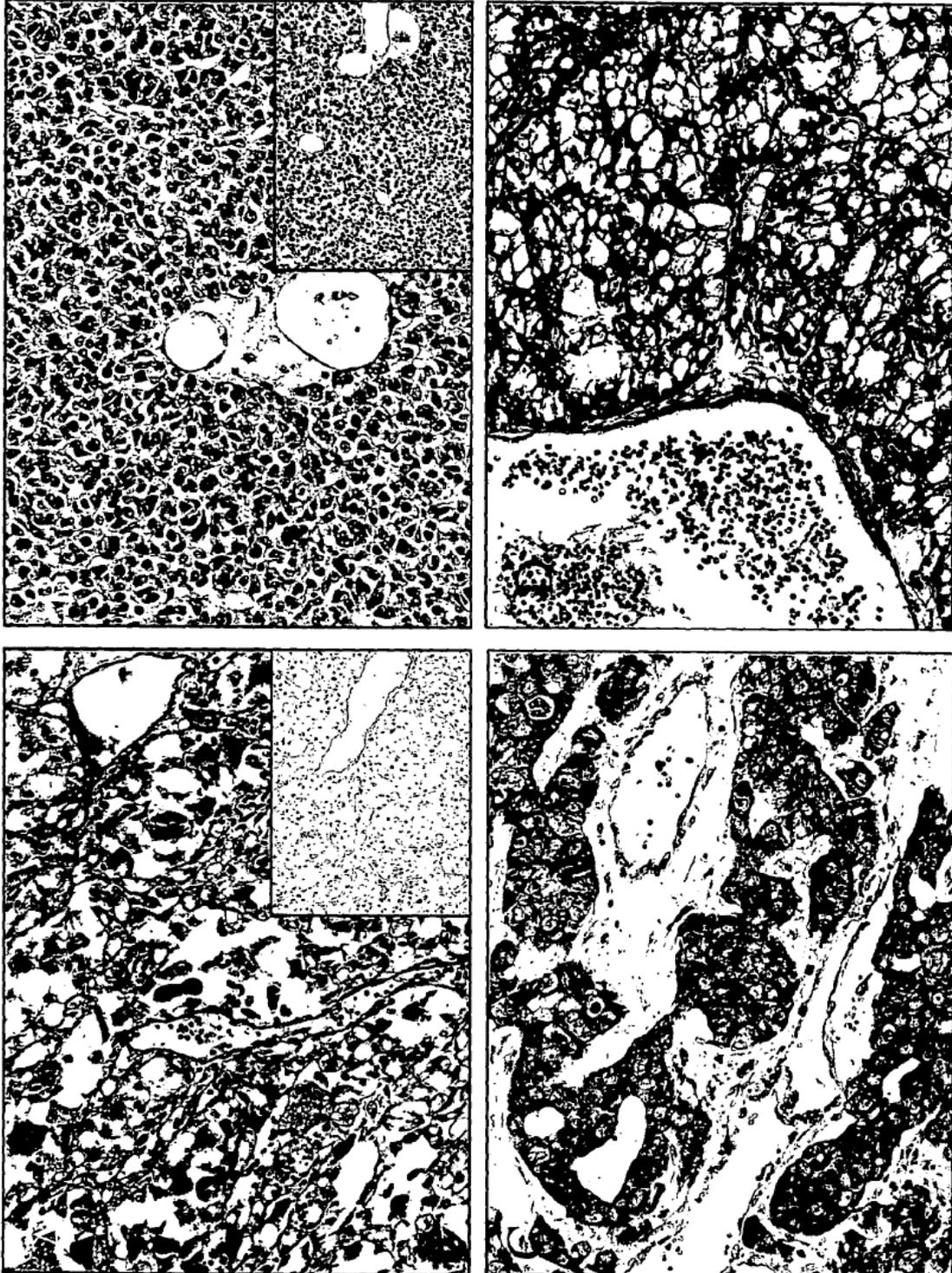


Figura 9

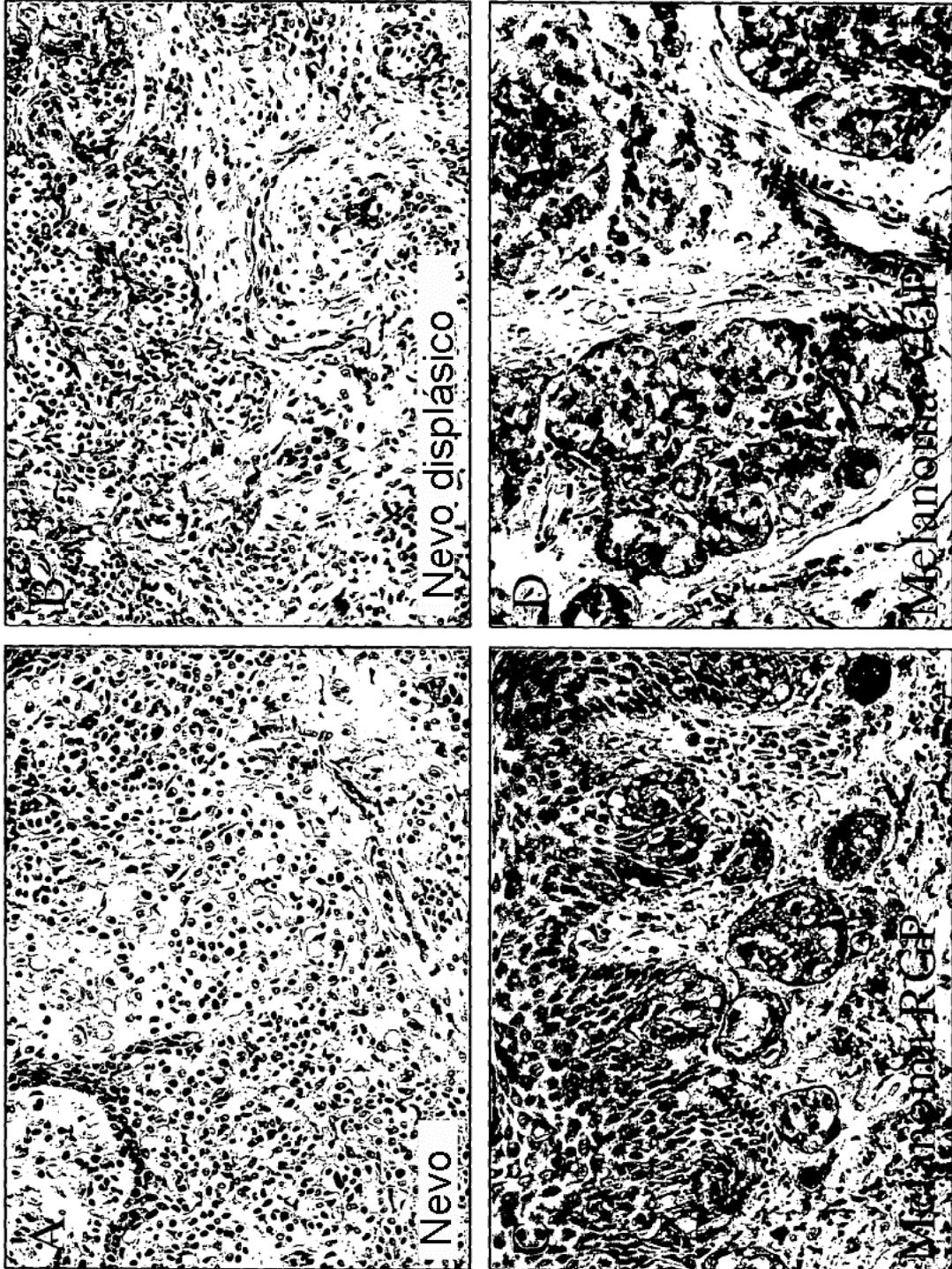


Figura 10

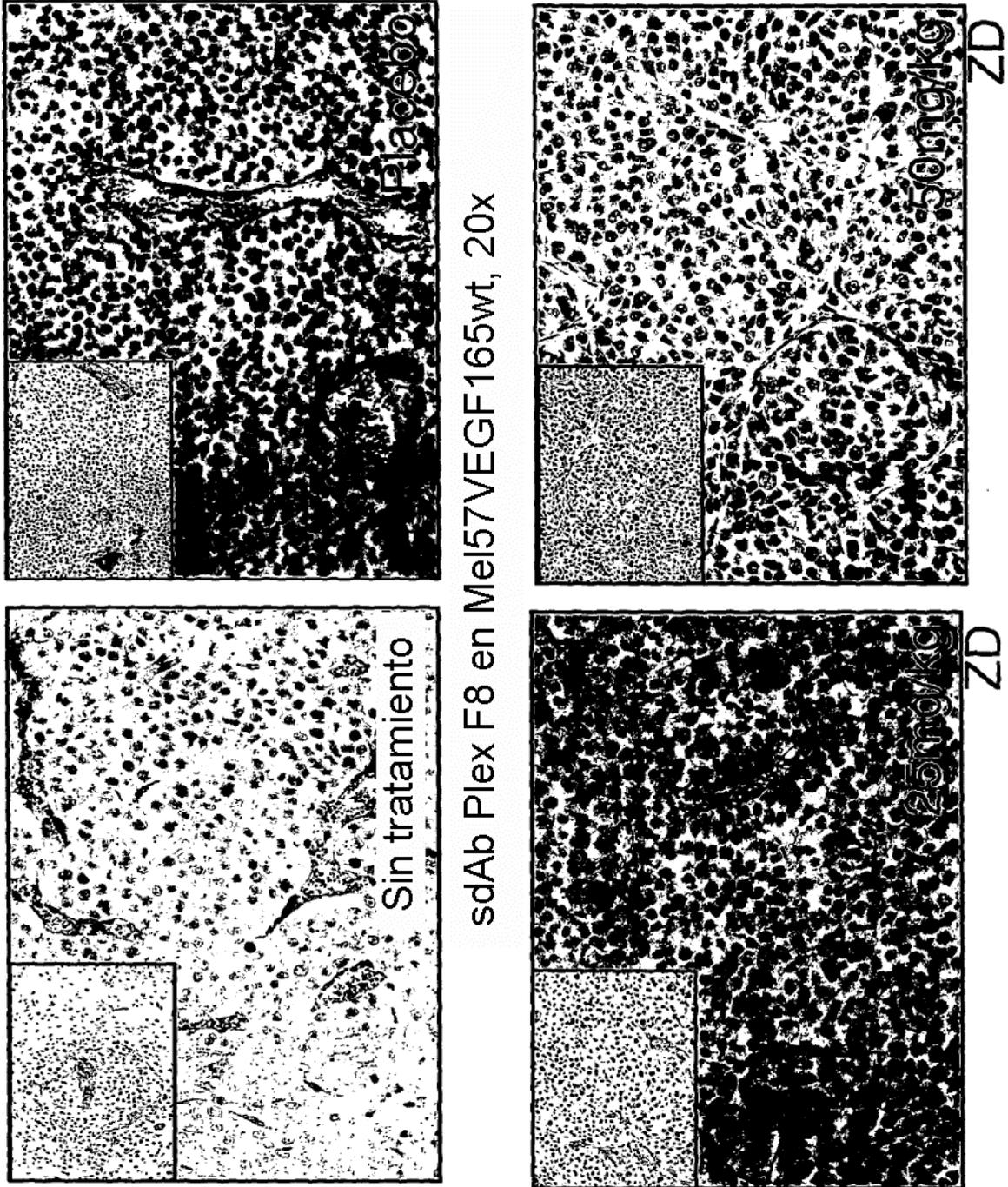


Figura 11

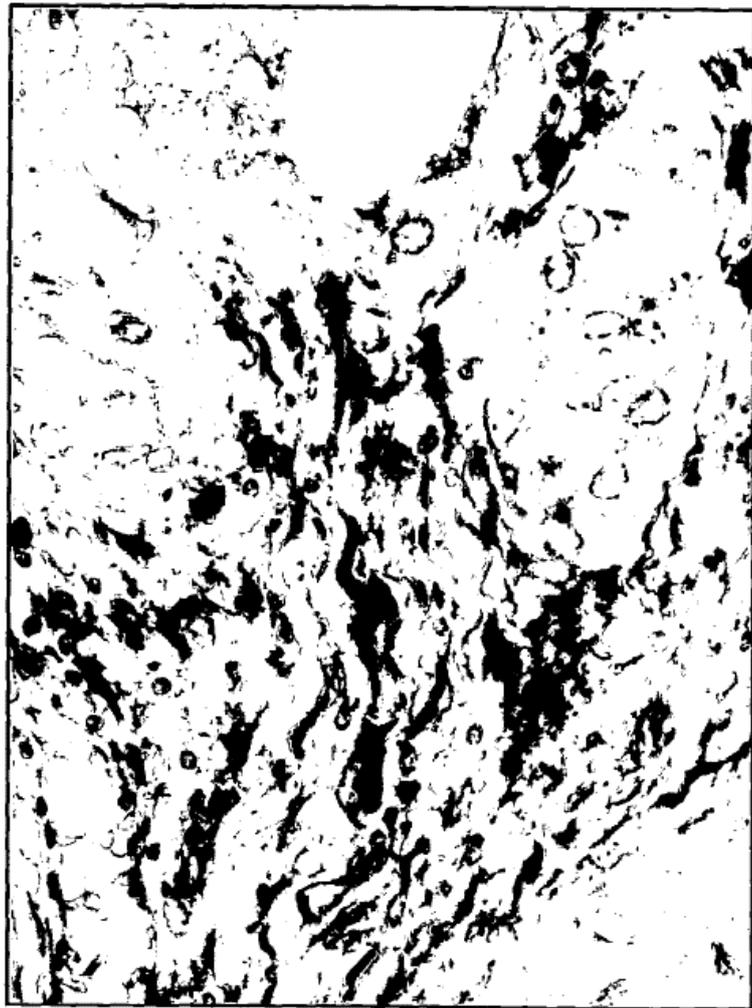


Figura 12

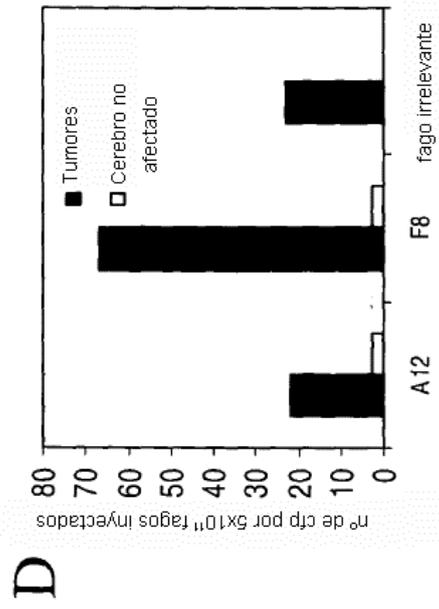
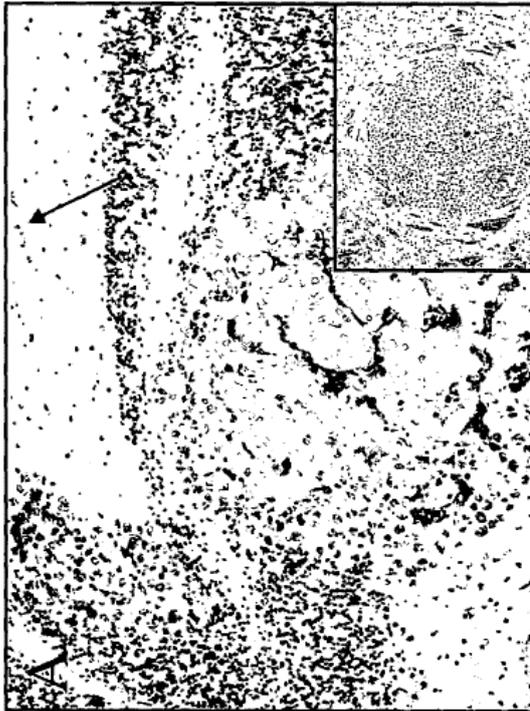


Figura 13

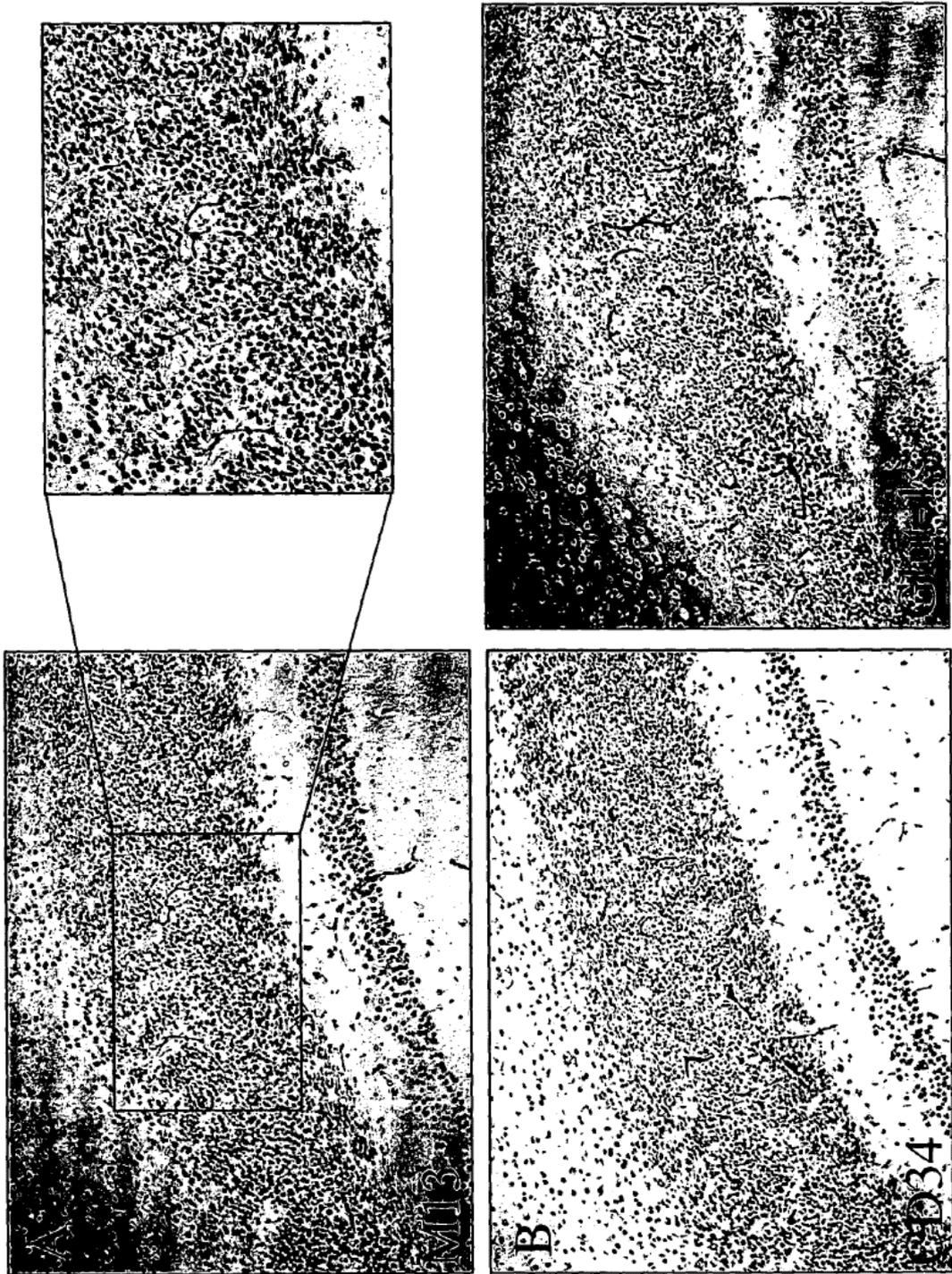


Figura 14

Me157-VEGF-A165      Me157-VEGF-A165/PLEXIN D1-ED

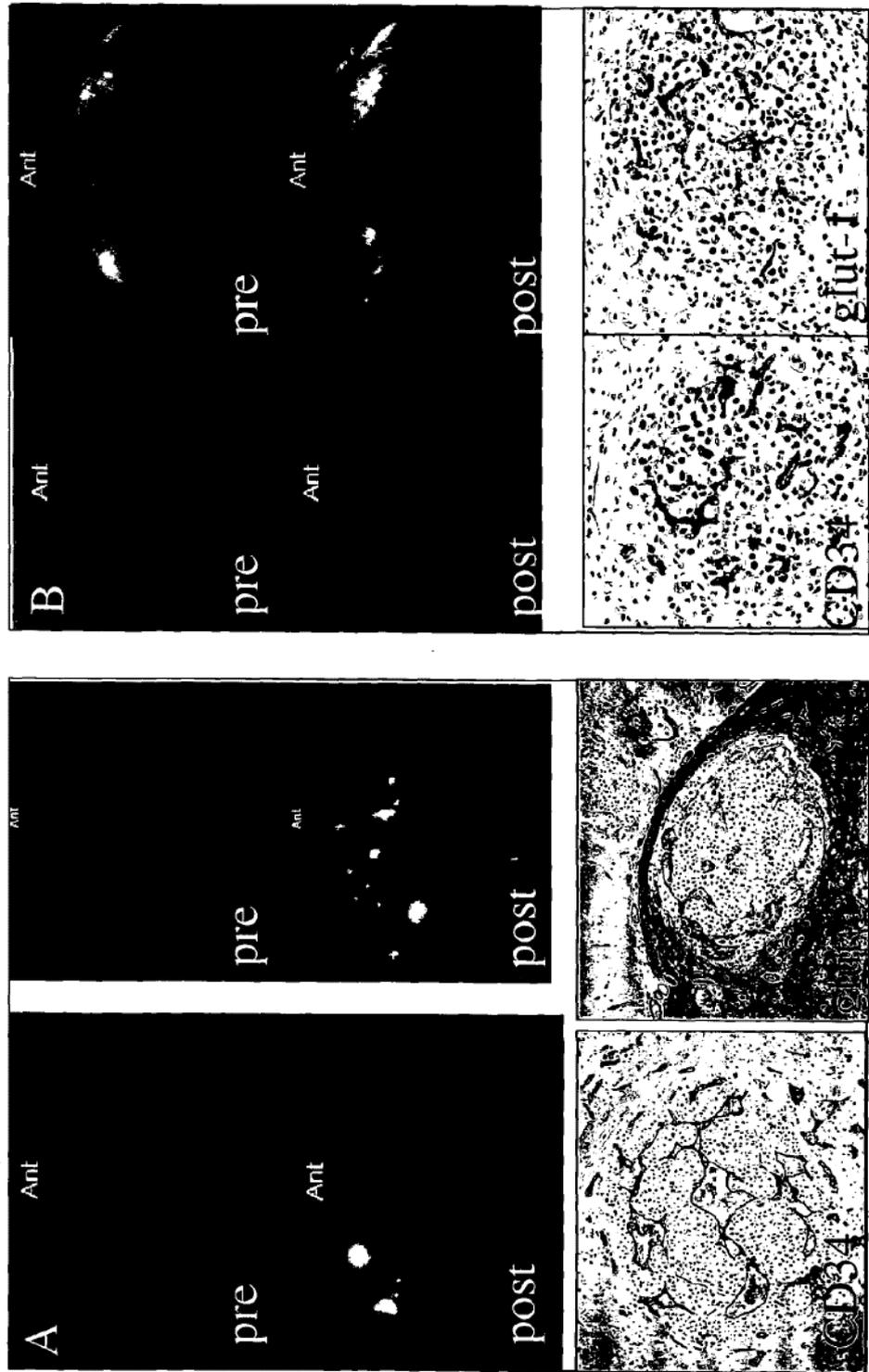


Figura 15

Suero de ratón 25:  
inmunizado con PLXND1  
recombinante (aa 47-506)  
de 50 kD

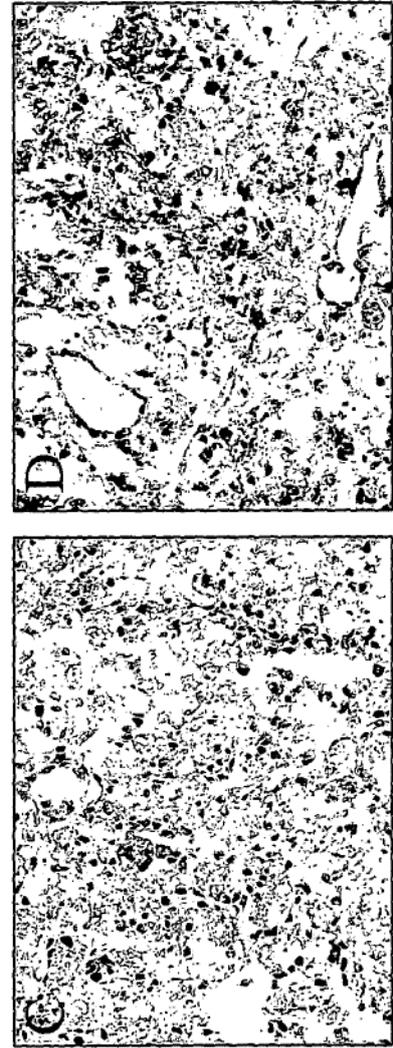
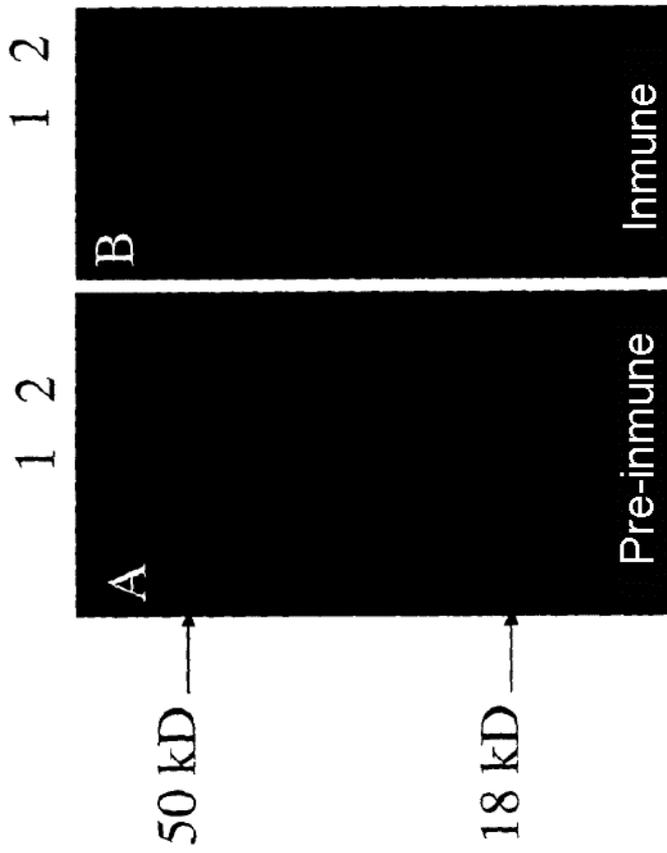


Figura 16

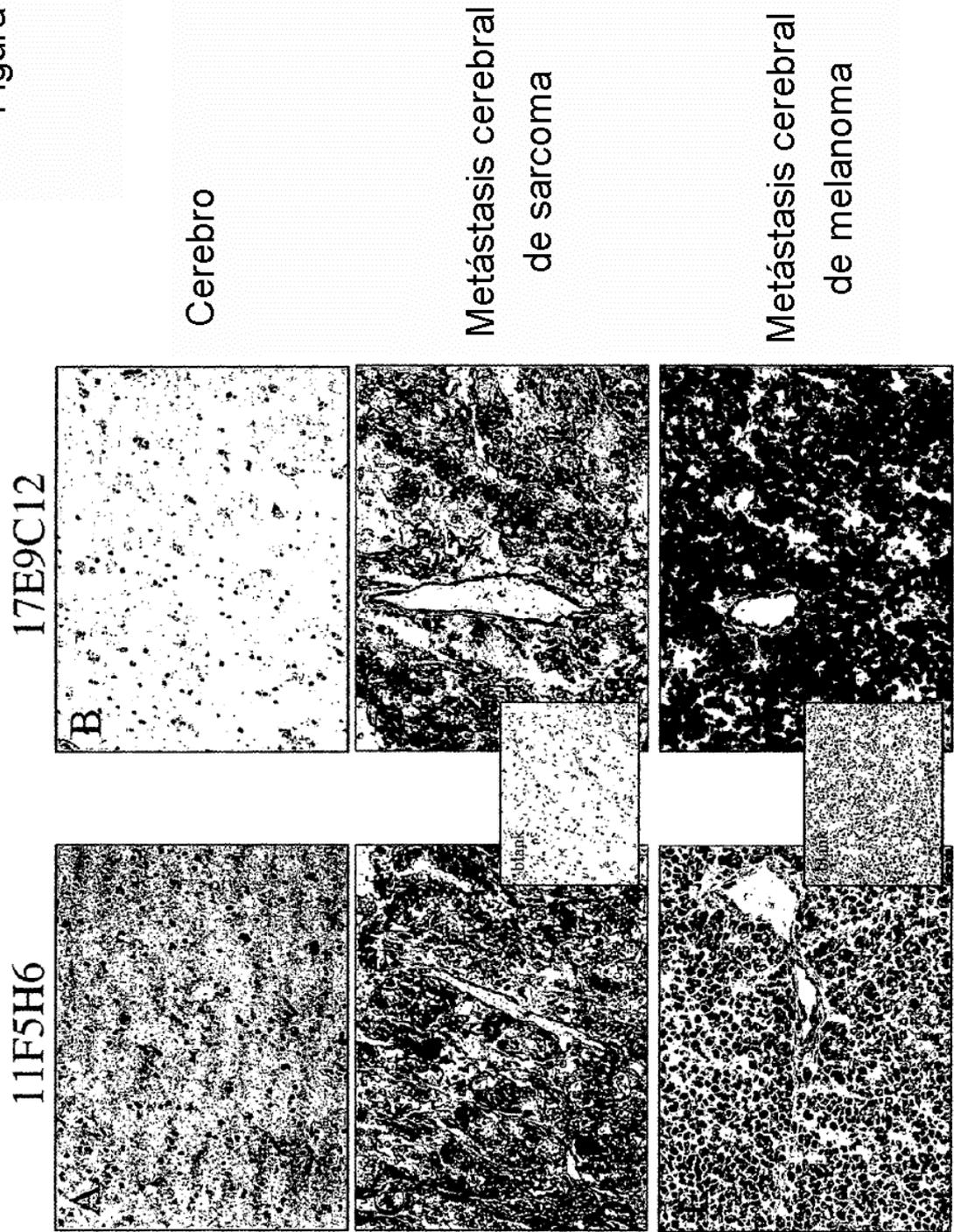


Figura 17

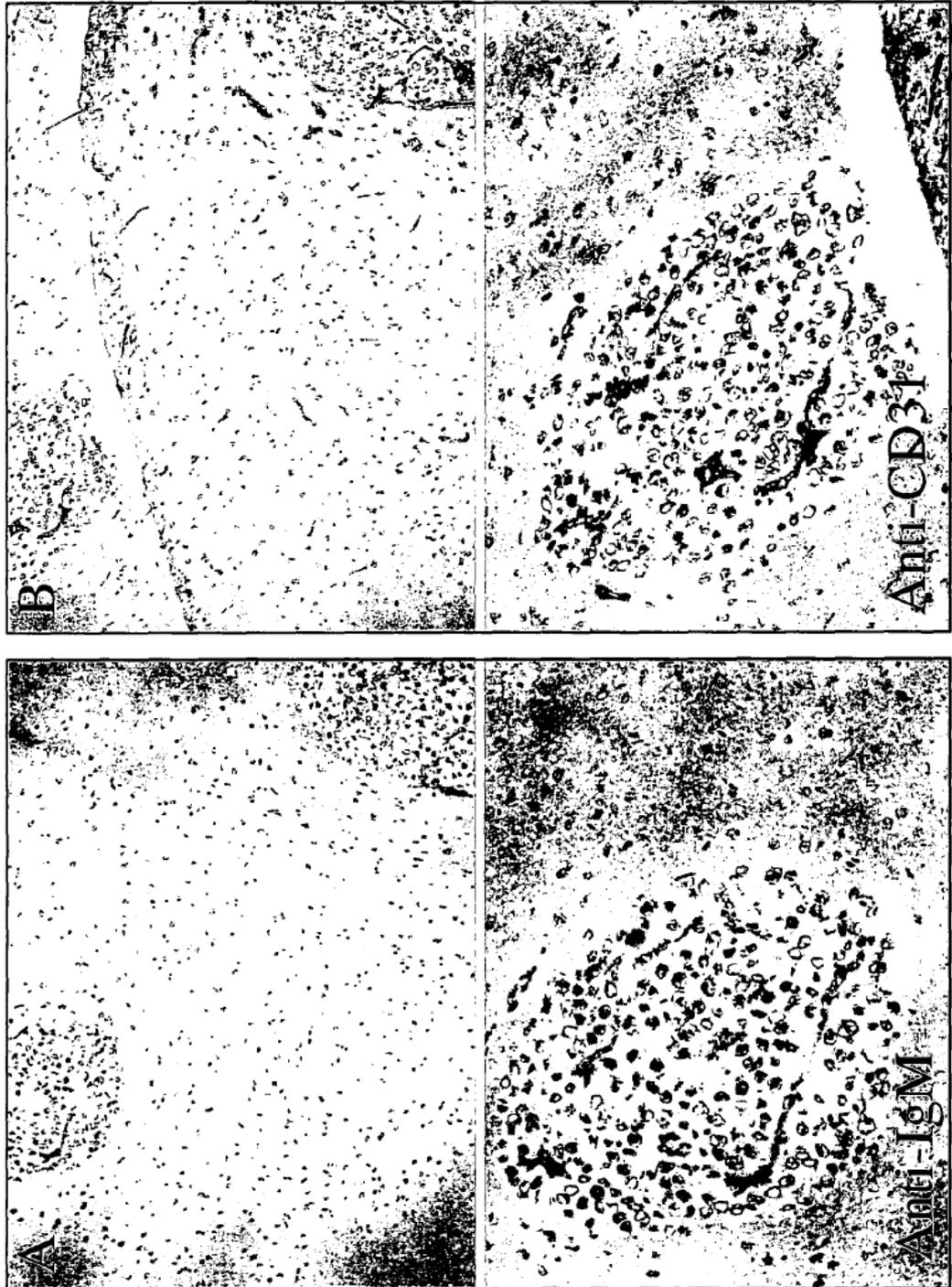


Figura 18

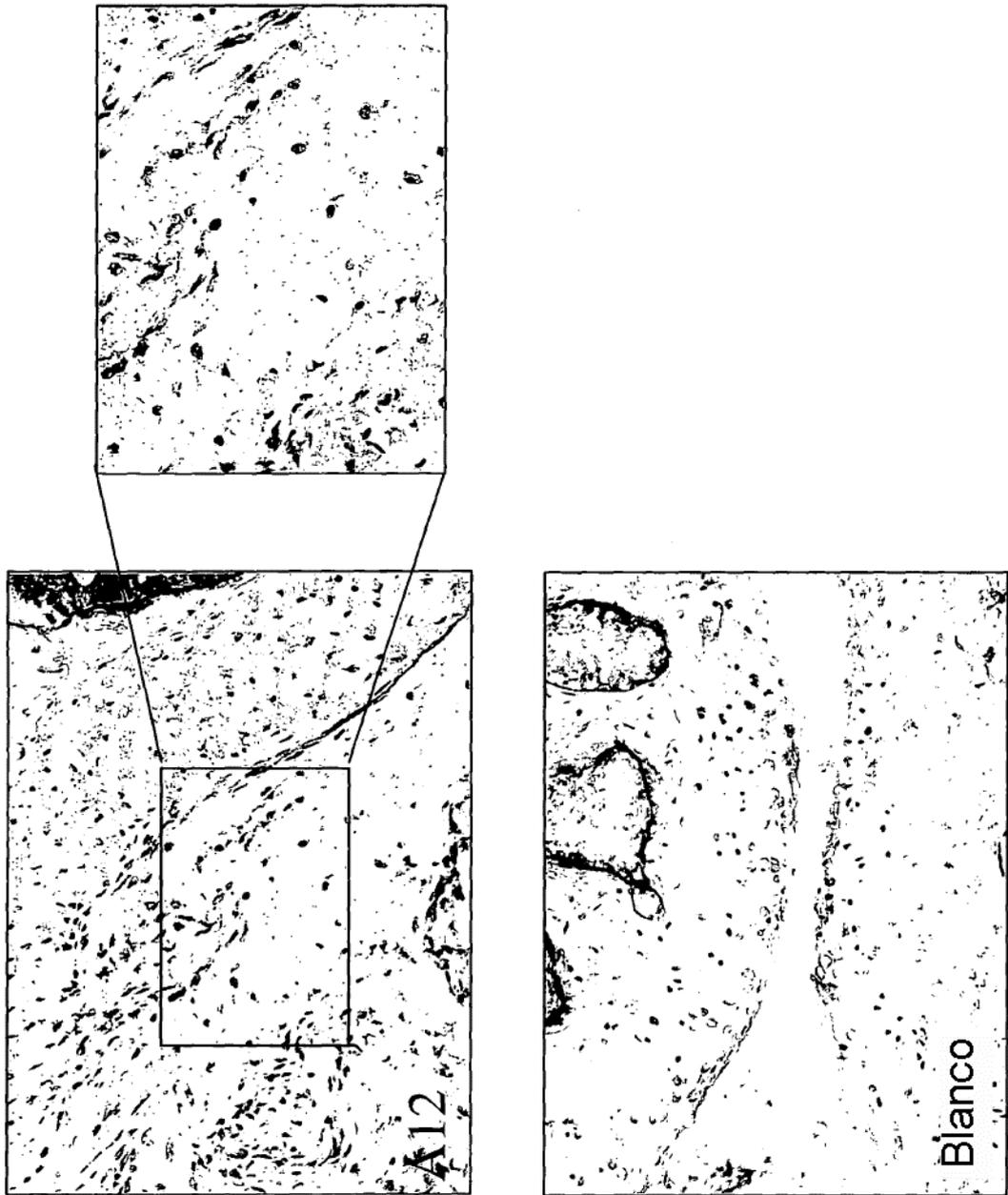


Figura 19

