

ANTICUERPOS ANTAGONISTAS ANTI-NPR1 Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 **[001]** Esta solicitud se presentó el 6 de diciembre de
2022 como Solicitud de Patente Internacional PCT y reivindica
prioridad sobre las Solicitudes de Patente Provisionales de
EE.UU. Núm. 63/286,476, presentada el 6 de diciembre de 2021,
y 63/310,078, presentada el 14 de febrero de 2022, en su
10 totalidad. El contenido de cada una de las cuales se incorpora
aquí como referencia.

REFERENCIA A UN XML DE LISTA DE SECUENCIAS

[002] Esta solicitud contiene un listado de secuencias
15 que se envió electrónicamente en formato XML. El XML del
listado de secuencias se incorpora aquí como referencia. Dicho
archivo XML, creado el 24 de noviembre de 2022, lleva el nombre
40848_0112WOU1_SL.xml y tiene un tamaño de 82,654 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

20 **[003]** La presente invención está relacionada con
anticuerpos antagonistas y fragmentos de unión a antígeno que
se unen específicamente al receptor 1 del péptido natriurético
(NPR1), y métodos terapéuticos y de diagnóstico para usar esos
25 anticuerpos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[004] El receptor 1 del péptido natriurético (NPR1; también conocido como NPR-A) es una guanilato ciclasa unida a
5 membrana que media la conversión intracelular de trifosfato de
guanosina en monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) (Martinez-
Rumayor, *et al.*, 2008 *Am J Cardiol* 101 (3a):3-8). NPR1 se
expresa ampliamente, incluso en el riñón, los pulmones, las
glándulas suprarrenales, la vasculatura, el cerebro, el hígado,
10 los tejidos endoteliales y adiposos y en niveles más bajos en
el corazón. Se activa uniéndose al péptido natriurético
auricular (ANP) o al péptido natriurético cerebral (BNP). La
activación y señalización de NPR1 estimulan muchas respuestas
fisiológicas que involucran muchos tejidos. El sistema ANP-
15 NPR1 ha sido bien estudiado por su papel en la vasorelajación,
natriuresis, diuresis, permeabilidad endotelial y en funciones
no cardiovasculares como la lipólisis y las funciones de las
células inmunes (Potter, 2011 *Pharmacol. Ther.* 130: 71-82). El
agonismo de NPR1 produce alteraciones de la presión arterial
20 (PA) sistémica a través de efectos mediados por cGMP sobre el
volumen intravascular, vasorelajación, natriuresis y diuresis.

[005] Los anticuerpos monoclonales contra NPR1 fueron
descritos por primera vez por Kitano *et al.*, en 1995 (*Immunol.*
Lett. 47: 215-22). Los anticuerpos anti-NPR1 activadores o
25 agonistas se describen, por ejemplo, en las

patentes/publicaciones de EE.UU. Núm. 9090695, 20160168251 y 20200123263, y en el documento WO2010065293.

[006] La hipotensión, o presión arterial baja, puede ser una afección relativamente benigna y asintomática, pero
5 puede volverse preocupante cuando la presión de bombeo no es suficiente para perfundir órganos clave con sangre oxigenada (Sharma, et al., actualizado en 2021 *Hipotensión*, disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499961/>). Las complicaciones de la hipotensión no tratada con gasto cardíaco
10 deficiente son graves e incluso pueden provocar la muerte.

[007] Los trastornos caracterizados por hipotensión tienen una gran necesidad médica insatisfecha de terapias seguras y de acción prolongada. Relativamente pocos fármacos aumentan la presión arterial y el volumen intravascular. La
15 mayoría de los fármacos existentes tienen limitaciones; por ejemplo, los agentes orales tienen una duración de acción corta, lo que requiere dosis múltiples al día, y los vasopresores intravenosos requieren infusión en una UCI con monitorización frecuente debido a un índice terapéutico
20 estrecho.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[008] En un aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos antagonistas y fragmentos de unión a antígeno de
25 los mismos que se unen específicamente a la proteína del

receptor 1 del péptido natriurético (NPR1). En una modalidad, se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína del receptor 1 del péptido natriurético (NPR1), en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a NPR1 y bloquea NPR1. En una modalidad adicional, bloquear NPR1 comprende inhibir y/o bloquear la señalización y/o actividad de NPR1. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-NPR1 son anticuerpos completamente humanos que se unen a NPR1 con alta afinidad y bloquean NPR1. Los anticuerpos de la presente invención son útiles, entre otras cosas, para bloquear o reducir la señalización de NPR1 y/o la actividad hipotensora de la proteína NPR1. En determinadas modalidades, los anticuerpos son útiles para prevenir, tratar o mejorar al menos un síntoma o indicación de una enfermedad o trastorno asociado a NPR1, incluida la hipotensión, en un sujeto. En determinadas modalidades, los anticuerpos se pueden administrar de forma profiláctica o terapéutica a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad o trastorno asociado a NPR1. En modalidades específicas, los anticuerpos se usan para aumentar la presión arterial sistémica en un sujeto que sufre de presión arterial baja. Dichos anticuerpos pueden usarse como terapia para un trastorno o afección asociada con hipotensión cuando se administran a un sujeto que lo necesita.

[009] Los anticuerpos antagonistas descritos en el presente documento se unen a NPR1 con alta afinidad y tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas (en comparación con los fármacos de atención estándar). Una dosis única de un anticuerpo de la presente invención condujo a un aumento sostenido de la presión arterial. De hecho, los anticuerpos descritos en el presente documento son eficaces para aumentar la presión arterial y mantener la presión aumentada durante hasta 28 días cuando se administran como una dosis única.

10 Dichos anticuerpos pueden usarse para proporcionar una eficacia superior, junto con una dosificación menos frecuente, en un sujeto con una enfermedad o trastorno asociado a NPR1 (por ejemplo, hipotensión).

[010] Los anticuerpos de la invención pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o pueden comprender sólo una porción de unión al antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂ o scFv), y pueden ser modificados para afectar la funcionalidad, por ejemplo, para aumentar la persistencia en el huésped o para eliminar

20 funciones efectoras residuales (Reddy, et al., 2000, *J. Immunol.* 164:1925-1933). En determinadas modalidades, los anticuerpos pueden ser biespecíficos.

[011] En un primer aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos antagonistas monoclonales

recombinantes aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a NPR1.

[012] En algunas modalidades, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales completamente humanos.

5 **[013]** Los anticuerpos anti-NPR1 ejemplares de la presente invención se enumeran en las Tablas 1 y 2 del presente documento. La Tabla 1 establece los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada (HCVR), regiones variables de cadena ligera (LCVR),
10 regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) de anticuerpos ejemplares. La Tabla 2 establece los
15 identificadores de secuencia de ácido nucleico de HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de los anticuerpos ejemplares.

[014] La presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada
20 de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el mismo.

[015] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma.

[016] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una región de variabilidad de cadena pesada (HCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 22, 38 y 55.

[017] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una región de variabilidad de cadena ligera (LCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 30, 46 y 63.

[018] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) contenidas dentro de una región variable de cadena pesada (HCVR) seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 22, 38 y 55; y tres CDR contenidas dentro de una región variable de cadena ligera (LCVR)

seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 30, 46 y 63.

[019] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1 emparejadas con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la Tabla 1. De acuerdo con ciertas modalidades, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR contenidas dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-NPR1 ejemplares enumerados en la Tabla 1. En ciertas modalidades, el par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR se selecciona de una de las SEQ ID NO: 2/10 (*p. ej.*, mAb38067), 22/30 (*p. ej.*, mAb38072), 38/46 (*p. ej.*, mAb38090) y 55/63 (*p. ej.*, mAb22034).

[020] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una HCVR y una LCVR, comprendiendo dicha HCVR una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1 que tiene no más de doce sustituciones de aminoácidos, y/o dicha LCVR comprendiendo una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1 que no tiene más de diez sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, la presente invención proporciona anticuerpos o

fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una HCVR y una LCVR, comprendiendo dicha HCVR una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1, teniendo dicha secuencia de aminoácidos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, 5 ocho, nueve, diez, once o doce sustituciones de aminoácidos. En otro ejemplo, la presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una HCVR y una LCVR, comprendiendo dicha LCVR una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1, teniendo dicha secuencia 10 de aminoácidos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos. En una modalidad, la presente invención proporciona anticuerpos anti-NPR1 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una HCVR y una LCVR, comprendiendo dicha HCVR una 15 secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1, teniendo dicha secuencia de aminoácidos al menos una sustitución de aminoácidos, y/o dicha LCVR comprende una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1, teniendo dicha secuencia de aminoácidos al menos una sustitución de aminoácidos.

20 **[021]** La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR1 enumeradas en la Tabla 1 o 25 una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al

menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[022] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR2 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[023] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[024] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR1 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al

menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[025] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR2 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[026] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[027] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden:

(a) un dominio de la región determinante de la cadena pesada (HCDR) 1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 24, 40 y 57;

(b) un dominio HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, 26, 42 y 59;

(c) un dominio HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 28, 44, y 61;

(d) un dominio de la región determinante de la cadena ligera (LCDR) 1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 48 y 65;

(e) un dominio LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en AAS y GAS; y

(f) un dominio LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, 32 y 69.

[028] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3 y LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1 emparejadas con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR3 enumeradas en la Tabla 1. De acuerdo con ciertas modalidades, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCDR3/LCDR3 contenidos dentro de

cualquiera de los anticuerpos anti-NPR1 ejemplares enumerados en la Tabla 1. En ciertas modalidades, el par de secuencias de aminoácidos HCDR3/LCDR3 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8/16 (*p. ej.*, mAb38067), 28/32 (*p. ej.*, mAb38072),
5 44/16 (*p. ej.*, mAb38090) y 61/ 69 (*p. ej.*, mAb22034).

[029] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una HCVR y una LCVR, comprendiendo dicha HCVR comprende HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que
10 difiere de una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1 en 1 aminoácido, HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1 en 1 aminoácido, y HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de
15 aminoácidos enumerada en la Tabla 1 en 1 aminoácido. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una HCVR y una LCVR, comprendiendo dicha LCVR, LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una
20 secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1 por 1 aminoácido, LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 1 en 1 aminoácido, y LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de aminoácidos
25 enumerada en la Tabla 1 en 1 aminoácido. Por ejemplo, la

presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una HCVR y una LCVR, comprendiendo dicha HCVR HCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o una secuencia de aminoácidos que difiere de SEQ ID NO: 24 por 1 aminoácido, HCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 o una secuencia de aminoácidos que difiere de SEQ ID NO: 26 por 1 aminoácido, y HCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 o una secuencia de aminoácidos que difiere de SEQ ID NO: 28 en 1 aminoácido. En otra modalidad ejemplar, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una HCVR y una LCVR, comprendiendo dicha LCVR LCDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos que difiere de SEQ ID NO: 12 por 1 aminoácido, LCDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de AAS o una secuencia de aminoácidos que difiere de AAS en 1 aminoácido, y LCDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32 o una secuencia de aminoácidos que difiere de SEQ ID NO: 32 por 1 aminoácido.

[030] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidos dentro de cualquiera de los anticuerpos ejemplares enumerados en la Tabla 1. En ciertas

modalidades, el conjunto de secuencias de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 6-SEQ ID NO: 8-SEQ ID NO: 12-AAS-SEQ ID NO: 16 (p. ej., mAb38067), SEQ ID NO: 24-SEQ ID NO: 26-SEQ ID NO: 28-SEQ ID NO: 12-AAS-SEQ ID NO: 32 (p. ej., mAb38072), SEQ ID NO: 40-SEQ ID NO: 42-SEQ ID NO: 44-SEQ ID NO: 48-AAS-SEQ ID NO: 16 (p. ej., mAb38090), y SEQ ID NO: 57-SEQ ID NO: 59-SEQ ID NO: 61-SEQ ID NO: 65-GAS-SEQ ID NO: 69 (p. ej., mAb22034).

10 **[031]** En una modalidad relacionada, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un conjunto de seis CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidos dentro de un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR como

15 definido por cualquiera de los anticuerpos ejemplares enumerados en la Tabla 1. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden el conjunto de secuencias de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 contenidos dentro de un

20 par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8/16 (p. ej., mAb38067), 28/32 (p. ej., mAb38072), 44/16 (p. ej., mAb38090) y 61/69 (p. ej., mAb22034). En una modalidad relacionada, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de

25 los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos

de región variable de cadena pesada (HCVR)/región variable de cadena ligera (LCVR) seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2/10, 22/30, 38/46 y 55/63.

[032] Los métodos y técnicas para identificar CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR son bien conocidos en la técnica y pueden usarse para identificar CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y/o LCVR especificadas presentadas en el presente documento. Las convenciones ejemplares que pueden usarse para identificar los límites de las CDR incluyen, por ejemplo, la definición de Kabat, la definición de Chothia y la definición de AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de la secuencia, la definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones del bucle estructural y la definición de AbM es un compromiso entre los enfoques de Kabat y Chothia. Véase, por ejemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); y Martin, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:9268-9272 (1989). También hay bases de datos públicas disponibles para identificar secuencias de CDR dentro de un anticuerpo.

[033] En ciertas modalidades, la presente invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a NPR1, en donde el anticuerpo o

fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena ligera se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, 36, 53 y 73.

5 **[034]** En modalidades adicionales, la presente invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a NPR1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada se
10 selecciona del grupo que consiste de SEQ ID NO: 18, 34, 51 y 71; y la cadena ligera se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, 36, 53 y 73.

[035] En modalidades adicionales, la presente invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo
15 que se une específicamente a NPR1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a residuos en el lóbulo inferior del dominio extracelular de NPR1. En aún otras modalidades, la presente invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une
20 específicamente a NPR1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo interactúa con al menos uno de los residuos de NPR1 seleccionados del grupo que consiste en Arg143, Leu144, Glu384, Leu401, Val402, Ala103, Ser405, Gly406, Arg407, Lys408, Trp411, Leu413, Gly414, Tyr415 y Pro416.

[036] En modalidades adicionales, la presente invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a NPR1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

[037] En modalidades adicionales, la presente invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a NPR1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

[038] En modalidades adicionales, la presente invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a NPR1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51; y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53.

[039] En modalidades adicionales, la presente invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a NPR1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71; y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73.

[040] En ciertas modalidades, la presente invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a NPR1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) contenidas dentro una región variable de cadena pesada (HCVR) y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas dentro de una región variable de cadena ligera (LCVR), en donde la HCVR comprende: (i) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 22, 38 y 55; (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 22, 38 y 55; (iii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 22, 38 y 55; o (iv) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo

que consiste en SEQ ID NO: 2, 22, 38 y 55, teniendo dicha secuencia de aminoácidos no más de 12 sustituciones de aminoácidos; y la LCVR comprende: (a) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 30, 46 y 63; (b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 30, 46 y 63; (c) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 30, 46 y 63; o (d) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 30, 46 y 63, teniendo dicha secuencia de aminoácidos no más de 10 sustituciones de aminoácidos.

[041] En ciertas modalidades preferidas, la presente invención incluye anticuerpos que se unen específicamente a NPR1 de manera antagonista, es decir, bloquean o reducen la unión y/o actividad de NPR1.

[042] La presente invención incluye anticuerpos anti-NPR1 que tienen un patrón de glicosilación modificado. En algunas modalidades, puede ser útil una modificación para eliminar sitios de glicosilación indeseables, o un anticuerpo que carezca de un resto de fucosa presente en la cadena de oligosacárido, por ejemplo, para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (ver Shield, et al. (2002) *JBC* 277:26733). En otras aplicaciones,

se puede realizar una modificación de la galactosilación para modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

[043] En ciertas modalidades, la presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que exhiben unión dependiente del pH a NPR1. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a NPR1 con mayor afinidad a pH neutro que a pH básico (es decir, unión reducida a pH básico).

10 **[044]** La presente invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten por la unión específica a NPR1 con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las CDR de un HCVR y las CDR de un LCVR, en donde HCVR y LCVR tienen
15 cada uno una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias HCVR y LCVR enumeradas en la Tabla 1.

[045] La presente invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten de forma cruzada por la unión a NPR1 con un anticuerpo
20 de referencia o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las CDR de un HCVR y las CDR de un LCVR, en donde HCVR y LCVR tienen cada uno una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias HCVR y LCVR enumeradas en la Tabla 1.

[046] La presente invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende tres CDR de una HCVR y tres CDR de una LCVR, en donde HCVR y LCVR tienen cada uno una amino secuencia de ácido seleccionada de las secuencias HCVR y LCVR enumeradas en la Tabla 1.

[047] En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención son biespecíficos y comprenden una primera especificidad de unión a un primer epítipo de NPR1 y una segunda especificidad de unión a un segundo epítipo de NPR1 en donde el primer y segundo epítopos son distintos y no se superponen.

[048] En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista anti-NPR1 aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una o más de las siguientes características: (a) es un anticuerpo monoclonal completamente humano; (b) se une a NPR1 humano a 25 °C y a 37 °C con una constante de disociación (K_D) de menos de 1.7 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial; (c) se une a NPR1 de mono a 25 °C y 37 °C con una K_D de menos de 1.99 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial; (d) se une a NPR1 humano en presencia de ANP a 25 °C y a 37 °C con una K_D de menos de 1.52 nM, medida en un ensayo

de resonancia de plasmón superficial; (e) inhibe la activación de NPR1 inducida por ligando (por ejemplo, inducida por ANP o BNP), medida mediante ensayo de acumulación de cGMP; (f) se une a NPR1 humano en presencia o ausencia de ANP o BNP con una EC₅₀ de menos de 2.9 nM, medida mediante inmunoensayo basado en electroquimioluminiscencia; (g) se une a NPR1 de mono en presencia o ausencia de ANP o BNP con una EC₅₀ de menos de 4.2 nM, medida mediante inmunoensayo basado en electroquimioluminiscencia; (h) aumenta las presiones sanguíneas sistémicas (incluidas las presiones sistólica, diastólica, arterial media y de pulso) cuando se administra a ratones normotensos e hipotensos, en donde el aumento de las presiones sanguíneas sistémicas dura hasta aproximadamente 28 días tras la administración de una dosis única; (i) aumenta la presión arterial sistémica cuando se administra a ratones hipotensos inducidos por sobreexpresión de ANP, en donde el aumento de la presión arterial sistémica dura hasta aproximadamente 28 días tras la administración de una dosis única; (j) aumenta la presión arterial sistémica en ratones hipotensos inducidos por LPS; y (k) comprende una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de HCVR enumerada en la Tabla 1 y una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de LCVR enumeradas en la Tabla 1.

[049] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-NPR1 o porciones de los mismos. En ciertas modalidades, se proporciona una molécula de polinucleótido
5 aislada que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada (HCVR) de un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína del receptor 1 del péptido natriurético (NPR1), en donde el anticuerpo o su
10 fragmento de unión a antígeno se une a NPR1 y bloquea NPR1. En modalidades adicionales, se proporciona una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera (LCVR) de un anticuerpo aislado o fragmento de unión a
15 antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína del receptor 1 del péptido natriurético (NPR1), en donde el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une a NPR1 y bloquea NPR1. Por ejemplo, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las
20 secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1; en ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de HCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que

tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el mismo.

[050] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las
5 secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la Tabla 1; en ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que
10 tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el mismo.

[051] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR1 enumeradas en la Tabla 1;
15 en ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCDR1 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99%
20 de identidad de secuencia con el mismo.

[052] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR2 enumeradas en la Tabla 1; en ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende
25 una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de

las secuencias de ácido nucleico HCDR2 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el mismo.

5 **[053]** La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCDR3 enumeradas en la Tabla 1; en ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de
10 las secuencias de ácido nucleico HCDR3 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el mismo.

[054] La presente invención también proporciona
15 moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de LCDR1 enumeradas en la Tabla 1; en ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR1 enumeradas en la Tabla
20 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el mismo.

[055] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las
25 secuencias de aminoácidos de LCDR2 enumeradas en la Tabla 1;

en ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR2 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que
5 tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el mismo.

[056] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR3 enumeradas en la Tabla 1; en
10 ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR3 enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99%
15 de identidad de secuencia con el mismo.

[057] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una HCVR, en donde la HCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3), en donde el conjunto de secuencias de aminoácidos
20 HCDR1-HCDR2-HCDR3 es como se define por cualquiera de las anticuerpos ejemplares enumerados en la Tabla 1.

[058] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una LCVR, en donde la LCVR comprende un conjunto de tres CDR (es decir, LCDR1-
25 LCDR2-LCDR3), en donde el conjunto de secuencias de aminoácidos

LCDR1-LCDR2-LCDR3 es como se define en cualquiera de los ejemplos anticuerpos enumerados en la Tabla 1.

[059] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican tanto una HCVR como una LCVR, en donde la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR enumeradas en la Tabla 1, y en donde la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las Secuencias de aminoácidos de LCVR enumeradas en la Tabla 1. En ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos de HCVR enumeradas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia con la misma, y una secuencia de polinucleótidos seleccionada de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de LCVR enumeradas en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tenga al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia con el mismo. En ciertas modalidades de acuerdo con este aspecto de la invención, la molécula de ácido nucleico codifica una HCVR y una LCVR, en donde tanto la HCVR como la LCVR se derivan del mismo anticuerpo anti-NPR1 enumerado en la Tabla 1.

[060] En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un vector que comprende una molécula de polinucleótido que codifica una HCVR de un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína del receptor 1 del péptido natriurético (NPR1), en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a NPR1 y bloquea NPR1. En otro aspecto relacionado, la presente invención proporciona un vector que comprende una molécula de polinucleótido que codifica una LCVR de un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína del receptor 1 del péptido natriurético (NPR1), en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a NPR1 y bloquea NPR1. En otro aspecto relacionado más, la presente invención proporciona vectores de expresión recombinantes capaces de expresar un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo. Por ejemplo, la presente invención incluye vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, es decir, moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias HCVR, LCVR y/o CDR como se establece en la Tabla 2. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona vectores de expresión que comprenden: (a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que

codifica una HCVR de un anticuerpo que se une a NPR1, en donde la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias enumeradas en la Tabla 1; y/o (b) una molécula de ácido nucleico que comprende una

5 secuencia de ácido nucleico que codifica una LCVR de un anticuerpo que se une a NPR1, en donde la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias enumeradas en la Tabla 1. También se incluye dentro del alcance de la presente invención células huésped

10 que comprenden un vector de acuerdo con la invención, así como métodos para producir los anticuerpos o porciones de los mismos cultivando las células huésped en condiciones que permitan la producción de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y recuperando los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos así

15 producidos. En determinadas modalidades, el método de producción de acuerdo con la invención comprende además formular el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como una composición farmacéutica que comprende un vehículo aceptable. En determinadas modalidades, las células

20 huésped comprenden una célula de mamífero o una célula procariótica. En determinadas modalidades, la célula huésped es una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula de *Escherichia coli* (*E. coli*). En ciertas modalidades, la presente invención proporciona métodos para producir un anticuerpo o

25 fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención,

comprendiendo los métodos introducir en una célula huésped un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una HCVR y/o LCVR de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención unido
5 operativamente a un promotor; cultivar la célula huésped en condiciones favorables para la expresión de la secuencia de ácido nucleico; y aislar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo del medio de cultivo y/o célula huésped. El anticuerpo aislado o su fragmento de unión a antígeno se puede
10 purificar usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica anterior.

[061] En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une
15 específicamente a la proteína del receptor 1 del péptido natriurético (NPR1), en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a NPR1 y bloquea NPR1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende una cantidad
20 terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo monoclonal recombinante o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a NPR1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la invención presenta una composición que es una combinación de un anticuerpo anti-
25 NPR1 y un segundo agente terapéutico o terapia. En una

modalidad, el segundo agente terapéutico o terapia es cualquier agente o terapia que se combina ventajosamente con un anticuerpo anti-NPR1. Los agentes o terapias ejemplares que pueden combinarse ventajosamente con un anticuerpo antagonista anti-NPR1 incluyen, sin limitación, otros agentes que se unen y/o bloquean la señalización y/o actividad de NPR1 (incluidos otros anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, etc.) y/o agentes que no se unen directamente a NPR1 pero que, no obstante, tratan o mejoran al menos un síntoma o indicación de una enfermedad o trastorno asociado con NPR1 (presentado en otra parte del presente documento). En otra parte del presente documento se describen terapias combinadas adicionales y coformulaciones que involucran los anticuerpos anti-NPR1 de la presente invención.

15 **[062]** En un cuarto aspecto, la invención proporciona métodos terapéuticos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con NPR1 en un sujeto usando un anticuerpo anti-NPR1 o una porción de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención, en donde los métodos terapéuticos comprenden
20 administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con la invención al sujeto que lo necesita. En determinadas modalidades, el trastorno tratado es cualquier enfermedad o afección que
25 mejora, mejora, inhibe o previene mediante el bloqueo de la

actividad de NPR1 (p. ej., hipotensión). En determinadas modalidades, la enfermedad o trastorno asociado a NPR1 se selecciona del grupo que consiste en hipotensión, shock circulatorio, shock séptico, hipotensión ortostática neurogénica, síndrome de taquicardia ortostática postural (POTS), insuficiencia cardíaca, shock cardiogénico, obesidad, insuficiencia renal, enfermedad crónica. enfermedad renal, edema macular, glaucoma, accidente cerebrovascular, trastornos pulmonares, fibrosis pulmonar, inflamación, asma, trastornos del crecimiento esquelético, fracturas óseas, diabetes, hipoglucemia y cáncer.

[063] En ciertas modalidades, la invención proporciona métodos para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno asociado a NPR1 que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-NPR1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención a un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede administrar de forma profiláctica o terapéutica a un sujeto (por ejemplo, a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad o trastorno asociado a NPR1). En determinadas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, o la composición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la invención, se administra en combinación con un segundo agente terapéutico o terapia. El segundo agente

terapéutico o terapia puede, en ciertas modalidades, seleccionarse del grupo que consiste en un inhibidor de la angiogénesis, un vasoconstrictor/vasopresor, un inmunosupresor, ácido ascórbico, un inhibidor de la calcineurina, un corticosteroide, un inhibidor de VEGF, un descongestionante, un antidepresivo, anticonceptivo hormonal, un estimulante (incluido un estimulante cardíaco), cafeína, oxigenación por membrana extracorpórea, dispositivo de asistencia ventricular, balón de contrapulsación intraaórtico, una modificación del estilo de vida, un suplemento dietético, un fármaco antimicrobiano, insulina y un fármaco antiinflamatorio. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico o terapia puede ser un agente o terapia que ayuda a contrarrestar o reducir cualquier posible efecto secundario asociado con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, si debe ocurrir dicho(s) efecto(s) secundario(s). El anticuerpo o fragmento del mismo, o la composición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la invención, se puede administrar por vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, oral o intramuscular. El anticuerpo o fragmento del mismo se puede administrar a una dosis de aproximadamente 0.1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. En determinadas modalidades, un anticuerpo de la presente invención se puede

administrar en una o más dosis que comprenden entre 10 mg y 600 mg.

[064] La presente invención también incluye el uso de un anticuerpo anti-NPR1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno que se beneficiaría del bloqueo de la unión y/o actividad de NPR1.

[065] Otras modalidades resultarán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[066] Las **Figuras 1A y 1B** muestran que los anticuerpos anti-NPR1 inhibieron la activación de hNPR1 inducida por (**Fig. 1A**) ANP y (**Fig. 1B**) BNP. Las células se pretrataron con concentraciones crecientes de anticuerpos anti-NPR1, mAb de control o tampón de dilución solo durante 15 minutos a 37 °C, seguido de concentraciones crecientes de ANP, BNP, ANP 0.2 nM o BNP 0.7 nM durante 30 minutos a 37 °C. El experimento se realizó por duplicado. Los símbolos abiertos indican condiciones en las que no se añadió ningún artículo de prueba o sólo se añadió una concentración constante de ANP o BNP, y los símbolos cerrados indican condiciones en las que el artículo de prueba se añadió en un rango de concentraciones; tampón de dilución: OptiMEM con 0.1% de FBS.

[067] Las **Figuras 2A-2E** muestran la inhibición no competitiva de la activación de NPR1 mediada por ANP por (**Fig. 2A**) H4H22034N, (**Fig. 2B**) REGN7541, (**Fig. 2C**) REGN7544 y (**Fig. 2D**) REGN7548 con células HEK293/hNPR1. Los datos del panel de las Figs. 2A a 2D se analizaron en el análisis de gráficos de Schild (**Fig. 2E**) para evaluar la pendiente de Schild para cada uno de los anticuerpos anti-NPR1. La detección de la intensidad de fluorescencia y la concentración de cGMP se calcularon como se describe en el procedimiento experimental. El experimento se realizó por duplicado. No se representó estimulación del ligando para cada concentración de anticuerpo indicada a 0.1 pM y se incluyó en el análisis del gráfico de Schild. Los símbolos abiertos indican condiciones de ANP solo sin artículo de prueba; los símbolos cerrados indican condiciones en las que se añadió el artículo de prueba en las concentraciones indicadas de 50 nM, 150 nM o 450 nM con ANP en un rango de concentraciones de 1 pM a 1 μ M; tampón de dilución: OptiMEM con FBS al 0.1%; CR: relación de concentración.

[068] Las **Figuras 3A-3C** muestran que los anticuerpos anti-NPR1 indujeron la internalización de NPR1 medida mediante un ensayo de citotoxicidad con ADC secundario (**Fig. 3A**) en ausencia de ligando o en presencia de (**Fig. 3B**) ANP 100 nM o (**Fig. 3C**) BNP de 100 nM. Las células HEK293/hNPR1 se pretrataron con concentraciones crecientes de anticuerpos anti-NPR1, mAb de control o tampón de dilución solo en

presencia o ausencia de ANP 100 nM o BNP 100 nM durante 5 minutos a 37 °C, seguido de un tratamiento secundario con ADC durante 3 días a 37°C . El experimento se realizó por duplicado. Los símbolos abiertos indican condiciones en las que no se
5 añadió ningún artículo de prueba o sólo se añadió una concentración constante de ANP o BNP, y los símbolos cerrados indican condiciones en las que el artículo de prueba se añadió en un rango de concentraciones; tampón de dilución: OptiMEM con 0.1% de FBS.

10 **[069]** La **Figura 4** muestra los efectos agudos de los mAb antagonistas de NPR1 sobre la presión del pulso en ratones normotensos NPR1^{hu/hu}: dosis única de 25 mg/kg. Se asignaron al azar ratones normotensos NPR1^{hu/hu} telemétricos en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una
15 única inyección intravenosa de 25 mg/kg de un mAb antagonista de NPR1 o PBS como se describe en la Tabla 25. Todos los valores son medias ± SEM, n=6 por grupo.

[070] La **Figura 5** muestra los efectos de los mAb antagonistas de NPR1 sobre la presión arterial sistólica en
20 ratones normotensos NPR1^{hu/hu}: dosis única de 25 mg/kg. Se asignaron al azar ratones normotensos NPR1^{hu/hu} telemétricos en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una única inyección intravenosa de 25 mg/kg de un mAb antagonista de NPR1 o PBS como se describe en la Tabla 25.
25 Todos los valores son medias ± SEM, n=6 por grupo.

[071] La **Figura 6** muestra los efectos de los mAb antagonistas de NPR1 sobre la presión arterial sistólica en ratones normotensos NPR1^{hu/hu}: dosis única de 1 mg/kg. Se asignaron al azar ratones normotensos NPR1^{hu/hu} telemétricos en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una única inyección subcutánea de 1 mg/kg de un mAb antagonista de NPR1 o una única inyección de 25 mg/kg de mAb de control de isotipo IgG4P como se describe en la Tabla 28. Todos los valores son medias $\pm$ SEM, n=4-5 por grupo.

10 [072] La **Figura 7** muestra los efectos de los mAb antagonistas de NPR1 sobre la presión arterial sistólica en ratones normotensos NPR1^{hu/hu}: dosis única de 25 mg/kg. Se asignaron al azar ratones normotensos NPR1^{hu/hu} telemétricos en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una única inyección subcutánea de 25 mg/kg de un mAb antagonista de NPR1 o mAb de control de isotipo IgG4P como se describe en la Tabla 28. Todos los valores son media $\pm$ SEM, n=4-5 por grupo.

[073] La **Figura 8** muestra los efectos de los mAb antagonistas de NPR1 sobre las presiones sanguíneas sistólicas en ratones NPR1^{hu/hu} hipotensos inducidos por sobreexpresión de ANP. Se asignaron al azar ratones normotensos NPR1^{hu/hu} telemétricos en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una dosis única de 50 ug de HDD de control o plásmido ANP seguido de una única inyección

intravenosa de 25 mg/kg de mAb antagonista de NPR1 o control de isotipo como se describe en la Tabla 31. Todos los valores son medias $\pm$ SEM, n=4-7 por grupo.

[074] Las **Figuras 9A y 9B** muestran los efectos de los mAb antagonistas de NPR1 sobre el peso del corazón absoluto (**Fig. 9A**) y relativo (**Fig. 9B**) después de ratones NPR1^{hu/hu} hipotensos inducidos por sobreexpresión. Se asignaron al azar ratones normotensos NPR1^{hu/hu} telemétricos en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una única inyección subcutánea de 25 mg/kg de un mAb antagonista de NPR1 o mAb de control de isotipo IgG4P como se describe en la Tabla 31. Todos los valores son media $\pm$ SEM, n=5-8 por grupo.

[075] La **Figura 10** muestra los efectos de los mAb antagonistas de NPR1 sobre las presiones del pulso en ratones NPR1^{hu/hu} hipotensos inducidos por LPS: dosis intravenosa única preventiva o terapéutica de 25 mg/kg. Los ratones NPR1^{hu/hu} telemétricos se asignaron al azar en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una única inyección intraperitoneal de 5 mg/kg de LPS o solución salina y una única inyección intravenosa de un mAb antagonista de NPR1 o PBS ~24 horas antes o 8 horas después de la dosis de LPS como se describe en la Tabla 35. Todos los valores son media $\pm$ SEM, n=7-10 por grupo.

[076] La **Figura 11** muestra el cambio medio en la presión del pulso normalizado al valor inicial para cada grupo de

tratamiento entre 3 días antes de la administración de REGN7544 o control del vehículo hasta el final del experimento. Los datos se expresan como media del grupo $\pm$ error estándar de la media.

5 **[077]** La **Figura 12** muestra el cambio medio en la presión arterial sistólica normalizada al valor inicial para cada grupo de tratamiento entre 3 días antes de la administración de REGN7544 o control del vehículo hasta el final del experimento. Los datos se expresan como media del grupo $\pm$ error estándar de
10 la media. Las líneas punteadas verticales indican la administración del fármaco indicada por la vía de administración (*es decir*, SC o PO).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 **[078]** Antes de describir los presentes métodos, debe entenderse que esta invención no se limita a métodos particulares y condiciones experimentales descritas, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente
20 documento tiene el propósito de describir modalidades particulares únicamente y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

[079] A menos que se defina lo contrario, todos los
25 términos técnicos y científicos utilizados en este documento

tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o prueba de la presente invención se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, ahora se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en este documento se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Definiciones

10 **[080]** El término "NPR1", también llamado "NPRA", se refiere al receptor 1 del péptido natriurético (también conocido como receptor A del péptido natriurético). NPR1 es una guanilato ciclase transmembrana homodimérica, una enzima que cataliza la síntesis de cGMP. NPR1 es el receptor de
15 péptidos natriuréticos tanto auriculares (ANP) como cerebrales (BNP) y sufre cambios conformacionales en el dominio extracelular tras la unión del ligando (Ogawa, *et al.*, 2004 *J. Biol. Chem.* 279: 28625-31). La proteína tiene 4 regiones distintas que comprenden un dominio de unión a ligando
20 extracelular, una única región transmembrana, un dominio de homología similar a la proteína quinasa intracelular y un dominio catalítico de guanilil ciclase. La secuencia de aminoácidos de la proteína NPR1 de longitud completa se ejemplifica mediante la secuencia de aminoácidos proporcionada
25 en UniProtKB/Swiss-Prot con el número de acceso P16066.1. El

término "NPR1" incluye la proteína NPR1 recombinante o un fragmento de la misma. El término también abarca la proteína NPR1 o un fragmento de la misma acoplado a, por ejemplo, etiqueta de histidina, Fc de ratón o humano, o una secuencia
5 señal tal como ROR1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 74-78).

[081] El término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a moléculas de inmunoglobulina compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L)
10 interconectadas por enlaces disulfuro (*es decir*, "moléculas de anticuerpo completas"), así como sus multímeros (*p. ej.*, IgM) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada ("HCVR" o "V_H") y una región constante de cadena pesada
15 (compuesta por los dominios CH₁, CH₂ y CH₃). Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera ("LCVR o "V_L") y una región constante de cadena ligera (C_L). Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de
20 complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada V_H y V_L está compuesto por tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En determinadas
25 modalidades de la invención, las FR del anticuerpo (o fragmento

de unión al antígeno del mismo) pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse de forma natural o artificial. Se puede definir una secuencia consenso de aminoácidos basándose en un análisis en paralelo
5 de dos o más CDR.

[082] También es posible la sustitución de uno o más residuos de CDR o la omisión de una o más CDR. En la literatura científica se han descrito anticuerpos en los que para la unión se puede prescindir de una o dos CDR. Padlan, *et al.*, (1995
10 *FASEB J.* 9:133-139), analizaron las regiones de contacto entre los anticuerpos y sus antígenos, basándose en estructuras cristalinas publicadas, y concluyeron que sólo alrededor de una quinta a una tercera parte de los residuos de CDR realmente entran en contacto con el antígeno. Padlan también encontró
15 muchos anticuerpos en los que una o dos CDR no tenían aminoácidos en contacto con un antígeno (ver también, Vajdos, *et al.*, 2002 *J Mol Biol* 320:415-428).

[083] Los residuos de CDR que no entran en contacto con el antígeno se pueden identificar basándose en estudios previos
20 (por ejemplo, los residuos H60-H65 en CDRH2 a menudo no son necesarios), a partir de regiones de las CDR de Kabat que se encuentran fuera de las CDR de Chothia, mediante modelado molecular y/o empíricamente. Si se omite una CDR o residuo(s) de la misma, normalmente se sustituye con un aminoácido que
25 ocupa la posición correspondiente en otra secuencia de

anticuerpo humano o un consenso de dichas secuencias. Las posiciones para la sustitución dentro de las CDR y los aminoácidos a sustituir también se pueden seleccionar empíricamente. Las sustituciones empíricas pueden ser
5 sustituciones conservadoras o no conservadoras.

[084] Los anticuerpos monoclonales anti-NPR1 completamente humanos descritos en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos en las regiones estructurales y/o
10 CDR de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondientes. Tales mutaciones pueden determinarse fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento con secuencias de la línea germinal
15 disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos presentadas en el presente documento, en donde uno o más
20 aminoácidos dentro de una o más regiones estructurales y/o CDR están mutados al residuo correspondiente de la secuencia de la línea germinal de la que se derivó el anticuerpo, o al residuo correspondiente de otra secuencia de la línea germinal humana, o a una sustitución conservadora de aminoácidos de los residuos
25 de la línea germinal correspondientes (dichos cambios de

secuencia se denominan aquí colectivamente como "mutaciones de la línea germinal"). Una persona con conocimientos habituales en la técnica, comenzando con las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera descritas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una o más mutaciones individuales de la línea germinal o combinaciones de las mismas. En determinadas modalidades, todos los residuos de la estructura y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L se mutan de nuevo a los residuos encontrados en la secuencia de la línea germinal original de la que se derivó el anticuerpo. En otras modalidades, solo ciertos residuos se mutan de nuevo a la secuencia de la línea germinal original, *por ejemplo*, solo los residuos mutados que se encuentran dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los residuos mutados que se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras modalidades, uno o más de los residuos estructurales y/o de CDR se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente (*es decir*, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal a partir de la cual se derivó originalmente el anticuerpo). Además, los anticuerpos de la presente invención pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la línea germinal dentro del marco y/o regiones CDR, *por ejemplo*, en donde ciertos residuos

individuales están mutados al residuo correspondiente de una secuencia de la línea germinal particular mientras que ciertos otros residuos que difieren de la secuencia de la línea germinal original se mantienen o se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de la línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígenos que contienen una o más mutaciones de la línea germinal se pueden analizar fácilmente para detectar una o más propiedades deseadas, tales como especificidad de unión mejorada, afinidad de unión aumentada, propiedades biológicas antagonistas mejoradas o potenciadas, inmunogenicidad reducida, etc. y los fragmentos de unión a antígeno obtenidos de esta manera general están abarcados dentro de la presente invención.

15 **[085]** La presente invención también incluye anticuerpos monoclonales anti-NPR1 completamente humanos que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR presentadas en el presente documento que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, la
20 presente invención incluye anticuerpos anti-NPR1 que tienen secuencias de aminoácidos HCVR, LCVR y/o CDR con, *p. ej.*, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc., sustituciones de aminoácidos conservadoras relativas a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en
25 el presente documento.

[086] El término "anticuerpo humano" o "anticuerpo completamente humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los mAb humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano" o "anticuerpo completamente humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir mAb en los que se hayan injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero (p. ej., ratón) en secuencias de FR humano. El término incluye anticuerpos que se producen de forma recombinante en un mamífero no humano o en células de un mamífero no humano. El término no pretende incluir anticuerpos aislados o generados en un sujeto humano.

[087] El término "recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención creados, expresados, aislados u obtenidos mediante tecnologías o métodos conocidos en la técnica como tecnología de ADN recombinante que incluyen, p. ej., empalme de ADN y expresión transgénica. El término se refiere a anticuerpos expresados en un sistema

de expresión de un mamífero no humano (incluidos mamíferos no humanos transgénicos, *p. ej.*, ratones transgénicos) o de una célula (*p. ej.*, células CHO) o aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes.

5 **[088]** El término "se une específicamente", o "se une específicamente a", o similares, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una
10 constante de disociación en equilibrio de al menos aproximadamente 1×10^{-8} M o menos (*p. ej.*, una K_D más pequeña indica una unión más estrecha). Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio,
15 resonancia de plasmón superficial y similares. Como se describe en el presente documento, los anticuerpos se han identificado mediante resonancia de plasmón superficial, *p. ej.*, BIACORE™, que se unen específicamente a NPR1. Además, los anticuerpos multiespecíficos que se unen a un dominio en NPR1 y uno o más
20 antígenos adicionales o un biespecífico que se une a dos regiones diferentes de NPR1 se consideran, no obstante, anticuerpos que "se unen específicamente", como se usa en el presente documento.

[089] El término anticuerpo de "alta afinidad" se refiere
25 a aquellos mAb que tienen afinidad de unión por NPR1, expresado

como K_D , de al menos 10^{-8} M; preferiblemente 10^{-9} M; más preferiblemente 10^{-10} M, incluso más preferiblemente 10^{-11} M, medido mediante resonancia de plasmón superficial, *por ejemplo*, BIACORE™ o ELISA de afinidad por solución.

5 **[090]** Por el término "velocidad de desaceleración", "Koff" o "kd" se refiere a un anticuerpo que se disocia de NPR1, con una velocidad constante de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, preferiblemente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, según lo determinado por resonancia de plasmón superficial, *por ejemplo*, BIACORE™.

10 **[091]** Los términos "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, como se usan en el presente documento, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado
15 genéticamente que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los términos "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, o "fragmento de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de
20 unirse a la proteína NPR1.

[092] En modalidades específicas, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo de la invención se pueden conjugar con un resto tal como un ligando o un resto terapéutico ("inmunoconjugado"), un segundo anticuerpo anti-NPR1 o

cualquier otro resto terapéutico útil para tratar una enfermedad o trastorno asociado a NPR1.

[093] Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está
5 sustancialmente libre de otros anticuerpos (Abs) que tienen diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a NPR1, o un fragmento del mismo, está sustancialmente libre de Abs que se unen específicamente a antígenos distintos de NPR1.

10 **[094]** Un "anticuerpo antagonista", como se usa en el presente documento (o un "anticuerpo que bloquea o reduce la actividad de NPR1"), pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a NPR1 da como resultado el bloqueo o la reducción de la señalización de NPR1 y/o al menos una actividad biológica de
15 NPR1. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-NPR1 puede aumentar la presión arterial sistémica tras su administración a un sujeto que lo necesite. Los anticuerpos anti-NPR1 descritos en el presente documento son anticuerpos antagonistas.

20 **[095]** Un "anticuerpo activador" o un "anticuerpo agonista", como se usa en el presente documento (o un "anticuerpo que aumenta o potencia la actividad de NPR1" o "un anticuerpo que estabiliza la conformación activada"), pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a NPR1 da como resultado
25 la activación de al menos una actividad biológica de NPR1. Por

ejemplo, un anticuerpo anti-NPR1 activador o un anticuerpo anti-NPR1 agonista puede disminuir la presión arterial sistémica tras la administración a un sujeto que lo necesite.

[096] El término "resonancia de plasmón superficial",
5 como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones biomoleculares en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo usando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor
10 AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.).

[097] El término " K_D ", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

[098] El término "epítopo" se refiere a un determinante
15 antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como paratopo. Un único antígeno puede tener más de un epítopo. Por lo tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas de un antígeno y pueden tener diferentes
20 efectos biológicos. El término "epítopo" también se refiere a un sitio en un antígeno al que responden las células B y/o T. También se refiere a una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. Los epítopos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítopos funcionales son
25 generalmente un subconjunto de los epítopos estructurales y

tienen aquellos residuos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítomos también pueden ser conformacionales, es decir, estar compuestos de aminoácidos no lineales. En determinadas modalidades, los epítomos pueden
5 incluir determinantes que son agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en determinadas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o
10 características de carga específicas.

[099] El término "competencia cruzada", como se usa en el presente documento, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un antígeno e inhibe o bloquea la unión de otro anticuerpo o fragmento de unión a
15 antígeno del mismo. El término también incluye competencia entre dos anticuerpos en ambas orientaciones, es decir, un primer anticuerpo que se une y bloquea la unión del segundo anticuerpo y viceversa. En determinadas modalidades, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo pueden unirse al mismo
20 epítomo. Alternativamente, el primer y segundo anticuerpos pueden unirse a epítomos diferentes, pero superpuestos, de modo que la unión de uno inhiba o bloquee la unión del segundo anticuerpo, por ejemplo, mediante impedimento estérico. La competencia cruzada entre anticuerpos se puede medir mediante
25 métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un

ensayo de interferometría de biocapa sin etiquetas en tiempo real. La competencia cruzada entre dos anticuerpos se puede expresar como la unión del segundo anticuerpo que es menor que la señal de fondo debido a la autounión (en donde el primer y segundo anticuerpo son el mismo anticuerpo). La competencia cruzada entre 2 anticuerpos se puede expresar, por ejemplo, como % de unión del segundo anticuerpo que es menor que la unión de fondo propia inicial (en la que el primer y el segundo anticuerpo son el mismo anticuerpo).

10 **[0100]** El término "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinea de manera óptima con inserciones o eliminaciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos. 15 en al menos aproximadamente el 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las bases de nucleótidos, según se mide mediante cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o 20 GAP, como se analiza a continuación. Una molécula de ácido nucleico que tiene identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en ciertos casos, codificar un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos o sustancialmente similar que el polipéptido codificado por la 25 molécula de ácido nucleico de referencia.

[0101] Tal como se aplica a los polipéptidos, el término "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de manera óptima, como mediante los programas GAP o BESTFIT que utilizan pesos de espacio predeterminados, comparten al menos el 90% de identidad de secuencia, incluso más preferiblemente al menos 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia. Preferiblemente, las posiciones de los residuos, que no son idénticas, difieren mediante sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una "sustitución de aminoácido conservadora" es aquella en la que un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí mediante sustituciones conservadoras, el porcentaje o grado de similitud puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Pearson, (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, que se incorpora en el presente documento como referencia. Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas

laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales de hidroxilo alifático: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amidas: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: 5 fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: 10 valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Alternativamente, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 presentada en Gonnet, et al., 15 (1992) *Science* 256: 1443-45, incorporado en el presente documento como referencia. Un reemplazo "moderadamente conservador" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

[0102] La similitud de secuencia de los polipéptidos 20 normalmente se mide utilizando un software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas compara secuencias similares utilizando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluidas sustituciones conservadoras de 25 aminoácidos. Por ejemplo, el software GCG contiene programas

como GAP y BESTFIT, que pueden usarse con parámetros predeterminados para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo salvaje y una muteína del mismo. Véase, *p. ej.*, GCG Versión 6.1. Las secuencias de polipéptidos también se pueden comparar usando FASTA con parámetros predeterminados o recomendados; un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (*p. ej.*, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de mejor superposición entre las secuencias de consulta y búsqueda (Pearson (2000) *supra*). Otro algoritmo preferido al comparar una secuencia de la invención con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, que utiliza parámetros predeterminados. Véase, *por ejemplo*, Altschul, *et al.*, (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 y (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia.

[0103] Por la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que produce el efecto deseado para el que se administra. La cantidad exacta dependerá del propósito del tratamiento y será determinable por un experto en la técnica utilizando técnicas conocidas (véase, *por ejemplo*,

Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding). Como se usa en el presente documento, la frase se refiere a una cantidad que bloquea NPR1 (*por ejemplo*, señalización de NPR1, actividad de NPR1) y/o que aumenta la presión arterial sistémica.

[0104] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, que necesita mejora, prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a NPR1 tal como hipotensión. El término incluye sujetos humanos que tienen o están en riesgo de tener dicha enfermedad o trastorno.

[0105] Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento" se refieren a la reducción o mejora de la gravedad de al menos un síntoma o indicación de una enfermedad o trastorno asociado a NPR1 debido a la administración de un agente terapéutico tal como un anticuerpo antagonista de la presente invención a un sujeto que lo necesite. Los términos incluyen la inhibición de la progresión de la enfermedad o del empeoramiento de un síntoma/indicación. Los términos también incluyen pronóstico positivo de la enfermedad, *es decir*, el sujeto puede estar libre de enfermedad o puede tener una enfermedad reducida tras la administración de un agente terapéutico tal como un anticuerpo de la presente invención. El agente terapéutico se

puede administrar en una dosis terapéutica al sujeto. El trastorno o enfermedad puede incluir hipotensión y/o un trastorno o enfermedad asociada con hipotensión y/o hipotensión asociada con una enfermedad o trastorno, por ejemplo, shock séptico y enfermedad neurodegenerativa. El trastorno o enfermedad también puede incluir el síndrome de taquicardia ortostática postural (POTS).

[0106] Los términos "prevenir", "previniendo" o "prevención" se refieren a la inhibición de la manifestación de una enfermedad o trastorno asociado a NPR1 tal como hipotensión o cualquier síntoma o indicación de dicha enfermedad o trastorno tras la administración de un anticuerpo de la presente invención.

[0107] Tal como se utiliza en este documento, la frase "presión arterial" puede referirse a cualquiera de la presión arterial sistólica, la presión arterial diastólica, la presión arterial media (área bajo la curva de presión arterial/tiempo, dividida entre la duración del ciclo cardíaco) y la presión del pulso (diferencia entre las presiones sistólica y diastólica). Se conocen en la técnica métodos para medir la presión sanguínea. La presión arterial se mide en unidades de milímetros de mercurio (mm Hg) y generalmente se expresa en términos de presión sistólica (sanguínea) sobre presión diastólica (sanguínea). Los métodos de medición incluyen métodos auscultatorios, oscilométricos, ultrasónicos y de

manguito digital. Generalmente se puede medir, por ejemplo, mediante un tensiómetro digital o un esfigmomanómetro.

Fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos

[0108] A menos que se indique específicamente lo contrario, se entenderá que el término "anticuerpo", como se
5 usa en el presente documento, abarca moléculas de anticuerpo que comprenden dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina (*es decir*, "moléculas de anticuerpo completas") así como fragmentos de unión a antígeno
10 de las mismas. Los términos "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, como se usan en el presente documento, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado
15 genéticamente que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los términos "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, o "fragmento de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de
20 unirse específicamente a la proteína NPR1. Un fragmento de anticuerpo puede incluir un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fv, un fragmento dAb, un fragmento que contiene una CDR o una CDR aislada. En determinadas modalidades, el término "fragmento de unión a antígeno" se
25 refiere a un fragmento polipeptídico de una molécula de unión

a antígeno multi-específica. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden derivarse, *por ejemplo*, de moléculas de anticuerpo completas usando cualquier técnica estándar adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que impliquen la manipulación y expresión de ADN que codifica la variable de anticuerpo y (opcionalmente) dominios constantes. Dicho ADN es conocido y/o está fácilmente disponible, *p. ej.*, de fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, *p. ej.*, bibliotecas de fagos-anticuerpos), o pueden sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o mediante el uso de técnicas de biología molecular, *por ejemplo*, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, añadir o eliminar aminoácidos, etc.

[0109] Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv (scFv) monocatenarias; (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (*p. ej.*, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada tal como un péptido CDR3), o un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas diseñadas, tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de dominio único,

anticuerpos con dominio eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (*p. ej.*, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), los pequeños
5 inmunofármacos modulares (SMIP) y los dominios IgNAR variables de tiburón también se incluyen dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno", como se usa en el presente documento.

[0110] Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo
10 normalmente comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR, que es adyacente o está en marco con una o más secuencias estructurales. En fragmentos de unión a antígeno que tienen un
15 dominio V_H asociado con un dominio V_L , los dominios V_H y V_L pueden estar situados entre sí en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ o $V_L - V_L$. Alternativamente, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio
20 V_H o V_L monomérico.

[0111] En determinadas modalidades, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Configuraciones ejemplares, no limitantes, de dominios
25 variables y constantes que se pueden encontrar dentro de un

fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención incluyen: (i) $V_H - C_{H1}$; (ii) $V_H - C_{H2}$; (iii) $V_H - C_{H3}$; (iv) $V_H - C_{H1} - C_{H2}$; (v) $V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$; (vi) $V_H - C_{H2} - C_{H3}$; (vii) $V_H - C_L$; (viii) $V_L - C_{H1}$; (ix) $V_L - C_{H2}$; (x) $V_L - C_{H3}$; (xi) $V_L - C_{H1} - C_{H2}$; (xii) $V_L - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$; (xiii) $V_L - C_{H2} - C_{H3}$; y (xiv) $V_L - C_L$. En cualquier configuración de dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de las configuraciones ejemplares enumeradas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar directamente unidos entre sí o pueden estar unidos mediante una bisagra o región conectora total o parcial. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (p. ej., 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos, que dan como resultado un enlace flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en un solo molécula polipeptídica. Además, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante enumeradas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, mediante enlace(s) disulfuro).

[0112] Al igual que con las moléculas de anticuerpo completas, los fragmentos de unión al antígeno pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (p. ej., biespecíficos). Un fragmento multiespecífico de unión a antígeno de un anticuerpo

comprenderá típicamente al menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítipo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluidos los formatos de anticuerpos biespecíficos ejemplares presentados en el presente documento, puede adaptarse para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención utilizando técnicas de rutina disponibles en la técnica.

10 **Preparación de anticuerpos humanos**

[0113] Se conocen en la técnica métodos para generar anticuerpos humanos en ratones transgénicos. Cualquiera de estos métodos conocidos se puede utilizar en el contexto de la presente invención para producir anticuerpos humanos que se unan específicamente a NPR1.

[0114] Puede usarse un inmunógeno que comprende cualquiera de los siguientes para generar anticuerpos contra la proteína NPR1. En determinadas modalidades, los anticuerpos de la invención se obtienen de ratones inmunizados con una proteína NPR1 nativa de longitud completa (véase, por ejemplo, número de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot P16066.1) o con ADN que codifica la proteína o fragmento de la misma. Alternativamente, la proteína o un fragmento de la misma puede producirse usando técnicas bioquímicas estándar y modificarse y usarse como inmunógeno.

[0115] En algunas modalidades, el inmunógeno puede ser una proteína NPR1 recombinante o un fragmento de la misma expresada en *E. coli* o en cualquier otra célula eucariótica o de mamífero tal como células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, SEQ ID NO: 74-78).

[0116] Utilizando la tecnología VELOCIMMUNE® (véase, por ejemplo, el documento US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) o cualquier otro método conocido para generar anticuerpos monoclonales, inicialmente se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad contra NPR1 que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. La tecnología VELOCIMMUNE® implica la generación de un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera humanas operativamente unidas a loci de región constante de ratón endógeno de manera que el ratón produce un anticuerpo que comprende una región variable humana y una región constante de ratón en respuesta al estímulo antigénico. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se aísla y se une operativamente al ADN que codifica las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera humana. Luego, el ADN se expresa en una célula capaz de expresar el anticuerpo completamente humano.

[0117] Generalmente, un ratón VELOCIMMUNE® se expone al antígeno de interés y se recuperan células linfáticas (como las células B) de los ratones que expresan anticuerpos. Las

células linfáticas pueden fusionarse con una línea celular de mieloma para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales, y dichas líneas celulares de hibridoma se examinan y seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. El ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera puede aislarse y unirse a regiones constantes isotípicas deseables de la cadena pesada y la cadena ligera. Una proteína anticuerpo de este tipo puede producirse en una célula, tal como una célula CHO. Alternativamente, el ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos de antígeno o los dominios variables de las cadenas ligera y pesada se puede aislar directamente de linfocitos específicos de antígeno.

[0118] Inicialmente, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Como en la sección experimental siguiente, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan por características deseables, incluyendo afinidad, selectividad, epítopo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar el anticuerpo completamente humano de la invención, por ejemplo. IgG1 o IgG4 de tipo salvaje o modificada. Si bien la región constante seleccionada puede variar según el uso específico, las características de unión al antígeno de alta afinidad y

especificidad del objetivo residen en el ión de la región variable.

Bioequivalentes

[0119] Los anticuerpos antagonistas anti-NPR1 y los
5 fragmentos de anticuerpos de la presente invención abarcan proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de los anticuerpos descritos, pero que conservan la capacidad de unirse a la proteína NPR1. Dichos anticuerpos variantes y fragmentos de anticuerpos comprenden una o más
10 adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia original, pero exhiben una actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos. Asimismo, las secuencias de ADN que codifican anticuerpos de la presente invención abarcan
15 secuencias que comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia divulgada, pero que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es esencialmente bioequivalente a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención.

20 [0120] Dos proteínas de unión a antígenos, o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya velocidad y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones
25 experimentales similares, ya sea de forma única dosis o dosis

múltiples. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de absorción pero no en su tasa de absorción y, sin embargo, pueden considerarse bioequivalentes porque dichas diferencias en la tasa de absorción son intencionales y se reflejan en el etiquetado, no son esenciales para alcanzar concentraciones efectivas de fármaco en el cuerpo, p. ej., en el uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el fármaco estudiado en particular.

10 **[0121]** En una modalidad, dos proteínas de unión a antígenos son bioequivalentes si no existen diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza o potencia.

15 **[0122]** En una modalidad, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si a un paciente se le puede cambiar una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluido un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o una efectividad reducida, en comparación con la terapia continuada sin dicho cambio.

20 **[0123]** En una modalidad, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si ambas actúan mediante un mecanismo o mecanismos de acción comunes para la condición o condiciones de uso, en la medida en que dichos mecanismos sean conocidos.

25 **[0124]** La bioequivalencia puede demostrarse mediante métodos *in vivo* y/o *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia

incluyen, *por ejemplo*, (a) una prueba *in vivo* en humanos u otros mamíferos, en la que la concentración del anticuerpo o sus metabolitos se mide en sangre, plasma, suero u otro fluido biológico en función del tiempo; (b) una prueba *in vitro* que
5 se haya correlacionado con datos de biodisponibilidad humana *in vivo* y que sea razonablemente predictivo de ellos; (c) una prueba *in vivo* en humanos u otros mamíferos en la que se mide el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su objetivo) en función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico
10 bien controlado que establezca la seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo.

[0125] Variantes bioequivalentes de los anticuerpos de la invención, *por ejemplo*, realizando diversas sustituciones de residuos o secuencias o eliminando residuos o secuencias
15 terminales o internos que no son necesarios para la actividad biológica. *Por ejemplo*, los residuos de cisteína que no son esenciales para la actividad biológica se pueden eliminar o reemplazar con otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos
20 tras la renaturalización. En otros contextos, los anticuerpos bioequivalentes pueden incluir variantes de anticuerpos que comprenden cambios de aminoácidos, que modifican las características de glicosilación de los anticuerpos, *por ejemplo*, mutaciones que eliminan o excluyen la glicosilación.

Anticuerpos anti-NPR1 que comprenden variantes de Fc

[0126] De acuerdo con ciertas modalidades de la presente invención, se proporcionan anticuerpos anti-NPR1 que comprenden un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que mejoran o disminuyen la unión del anticuerpo al receptor FcRn, *p. ej.*, a pH ácido en comparación con pH neutro. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-NPR1 que comprenden una mutación en la región C_H2 o C_H3 del dominio Fc, en donde la mutación aumenta la afinidad del dominio Fc por FcRn en un ambiente ácido (*por ejemplo*, en un endosoma donde el pH oscila entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 6.0). Tales mutaciones pueden dar lugar a un aumento de la vida media sérica del anticuerpo cuando se administra a un animal. Los ejemplos no limitantes de dichas modificaciones de Fc incluyen, *por ejemplo*, una modificación en la posición 250 (*por ejemplo*, E o Q); 250 y 428 (*por ejemplo*, L o F); 252 (*por ejemplo*, L/Y/F/W o T), 254 (*por ejemplo*, S o T) y 256 (*por ejemplo*, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (*por ejemplo*, H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (*por ejemplo*, A, W, H, F o Y [N434A, N434W, N434H, N434F o N434Y]); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (*por ejemplo*, 308F, V308F) y 434. En una modalidad, la modificación comprende una modificación 428L (*por ejemplo*, M428L) y 434S (*por ejemplo*, N434S); una modificación 428L, 259I (*p. ej.*, V259I) y 308F (*p. ej.*, V308F); una

modificación 433K (p. ej., H433K) y una modificación 434 (p. ej., 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (p. ej., 252Y, 254T y 256E); una modificación de 250Q y 428L (p. ej., T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (p. ej., 308F o 308P).

5 En otra modalidad más, la modificación comprende una modificación 265A (p. ej., D265A) y/o una modificación 297A (p. ej., N297A).

[0127] Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-NPR1 que comprenden un dominio Fc que
10 comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en: 250Q y 248L (por ejemplo, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (p. ej., M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (p. ej., M428L y N434S); 257I y 311I (por ejemplo, P257I y Q311I); 257I y 434H (por ejemplo, P257I y N434H); 376V y 434H
15 (p. ej., D376V y N434H); 307A, 380A y 434A (por ejemplo, T307A, E380A y N434A); y 433K y 434F (p. ej., H433K y N434F). Todas las combinaciones posibles de las mutaciones del dominio Fc anteriores y otras mutaciones dentro de los dominios variables del anticuerpo descritos en el presente documento se contemplan
20 dentro del alcance de la presente invención.

[0128] La presente invención también incluye anticuerpos anti-NPR1 que comprenden una región constante de cadena pesada (C_H) quimérica, en donde la región C_H quimérica comprende segmentos derivados de las regiones C_H de más de un isotipo de
25 inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención

pueden comprender una región C_H quimérica que comprende parte o la totalidad de un dominio C_H2 derivado de una molécula de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, combinada con parte o la totalidad de un dominio C_H3 derivado de una molécula de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. Según ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención comprenden una región C_H quimérica que tiene una región bisagra quimérica. Por ejemplo, una bisagra quimérica puede comprender una secuencia de aminoácidos de "bisagra superior" (residuos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 según la numeración UE) derivada de una región bisagra de IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4 humana, combinada con una secuencia "bisagra inferior" (residuos de aminoácidos de las posiciones 228 a 236 según la numeración UE) derivada de una región bisagra de IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4 humana. De acuerdo con determinadas modalidades, la región bisagra quimérica comprende residuos de aminoácidos derivados de una bisagra superior de IgG1 humana o de una IgG4 humana y residuos de aminoácidos derivados de una bisagra inferior de IgG2 humana. Un anticuerpo que comprende una región C_H quimérica como se describe en el presente documento puede, en ciertas modalidades, exhibir funciones efectoras de Fc modificadas sin afectar adversamente las propiedades terapéuticas o farmacocinéticas del anticuerpo. (Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de

EE.UU. 2014/0243504, cuya invención se incorpora aquí como referencia en su totalidad).

Características biológicas de los anticuerpos.

[0129] En general, los anticuerpos antagonistas de la presente invención funcionan uniéndose a la proteína NPR1 y bloqueando su señalización y/o actividad. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno que se unen a NPR1 humano a 25 °C y a 37 °C con una constante de disociación (K_D) de menos de 1.7 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial, *p. ej.*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento. En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen a NPR1 humano con una K_D de menos de aproximadamente 1.27 nM, menos de aproximadamente 0.34 nM, menos de aproximadamente 0.08 nM, menos de aproximadamente 0.06 nM, medida por resonancia de plasmones de superficie, *p. ej.*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0130] La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno que se unen a NPR1 de mono a 25 °C y a 37 °C con una constante de disociación (K_D) de menos de 1.99 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón de superficie, *p. ej.*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento. En

determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen a NPR1 de mono con una K_D de menos de aproximadamente 1.23 nM, de menos de aproximadamente 0.32 nM, de menos de aproximadamente 0.1 nM, de menos de aproximadamente 0.07 nM, medida por resonancia de plasmones de superficie, *p. ej.*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0131] La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno que se unen a NPR1 humano en presencia de ANP a 25 °C y a 37 °C con una K_D inferior a 1.52 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón de superficie, *p. ej.*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento. En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen a NPR1 humano en presencia de ANP a 25 °C y a 37 °C con una K_D de menos de aproximadamente 1.1 nM, menos de aproximadamente 0.8 nM, menos de aproximadamente 0.6 nM, y menos de aproximadamente 0.5 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial, *p. ej.*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0132] La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno que inhiben la

activación de NPR1 inducida por ligando (por ejemplo, inducida por ANP o BNP), medida mediante ensayo de acumulación de cGMP, *p. ej.*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 6 en el presente documento. En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos inhiben la activación de NPR1 inducida por ligando en al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 92%, al menos aproximadamente un 99% y al menos aproximadamente un 100%, como medido mediante ensayo de acumulación de cGMP, *por ejemplo*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 6 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0133] La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno que se unen a NPR1 humano en presencia o ausencia de ANP o BNP con una EC_{50} de menos de 2.9 nM, medida mediante inmunoensayo basado en electroquimioluminiscencia, *p. ej.*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 7 del presente documento. En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen a NPR1 humano en presencia o ausencia de ANP o BNP con una EC_{50} de menos de aproximadamente 2.1 nM, menos de aproximadamente 1.2 nM y menos de aproximadamente 0.6 nM, según se mide mediante inmunoensayo basado en electroquimioluminiscencia, *p. ej.*, usando el formato

de ensayo como se define en el Ejemplo 7 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0134] La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno que se unen a NPR1 de mono en presencia o ausencia de ANP o BNP con una EC_{50} de menos de 4.2 nM, medida mediante inmunoensayo basado en electroquimioluminiscencia, *p. ej.*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 7 del presente documento. En determinadas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen a NPR1 de mono en presencia o ausencia de ANP o BNP con una EC_{50} de menos de aproximadamente 2.9 nM, menos de aproximadamente 2.1 nM y menos de aproximadamente 0.7 nM, según se mide mediante inmunoensayo basado en electroquimioluminiscencia, *p. ej.*, usando el formato de ensayo como se define en el Ejemplo 7 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0135] La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno que aumentan las presiones sanguíneas sistémicas (incluidas las presiones sistólica, diastólica, arterial media y de pulso) cuando se administran a ratones normotensos e hipotensos, en donde el aumento de las presiones sanguíneas sistémicas dura hasta aproximadamente 28 días tras la administración de una dosis única, *p. ej.*, como se describe en el Ejemplo 9 en el presente documento.

[0136] La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno que aumentan la presión arterial sistémica cuando se administran a ratones hipotensos inducidos por sobreexpresión de ANP, en donde el aumento en la presión arterial sistémica dura hasta aproximadamente 28 días tras la administración de una dosis única, *p. ej.*, como se describe en el Ejemplo 10 en el presente documento.

[0137] La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que aumentan la presión arterial sistémica en ratones hipotensos inducidos por LPS, como se describe en el Ejemplo 11 en el presente documento.

[0138] En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo recombinante aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína NPR1 en presencia o ausencia de ANP o BNP y reduce o bloquea la señalización y/o actividad de NPR1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo presenta una o más de las siguientes características: (a) es un anticuerpo monoclonal completamente humano; (b) se une a NPR1 humano a 25 °C y 37 °C con una constante de disociación (K_D) de menos de 1.7 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial; (c) se une a NPR1 de mono a 25 °C y 37 °C con una K_D de menos de 1.99 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial; (d) se une a NPR1 humano en presencia de ANP a 25 °C y 37 °C con

una K_D de menos de 1.52 nM, medida en un ensayo de resonancia de plasmón superficial; (e) inhibe la activación de NPR1 inducida por ligando, medida mediante ensayo de acumulación de cGMP; (f) se une a NPR1 humano en presencia o ausencia de ANP o BNP con una EC_{50} de menos de 2.9 nM, medida mediante inmunoensayo basado en electroquimioluminiscencia; (g) se une a NPR1 de mono en presencia o ausencia de ANP o BNP con una EC_{50} de menos de 4.2 nM, medida mediante inmunoensayo basado en electroquimioluminiscencia; (h) aumenta la presión arterial sistémica cuando se administra a ratones normotensos e hipotensos, en donde el aumento de la presión arterial sistémica dura hasta aproximadamente 28 días tras la administración de una dosis única; (i) aumenta la presión arterial sistémica cuando se administra a ratones hipotensos inducidos por sobreexpresión de ANP, en donde el aumento de la presión arterial sistémica dura hasta aproximadamente 28 días tras la administración de una dosis única; (j) aumenta la presión arterial sistémica en ratones hipotensos inducidos por LPS; y (k) comprende una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de HCVR enumeradas en la Tabla 1 y una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de LCVR enumeradas en la Tabla 1.

[0139] Los anticuerpos de la presente invención pueden poseer una o más de las características biológicas antes

mencionadas, o cualquier combinación de las mismas. Otras características biológicas de los anticuerpos de la presente invención serán evidentes para un experto en la técnica a partir de una revisión de la presente invención que incluye
5 los Ejemplos de trabajo en el presente documento.

Mapeo de epítomos y tecnologías relacionadas

[0140] La presente invención incluye anticuerpos antagonistas anti-NPR1 que interactúan con uno o más aminoácidos que se encuentran dentro de una o más regiones de
10 la molécula de proteína NPR1. El epítomo al que se unen los anticuerpos puede consistir en una única secuencia contigua de 3 o más (p. ej., 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos ubicados dentro de cualquiera de los dominios antes mencionados de la molécula de
15 proteína NPR1 (p. ej., un epítomo lineal en un dominio). Alternativamente, el epítomo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) ubicados dentro de uno o ambos de los dominios antes mencionados de la molécula de proteína (p. ej., un epítomo
20 conformacional).

[0141] Pueden usarse diversas técnicas conocidas por los expertos en la técnica para determinar si un anticuerpo "interactúa con uno o más aminoácidos" dentro de un polipéptido o proteína. Las técnicas ejemplares incluyen, por ejemplo,
25 ensayos de bloqueo cruzado de rutina, tales como el descrito

en Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Otros métodos incluyen análisis mutacional de barrido de alanina, análisis de transferencia de péptidos (Reineke, (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), estudios
5 cristalográficos de análisis de escisión de péptidos y análisis de RMN. Además, se pueden emplear métodos tales como escisión de epítomos, extracción de epítomos y modificación química de antígenos (Tomer, (2000) *Prot. Sci.* 9:487-496). Otro método que se puede utilizar para identificar los aminoácidos dentro
10 de un polipéptido con el que interactúa un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado mediante espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio implica marcar con deuterio la proteína de interés, seguido de la unión del anticuerpo a
15 la proteína marcada con deuterio. A continuación, el complejo proteína/anticuerpo se transfiere al agua y los protones intercambiables dentro de los aminoácidos que están protegidos por el complejo anticuerpo experimentan un retrointercambio de deuterio a hidrógeno a un ritmo más lento que los protones
20 intercambiables dentro de los aminoácidos que no forman parte de la interfaz. Como resultado, los aminoácidos que forman parte de la interfaz proteína/anticuerpo pueden retener deuterio y, por lo tanto, exhibir una masa relativamente mayor en comparación con los aminoácidos no incluidos en la interfaz.
25 Después de la disociación del anticuerpo, la proteína objetivo

se somete a escisión por proteasa y análisis de espectrometría de masas, revelando así los residuos marcados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que interactúa el anticuerpo. Véase, por ejemplo, Ehring, (1999)
5 *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen y Smith, (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

[0142] El término "epítopo" se refiere a un sitio en un antígeno al que responden las células B y/o T. Los epítomos de células B pueden formarse tanto a partir de aminoácidos
10 contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se retienen al exponerse a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítomos formados por plegamiento terciario
15 normalmente se pierden al tratar con disolventes desnaturizantes. Un epítopo normalmente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

[0143] El perfil asistido por modificación (MAP), también
20 conocido como perfil de anticuerpos basado en la estructura del antígeno (ASAP), es un método que clasifica una gran cantidad de anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos contra el mismo antígeno según las similitudes del perfil de unión de cada anticuerpo a superficies antigénicas modificadas química
25 o enzimáticamente (véase el documento US 2004/0101920,

incorporado específicamente en el presente documento como referencia en su totalidad). Cada categoría puede reflejar un epítopo único, ya sea claramente diferente o parcialmente superpuesto con el epítopo representado por otra categoría.

5 Esta tecnología permite un filtrado rápido de anticuerpos genéticamente idénticos, de modo que la caracterización pueda centrarse en anticuerpos genéticamente distintos. Cuando se aplica a la detección de hibridomas, MAP puede facilitar la identificación de clones de hibridomas raros que producen mAb

10 que tienen las características deseadas. Se puede usar MAP para clasificar los anticuerpos de la invención en grupos de anticuerpos que se unen a diferentes epítopos.

[0144] En determinadas modalidades, la presente invención incluye anticuerpos antagonistas anti-NPR1 y fragmentos de

15 unión a antígeno de los mismos que interactúan con uno o más epítopos que se encuentran dentro del dominio extracelular de NPR1. El o los epítopos pueden consistir en una o más secuencias contiguas de 3 o más (*p. ej.*, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos ubicados

20 dentro del dominio extracelular de NPR1. Alternativamente, el epítopo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos (o secuencias de aminoácidos) no contiguos ubicados dentro de NPR1.

[0145] La presente invención incluye anticuerpos anti-

25 NPR1 antagonista que se unen al mismo epítopo, o una porción

del epítopo, que cualquiera de los anticuerpos ejemplares
específicos enumerados en la Tabla 1. Asimismo, la presente
invención también incluye anticuerpos anti-NPR1 antagonista
que compiten por la unión a la proteína NPR1 o un fragmento de
5 la misma con cualquiera de los anticuerpos ejemplares
específicos enumerados en la Tabla 1. Por ejemplo, la presente
invención incluye anticuerpos anti-NPR1 antagonistas que
compiten de forma cruzada por la unión a la proteína NPR1 con
uno o más anticuerpos enumerados en la Tabla 1.

10 **[0146]** Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se
une al mismo epítopo que, un anticuerpo anti-NPR1 de referencia
o compite por unirse con él, mediante el uso de métodos
rutinarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, para
determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítopo
15 que un anticuerpo anti-NPR1 de referencia de la invención, se
permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína
o péptido NPR1 en condiciones de saturación. A continuación,
se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para unirse
a la molécula de proteína NPR1. Si el anticuerpo de prueba es
20 capaz de unirse a NPR1 después de la unión por saturación con
el anti-NPR1 de referencia anticuerpo, se puede concluir que
el anticuerpo de prueba se une a un epítopo diferente al del
anticuerpo anti-NPR1 de referencia. Por otro lado, si el
anticuerpo de prueba no es capaz de unirse a la proteína NPR1
25 después de la unión por saturación con el anticuerpo anti-NPR1

de referencia, entonces el anticuerpo de prueba puede unirse al mismo epítopo que el epítopo unido por el anticuerpo anti-NPR1 de referencia de la invención.

[0147] Para determinar si un anticuerpo compite por unirse con un anticuerpo anti-NPR1 de referencia, la metodología de unión descrita anteriormente se realiza en dos orientaciones: en una primera orientación, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína NPR1 en condiciones de saturación, seguido de la evaluación de la unión del anticuerpo de prueba a la molécula NPR1. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de prueba se una a una molécula de NPR1 en condiciones de saturación, seguido de una evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la molécula de NPR1. Si, en ambas orientaciones, sólo el primer anticuerpo (saturante) es capaz de unirse a la molécula NPR1, entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y el anticuerpo de referencia compiten por la unión a NPR1. Como apreciará un experto en la técnica, un anticuerpo que compite por unirse con un anticuerpo de referencia puede no necesariamente unirse al epítopo idéntico que el anticuerpo de referencia, pero puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia uniéndose a un epítopo superpuesto o adyacente.

[0148] Dos anticuerpos se unen al mismo epítopo o al epítopo superpuesto si cada uno inhibe (bloquea) competitivamente la unión del otro al antígeno. Es decir, un

exceso de 1, 5, 10, 20 o 100 veces de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos un 50%, pero preferiblemente un 75%, 90% o incluso un 99%, medido en un ensayo de unión competitiva (véase, p. ej., Junghans, et al., *Cancer Res.* 1990 50:1495-1502). Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítipos superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

[0149] Experimentos de rutina adicionales (p. ej., análisis de unión y mutación peptídica) para confirmar si la falta observada de unión del anticuerpo de prueba se debe en realidad a la unión al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Se pueden realizar experimentos de este tipo usando ELISA, RIA, resonancia de plasmón superficial, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión de anticuerpos cuantitativo o cualitativo disponible en la técnica.

[0150] En determinadas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína del receptor 1 del péptido natriurético (NPR1) y bloquea NPR1.

Inmunosconjugados

[0151] La invención abarca a un anticuerpo monoclonal anti-NPR1 antagonista de humano conjugado con un resto terapéutico ("inmunosconjugado"), para tratar una enfermedad o trastorno asociado a NPR1 (p. ej., hipotensión). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "inmunosconjugado" se refiere a un anticuerpo que está química o biológicamente unido a un agente radiactivo, una citocina, un interferón, una diana o fracción indicadora, una enzima, un péptido o proteína o un agente terapéutico. El anticuerpo puede estar unido al agente radiactivo, citoquina, interferón, fracción diana o informadora, enzima, péptido o agente terapéutico en cualquier ubicación a lo largo de la molécula siempre que sea capaz de unirse a su diana. Ejemplos de inmunosconjugados incluyen conjugados de fármaco-anticuerpo y proteínas de fusión anticuerpo-toxina. En una modalidad, el agente puede ser un segundo anticuerpo diferente contra la proteína NPR1. El tipo de fracción terapéutica que puede conjugarse con el anticuerpo anti-NPR1 y tendrá en cuenta la afección a tratar y el efecto terapéutico deseado a conseguir. En la técnica se conocen ejemplos de agentes adecuados para formar inmunosconjugados; véase, por ejemplo, el documento WO 05/103081.

Anticuerpos multiespecíficos

[0152] Los anticuerpos antagonistas de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o

multiespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido diana. Véase, por ejemplo, Tutt, et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer, et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244.

[0153] Cualquiera de las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la invención, o variantes de las mismas, se puede construir usando técnicas biológicas moleculares estándar (p. ej., ADN recombinante y tecnología de expresión de proteínas), como sabrá una persona con conocimientos habituales en la técnica.

[0154] En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de NPR1 se generan en un formato biespecífico (un "biespecífico") en el que regiones variables que se unen a dominios distintos de la proteína NPR1 se unen entre sí para conferir especificidad de dominio dual dentro de una única molécula de unión. Las regiones variables con especificidad por dominios individuales (p. ej., segmentos del dominio N-terminal), o que pueden unirse a diferentes regiones dentro de un dominio, se emparejan en un armazón estructural que permite que cada región se una simultáneamente a los epítomos separados, o a diferentes regiones dentro de un dominio. En un ejemplo de biespecífico, las regiones variables de cadena pesada (V_H) de un aglutinante con especificidad por un dominio

se recombinan con regiones variables de cadena ligera (V_L) de una serie de aglutinantes con especificidad por un segundo dominio para identificar compañeros V_L no cognados que pueden emparejarse con un V_H original sin alterar la especificidad original para ese V_H . De esta manera, un único segmento V_L (p. 5 ej., V_{L1}) se puede combinar con dos dominios V_H diferentes (p. ej., V_{H1} y V_{H2}) para generar un biespecífico compuesto de dos "brazos" de unión ($V_{H1}-V_{L1}$ y $V_{H2}-V_{L1}$). El uso de un único segmento V_L reduce la complejidad del sistema y, por lo tanto, 10 simplifica y aumenta la eficiencia en los procesos de clonación, expresión y purificación utilizados para generar el biespecífico (véanse, por ejemplo, US2011/0195454 y US2010/0331527).

[0155] Alternativamente, pueden prepararse anticuerpos 15 que se unen a más de un dominio y una segunda diana, tales como, entre otros, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-NPR1 diferente, en un formato biespecífico usando técnicas descritas en el presente documento, u otras técnicas conocidas por los expertos. Las regiones variables de anticuerpos que se 20 unen a distintas regiones pueden unirse con regiones variables que se unen a sitios relevantes en, por ejemplo, el dominio extracelular de NPR1, para conferir especificidad de antígeno dual dentro de una única molécula de unión. Los biespecíficos de esta naturaleza diseñados adecuadamente cumplen una doble 25 función. Las regiones variables con especificidad por el

dominio extracelular se combinan con una región variable con especificidad por fuera del dominio extracelular y se emparejan en un armazón estructural que permite que cada región variable se una a antígenos separados.

5 **[0156]** Otros formatos biespecíficos ejemplares que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, *por ejemplo*, formatos biespecíficos basados en scFv o diacuerpos, fusiones IgG-scFv, dominio variable dual (DVD)-Ig, Quadroma, botón en ojal (knobs-into-holes), cadena
10 ligera común (*p. ej.*, cadena ligera común con botón en ojal, etc.), CrossMab, CrossFab, cuerpo (SEED), cremallera de leucina, Duobody, IgG1/IgG2, Fab de doble acción (DAF)-IgG y formatos biespecíficos de Mab² (*ver, p. ej.*, Klein, *et al.*, 2012, mAbs 4:6, 1-11, y las referencias citadas allí, para una
15 revisión de los formatos anteriores). Los anticuerpos biespecíficos también se pueden construir usando conjugación de péptido/ácido nucleico, *p. ej.*, en donde se usan aminoácidos no naturales con reactividad química ortogonal para generar conjugados de anticuerpo-oligonucleótido específicos de sitio
20 que luego se autoensamblan en complejos multiméricos con composición, valencia y geometría definidas. (*Ver, p. ej.*, Kazane, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Publicación electrónica: 4 de diciembre de 2012]).

Administración Terapéutica y Formulaciones

[0157] La invención proporciona composiciones terapéuticas que comprenden anticuerpos anti-NPR1 antagonistas o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente
5 invención. Las composiciones terapéuticas de acuerdo con la invención se administrarán con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan a las formulaciones para proporcionar transferencia, administración, tolerancia y similares mejorados. Se puede encontrar una multitud de
10 formulaciones apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que
15 contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones de carbowax (polietilenglicoles de distintos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax.
20 Véase también, Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

[0158] La dosis de anticuerpo puede variar dependiendo de la edad y el tamaño del sujeto al que se va a administrar, la
25 enfermedad diana, las condiciones, la vía de administración y

similares. Cuando se usa un anticuerpo de la presente invención para tratar una enfermedad o trastorno en un paciente adulto, o para prevenir dicha enfermedad, es ventajoso administrar el anticuerpo de la presente invención normalmente en una dosis
5 única de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En una modalidad, el anticuerpo según la invención se administra en una dosis única de aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal. Dependiendo de la gravedad de la afección, se puede ajustar la frecuencia y la duración del
10 tratamiento. En determinadas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se puede administrar como una dosis inicial de al menos alrededor de 0.1 mg a aproximadamente 800 mg, alrededor de 1 a aproximadamente 600 mg, alrededor de 5 a aproximadamente 500
15 mg, alrededor de 10 a aproximadamente 400 mg, o aproximadamente 100 mg. En ciertas modalidades, la dosis inicial puede ir seguida de la administración de una segunda o una pluralidad de dosis posteriores del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo en una cantidad que puede ser
20 aproximadamente igual o menor que la de la dosis inicial, en donde las dosis posteriores están separadas por al menos 1 día a 3 días; al menos una semana, al menos 2 semanas; al menos 3 semanas; al menos 4 semanas; al menos 5 semanas; al menos 6 semanas; al menos 7 semanas; al menos 8 semanas; al menos 9

semanas; al menos 10 semanas; al menos 12 semanas; o al menos 14 semanas.

[0159] Se conocen varios sistemas de administración y pueden usarse para administrar la composición farmacéutica de la invención, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptores (ver, por ejemplo, Wu, et al., (1987) *J. Biol.* 262:4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, entre otros, vía intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición se puede administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. La composición farmacéutica también puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase, por ejemplo, Langer, (1990) *Science* 249:1527-1533).

[0160] También se contempla en el presente documento el uso de nanopartículas para administrar los anticuerpos de la presente invención. Las nanopartículas conjugadas con anticuerpos pueden usarse tanto para aplicaciones terapéuticas como de diagnóstico. Las nanopartículas conjugadas con

anticuerpos y los métodos de preparación y uso se describen en detalle en Arruebo, M., et al., 2009 ("Nanopartículas conjugadas con anticuerpos para aplicaciones biomédicas" en *J. Nanomat.* Volumen 2009, ID de artículo 439389, 24 páginas, doi: 10.1155/2009/439389), incorporado en el presente documento como referencia. Las nanopartículas se pueden desarrollar y conjugar con anticuerpos contenidos en composiciones farmacéuticas para atacar células. También se han descrito nanopartículas para la administración de fármacos, por ejemplo, en los documentos US 8257740 o US 8246995, cada uno incorporado en el presente documento en su totalidad.

[0161] En determinadas situaciones, la composición farmacéutica se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, se puede utilizar una bomba. En otra modalidad, se pueden usar materiales poliméricos. En otra modalidad más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca del objetivo de la composición, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica.

[0162] Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracraneales, intraperitoneales e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse mediante métodos públicamente conocidos.

[0163] Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y jeringa estándar. Además, con respecto a la administración subcutánea, un dispositivo de administración en forma de pluma tiene fácilmente aplicaciones para administrar una composición farmacéutica de la presente invención. Un dispositivo de suministro de pluma de este tipo puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de administración de pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y el cartucho está vacío, el cartucho vacío se puede desechar fácilmente y reemplazar con un cartucho nuevo que contiene la composición farmacéutica. Entonces se puede reutilizar el dispositivo de entrega de la pluma. En un dispositivo dispensador de pluma desechable, no hay ningún cartucho reemplazable. Más bien, el dispositivo de administración de pluma desechable viene precargado con la composición farmacéutica mantenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que se vacía el depósito de la composición farmacéutica, se desecha todo el dispositivo.

[0164] Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para adaptarse a una dosis de los ingredientes activos. Dichas

formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad de anticuerpo contenida es generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg por forma de dosificación en una dosis unitaria; especialmente en la forma de inyección, se prefiere que el anticuerpo esté contenido en aproximadamente 5 a aproximadamente 300 mg y en aproximadamente 10 a aproximadamente 300 mg para las otras formas de dosificación.

10 **Usos terapéuticos de los anticuerpos**

[0165] Los anticuerpos antagonistas de la presente invención son útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastorno o afección asociada con NPR1 y/o para mejorar al menos un síntoma asociado con dicha enfermedad, trastorno o afección. En determinadas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se puede administrar en una dosis terapéutica a un paciente con una enfermedad o trastorno o afección asociada con NPR1.

20 **[0166]** El trastorno o enfermedad puede incluir hipotensión y/o un trastorno o enfermedad asociada con hipotensión y/o hipotensión asociada con una enfermedad o trastorno, por ejemplo, shock circulatorio, shock séptico y enfermedad neurodegenerativa. La hipotensión es una
25 disminución de la presión arterial sistémica por debajo de los

valores bajos aceptados. La hipotensión existe como un rango, sin un valor hipotensor estándar aceptado, pero las presiones inferiores a 90 mm Hg (sistólica)/60 mm Hg (diastólica) se reconocen como hipotensivas. Los síntomas de hipotensión pueden

5 incluir, entre otros, aturdimiento, mareos, síncope, dolor en el pecho, dificultad para respirar, latidos cardíacos irregulares, temperatura corporal elevada, dolor de cabeza, rigidez en el cuello, dolor severo en la parte superior de la espalda, tos con esputo, diarrea, vómitos, disuria, reacciones

10 alérgicas, fatiga y aberraciones de la visión. Las complicaciones de la hipotensión no tratada con gasto cardíaco deficiente son graves y, en última instancia, pueden provocar la muerte. En caso de shock inminente o shock fulminante, la hipotensión no tratada puede provocar una falla multiorgánica

15 (Sharma, et al., actualizado en 2021, *Hypotension*, disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499961/>). En una modalidad, un anticuerpo anti-NPR1 antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención se usa para tratar un síntoma o una indicación de un tipo de

20 hipotensión. En otra modalidad, un anticuerpo anti-NPR1 antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención se usa para aumentar la presión sanguínea de un sujeto que tiene hipotensión y/o que tiene una enfermedad o trastorno asociado con hipotensión.

[0167] El shock séptico se caracteriza por hipotensión refractaria, que provoca una perfusión inadecuada de los tejidos y se asocia con altas tasas de mortalidad. El tratamiento estándar para la sepsis asociada a hipotensión es la administración de vasopresores, como catecolaminas o miméticos, vasopresina o Ang II, para mantener la presión arterial y las concentraciones séricas de lactato en ausencia de hipovolemia. Sin embargo, los vasopresores estándar de atención tienen inconvenientes importantes, que incluyen la necesidad de ajustar la dosis con frecuencia, tener un rango terapéutico estrecho, requerir acceso venoso central y atención en la UCI, y posiblemente incluso reducir la perfusión capilar (que causa isquemia tisular (por ejemplo, necrosis digital) en dosis altas prolongadas). Por lo tanto, sigue existiendo una importante necesidad insatisfecha de abordar la hipotensión (refractaria). En una modalidad, un anticuerpo anti-NPR1 antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención se usa para tratar un síntoma o una indicación de shock séptico, o para tratar la hipotensión refractaria del shock séptico. En otra modalidad, el uso de un anticuerpo anti-NPR1 antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención para tratar el shock séptico, o para tratar la hipotensión refractaria del shock séptico, permite un uso reducido de vasopresores. Como resultado, se requiere una

duración reducida de la estancia en la unidad de cuidados intensivos (UCI).

[0168] La hipotensión ortostática neurogénica constituye hipotensión en la posición erguida (la presión arterial cae al estar de pie, lo que provoca hipoperfusión cerebral) y generalmente se debe a defectos en los reflejos autónomos asociados con enfermedades neurodegenerativas. Complica múltiples enfermedades y se asocia con una morbilidad significativa, con un impacto de los síntomas en las actividades diarias clasificado como grave o muy grave en casi el 50% de los pacientes. Las dos terapias farmacológicas actualmente aprobadas tienen sólo una eficacia modesta, ya que ambas son de acción corta y requieren dosificación tres veces al día (TID). En una modalidad, se usa un anticuerpo anti-NPR1 antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención para tratar la hipotensión ortostática neurogénica.

[0169] El trastorno o enfermedad también puede incluir el síndrome de taquicardia ortostática postural (POTS). Este síndrome se caracteriza por taquicardia más síntomas en posición erguida, aunque sin hipotensión. En POTS, se registra en adultos un aumento de la frecuencia cardíaca desde la posición horizontal hasta la posición de pie (o según lo probado en una mesa inclinada) de al menos 30 latidos por minuto, medido durante los primeros 10 minutos de pie. El POTS

suele afectar a mujeres jóvenes y causa una morbilidad significativa. Los síntomas que ocurren al ponerse de pie incluyen aturdimiento, temblores, palpitaciones, debilidad, fatiga, visión borrosa, síncope ocasional y similares. Más del
5 80% de los pacientes con POTS informan una calidad de vida significativamente reducida. Si bien se utilizan habitualmente fludrocortisona, midodrina y betabloqueantes, no han demostrado una eficacia terapéutica significativa; de hecho, actualmente la FDA no ha aprobado ningún medicamento específico
10 para tratar el POTS. En una modalidad, se usa un anticuerpo anti-NPR1 antagonista o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención para tratar POTS.

[0170] En ciertas modalidades, los anticuerpos antagonistas de la presente invención son útiles para tratar o
15 prevenir al menos un síntoma o indicación de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en hipotensión, shock circulatorio, shock séptico, hipotensión ortostática neurogénica, síndrome de taquicardia ortostática postural. (POTS), insuficiencia cardíaca, shock cardiogénico, obesidad,
20 insuficiencia renal, enfermedad renal crónica, edema macular, glaucoma, accidente cerebrovascular, trastornos pulmonares, fibrosis pulmonar, inflamación, asma, trastornos del crecimiento esquelético, fracturas óseas, diabetes, hipoglucemia y cáncer.

[0171] También se contempla en el presente documento usar uno o más anticuerpos de la presente invención de forma profiláctica en sujetos con riesgo de sufrir una enfermedad o trastorno asociado a NPR1.

5 [0172] En una modalidad de la invención, los presentes anticuerpos se usan para la preparación de una composición farmacéutica o medicamento para tratar pacientes que padecen una enfermedad, trastorno o afección presentada en el presente documento. En otra modalidad de la invención, los presentes
10 anticuerpos se usan como terapia complementaria con cualquier otro agente o cualquier otra terapia conocida por los expertos en la técnica útil para tratar o mejorar una enfermedad, trastorno o afección presentada en el presente documento.

Terapias combinadas

15 [0173] Las terapias combinadas pueden incluir un anticuerpo antagonista de la invención y cualquier agente terapéutico adicional que pueda combinarse ventajosamente con un anticuerpo de la invención, o con un fragmento biológicamente activo de un anticuerpo de la invención. Los
20 anticuerpos de la presente invención se pueden combinar sinérgicamente con uno o más fármacos o terapias utilizadas para tratar una enfermedad o trastorno asociado a NPR1, incluida la hipotensión. En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención se pueden combinar con un segundo

agente terapéutico o terapia para mejorar uno o más síntomas de dicha enfermedad o afección.

[0174] Dependiendo de la enfermedad, trastorno o afección, los anticuerpos de la presente invención se pueden
5 usar en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales que incluyen, entre otros, un inhibidor de la angiogénesis, un vasoconstrictor/vasopresor, un inmunosupresor, ácido ascórbico, un inhibidor de la calcineurina, un corticosteroide, un inhibidor de VEGF, un
10 descongestionante, un antidepresivo, un anticonceptivo hormonal, un estimulante (incluido un estimulante cardíaco), cafeína, oxigenación por membrana extracorpórea, un dispositivo de asistencia ventricular, un balón de contrapulsación intraaórtico, una modificación del estilo de
15 vida, un suplemento dietético, un fármaco antimicrobiano, insulina y un fármaco antiinflamatorio.

[0175] Como se usa en el presente documento, el término "en combinación con" significa que se pueden administrar componentes terapéuticamente activos adicionales antes,
20 simultáneamente o después de la administración del anticuerpo antagonista anti-NPR1 de la presente invención. El término "en combinación con" también incluye la administración secuencial o concomitante de un anticuerpo anti-NPR1 y un segundo agente terapéutico o terapia.

[0176] Los componentes terapéuticamente activos adicionales pueden administrarse a un sujeto antes de la administración de un anticuerpo anti-NPR1 de la presente invención. Por ejemplo, se puede considerar que un primer
5 componente se administra "antes de" un segundo componente si el primer componente se administra 1 semana antes, 72 horas antes, 60 horas antes, 48 horas antes, 36 horas antes, 24 horas antes, 12 horas antes, 6 horas antes, 5 horas antes, 4 horas antes, 3 horas antes, 2 horas antes, 1 hora antes, 30 minutos
10 antes o menos de 30 minutos antes de la administración del segundo componente. En otras modalidades, el componente o componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto después de la administración de un anticuerpo anti-NPR1 de la presente invención. Por ejemplo, se
15 puede considerar que un primer componente se administra "después" de un segundo componente si el primer componente se administra 30 minutos después, 1 hora después, 2 horas después, 3 horas después, 4 horas después, 5 horas después, 6 horas después, 12 horas después, 24 horas después, 36 horas después,
20 48 horas después, 60 horas después, 72 horas después o más de la administración del segundo componente. Aún en otras modalidades, el componente o componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto simultáneamente con la administración de un anticuerpo anti-
25 NPR1 de la presente invención. La administración "concurrente",

para los fines de la presente invención, incluye, *p. ej.*, la administración de un anticuerpo anti-NPR1 y un componente terapéuticamente activo adicional a un sujeto en una forma de dosificación única, o en formas de dosificación separadas administradas al sujeto dentro de aproximadamente 30 minutos o 5 menos uno del otro. Si se administra en formas de dosificación separadas, cada forma de dosificación se puede administrar por la misma vía (*p. ej.*, tanto el anticuerpo anti-NPR1 como el componente terapéuticamente activo adicional se pueden 10 administrar por vía intravenosa, etc.); alternativamente, cada forma de dosificación puede administrarse a través de una ruta diferente (*p. ej.*, el anticuerpo anti-NPR1 puede administrarse por vía intravenosa y el componente terapéuticamente activo adicional puede administrarse por vía oral). En cualquier caso, 15 la administración de los componentes en una dosis única, en formas de dosificación separadas por la misma ruta o en formas de dosificación separadas por rutas diferentes se considera "administración concurrente" para los fines de la presente invención. Para propósitos de la presente invención, la 20 administración de un anticuerpo anti-NPR1 "antes", "concurrente con" o "después" (como se definen esos términos en el presente documento anteriormente) de la administración de un componente terapéuticamente activo adicional se considera la administración de un anticuerpo anti-NPR1 "en combinación 25 con" un componente terapéuticamente activo adicional.

[0177] La presente invención incluye composiciones farmacéuticas en las que un anticuerpo anti-NPR1 de la presente invención se coformula con uno o más de los componentes terapéuticamente activos adicionales como se describe en otra
5 parte del presente documento.

Usos diagnósticos de los anticuerpos

[0178] Los anticuerpos antagonistas de la presente invención se pueden usar para detectar y/o medir NPR1 en una muestra, *por ejemplo*, con fines de diagnóstico. Algunas
10 modalidades contemplan el uso de uno o más anticuerpos de la presente invención en ensayos para detectar una enfermedad o trastorno asociado a NPR1. Los ensayos de diagnóstico ejemplares para NPR1 pueden comprender, *p. ej.*, poner en contacto una muestra, obtenida de un paciente, con un
15 anticuerpo anti-NPR1 de la invención, en el que el anticuerpo anti-NPR1 se marca con una etiqueta detectable o una molécula indicadora o se usa como ligando de captura para aislar selectivamente NPR1 de muestras de pacientes. Alternativamente, un anticuerpo anti-NPR1 no marcado se puede
20 utilizar en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que el mismo está marcado de forma detectable. El marcador detectable o molécula informadora puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I ; un resto fluorescente o quimioluminiscente tal como isotiocianato de
25 fluoresceína o rodamina; o una enzima tal como fosfatasa

alcalina, β -galactosidasa, peroxidasa de rábano picante o luciferasa. Los ensayos ejemplares específicos que se pueden usar para detectar o medir NPR1 en una muestra incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

[0179] Las muestras que se pueden usar en ensayos de diagnóstico de NPR1 según la presente invención incluyen cualquier muestra de tejido o fluido que se pueda obtener de un paciente, que contenga cantidades detectables de proteína NPR1, o fragmentos de la misma, en condiciones normales o patológicas. Generalmente, los niveles de proteína NPR1 en una muestra particular obtenida de un paciente sano (p. ej., un paciente que no padece una enfermedad asociada con NPR1) se medirán para establecer inicialmente un nivel inicial o estándar de NPR1. Este nivel inicial de NPR1 puede luego compararse con los niveles de NPR1 medidos en muestras obtenidas de individuos sospechosos de tener una afección asociada a NPR1, o síntomas asociados con dicha afección.

[0180] Los anticuerpos específicos para la proteína NPR1 pueden no contener marcadores o restos adicionales, o pueden contener un marcador o resto N-terminal o C-terminal. En una modalidad, el marcador o resto es biotina. En un ensayo de unión, la ubicación de un marcador (si lo hay) puede determinar la orientación del péptido con respecto a la superficie sobre

la que se une el péptido. Por ejemplo, si una superficie está recubierta con avidina, un péptido que contiene una biotina N-terminal se orientará de manera que la porción C-terminal del péptido estará distal a la superficie.

5

EJEMPLOS

[0181] Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una invención y una descripción completas de cómo elaborar y utilizar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han hecho esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados, la temperatura ambiente es aproximadamente 25 °C y la presión es atmosférica o cercana.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos humanos contra el receptor 1 del péptido natriurético (NPR1)

[0182] Se generaron anticuerpos humanos contra la proteína NPR1 en un ratón VELOCIMMUNE® que comprendía ADN que codifica regiones variables de cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana. Los ratones fueron inmunizados con NPR1 humano y ADN de ANP de ratón mediante administración

hidrodinámica de ADN y reforzados con el dominio extracelular de la proteína NPR1 humana complejada con ANP de ratón.

[0183] La respuesta inmune de los anticuerpos se controló mediante un inmunoensayo específico de NPR1. Cuando se logró la respuesta inmune deseada, se recolectaron esplenocitos y se fusionaron con células de mieloma de ratón para preservar su viabilidad y formar líneas celulares de hibridoma. Las líneas celulares de hibridoma se examinaron y seleccionaron para identificar líneas celulares que producen anticuerpos específicos de NPR1. Las líneas celulares se usaron para obtener varios anticuerpos quiméricos anti-NPR1 (*es decir*, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes de ratón).

[0184] Los anticuerpos anti-NPR1 también se aislaron directamente de células B de ratón positivas para antígeno sin fusión con células de mieloma, como se describe en la patente de EE.UU. núm. 7,582,298, incorporada específicamente en el presente documento como referencia en su totalidad. Usando este método, se obtuvieron varios anticuerpos anti-NPR1 completamente humanos (*es decir*, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes humanos).

[0185] Los anticuerpos ejemplares generados como se describe anteriormente se denominaron mAb38067, mAb38072, mAb38090 y mAb22034.

[0186] Las propiedades biológicas de los anticuerpos ejemplares generados de acuerdo con los métodos de este Ejemplo se describen en detalle en los Ejemplos establecidos a continuación.

5 **Ejemplo 2: Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de región variable de cadena pesada y ligera**

[0187] La Tabla 1 establece los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera y las CDR de anticuerpos anti-NPR1
10 seleccionados de la invención.

Tabla 1: Identificadores de secuencia de aminoácidos

	SEQ ID NO:							
Designación de anticuerpos	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb38067	2	4	6	8	10	12	AAS	16
mAb38072	22	24	26	28	30	12	AAS	32
mAb38090	38	40	42	44	46	48	AAS	16
mAb22034	55	57	59	61	63	65	GAS	69

[0188] Los identificadores de secuencia de ácido nucleico correspondientes se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2: Identificadores de secuencia de ácidos nucleicos

Designación de anticuerpos	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
mAb38067	1	3	5	7	9	11	gctgc atcc	15
mAb38072	21	23	25	27	29	11	gctgc atcc	31
mAb38090	37	39	41	43	45	47	gctgc atcc	49
mAb22034	54	56	58	60	62	64	ggcgc atcc	68

[0189] Los anticuerpos a los que se hace referencia en el presente documento normalmente tienen regiones variables completamente humanas, pero pueden tener regiones constantes humanas o de ratón. Como apreciará un experto en la técnica, un anticuerpo que tiene un isotipo Fc particular se puede convertir en un anticuerpo con un isotipo Fc diferente (*p. ej.*, un anticuerpo con un Fc IgG1 de ratón se puede convertir en un anticuerpo con un IgG1 humana o IgG4 humana, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (incluidas las CDR), que se indican mediante los identificadores numéricos que se muestran en la Tabla 1, seguirán siendo los mismos y se espera que las propiedades de unión al antígeno sean idénticas o sustancialmente similares independientemente de la naturaleza del dominio Fc.

[0190] En determinadas modalidades, los anticuerpos seleccionados con un Fc de IgG1 de ratón se convierten en anticuerpos con Fc de IgG4 humano. En una modalidad, el dominio Fc de IgG4 comprende 2 o más cambios de aminoácidos como se describe en el documento US20100331527. En una modalidad, el Fc de IgG4 humana comprende una mutación de serina a prolina en la región bisagra (S108P) para promover la estabilización del dímero. A menos que se indique lo contrario, todos los anticuerpos usados en los siguientes ejemplos comprenden un isotipo IgG4 humano.

[0191] Los anticuerpos ejemplares mAb38067, mAb38072, mAb38090 y mAb22034 que comprenden un Fc de IgG4 humano que comprende una mutación de serina a prolina en la región bisagra (S108P) se designaron como REGN7541, REGN7544, REGN7548 y H4H22034 respectivamente. La Tabla 3 establece los identificadores de secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de las secuencias de cadenas pesadas y ligeras de longitud completa de estos anticuerpos.

Tabla 3: Identificadores de secuencia de cadena pesada y cadena ligera de longitud completa

ID de anticuerpos	Nombre de anticuerpo	SEQ ID NO:			
		HC		LC	
		ADN	PEP	ADN	PEP
mAb38067	REGN7541	17	18	19	20
mAb38072	REGN7544	33	34	35	36
mAb38090	REGN7548	50	51	52	53

mAb22034	H4H22034	70	71	72	73
----------	----------	----	----	----	----

Construcciones de control utilizadas en los siguientes ejemplos

[0192] La siguiente construcción de control (anticuerpo anti-NPR1) se incluyó en los experimentos descritos en el presente documento, con fines comparativos: "Comparador 1", un anticuerpo monoclonal contra NPR1 humano que tiene secuencias VH/VL del anticuerpo "mAb5591" de acuerdo con la patente de EE.UU. núm. 20120114659 (Morphosys).

Ejemplo 3: Cinética de unión de Biacore de anticuerpos monoclonales anti-NPR1 que se unen a diversos reactivos de NPR1 medidos a 25°C y 37°C

Procedimiento experimental

[0193] La constante de disociación de equilibrio (K_D) para diferentes reactivos NPR1 que se unen a anticuerpos monoclonales (mAb) anti-NPR1 purificados se determinó utilizando un biosensor Biacore 8k basado en resonancia de plasmón superficial (SPR) en tiempo real. Todos los estudios de unión se realizaron en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tampón de surfactante P20 al 0.05% v/v, pH 7.4 (HBS-EP) a 25 °C y 37 °C. La superficie del chip sensor Biacore CM5 se derivatizó por primera vez mediante acoplamiento de amina con un anticuerpo específico anti-Fc humano para capturar mAb anti-NPR1. Se realizaron estudios de unión en el dominio

extracelular NPR1 humano expresado con una myc-myc-hexahistidina C-terminal (hNPR1-MMH; SEQ ID NO: 74), el dominio extracelular NPR1 de mono expresado con una myc-myc-hexahistidina C-terminal (mfNPR1-MMH; SEQ ID NO:75), dominio
 5 extracelular NPR1 de ratón expresado con un myc-myc-hexahistidina C-terminal (mNPR1-MMH; SEQ ID NO:76), dominio extracelular NPR1 de perro expresado con un myc-myc-C-terminal hexahistidina (dog_NPR1-MMH; SEQ ID NO:77), dominio extracelular NPR1 de cerdo expresado con una myc-myc-
 10 hexahistidina C-terminal (pig_NPR1-MMH; SEQ ID NO:78) y hNPR1-MMH + 10x hANP.

[0194] Diferentes concentraciones (40 nM - 0.625 nM, diluciones en serie de 4 veces) de hNPR1-MMH, mfNPR1-MMH, hNPR1-MMH en presencia de una concentración de 10 veces de
 15 hANP, o una concentración fija (40 nM) de mNPR1-MMH, dog_NPR1-MMH, pig_NPR1-MMH se prepararon en tampón de ejecución HBS-EP y luego se inyectaron durante 150 segundos a un caudal de 30 μ l/min, mientras que la disociación de mAb unidos a diferentes reactivos NPR1 se monitoreó durante 30 minutos en tampón de
 20 ejecución HBS-EP. Al final de cada ciclo, la superficie de captura de mAb anti-NPR1 se regeneró utilizando una inyección de 12 segundos de ácido fosfórico 10 mM. La tasa de asociación (k_a) y la tasa de disociación (k_d) se determinaron ajustando los sensogramas de unión en tiempo real a un modelo de unión
 25 1:1 con limitación de transporte masivo utilizando el software

de evaluación Biacore insight. La constante de equilibrio de disociación de unión (K_D) y la vida media disociativa ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de las tasas cinéticas como:

$$K_D \text{ (M)} = \frac{k_d}{k_a}, \text{ y } t_{1/2} \text{ (min)} = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

5 Los parámetros de cinética de unión para diferentes reactivos de NPR1 que se unen a diferentes mAb anti-NPR1 de la invención a 25 °C y 37 °C se muestran en las Tablas 4 a 15.

Resultados

10 **[0195]** A 25 °C, los anticuerpos monoclonales anti-NPR1 se unieron a hNPR1-MMH con valores de K_D que oscilaban entre 47.4 pM y 1.27 nM, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb anti-NPR1 a hNPR1-MMH a 25 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	40 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H22034N	59 ± 0.4	34	3.26E+05	4.15E-04	1.27E-09	28
REGN7541	59 ± 0.2	26	2.02E+05	6.80E-05	3.36E-10	170
REGN7544	60 ± 0.4	29	2.81E+05	1.33E-05	4.74E-11	868
REGN7548	59 ± 0.3	38	4.22E+05	3.40E-05	8.06E-11	340
Control de isotipo	59 ± 0.1	0	NB*	NB	NB	NB

*NB = no se detectó unión

[0196] A 37°C, los anticuerpos monoclonales anti-NPR1 se unieron a hNPR1-MMH con valores de K_D que oscilaban entre 57,4 pM y 1,7 nM, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb anti-NPR1 a hNPR1-MMH a 37 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	40 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t^{1/2}$ (min)
H4H22034N	71 ± 0.3	44	6.26E+05	1.06E-03	1.70E-09	11
REGN7541	69 ± 0.4	41	7.47E+05	1.34E-04	1.79E-10	86
REGN7544	72 ± 0.2	43	5.69E+05	3.27E-05	5.74E-11	353
REGN7548	71 ± 0.3	50	7.77E+05	6.60E-05	8.49E-11	175
Control de isotipo	73 ± 0.1	0	NB*	NB	NB	NB

*NB = no se detectó unión

[0197] A 25 °C, los anticuerpos monoclonales anti-NPR1 se unieron a mfNPR1-MMH con valores de K_D que oscilaban entre 69 pM y 1.23 nM, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb anti-NPR1 a mfNPR1-MMH a 25 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	40 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t^{1/2}$ (min)
H4H22034N	59 ± 0.4	33	3.18E+05	3.92E-04	1.23E-09	29
REGN7541	59 ± 0.2	26	2.11E+05	6.71E-05	3.18E-10	172

REGN7544	60 ± 0.1	29	2.79E+05	2.02E-05	7.25E-11	571
REGN7548	59 ± 0.2	38	4.19E+05	2.89E-05	6.90E-11	399
Control de isotipo	59 ± 0.1	1	NB*	NB	NB	NB

*NB = no se detectó unión

[0198] A 37°C, los anticuerpos monoclonales anti-NPR1 se unieron a mfNPR1-MMH con valores de K_D que oscilaban entre 53.6 pM y 1.99 nM, como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb anti-NPR1 a mfNPR1-MMH a 37 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	40 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H22034N	71 ± 0.3	37	5.04E+05	1.00E-03	1.99E-09	12
REGN7541	69 ± 0.4	36	6.63E+05	1.04E-04	1.57E-10	111
REGN7544	72 ± 0.1	36	5.48E+05	2.94E-05	5.36E-11	393
REGN7548	71 ± 0.2	39	6.62E+05	6.49E-05	9.81E-11	178
control de isotipos	72 ± 0.1	0	NB*	NB	NB	NB

*NB = no se detectó unión

10 [0199] A 25°C, los anticuerpos monoclonales anti-NPR1 se unieron a hNPR1-MMH en presencia de una concentración de hANP de 10 veces con valores de K_D que oscilaban entre 78.8 pM y 500 pM, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb anti-NPR1 a hNPR1-MMH en presencia de una concentración de 10 veces de hANP a 25 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	40 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H22034N	60 ± 0.2	35	3.46E+05	1.73E-04	5.00E-10	67
REGN7541	60 ± 0.2	23	2.19E+05	6.07E-05	2.77E-10	190
REGN7544	59 ± 0	26	2.61E+05	4.83E-05	1.85E-10	239
REGN7548	61 ± 0	39	5.52E+05	4.35E-05	7.88E-11	266
control de isotipo	57 ± 0.2	0	NB*	NB	NB	NB

*NB = no se detectó unión

5

[0200] A 37°C, los anticuerpos monoclonales anti-NPR1 se unieron a hNPR1-MMH en presencia de una concentración de hANP de 10 veces con valores de K_D que oscilaban entre 642 pM y 1.52 nM, como se muestra en la Tabla 9.

10

Tabla 9: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb anti-NPR1 a hNPR1-MMH en presencia de una concentración de 10 veces de hANP a 37 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	40 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H22034N	75 ± 0.2	42	4.71E+05	7.17E-04	1.52E-09	16

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	40 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
REGN7541	72 ± 0.2	32	3.49E+05	3.78E-04	1.08E-09	31
REGN7544	69 ± 0.2	34	4.26E+05	3.51E-04	8.25E-10	33
REGN7548	75 ± 0.1	42	5.93E+05	3.80E-04	6.42E-10	30
control de isotipo	69 ± 0.1	0	NB*	NB	NB	NB

*NB = no se detectó unión

[0201] A 25 °C, solo dos anticuerpos monoclonales anti-NPR1 se unieron a pig_NPR1-MMH con valores de K_D que oscilaban entre 35.8 nM y 122 nM, como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb anti-NPR1 a pig_NPR1-MMH a 25 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	40 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H22034N	60 ± 0.1	0	NB	NB	NB	NB
REGN7541	60 ± 0	0	NB	NB	NB	NB
REGN7544	59 ± 0.1	2	5.58E+04	6.79E-03	1.22E-07	1.7
REGN7548	61 ± 0.1	11	1.19E+05	4.27E-03	3.58E-08	2.7
control de isotipo	57 ± 0	0	NB*	NB	NB	NB

*NB = no se detectó unión

[0202] A 37°C, solo dos anticuerpos monoclonales anti-NPR1 se unieron a pig_NPR1-MMH con valores de KD que oscilaban entre 42.1 nM y 98.1 nM, como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb

5 **anti-NPR1 a pig_NPR1-MMH a 37 °C**

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	40 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H22034N	75 ± 0	0	NB	NB	NB	NB
REGN7541	73 ± 0	0	NB	NB	NB	NB
REGN7544	69 ± 0.3	5	9.65E+04	9.47E-03	9.81E-08	1.2
REGN7548	75 ± 0.1	14	2.20E+05	9.27E-03	4.21E-08	1.2
control de isotipo	69 ± 0.1	0	NB*	NB	NB	NB

*NB = no se detectó unión

[0203] A 25 °C o a 37 °C, ninguno de los anticuerpos monoclonales anti-NPR1 se unió a mNPR1-MMH como se muestra en la Tabla 12 y la Tabla 13, respectivamente.

Tabla 12: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb

10 **anti-NPR1 a mNPR1-MMH a 25 °C**

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	40 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H22034N	60	0	NB	NB	NB	NB
REGN7541	60	0	NB	NB	NB	NB

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	40 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
REGN7544	59	0	NB	NB	NB	NB
REGN7548	61	0	NB	NB	NB	NB
control de isotipo	57	0	NB*	NB	NB	NB

*NB = no se detectó unión

Tabla 13: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb anti-NPR1 a mNPR1-MMH a 37 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	40 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H22034N	75	0	NB	NB	NB	NB
REGN7541	73	0	NB	NB	NB	NB
REGN7544	69	0	NB	NB	NB	NB
REGN7548	75	0	NB	NB	NB	NB
control de isotipo	69	0	NB*	NB	NB	NB

5

*NB = no se detectó unión

[0204] A 25 °C o a 37 °C, ninguno de los anticuerpos monoclonales anti-NPR1 se unió a dog_NPR1-MMH como se muestra en la Tabla 14 y la Tabla 15, respectivamente.

Tabla 14: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb anti-NPR1 a dog_NPR1-MMH a 25 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	40 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H22034N	60 ± 0	0	NB	NB	NB	NB
REGN7541	60 ± 0.1	0	NB	NB	NB	NB
REGN7544	59 ± 0.2	0	NB	NB	NB	NB
REGN7548	61 ± 0	0	NB	NB	NB	NB
control de isotipo	57 ± 0	0	NB*	NB	NB	NB

*NB = no se detectó unión

5 **Tabla 15: Parámetros cinéticos de unión de diferentes mAb anti-NPR1 a dog_NPR1-MMH a 37 °C**

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	40 nM Ag unido (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H4H22034N	75 ± 0	0	NB	NB	NB	NB
REGN7541	73 ± 0.3	0	NB	NB	NB	NB
REGN7544	69 ± 0.2	0	NB	NB	NB	NB
REGN7548	75 ± 0	0	NB	NB	NB	NB
control de isotipo	69 ± 0.1	0	NB*	NB	NB	NB

*NB = no se detectó unión

Ejemplo 4: Sensibilidad al pH de anticuerpos monoclonales anti-NPR1 que se unen a reactivos de NPR1 medida a 37 °C

Procedimiento experimental

[0205] Las constantes de velocidad de disociación (k_d) para diferentes anticuerpos monoclonales (mAb) anti-NPR1 en tampones de pH 7.4 y pH 6.0 se determinaron utilizando un biosensor Biacore 4000 basado en resonancia de plasmón superficial (SPR) en tiempo real. Todos los estudios de unión se realizaron a 37 °C utilizando dos tampones de ejecución, (i) PBS, 0.05% v/v Surfactante Tween-20, pH 7.4 (PBS-T-pH 7.4) y (ii) PBS, 0.05% v/v Surfactante Tween-20, pH 6.0 (PBS-T-pH6.0). La superficie del chip sensor Biacore CM5 se derivatizó por primera vez mediante acoplamiento de amina con un anticuerpo específico anti-Fc humano para capturar mAb anti-NPR1. Diferentes concentraciones de dominio extracelular NPR1 humano expresado con una myc-myc-hexahistidina C-terminal (hNPR1-MMH; SEQ ID NO:74) o dominio extracelular NPR1 de mono expresado con una myc-myc-hexahistidina C-terminal (mfNPR1-MMH; SEQ ID NO: 75) (30 nM y 10 nM) se prepararon en tampón PBS-T-pH7, se inyectaron 4 a un caudal de 30 μ l/min durante 4 minutos seguido de la disociación de los reactivos NPR1 unidos en PBS-T-pH7.4 o PBS-T-pH6.0 ejecutando tampones durante 5 minutos.

[0206] Las constantes de velocidad de disociación (k_d) en dos tampones de pH se determinaron ajustando los sensorgramas

de unión en tiempo real a un modelo de unión 1:1 utilizando el software de ajuste de curvas Scrubber 2.0c. La vida media disociativa ($t_{1/2}$) se calculó a partir de los valores de k_d como:

$$t_{1/2} \text{ (min)} = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

5 Resultados

[0207] Los valores de k_d y $t_{1/2}$ para diferentes mAb anti-NPR1 que se unen a hNPR1-MMH o mfnNPR1-MMH en PBS-T, pH 7.4, seguido de disociación en PBS-T-pH 7.4 o PBS-T-pH 6.0 de la invención a 37°C se muestran en la Tabla 16 a la Tabla 19.

10 **Tabla 16: Unión de diferentes anticuerpos monoclonales (mAb) anti-NPR1 a hNPR1-MMH en tampón PBS-T-pH7.4 y la disociación en tampón PBS-T-pH7.4 a 37 ° C**

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	30 nM Ag unido (RU)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)
H4H22034N	310 ± 1.5	150	7.67E-04	15
REGN7541	326 ± 0.4	170	7.34E-05	157
REGN7544	359 ± 1.1	192	4.24E-05	273
REGN7548	356 ± 1.4	215	6.58E-05	176
control de isotipo	340 ± 1.4	2	NB*	NB

*NB = no se detectó unión

15 **Tabla 17: Unión de diferentes anticuerpos monoclonales (mAb) anti-NPR1 a hNPR1-MMH en tampón PBS-T-pH7.4 y la disociación en tampón PBS-T-pH6.0 a 37 ° C**

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	30 nM Ag unido (RU)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)
H4H22034N	349 ± 0.6	172	1.38E-04	83

REGN7541	369 ± 0.5	193	5.31E-05	217
REGN7544	368 ± 1.1	193	1.58E-05	731
REGN7548	366 ± 1.3	219	1.65E-05	702
control de isotipo	344 ± 0.9	2	NB*	NB

*NB = no se detectó unión

Tabla 18: Unión de diferentes anticuerpos monoclonales (mAb) anti-NPR1 a mfNPR1-MMH en tampón PBS-T-pH7.4 y la disociación en tampón PBS-T-pH7.4 a 37 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	30 nM Ag unido (RU)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)
H4H22034N	308 ± 0.2	139	7.81E-04	15
REGN7541	322 ± 0.5	158	9.48E-05	122
REGN7544	356 ± 1.2	178	3.55E-05	325
REGN7548	354 ± 0.8	203	6.22E-05	186
control de isotipo	340 ± 2.2	1	NB*	NB

*NB = no se detectó unión

Tabla 19: Unión de diferentes anticuerpos monoclonales (mAb) anti-NPR1 a mfNPR1-MMH en tampón PBS-T-pH7.4 y la disociación en tampón PBS-T-pH6.0 a 37 °C

mAb capturado	Nivel de captura de mAb (RU)	30 nM Ag unido (RU)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (min)
H4H22034N	336 ± 8.2	157	1.54E-04	75
REGN7541	367 ± 0.5	179	6.94E-05	166
REGN7544	363 ± 1.9	181	1.50E-05	768
REGN7548	363 ± 0.8	207	2.67E-05	433

control de isotipo	336 ± 4.4	2	NB*	NB
--------------------	-----------	---	-----	----

*NB = no se detectó unión

Ejemplo 5: Competencia cruzada de octetos entre diferentes anticuerpos monoclonales anti-NPR1

Procedimiento experimental

5 **[0208]** La competencia de unión entre diferentes anticuerpos monoclonales (mAb) anti-NPR1 se determinó mediante un ensayo de interferometría de biocapa (BLI) sin etiquetas en tiempo real en la plataforma de biosensor Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Todo el experimento se realizó a 25°C en HEPES
10 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, BSA 1 mg/ml, NaN₃ al 0.02%, Surfactante Tween-20 al 0.05% v/v, pH 7.4 (HBS-EBT) con la placa agitada a una velocidad de 1000rpm. Evaluar si dos anticuerpos son capaces de competir entre sí para unirse a sus respectivos epítomos en el dominio extracelular NPR1 humano
15 recombinante expresado con una myc-myc-hexahistidina C-terminal (hNPR1-MMH; SEQ ID NO: 74), alrededor de 0.64 nm de hNPR1-MMH se capturó primero en puntas de biosensor Octet recubiertas con anticuerpo anti-Penta-His (Fortebio Inc, # 18-5122) sumergiendo las puntas del biosensor en pocillos que
20 contenían una solución de 40-50 µg/ml de hNPR1-MMH durante 60 segundos.

[0209] Las puntas del biosensor capturado con antígeno se saturaron luego con un primer anticuerpo monoclonal anti-NPR1 (posteriormente denominado mAb-1) sumergiéndolo en pocillos

que contenían una solución de 50 µg/ml de mAb-1 durante 4 minutos. Posteriormente, las puntas del biosensor se sumergieron en pocillos que contenían una solución de 50 µg/ml de un segundo anticuerpo monoclonal anti-NPR1 (posteriormente denominado mAb-2) durante 3 minutos. Las puntas del biosensor se lavaron en tampón HBS-EBT entre cada paso del experimento. La respuesta de unión en tiempo real se monitoreó durante todo el transcurso del experimento y se registró la respuesta de unión al final de cada paso.

10 Resultados

[0210] La respuesta de unión de mAb-2 a hNPR1-MMH precomplejada con mAb-1 se comparó con la respuesta de unión cuando se invirtió el orden (primer anticuerpo de mAb-2 unido, segundo anticuerpo de mAb1 unido) y se determinó el comportamiento competitivo/no competitivo de diferentes anticuerpos monoclonales anti-NPR1 como se resume en la Tabla 20.

Tabla 20. Competencia cruzada entre diferentes anticuerpos monoclonales anti-NPR1 para la unión a hNPR1-MMH

mAb-1	mAb-2 compitiendo con mAb-1
H4H22034N	H4H22034N
	REGN7541
	REGN7544
	REGN7548

REGN7541	H4H22034N
	REGN7541
	REGN7544
	REGN7548
REGN7544	H4H22034N
	REGN7541
	REGN7544
	REGN7548
REGN7548	H4H22034N
	REGN7541
	REGN7544
	REGN7548

Ejemplo 6: Evaluación del antagonismo de NPR1 de anticuerpos anti-NPR1 antagonistas

Procedimiento experimental

5 **[0211]** Para evaluar la regulación del receptor 1 del péptido natriurético humano (hNPR1), se generó y clasificó una línea celular HEK293 que expresa establemente hNPR1 (aminoácidos M1 a G1061 del núm. de acceso NP_000897.3) con etiquetas C-term myc y FLAG para células que expresan hNPR1

10 alta. La línea celular resultante se denominó HEK293/hNPR1.MycDDK HS, abreviada como HEK293/hNPR1, y se mantuvo en DMEM que contenía FBS al 10%, NEAA, pluma/estreptococo/glutamina y 500 µg/ml de sulfato G418. La unión del ligando a NPR1 activa el dominio de guanilato ciclasa

15 del receptor, que cataliza la producción de cGMP a partir de GTP (Zois, et al., 2014 Natriuretic peptides in cardiometabolic

regulation and disease. Nature Publishing Group, 11(7), 403-412). Se utilizó un ensayo homogéneo de fluorescencia resuelta en el tiempo (HTRF) que mide los niveles de cGMP para evaluar la actividad de NPR1.

5 *Análisis del antagonismo de NPR1*

[0212] Para evaluar el antagonismo de NPR1, se sembraron células HEK293/hNPR1 en placas de media área de 96 pocillos a 20,000 células/pocillo en medio de crecimiento completo y se cultivaron durante la noche. Al día siguiente, el medio de
10 crecimiento se reemplazó con tampón de dilución (OptiMEM con FBS al 0.1%) que contenía anticuerpos anti-NPR1 o de control de isotipo en un rango de concentraciones (0.017 nM - 1 µM, con una condición adicional sin anticuerpo) y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Después del pretratamiento, las células
15 HEK293/hNPR1 se estimularon con ligando, ANP o BNP, en un rango de concentraciones (ANP = 0.002 - 2 nM o BNP = 0.0039 - 4 nM, con una condición adicional sin ligando) realizadas en tampón de dilución o tampón de dilución que contenía ANP 0.2 nM o BNP 0.7 nM y se incubaron a 37 °C durante 30 min.

20 **[0213]** El ensayo HTRF se realizó utilizando un kit cGMP HTRF (Cisbio, #62GM2PEH) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La intensidad de la fluorescencia se detectó utilizando un lector de placas multietiquetas EnVision (Perkin Elmer) y la relación de transferencia de energía de resonancia
25 de fluorescencia (FRET) se calculó de acuerdo con las

instrucciones del fabricante. Las proporciones de FRET se convirtieron en concentraciones de cGMP en escala logarítmica de acuerdo con la curva estándar de cGMP y se analizaron utilizando una ecuación logística de 4 parámetros sobre una
 5 curva de concentración-respuesta de 10 puntos para obtener los valores de la mitad de la concentración inhibidora máxima (IC₅₀) para los anticuerpos anti-NPR1 usando GraphPad Prism 8. Los valores de la mitad de la concentración efectiva máxima (EC₅₀) del ligando no se calcularon debido al límite de cuantificación
 10 en concentraciones altas. La inhibición máxima se calculó con la ecuación que se describe a continuación:

% Inhibición máxima

$$= \frac{[\text{Log cGMP}, M]_{0.2\text{nM ANP o } 0.7\text{nM BNP}} - [\text{Log cGMP}, M]_{1\text{ }\mu\text{M anticuerpo de prueba con ligando}}}{[\text{Log cGMP}, M]_{0.2\text{nM ANP o } 0.7\text{nM BNP}} - [\text{Log cGMP}, M]_{\text{línea basal}}} \times 100$$

15 **[0214]** En esta ecuación, [Log cGMP, M] línea basal, [Log cGMP, M] 1 μ M anticuerpo de prueba con ligando y [Log cGMP, M] 0.2 nM ANP o 0.7 nM BNP son los valores de concentración de cGMP en escala logarítmica de las células tratadas con tampón de dilución solo, la concentración más alta de anticuerpos
 20 anti-NPR1 a 1 μ M con ANP 0.2 nM o BNP 0.7 nM, y ANP 0.2 nM o BNP 0.7 nM solo, respectivamente.

Determinación del modo de antagonismo de NPR1

[0215] El modo de inhibición de los anticuerpos anti-NPR1 de la activación de NPR1 mediada por ANP se evaluó mediante el
 25 análisis de Schild (Kenakin 1997 Pharmacologic Analysis of

Drug-Receptor Interaction. 3^a edición. Filadelfia: Lippincott-Raven) de un ensayo de acumulación de cGMP. Las condiciones se optimizaron para que las curvas de respuesta de concentración de ANP cayeran en el rango lineal de la curva estándar de cGMP.

5 Brevemente, se separaron células HEK293/hNPR1 de las placas utilizando una solución de disociación celular libre de enzimas. Luego, la suspensión celular se volvió a sembrar en placas de 96 pocillos de bajo volumen a 1,000 células/pocillo en tampón de dilución. Luego, las células se pretrataron con

10 anticuerpos anti-NPR1 en tampón de dilución a una concentración fija de 0 nM, 50 nM, 150 nM o 450 nM durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después del pretratamiento, se añadió ANP a las células, en un rango de concentraciones (1.0 pM a 1 μ M) en tampón de dilución (con una condición adicional sin

15 ANP), y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

[0216] El ensayo HTRF, la detección de la intensidad de la fluorescencia y el cálculo de la concentración de cGMP se realizaron como se describió anteriormente. Al utilizar placas de bajo volumen de 96 pocillos, los volúmenes necesarios para

20 la curva estándar de cGMP y los reactivos de detección fueron la mitad de los utilizados con placas de media área de 96 pocillos.

[0217] Todos los parámetros del ensayo se analizaron utilizando GraphPad Prism 8. Los valores de EC₅₀ de ANP en

25 presencia o ausencia de anticuerpos anti-NPR1 se calcularon

utilizando una ecuación logística de 4 parámetros sobre una curva de concentración-respuesta de 11 puntos. La disminución de la respuesta máxima de ANP por anticuerpos anti-NPR1 se calculó mediante la ecuación:

5

% disminución de respuesta máxima de ANP

$$= \frac{[Log\ cGMP, M]_{1\mu M\ ANP} - [Log\ cGMP, M]_{1\ \mu M\ ANP\ con\ 450nM\ antagonista}}{[Log\ cGMP, M]_{1\mu M\ ANP} - [Log\ cGMP, M]_{línea\ basal}} \times 100$$

[0218] La pendiente de Schild se determinó mediante el análisis de gráficos de Schild obtenido trazando Log (relación de concentración - 1) en el eje Y frente a las concentraciones de antagonista en escala logarítmica en el eje X. La relación de concentración se define como los valores de EC₅₀ de ANP en presencia de antagonista a diferentes concentraciones divididos entre el valor de EC₅₀ de ANP en ausencia de antagonista.

15

Análisis de la internalización mediada por anticuerpos anti-NPR1 con conjugados secundarios de anticuerpo-fármaco en un ensayo de citotoxicidad basado en células

[0219] La internalización de los anticuerpos anti-NPR1 se evaluó indirectamente mediante un ensayo de citotoxicidad utilizando un anticuerpo secundario conjugado con una carga útil citotóxica, monometil auristatina F (MMAF). Después de unir NPR1 a las células, el anticuerpo anti-NPR1 se internalizará con el receptor, lo que dará como resultado la cointernalización del conjugado fármaco-anticuerpo secundario

20

25

Fc fab antihumano (ADC secundario), la liberación de la carga útil citotóxica conjugada y la destrucción de las células. Por lo tanto, el grado de citotoxicidad se puede utilizar para evaluar la capacidad del anticuerpo para internalizarse al
5 atacar el objetivo.

[0220] Para el ensayo, se sembraron células HEK293/hNPR1 en placas blancas de 96 pocillos a razón de 1,000 células/pocillo en medio de crecimiento completo y se cultivaron durante la noche. Al día siguiente, las células se
10 pretrataron con anticuerpos anti-NPR1 o de control en un rango de concentraciones (diluciones en serie de 914 fM a 6 nM en tampón de dilución, con una condición adicional sin anticuerpo) en presencia o ausencia de ANP 100 nM o BNP 100 nM durante 5 minutos a 37 °C. Después del pretratamiento, se añadió el ADC
15 secundario a una concentración final de 20 nM a las células HEK293/hNPR1. Para evaluar la destrucción máxima en el ensayo, se añadió digitonina a una concentración final de 48 µg/ml a los pocillos de control. Las células tratadas se incubaron a 37°C durante tres días.

20 **[0221]** Para medir la viabilidad celular, se utilizó Promega CellTiter-Glo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La intensidad de la luminiscencia se detectó usando un lector de placas multietiquetas EnVision y se analizó usando una ecuación logística de 4 parámetros sobre una curva de
25 concentración-respuesta de 9 puntos para obtener los valores

de IC₅₀ de los anticuerpos anti-NPR1 usando GraphPad Prism 8. El porcentaje de viabilidad celular o muerte celular se calculó utilizando las ecuaciones que se describen a continuación:

5 % *Viabilidad*

$$= \frac{RLU_{\text{tamp. de dilución 100 nM ANP o 100nM BNP solo}} - RLU_{6 \text{ nM anticuerpo de prueba}}}{RLU_{\text{tamp. de dilución 100 nM ANP o 100nM BNP solo}} - RLU_{\text{digitonina}}} \times 100$$

$$\% \text{ Muerte} = 100 - \% \text{ Viabilidad}$$

Resultados

Evaluación de la inhibición de la activación de NPR1
10 *mediada por ligando por anticuerpos anti-NPR1*

[0222] Tanto el ANP como el BNP activaron las células HEK293/hNPR1, estimulando la acumulación de cGMP de una manera dependiente de la concentración (Figuras 1A y 1B). Todos los anticuerpos anti-NPR1 bloquearon significativamente la
15 activación de NPR1 inducida por ANP 0.2 nM o BNP 0.7 nM con valores de IC₅₀ de 7.0 - 51 nM y una inhibición máxima de 82% - 107 % (Figuras 1A y 1B y Tabla 21). El anticuerpo de control de isotipo no mostró ninguna inhibición significativa de la activación de NPR1 inducida por ANP 0.2 nM o BNP 0.7 nM (Figuras
20 1A y 1B y Tabla 21).

Tabla 21. Los anticuerpos anti-NPR1 inhibieron significativamente la activación de NPR1 inducida por ligando medida mediante el ensayo de acumulación de cGMP

Anticuerpo	Con 0.2 nM ANP		Con 0.7 nM BNP	
	IC ₅₀ , M	Inh. máx., %	IC ₅₀ , M	Inh. máx., %

H4H22034N	2.00E-08	82	1.33E-08	99
REGN7541	4.41E-08	90	1.49E-08	100
REGN7544	5.13E-08	92	1.63E-08	107
REGN7548	1.91E-08	92	7.02E-09	103
Control mAb	ND	-1	ND	-9

ND: no determinado debido a la falta de cambios dependientes de la concentración en señal; Inh. máx.: inhibición máxima.

5 **[0223]** En conjunto, H4H22034N, REGN7541, REGN7544 y REGN7548 mostraron una inhibición significativa de la activación de NPR1 inducida por ligando medida mediante el ensayo de acumulación de cGMP.

Evaluación del modo mediante el cual los anticuerpos anti-NPR1 inhiben la activación de NPR1 mediada por ANP

10 **[0224]** Se realizó un análisis de Schild para determinar el modo de inhibición del anticuerpo anti-NPR1 en la activación de NPR1 mediada por ANP. En el análisis, un desplazamiento paralelo hacia la derecha de las curvas concentración-respuesta del agonista con una pendiente de Schild de ~1 sin alterar la respuesta máxima es indicativo de un antagonista competitivo. Por el contrario, un desplazamiento incomparable hacia la derecha de las curvas concentración-respuesta del agonista con una pendiente de Schild no cercana a uno es indicativo de un antagonista no competitivo. Un antagonista que puede cambiar

15

20

la respuesta máxima de un agonista se define como antagonista insuperable, mientras que un antagonista que no cambia la respuesta máxima de un agonista se define como antagonista superable (Kenakin, 1997).

5 **[0225]** Utilizando el análisis de Schild, H4H22034N, REGN7541, REGN7544 y REGN7548 demostraron una inhibición no competitiva del agonista de ANP en un ensayo de acumulación de cGMP (Figuras 2A-2E). El aumento de la concentración de los cuatro anticuerpos anti-NPR1 dio lugar a desplazamientos hacia
10 la derecha sin precedentes de las curvas de concentración-respuesta de ANP con pendientes de Schild que no estaban cercanas a 1. Además, la inhibición por H4H22034N no cambió la respuesta máxima de ANP, mientras que la inhibición por REGN7541, REGN7544 y REGN7548 redujeron la respuesta máxima de
15 ANP a 10 - 62% (Figuras 2A-2E y Tabla 22).

Tabla 22. Los anticuerpos anti-NPR1 mostraron antagonismo no competitivo en el análisis de Schild

Anticuerpo	Pendiente de Schild	Disminución máx. de % ANP
H4H22034N	0.05	0.1
REGN7541	2.0	25.5
REGN7544	2.6	61.6
REGN7548	1.4	10.0

[0226] En conjunto, H4H22034N, REGN7541, REGN7544 y REGN7548 demostraron un antagonismo no competitivo con varios efectos sobre la respuesta máxima del ligando.

Evaluación de la Internalización NPR1 inducida por anticuerpos anti-NPR1

[0227] La internalización de los anticuerpos anti-NPR1 se evaluó utilizando un ensayo de citotoxicidad mediado por ADC secundario en presencia o ausencia de ligando. En ausencia de ligando, todos los anticuerpos anti-NPR1 indujeron la internalización de NPR1 de una manera dependiente de la concentración con valores de IC_{50} de 58 - 243 pM y una destrucción máxima de 82% - 85% (Figuras 3A-3C y Tabla 23). En presencia de ligando 100 nM, los anticuerpos anti-NPR1 indujeron la internalización de NPR1 con valores de IC_{50} de 132 - 703 pM y una destrucción máxima del 50% - 82%. El anticuerpo de control de isotipo no mostró ninguna internalización significativa de NPR1 en presencia o ausencia de ligando (Figuras 3A-3C y Tabla 23).

Tabla 23. Internalización de anticuerpos anti-NPR1 en presencia o ausencia de ligando medida mediante un ensayo de citotoxicidad mediado por ADC secundario

Anticuerpo	No ligando		Con 100nM ANP		Con 100nM BNP	
	IC_{50} , M	Muerte máx., %	IC_{50} , M	Muerte máx., %	IC_{50} , M	Muerte máx., %
H4H22034N	5.84E-11	85	1.85E-10	82	1.32E-10	82

REGN7541	1.95E-10	83	6.67E-10	60	5.55E-10	78
REGN7544	2.43E-10	82	7.03E-10	50	6.77E-10	74
REGN7548	8.69E-11	85	3.97E-10	74	2.95E-10	79
Control mAb	ND	0.01	ND	-4	ND	0.5

ND: no determinado debido a la falta de cambios en la señal dependientes de la concentración.

[0228] En conjunto, H4H22034N, REGN7541, REGN7544 y
5 REGN7548 mostraron una internalización de anticuerpos anti-NPR1 de NPR1 en presencia o ausencia de ligando, medida mediante un ensayo de citotoxicidad mediado por ADC secundario.

**Ejemplo 7: Potencia y especificidad de anticuerpos anti-NPR1 que se unen a NPR1 solo o en complejo con ANP o BNP en la
10 superficie celular usando detección basada en electroquimioluminiscencia**

Procedimiento experimental

[0229] La capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-NPR1 humano para unirse a células que expresan NPR1 (hNPR1 o
15 mfNPR1) humano o de mono (*Macaca fascicularis*) en presencia o ausencia de ligandos peptídicos natriuréticos auriculares humanos (ANP) o cerebro humano (BNP) se determinó utilizando un Inmunoensayo basado en electroquimioluminiscencia (ECL).

[0230] Brevemente, se generaron células que expresan
20 HEK293/hNPR1 transfectando células 293 de riñón embrionario humano (HEK) con el plásmido pLVX.hNPR1.myc.DDK resistente a

neomicina que codifica NPR1 humano (aminoácidos M1-G1061, UniProtKB - P16066). De manera similar, se generaron células HEK293/mfNPR1 transfectando células HEK293 con el plásmido pRG984 resistente a neomicina que codifica NPR1 de mono de longitud completa (aminoácidos M1-G1061, número de acceso XP_005541809.1). La línea celular HEK293 no transfectada, que no mostró unión detectable de un anticuerpo anti-hNRP1 comercial mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), se incluyó en el experimento como control de unión no específica.

[0231] Los experimentos se llevaron a cabo según el siguiente procedimiento. Los cultivos de las líneas celulares descritas anteriormente se enjuagaron una vez en tampón 1xPBS sin Ca^{2+} / Mg^{2+} y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C con solución de disociación celular libre de enzimas para separar las células del matraz. Los sedimentos celulares recolectados se lavaron una vez y se resuspendieron en 1xPBS con Ca^{2+} / Mg^{2+} y luego las células se contaron con un contador de células Cellometer™ Auto T4 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). Se sembraron aproximadamente 2.0×10^4 células por pocillo en placas de electrodos de carbono de 96 pocillos (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Los sitios de unión no específicos se bloquearon usando BSA al 2% (p/v) en 1xPBS que contenía Ca^{2+} / Mg^{2+} durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron células

HEK293/hNPR1 y HEK293/mfNPR1 durante 0.5 horas a temperatura ambiente con hANP 10 nM (Tocris, Minneapolis, MN), hBNP 100 nM (Tocris, Minneapolis, MN) o tampón de dilución de muestra solo, mientras se trataban células HEK293 sólo con tampón de dilución de muestra. Sin lavado, se añadieron a las células diluciones en serie de anti-NPR1, Comparador 1 o el anticuerpo de control de isotipo, que oscilaban entre 1.7 pM y 100 nM, o tampón que no contenía anticuerpo, seguido de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavaron las placas para eliminar los anticuerpos no unidos, hANP y hBNP utilizando un lavador de placas AquaMax2000 con un cabezal de lavado de células (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA). Los anticuerpos unidos a la placa se detectaron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana conjugado con SULFO-TAG™ específico para cadenas pesadas y ligeras (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) que se incubó con las células durante 1 hora a temperatura ambiente.

[0232] Después de los lavados, las placas se revelaron con Read Buffer (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante y las señales luminiscentes se registraron con un SECTOR Imager 600 (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD). Las señales de unión en una unidad de RLU se analizaron en función de la concentración de anticuerpos y los datos se equiparon con un modelo dosis-respuesta sigmoideo (logístico de cuatro

parámetros) utilizando el paquete estadístico R (código abierto). El valor de EC_{50} , definido como la concentración de anticuerpo a la que se detecta el 50% de la señal de unión máxima, se determinó para indicar la potencia de unión de los anticuerpos anti-NPR1 a células que expresan NPR1 con o sin ANP o BNP formando complejos con NPR1 en la superficie celular.

Resultados

[0233] La capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-NPR1 para unirse específicamente a la superficie de células HEK293 diseñadas para expresar NPR1 humano o de mono en presencia o ausencia de ANP o BNP se evaluó mediante un inmunoensayo basado en electroquimioluminiscencia. Se analizó la dependencia de la concentración de la unión del anticuerpo y se determinaron los valores de EC_{50} . Los resultados se resumen en la Tabla 24.

Tabla 24: Potencia de unión de anticuerpos anti-NPR1 a células que expresan NPR1 en presencia o ausencia de ligandos de NPR1.

Anticuerpo	Experimento	Potencia de unión celular, EC_{50} (M)					
		HEK293/hNPR1			HEK293/mfNPR1		
		No se agregó ligando	+10 nM hanp	+100 nM hBNP	No se agregó ligando	+10 nM hanp	+100 nM hBNP
H4H22034	1	3.4E-10	5.6E-10	4.3E-10	3.3E-10	6.7E-10	4.2E-10
REGN7541	1	1.3E-09	2.1E-09	1.1E-09	1.4E-09	2.9E-09	9.2E-10

REGN7544	1	1.7E-09	2.9E-09	1.5E-09	1.7E-09	4.2E-09	1.7E-09
REGN7548	2	6.8E-10	1.2E-09	8.1E-10	5.6E-10	1.2E-09	5.6E-10
Comparador 1	2	NB	5.7E-10	1.8E-09	NB	C ^a	C ^a
Control de isotipo	2	NB	NB	NB	NB	NB	NB

Abreviaturas: NB - sin unión; INC - no concluyente: el valor de EC₅₀ no se pudo calcular debido a que los datos carecían de curvatura sigmoidea para adaptarse al modelo dosis-respuesta sigmoidea (ajuste de curva sigmoidea de 4 parámetros), pero el anticuerpo mostró una unión específica marginal a las células que expresan mfNPR1 en presencia de hANP 10 nM o hBNP 100 nM.

[0234] Cuatro anticuerpos anti-NPR1 (H4H22034, REGN7541, REGN7544, REGN7548) de la invención se unieron a las células humanas diseñadas con NPR1 en presencia de hANP 10 nM o hBNP 100 nM. La potencia de estos anticuerpos en células HEK293/hNPR1.myc.DDK en presencia de hANP 10 nM o hBNP 100 nM osciló entre valores de EC₅₀ de 0.56 nM a 2.9 nM o de 0.43 nM a 1.5 nM, respectivamente (Tabla 24). Se determinaron potencias de unión similares en células que expresan hNPR1 en ausencia de hANP y hBNP, con valores de EC₅₀ que oscilaban entre 0.34 nM y 1.7 nM. No se observó unión detectable para estos anticuerpos en células HEK293 parentales en las mismas condiciones experimentales. Estos resultados sugieren que los anticuerpos

son aglutinantes específicos de NPR1 y que la potencia de unión a NPR1 humana para estos anticuerpos no se ve afectada por la presencia de ANP o BNP.

[0235] Por el contrario, el Comparador 1 exhibió especificidad de unión a células hNPR1 sólo cuando hANP o hBNP estaban presentes (hANP 10 nM o hBNP 100 nM), con valores de EC_{50} de 0.57 nM y 1.8 nM, respectivamente, y no se observó unión detectable en ausencia de hANP y hBNP, por lo que se clasifica como aglutinante exclusivo del complejo NPR1-ANP/BNP.

[0236] Los anticuerpos anti-NPR1 H4H22034, REGN7541, REGN7544, REGN7548 también se unieron a las células que expresan NPR1 de mono (HEK293/mfNPR1) con valores de EC_{50} que oscilan entre 0.33 nM y 1.7 nM. De manera similar a las células hNPR1, la adición de hANP 10 nM o 100 nM de hBNP no afectó la unión del anticuerpo anti-NPR1 a las células HEK293/mfNPR1; Los valores de EC_{50} para la unión de anticuerpos variaron de 0.67 nM a 4.2 nM o de 0.42 nM a 1.7 nM en presencia de hANP y hBNP, respectivamente (Tabla 24) y no se detectó unión para ninguno de los anticuerpos en las células HEK293 parentales. Por el contrario, el Comparador 1 se unió específicamente a células diseñadas con HEK293/mfNPR1 solo en presencia de hANP 10 nM o hBNP 100 nM; sin embargo, los valores de EC_{50} no se pudieron determinar debido a que la curva de unión dependiente de la concentración carecía de curvatura sigmoidea y no se pudieron ajustar los datos con el modelo de unión.

[0237] En el experimento, el control de isotipo no se unió a las células HEK293/hNPR1, HEK293/mfNPR1 ni a HEK293.

Ejemplo 8: Caracterización de los efectos agudos sobre la presión arterial sistémica después de una dosis intravenosa única de 25 mg/kg de un mAb antagonista de NPR1 en ratones NPR1^{hu/hu} telemétricos normotensos

Procedimiento experimental

[0238] Los objetivos de este estudio fueron evaluar los efectos agudos de los anticuerpos antagonistas de NPR1 sobre la presión arterial sistémica inicial en ratones NPR1^{hu/hu} normotensos telemétricos. A ratones macho NPR1^{hu/hu} (n = 30) de edades comprendidas entre 14 y 16 semanas se les implantaron telémetros PA-C10 (DSI, St. Paul, MN) y se les permitió recuperarse durante al menos 7 días. Los animales se estratificaron en grupos (Grupos 1-5) según el peso corporal (Tabla 25). Los animales se alojaron individualmente en condiciones estándar (temperaturas de 64°F a 84°F (18°C a 29°C); humedad relativa del 30% al 70%) y se mantuvo un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Se proporcionaron alimentos (comida en pellets estándar de Research Diets) y agua *ad libitum*.

Tabla 25. Resumen de dosis y grupos de dosis

Grupo Núm.	Artículo de prueba o control	Nivel de dosis (mg/kg/dosis)	Volumen de dosis (mL/kg)	Número de animales
				Machos
1	PBS	0	5	6

2	H4H22034N	25	6
3	REGN7541		6
4	REGN7544		6
5	REGN7548		6

[0239] Las proteínas de prueba se administraron a los animales apropiados mediante una única inyección intravenosa el Día 0. El volumen de dosis para cada animal se basó en la
5 medición de peso corporal más reciente.

[0240] Se recogieron la presión sistólica, la presión diastólica, la presión arterial media, la presión del pulso y la frecuencia cardíaca durante 10 segundos cada minuto durante el periodo de prueba. Los datos de telemetría se presentan como
10 valores medios de 60 minutos o 24 horas. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

Resultados

[0241] La evaluación *in vivo* demostró que, en comparación con el control de PBS, los animales a los que se les administró
15 un anticuerpo antagonista de NPR1 tuvieron aumentos rápidos y persistentes de la presión arterial sistémica (Figura 4) después de una dosis intravenosa única de cualquiera de los anticuerpos evaluados. Los cambios de presión ocurrieron casi de inmediato (Figura 4) y duraron hasta el día 7 del estudio,
20 la duración del experimento (Figura 5). La magnitud del aumento agudo de la presión arterial evaluada por el cambio medio (de 48 horas después de la dosis) de la presión arterial sistólica

desde el valor inicial osciló entre $+7.64 \pm 1.13$ (REGN7541) y $+9.81 \pm 1.03$ (H4H22034N) mmHg. La magnitud del aumento de la presión arterial evaluada por el cambio medio (de 7 días después de la dosis) de la presión arterial sistólica desde el

5 valor inicial osciló entre $+7.65 \pm 1.03$ (REGN7548) y $+9.55 \pm 1.16$ (H4H22034N) mmHg.

[0242] Las presiones diastólica, arterial media y del pulso (Tabla 26 y Tabla 27) también cambiaron significativamente después de la dosificación de mAb

10 bloqueadores de NPR1, con magnitudes y duraciones del efecto consistentes con las observadas e informadas sobre las presiones sanguíneas sistólicas. Las respuestas de la frecuencia cardíaca fueron variables (Tabla 26 y Tabla 27), y los cambios agudos generalmente tendieron a una mayor reducción

15 de la frecuencia en relación con el valor inicial. Estos cambios son consistentes con el aumento observado en la presión. La evaluación de la frecuencia cardíaca durante 7 días demostró un aumento relativo significativo para los animales que recibieron REGN7548.

20 **Tabla 26. Cambio medio 48 horas después de la dosis con respecto a la presión arterial y la frecuencia cardíaca iniciales**

Grupo de dosis:	Dosis (mg/kg)	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)	Arterial media (mmHg)	Presión de pulso (mmHg)	Frecuencia cardíaca (BPM)
-----------------	---------------	------------------	-------------------	-----------------------	-------------------------	---------------------------

PBS	0	0.08±1.0	0.04±0.89	0.03±0.95	0.04±0.17	- 10.02±6.8 5
H4H22034N	25	9.81±1.03* ***	4.30±0.89**	7.22±0.96**	5.51±0.21**	- 22.80±6.7 5
REGN7541		7.64±1.13* ***	3.01±0.95**	5.62±1.04**	4.55±0.28**	- 14.38±8.5 9
REGN7544		8.68±1.03* ***	3.79±0.94**	6.42±0.98**	4.89±0.22**	- 17.91±7.2 2
REGN7548		7.87±1.08* ***	2.78±0.94**	5.55±1.01**	5.09±0.22**	- 11.44±6.7 3

Ratones *NPR1^{hu/hu}* normotensos telemétricos fueron aleatorizados en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una única inyección intravenosa de 25 mg/kg de mAb antagonista de *NPR1* o PBS como se describe en la Tabla 25. Todos los valores son medias $\pm$ SEM, n=6 por grupo. Estadísticas: ANOVA de dos vías con Dunnett; *p<.05 frente a PBS.

Tabla 27. Cambio medio de 7 días después de la dosis con respecto a la presión arterial y la frecuencia cardíaca iniciales

Grupo de dosis:	Dosis (mg/kg)	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)	Arterial media (mmHg)	Presión de pulso (mmHg)	Frecuencia cardíaca (BPM)
PBS	0	-0.82±0.24	-0.26±0.17	-0.66±0.20	-0.56±0.15	- 21.98±3. 75

H4H22034N	25	9.55±1.16*** *	4.79±0.49*** *	7.19±0.83* ***	4.76±0.70*** *	- 22.75±3. 93
REGN7541		8.89±1.54*** *	5.44±1.12*** *	7.19±1.27* ***	3.45±0.64***	- 18.41±4. 51
REGN7544		7.97±1.03*** *	3.85±0.64*** *	5.96±0.80* ***	4.12±0.63*** *	- 22.53±4. 89
REGN7548		7.65±1.03*** *	3.44±0.47*** *	5.66±0.75* ***	4.21±0.62*** *	- 9.54±3.2 5***

Ratones $NPR1^{hu/hu}$ normotensos telemétricos fueron aleatorizados en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una única inyección intravenosa de 25 mg/kg de mAb antagonista de NPR1 o PBS como se describe en la Tabla 25. Todos los valores son medias $\pm$ SEM, n=6 por grupo. Estadísticas: ANOVA de dos vías con Dunnett; *p<.05 frente a PBS.

[0243] Los anticuerpos antagonistas de NPR1 H4H22034N, REGN7541, REGN7544 y REGN7548 aumentaron significativa y rápidamente la presión arterial sistémica pocas horas después de una única inyección subcutánea en ratones $NPR1^{hu/hu}$ normotensos. Los efectos hemodinámicos observados duraron los 7 días del experimento.

Ejemplo 9: Caracterización del efecto sobre la presión arterial sistémica de una dosis única de 1 o 25 mg/kg de un mAb antagonista de NPR1 en ratones NPR1^{hu/hu} normotensos

Procedimiento experimental

5 **[0244]** Los objetivos de este estudio fueron evaluar los efectos de los anticuerpos antagonistas de NPR1 sobre la presión arterial sistémica inicial en ratones NPR1^{hu/hu} normotensos telemétricos. A ratones macho NPR1^{hu/hu} (n = 54) de edades comprendidas entre 20 y 24 semanas se les implantaron
10 telémetros PA-C10 (DSI, St. Paul, MN) y se les permitió recuperarse durante al menos 7 días. Los animales se estratificaron en grupos (Grupos 1-10) basándose en el peso corporal y las presiones sistólica y pulmonar basales, antes de ser asignados al grupo (Tabla 28). Los animales se alojaron
15 individualmente en condiciones estándar (temperaturas de 64°F a 84°F (18°C a 29°C); humedad relativa de 30% a 70%) y se mantuvo un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Se proporcionaron alimentos (comida en pellets estándar de Research Diets) y agua *ad libitum*.

20 **Tabla 28. Sumario de dosis y grupos de dosis**

Grupo Núm.	Artículo de prueba o control	Nivel de dosis (mg/kg/dosis)	Volumen de dosis (mL/kg)	Número de animales
				Machos
1	PBS	0	5	5
2	mAb de control de isotipo IgG4P	25		5
3	H4H22034N	1		5

4	REGN7541			5
5	REGN7544			5
6	REGN7548			5
7	H4H22034N			6
8	REGN7541	25		6
9	REGN7544			6
10	REGN7548			6

[0245] Las proteínas de prueba se administraron a los animales apropiados mediante una única inyección subcutánea el Día 0. El volumen de dosis para cada animal se basó en la medición de peso corporal más reciente.

[0246] Se recogieron la presión sistólica, la presión diastólica, la presión arterial media, la presión del pulso y la frecuencia cardíaca durante 10 segundos cada 10 minutos durante el periodo de prueba. Los datos de telemetría se presentan como valores medios de 24 horas. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

Resultados

[0247] La caracterización *in vivo* de los anticuerpos antagonistas de NPR1 demostró que, en comparación con el isotipo IgG4P y los animales con dosis de control de PBS, los ratones NPR1^{hu/hu} con dosis de antagonista de NPR1 presentaron aumentos significativos y persistentes de la presión arterial sistémica después de una dosis subcutánea única de 1 o 25 mg/kg de cualquier anticuerpo antagonista de NPR1 evaluado (Tabla

29, Tabla 30, Figura 6, Figura 7). La magnitud del aumento de la presión arterial después de una dosis única subcutánea de 1 mg/kg evaluada por el cambio medio (de los días 0 a 14 después de la dosis) de la presión arterial sistólica desde el valor inicial osciló entre $+6.81 \pm 0.76$ (REGN7548) y $+11.22 \pm 0.93$ (REGN7541) mmHg (Tabla 29 y Figura 6). La magnitud del aumento de la presión arterial después de una dosis única subcutánea de 25 mg/kg, evaluada por el cambio medio (de los días 0 a 14 después de la dosis) de la presión arterial sistólica desde el valor inicial, osciló entre $+8.82 \pm 0.64$ (H4H22034) y $+9.76 \pm 0.92$ (REGN7544) mmHg (Tabla 29 y Figura 7).

Tabla 29. Cambio medio de 14 días después de la dosis con respecto a la presión arterial y la frecuencia cardíaca iniciales

Grupo de dosis:	Dosis (mg/kg)	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)	Arterial media (mmHg)	Presión de pulso (mmHg)	Frecuencia cardíaca (BPM)
PBS	0	1.69 ± 0.23	-0.39 ± 0.14	0.57 ± 0.13	2.07 ± 0.19	-6.52 ± 2.45
mab de control de isotipo IgG4P	25	$0.53 \pm 0.27^*$ ***	0.26 ± 0.26	-0.03 ± 0.26	$0.80 \pm 0.09^*$ ***	-4.92 ± 1.78
H4H22034N	1	$7.10 \pm 0.60^*$ ***	$3.81 \pm 0.43^{**}$ **	$5.55 \pm 0.51^{**}$ **	3.29 ± 0.30	-16.51 ± 3.24
REGN7541		11.22 ± 0.9 3****	$7.23 \pm 0.69^{**}$ **	$9.29 \pm 0.78^{**}$ **	$4.0 \pm 0.41^{**}$ *	-0.48 ± 2.74
REGN7544		$7.39 \pm 0.67^*$ ***	$4.00 \pm 0.39^{**}$ **	$5.82 \pm 0.51^{**}$ **	$3.39 \pm 0.37^*$	-1.43 ± 2.74
REGN7548		$6.81 \pm 0.76^*$ ***	$3.91 \pm 0.84^{**}$ **	$5.36 \pm 0.68^{**}$ **	2.93 ± 0.68	-9.06 ± 1.90

H4H22034N	25	8.82±0.64* ***	4.55±0.58**	6.70±0.56**	4.29±0.32* ***	-7.45±2.48
REGN7541		9.24±0.76* ***	5.77±0.61**	7.47±0.66**	3.50±0.33	-12.63±2.45
REGN7544		9.76±0.92* ***	3.13±0.42**	6.51±0.64**	6.66±0.54* ***	- 21.61±3.17 ****
REGN7548		8.37±0.69* ***	3.61±0.38**	6.14±0.52**	4.77±0.35* ***	-12.43±2.32

Ratones *NPR1^{hu/hu}* normotensos telemétricos fueron aleatorizados en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una única inyección subcutánea de 1 o 25 mg/kg de mAb antagonista de *NPR1*, control de isotipo o PBS como se describe en la Tabla 28. Todos los valores son medias $\pm$ SEM, n=4-5 por grupo. Estadísticas: ANOVA de dos vías con Dunnett; *p<.05 frente a PBS.

Tabla 30. Cambio medio posterior a la dosis entre 15 y 27 días respecto de la presión arterial y la frecuencia cardíaca basales

Grupo de dosis:	Dosis (mg/kg)	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)	Arterial media (mmHg)	Presión de pulso (mmHg)	Frecuencia cardíaca (BPM)
PBS	0	3.37±0.40	-0.17±0.35	1.45±0.36	3.55±0.07	-30.93±1.85
mAb de control de isotipo IgG4P	25	0.50±0.38 ****	0.44±0.35	0.49±0.35	0.07±0.07* ***	-25.24±1.95
H4H22034N	1	4.04±0.30	1.50±0.28	2.62±0.28	2.55±0.20	-41.12±2.29*
REGN7541		9.03±0.32 ****	5.83±0.51**	7.44±0.49**	3.60±0.21	-24.76±1.89
REGN7544		5.20±0.54 *	5.02±0.42**	4.95±0.47**	0.16±0.32* ***	- 15.75±2.68**
REGN7548		4.79±0.34	3.47±0.31**	3.92±0.30**	1.36±0.19*	- 19.30±1.86**

H4H22034N	25	10.53±0.4 3****	5.38±0.42** **	7.78±0.42** **	5.17±0.15* *	-29.57±2.31
REGN7541		12.05±0.3 2****	9.36±0.44** **	10.29±0.35* ***	2.73±0.23	-31.24±1.97
REGN7544		14.20±0.4 2****	4.94±0.36** **	9.43±0.37** **	9.30±0.14* ***	- 41.43±2.15**
REGN7548		10.58±0.2 9****	4.71±0.25** **	7.52±0.26** **	5.89±0.10* ***	-35.53±1.75

Ratones *NPR1^{hu/hu}* normotensos telemétricos fueron aleatorizados en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una única inyección subcutánea de 1 o 25 mg/kg de mAb antagonista de NPR1, control de isotipo o PBS como se describe en la Tabla 28. Todos los valores son medias $\pm$ SEM, n=4-5 por grupo. Estadísticas: ANOVA de dos vías con Dunnett; *p<.05 frente a PBS.

[0248] Los efectos crónicos de estos anticuerpos antagonistas de NPR1 se evaluaron durante 27 días (Tabla 30 y Figura 6 y Figura 7). Después de una única inyección subcutánea de 1 mg/kg el día 0, la presión arterial sistémica permaneció significativamente elevada para 3 de los 4 mAb bloqueadores de NPR1 evaluados durante el periodo de prueba (Tabla 30 y Figura 6). La magnitud del aumento de la presión arterial después de una dosis única subcutánea de 1 mg/kg evaluada por el cambio medio (de los días 15 a 27 después de la dosis) de la presión arterial sistólica desde el valor inicial osciló entre $+4.04 \pm 0.30$ (H4H22034) y $+9.03 \pm 0.32$ (REGN7541) mmHg. Después de una única inyección subcutánea de 25 mg/kg el día 0, la presión arterial sistémica permaneció significativamente elevada para todos los mAb bloqueadores de NPR1 evaluados. La magnitud del

aumento de la presión arterial después de una dosis única subcutánea de 25 mg/kg, evaluada por el cambio medio (de los días 15 a 27 después de la dosis) de la presión arterial sistólica desde el valor inicial, osciló entre $+10.53 \pm 0.43$ (H4H22034) y $+14.2 \pm 0.42$ (REGN7544) mmHg. Las respuestas de la frecuencia cardíaca fueron variables (Tabla 29 y Tabla 30), con tendencias generales de reducción de la frecuencia consistentes con el aumento observado de la presión arterial sistémica. Las presiones diastólica, arterial media y del pulso (Tabla 29 y Tabla 30) también cambiaron significativamente después de la dosificación de mAb bloqueadores de NPR1, con magnitudes y duraciones del efecto consistentes con las observadas e informadas sobre las presiones arteriales sistólicas.

[0249] Los anticuerpos antagonistas de NPR1 H4H22034N, REGN7541, REGN7544 y REGN7548 aumentaron significativamente la presión arterial sistémica durante hasta 27 días después de una única inyección subcutánea en ratones NPR1^{hu/hu} normotensos.

Ejemplo 10: Caracterización del efecto sobre la presión arterial sistémica de la sobreexpresión de ANP mediante administración hidrodinámica de ADN y capacidad para revertir

los efectos después de una dosis única de 25 mg/kg de un mAb antagonista de NPR1 en ratones NPR1^{hu/hu} hipotensos.

Procedimiento experimental

[0250] Los objetivos de este estudio fueron evaluar los
5 efectos de los anticuerpos antagonistas de NPR1 y su capacidad
para revertir los efectos hipotensores de la sobreexpresión de
ANP en ratones NPR1^{hu/hu} hipotensos telemétricos. A ratones macho
NPR1^{hu/hu} (n = 48) de edades comprendidas entre 12 y 16 semanas
se les implantaron telémetros PA-C10 (DSI, St. Paul, MN) y se
10 les permitió recuperarse durante al menos 7 días. Los animales
se estratificaron en grupos (Grupos 1-6) según el peso corporal
(Tabla 31). Los animales se alojaron individualmente en
condiciones estándar (temperaturas de 64°F a 84°F (18°C a
29°C); humedad relativa de 30% a 70%) y se mantuvo un ciclo de
15 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Se proporcionaron
alimentos (comida en pellets estándar de Research Diets) y agua
ad libitum.

Tabla 31. Sumario de dosis y grupos de dosis

Grupo Núm.	Construcción de HDD	Dosis de construcción HDD (µg de ADN, iv)	Artículo de prueba o control	Nivel de dosis (mg/kg/dosis , iv)	Volumen de dosis (mL/kg)	Número de animales
						Machos
1	Plásmido de control	50	MAB de control de isotipo	25	5	8
2	Plásmido ANP		H4H22034 N			8
3			REGN7541			8
4			REGN7544			8
5			REGN7548			8
6						8

[0251] Los plásmidos HDD y las proteínas de prueba se administraron a los animales apropiados mediante inyecciones intravenosas únicas el día 0 y el día 7, respectivamente. El volumen de dosis para la administración de las proteínas de prueba se basó en la medición de peso corporal más reciente.

[0252] Se recogieron la presión sistólica, la presión diastólica, la presión arterial media, la presión del pulso y la frecuencia cardíaca durante 10 segundos cada minuto durante el periodo de prueba. Los datos de telemetría se presentan como valores medios de 24 horas. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

Resultados

[0253] La caracterización *in vivo* de los anticuerpos antagonistas de NPR1 demostró que, en comparación con animales

con dosis de control del isotipo IgG4P, los anticuerpos antagonistas de NPR1 fueron capaces de normalizar rápida y persistentemente las reducciones de la presión arterial sistémica inducidas por la sobreexpresión de ANP en ratones NPR1^{hu/hu} (Tabla 32 y Tabla 33). Las concentraciones séricas de NTproANP aumentaron significativa y persistentemente durante el periodo de prueba (Tabla 34), lo que indica una sobreexpresión efectiva de ANP. La magnitud del aumento de la presión arterial en ratones hipotensos inducidos por ANP HDD después de una dosis única intravenosa de 25 mg/kg de un bloqueador NPR1, evaluado por el cambio medio (de los días 7 a 28 después de la dosis) de la presión arterial sistólica desde el inicio osciló entre -9.27 ± 0.61 (H4H22034N) a $+10.26 \pm 1.48$ (REGN7544) mmHg (Tabla 33 y Figura 8) en relación con la dosificación HDD previa a ANP.

Tabla 32. Cambio medio de la dosis de HDD a los 7 días con respecto a la presión arterial y la frecuencia cardíaca basales

Grupo de HDD:	Artículo de prueba	Dosis del artículo de prueba (mg/kg)	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)	Arterial media (mmHg)	Presión de pulso (mmHg)	Frecuencia cardíaca (BPM)
Plásmido de control	mAb de control de isotipo	25	- 2.83±0.94	-0.79±0.88	- 1.75±0.84	- 2.05±0.43	0.36±6.65
Plásmido ANP			- 27.31±3.53****	- 14.21±1.75* ***	- 21.65±2.72****	- 13.00±1.82****	29.90±11.10***
	H4H22 034N		- 26.27±3.57****	- 12.94±1.74* ***	- 20.13±2.69****	- 13.23±1.86****	32.31±14.17***
	REGN7 541		- 26.92±3.58****	- 13.92±1.84* ***	- 20.70±2.77****	- 12.96±1.78****	21.84±10.08*
	REGN7 544		- 28.18±3.73****	- 14.57±1.79* ***	- 21.99±2.80****	- 13.62±2.04****	18.67±17.90
	REGN7 548		- 25.40±3.12****	- 12.65±1.44* ***	- 19.72±2.35****	- 12.70±1.72****	27.46±11.94**

Ratones *NPR1^{hu/hu}* normotensos telemétricos fueron aleatorizados en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una dosis única de 50 ug de HDD de control o plásmido ANP seguido de una única inyección intravenosa de 25 mg/kg de mAb antagonista de *NPR1* o control de isotipo como se describe en la Tabla 31. Todos los valores son medias $\pm$ SEM, n=4-7 por grupo. Estadísticas: ANOVA

de dos vías con Dunnett; * $p < .05$ vs. Plásmido Control (pHDD1) + Control Isotipo.

Tabla 33. Cambio medio de la dosis post HDD de 8 a 28 días con respecto a la presión arterial y la frecuencia cardíaca basales

Grupo de HDD:	Artículo de prueba	Dosis del artículo de prueba (mg/kg)	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)	Arterial media (mmHg)	Presión de pulso (mmHg)	Frecuencia cardíaca (BPM)
Plásmido de control	mAb de control de isotipo	25	- 0.93±0.53****	0.81±0.46 ****	- 0.18±0.47* ***	- 1.75±0.22*** *	- 14.04±1.86*** *
Plásmido ANP			- 30.40±0.51	- 15.68±0.41	- 23.77±0.45	- -14.64±0.18	- 10.49±1.77
	H4H2203 4N		- 9.27±0.61****	- 6.21±0.61 ****	- 7.67±0.57* ***	- 3.04±0.24*** *	- 23.86±2.40*** *
	REGN75 41		6.02±0.85****	0.43±0.54 ****	3.25±0.64* ***	5.59±0.54*** *	- 51.16±3.86*** *
	REGN75 44		10.26±1.48****	2.95±0.87 ****	6.45±1.12* ***	7.32±0.72*** *	- 65.29±5.12*** *

	REGN75 48	1.44±0.80****	- 1.29±0.65 ****	0.07±0.67* ***	2.73±0.21*** *	- 41.61± 2.57*** *

Ratones $NPR1^{hu/hu}$ normotensos telemétricos fueron aleatorizados en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una dosis única de 50 ug de HDD de control o plásmido ANP seguido de una única inyección intravenosa de 25 mg/kg de mAb antagonista de $NPR1$ o control de isotipo como se describe en la Tabla 31. Todos los valores son medias $\pm$ SEM, n=4-7 por grupo. Estadísticas: ANOVA de dos vías con Dunnett; *p<.05 vs. Plásmido control (pHDD1) + Control isotipo.

Tabla 34. Concentraciones séricas de NTproANP los días 14, 21 y 28

Grupo de HDD:	Artículo de prueba	Dosis del artículo de prueba (mg/kg)	Concentraciones séricas de NTproANP (nMol/L)		
			Día 14	Día 21	Día 28
Plásmido de control	mAb de control de isotipo	25	0.61±0.07	0.85±0.15	0.49±0.08
Plásmido ANP			5.21±1.00* ***	5.54±0.55 ****	5.45±0.96 ****
	H4H22034N		4.74±0.62* **	4.76±0.61 ***	4.71±0.56 ***
	REGN7541		5.51±0.84* ***	5.26±0.85 ***	4.96±0.87 ***
	REGN7544		6.88±0.41* ***	5.58±0.77 ***	6.40±0.42 ****
	REGN7548		6.07±0.29* ***	5.44±0.88 ****	5.78±0.21 ****

Ratones *NPR1^{hu/hu}* normotensos telemétricos fueron aleatorizados en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una dosis única de 50 ug de HDD de control o plásmido ANP seguido de una única inyección intravenosa de 25 mg/kg de mAb antagonista de NPR1 o control de isotipo como se describe en la Tabla 31. Todos los valores son medias $\pm$ SEM, n=5-8 por grupo. Estadísticas: ANOVA de dos vías con Dunnett; *p<.05 vs. Plásmido control (pHDD1) + Control isotipo.

10 **[0254]** De acuerdo con las reducciones significativas y persistentes de las presiones sistémicas y las probables reducciones de la poscarga del ventrículo izquierdo, los pesos absolutos y relativos del corazón se redujeron significativamente en ratones que habían recibido ANP HDD
15 (Figuras 9A y 9B). Los corazones de animales que recibieron un mAb bloqueador de NPR1 no fueron diferentes de los controles normotensos e indican un aumento efectivo en las presiones sistémica y ventricular.

20 **[0255]** Los anticuerpos antagonistas de NPR1 H4H22034N, REGN7541, REGN7544 y REGN7548 aumentaron significativa y persistentemente la presión arterial sistémica durante hasta 28 días en ratones *NPR1^{hu/hu}* hipotensos inducidos por ANP HDD.

Ejemplo 11: Bloqueo de NPR1 en dosificación preventiva y terapéutica con modelo de choque inducido por LPS en ratones NPR1^{hu/hu} telemétricos

Procedimiento experimental

5 **[0256]** Los objetivos de este estudio fueron evaluar los efectos de los anticuerpos antagonistas de NPR1 dosificados de forma preventiva o terapéutica a ratones NPR1^{hu/hu} telemétricos que tenían hipotensión como resultado de la administración de LPS. A ratones macho NPR1^{hu/hu} (n = 58) de edades comprendidas
10 entre 12 y 17 semanas se les implantaron telémetros PA-C10 (DSI, St. Paul, MN) y se les permitió recuperarse durante al menos 7 días. Los animales se estratificaron en grupos (Grupos 1-6) basándose en el peso corporal y las presiones sistólica y de pulso, antes de ser asignados al grupo (Tabla 35). Los
15 animales se alojaron individualmente en condiciones estándar (temperaturas de 64°F a 84°F (18°C a 29°C); humedad relativa de 30% a 70%) y se mantuvo un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Se proporcionaron alimentos (comida en pellets estándar de Research Diets) y agua *ad libitum*.

20 **Tabla 35. Resumen de dosis y grupos de dosis**

Grupo Núm.	Número de animales	Desafío	Artículo de prueba o control	Nivel de dosis (mg/kg/ iv)	Volumen de dosis (mL/kg)
	Machos				
1	8	Salina	PBS	0	5
2	10	LPS (5			
3	10	mg/kg, ip)	REGN7544	25	

4	10	REGN7548	
5	10	*Preventivo* -REGN7544	
6	10	*Preventivo* -REGN7548	

[0257] A los animales se les administró una única inyección intraperitoneal de 5 mg/kg de LPS o PBS el día 0. Las proteínas de prueba se administraron a los animales apropiados mediante una única inyección intravenosa aproximadamente 24 horas antes u 8 horas después de la dosis de LPS. El volumen de dosis para cada animal se basó en la medición de peso corporal más reciente.

[0258] Se recogieron la presión sistólica, la presión diastólica, la presión arterial media, la presión del pulso y la frecuencia cardíaca durante 10 segundos cada 10 minutos durante el periodo de prueba. Los datos de telemetría se presentan como valores medios de 24 horas. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

15 Resultados

[0259] La caracterización *in vivo* de anticuerpos antagonistas de NPR1 dosificados de forma preventiva o terapéutica a ratones NPR1^{hu/hu} hipotensos inducidos por LPS mostró aumentos significativos y persistentes de la presión arterial sistémica (Tabla 36, Tabla 37, Figura 10). Los animales que recibieron dosis preventivas presentaron rápidos aumentos de presión (Tabla 36). La magnitud del aumento de la presión arterial en el brazo preventivo del estudio después de

una dosis única intravenosa de 25 mg/kg, evaluada por el cambio medio (de 24 horas antes del tiempo de la dosis de LPS) de la presión arterial sistólica desde el inicio osciló entre $+7.24 \pm 1.18$ (REGN7548) a $+9.07 \pm 1.10$ (REGN7541) mmHg (Tabla 36 y Figura 10). La magnitud del aumento de la presión arterial después de una dosis intravenosa única de 25 mg/kg administrada 8 horas después de la dosis de LPS, según lo evaluado por el cambio medio (de 8 horas a 48 horas después de la dosis de LPS) de la presión arterial sistólica desde el inicio osciló entre -1.49 ± 2.244 (REGN7548) a -1.49 ± 2.24 (REGN7544) mmHg (Tabla 37). Las presiones de pulso en animales a los que se les administraron dosis terapéuticas, según lo evaluado por el cambio medio (de 8 horas a 48 horas después de la dosis de LPS), desde el valor inicial, variaron de $0,27 \pm 0,93$ (REGN7548) a $-0,40 \pm 0,91$ (REGN7544) mmHg (Tabla 37, Figura 10).

Tabla 36. Cambio medio de 24 horas antes del tiempo 0 antes de la dosis de LPS con respecto a la presión arterial y la frecuencia cardíaca basales

Desafío	Grupo de dosis:	Dosis (mg/kg)	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)	Arterial media (mmHg)	Presión de pulso (mmHg)	Frecuencia cardíaca (BPM)
Salina	PBS	0	0.14 ± 1.2	-0.13 ± 1.02	0.03 ± 1.10	0.30 ± 0.2 3***	1.85 ± 8.06

LPS	PBS		- 0.90±1.2	0.26±1.06	-0.37±1.15	- 1.13±0.1 9	4.89±7.91
LPS	*Preven tivo* - REGN7 544	25	9.07±1.1 0****	3.49±0.96* **	6.65±0.99* ***	5.60±0.3 2****	- 2.57±5.84
LPS	*Preven tivo* - REGN7 548		7.24±1.1 8****	1.93±1.08	4.93±1.09* ***	5.30±0.2 4****	- 2.93±5.31
LPS	REGN7 544		- 0.04±1.3 6	2.46±1.28	1.08±1.31	- 2.55±0.2 0**	- 0.57±8.27
LPS	REGN7 548		- 0.44±1.2 6	-0.49±1.11	-0.41±1.18	0.05±0.1 8****	2.85±8.05

Ratones NPR1^{hu/hu} telemétricos fueron aleatorizados en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una única inyección intraperitoneal de 5 mg/kg de LPS o solución salina y una única inyección intravenosa de un mAb antagonista de NPR1 o PBS ~24 horas antes o 8 horas después de la dosis de LPS como se describe en la Tabla 35. Todos los valores son media ± SEM, n=7-10 por grupo. Estadísticas: ANOVA de dos vías con Dunnett; *p<.05 vs. LPS + PBS.

Tabla 37. Cambio medio de 8 a 48 horas después de la dosis de LPS con respecto a la presión arterial y la frecuencia cardíaca basales

Desafío	Grupo de dosis:	Dosis (mg/kg)	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)	Arterial media (mmHg)	Presión de pulso (mmHg)	Frecuencia cardíaca (BPM)
---------	-----------------	---------------	------------------	-------------------	-----------------------	-------------------------	---------------------------

Salina	PBS	0	0.66±0.68* ***	0.10±0.69*** *	- 0.15±0.71* ***	0.56±0.13****	- 41.12±6.54****
LPS	PBS		-7.52±1.75	-3.33±1.34	-5.77±1.48	- 4.19±0.54	- 10.32±5.50
LPS	*Preventivo* - REGN7544	25	- 3.32±2.28* *	-3.41±1.69	-3.88±1.93	0.24±0.85****	- 39.73±3.84****
LPS	*Preventivo* - REGN7548		-6.13±2.19	-5.10±1.48	-5.84±1.76	- 1.03±0.95****	- 4.37±5.63
LPS	REGN7544		- 1.49±2.46* ***	-1.92±1.71	- 1.57±2.03* **	- 0.40±0.91****	- 66.59±9.70****
LPS	REGN7548		- 1.49±2.24* ***	-1.50±1.60	- 1.63±1.85* *	- 0.27±0.93****	- 69.46±8.02****

Ratones *NPR1^{hu/hu}* telemétricos fueron aleatorizados en grupos con base en el peso corporal. A los animales se les administró una única inyección intraperitoneal de 5 mg/kg de LPS o solución salina y una única inyección intravenosa de un mAb antagonista de NPR1 o PBS ~24 horas antes o 8 horas después de la dosis de LPS como se describe en la Tabla 35. Todos los valores son media ± SEM, n=7-10 por grupo. Estadísticas: ANOVA de dos vías con Dunnett; *p<.05 vs. LPS + PBS.

[0260] Los anticuerpos antagonistas de NPR1 REGN7544 y REGN7548 aumentaron significativa y persistentemente la presión arterial sistémica cuando se administraron de forma

preventiva o terapéutica a ratones que desarrollaron hipotensión inducida por LPS después de una dosis intraperitoneal única de LPS.

Ejemplo 12: Cada monómero NPR1 se une a un Fab REGN7544

5 Procedimiento experimental

Formación compleja de NPR1 + REGN7544 Fab + ANP

[0261] El dominio extracelular NPR1 humano con una etiqueta myc-myc-6xHis C-terminal (hNPR1-mmh; SEQ ID NO: 74) se mezcló con factor natriurético auricular (ANP, Tocris) y
10 REGN7544 Fab en una proporción molar de 1 hNPR1-mmh+ 2 ANP + 1 REGN7544 Fab. El complejo se incubó durante la noche a 4°C y luego se purificó sobre una columna de filtración en gel Superdex 200 de aumento 10/300 GL equilibrada con Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM. Las fracciones máximas se recogieron y se
15 concentraron usando un concentrador centrífugo MWCO de 10 kDa (Amicon).

Preparación de la red Cryo EM y recopilación de datos

[0262] El complejo NPR1-ANP-REGN7544 se diluyó a 0.87 mg/ml y se añadió poli (anhídrido maleico-alt-1-deceno)
20 sustituido con 3-(dimetilamino)propilamina (PMAL-C8; Anatrace Cat. #P5008) a una concentración final de 0.15%. La muestra se depositó sobre una rejilla UltrAufoil (Quantifoil GmbH) recién limpiada con plasma. El exceso de solución se eliminó con papel de filtro y se sumergió en etano líquido congelado usando un
25 Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Part #1086439). La rejilla se

cargó en un Titan Krios G3i (Thermo Fisher, núm. de pieza 1137337) equipado con un filtro de energía Bioquantum + detector de electrones directo K3 (Gatan Inc, núm. de pieza 1147213). Las películas se recopilaron utilizando EPU v 2.7 (Thermo Fisher) con un aumento de 105,000x, correspondiente a un tamaño de píxel de 0.86 Å. Se utilizó una tasa de dosis de 15 electrones por píxel por segundo, y cada película duró 2 segundos y 46 fotogramas, lo que corresponde a una dosis total de ~40 electrones por Å².

10 *Procesamiento de datos crio-EM*

[0263] Todo el procesamiento de datos crio-EM se llevó a cabo utilizando cryoSPARC v3.2.0 (Structura Biotechnology Inc.). Las películas se alinearon mediante corrección de movimiento de parche y estimación de CTF de parche. Se
15 recopilaron un total de 6692 películas y luego se seleccionaron 6474 películas después de la corrección de movimiento y el parche CTF. Un conjunto inicial de partículas recogidas con el selector de blobs se sometió a una clasificación 2D para generar plantillas para la selección de plantillas. ~1.6
20 millones de partículas recogidas mediante selección de plantillas se sometieron a múltiples rondas de clasificación 2D, lo que dio como resultado 814,655 partículas complejas "buenas". La reconstrucción ab initio con 6 clases seguida de un refinamiento heterogéneo generó una clase "buena" que
25 contenía 310,944 partículas que correspondían al Fab NPR1-ANP-

REGN7544 completo en un mapa isotrópico. Se siguió un refinamiento no uniforme de las partículas en la clase "buena" mediante refinamiento local que resultó en un mapa de resolución de 3.15 Å (FSC = 0.143) que se utilizó para la construcción del modelo. En este mapa, colocamos manualmente modelos de NPR1 (tomado del código PDB 1T34) y los dos Fab (tomado del anticuerpo Regeneron anterior). Estos modelos luego se reconstruyeron manualmente usando Coot (v 0.8.2 Laboratorio de Biología Molecular del Consejo de Investigación Médica) y el espacio real se refinó con el mapa usando Phenix (v 1.15.2 The PHENIX Industrial Consortium).

Formación compleja de NPR1 + REGN7544 Fab

[0264] El dominio extracelular NPR1 humano con una etiqueta myc-myc-6xHis C-terminal (hNPR1-mmh; SEQ ID NO: 74) se mezcló con el Fab REGN7544 en una relación molar de 1 hNPR1-mmh + 1 Fab REGN7544. El complejo se incubó durante la noche a 4°C, luego se purificó sobre una columna de filtración en gel Superdex 200 de aumento 10/300 GL equilibrada con Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM. Las fracciones máximas se recogieron y se concentraron usando un concentrador centrífugo MWCO de 10 kDa (Amicon).

Preparación de la red Cryo EM y recopilación de datos

[0265] El complejo NPR1-REGN7544 se diluyó a 0.8 mg/ml y se añadió poli(anhídrido maleico-alt-1-deceno) sustituido con 3-(dimetilamino)propilamina (PMAL-C8; Anatrace Cat. #P5008)

hasta una concentración final del 0.15%. La muestra se depositó sobre una rejilla UltraAufoil (Quantifoil GmbH) recién limpiada con plasma. El exceso de solución se eliminó con papel de filtro y se sumergió en etano líquido congelado usando un Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Part #1086439). La rejilla se cargó en un Titan Krios G3i (Thermo Fisher, núm. de pieza 1137337) equipado con un filtro de energía Bioquantum + detector de electrones directo K3 (Gatan Inc, núm. de pieza 1147213). Las películas se recopilaron utilizando EPU v 2.7 (Thermo Fisher) con un aumento de 105,000x, correspondiente a un tamaño de píxel de 0.86 Å. Se utilizó una tasa de dosis de 15 electrones por píxel por segundo, y cada película duró 2 segundos y 46 fotogramas, lo que corresponde a una dosis total de ~40 electrones por Å².

15 *Procesamiento de datos crio-EM*

[0266] Todo el procesamiento de datos crio-EM se llevó a cabo utilizando cryoSPARC v3.2.0 (Structura Biotechnology Inc.). Las películas se alinearon mediante corrección de movimiento de parche y estimación de CTF de parche. Se recopiló un total de 10,378 películas y luego se seleccionaron 9660 películas después de la corrección de movimiento y el parche CTF. Un conjunto inicial de partículas recogidas con el selector de blobs se sometió a una clasificación 2D para generar plantillas para la selección de plantillas. ~1.7 millones de partículas recogidas mediante selección de

plantillas se sometieron a múltiples rondas de clasificación 2D, lo que dio como resultado 762,681 partículas complejas "buenas". La reconstrucción ab initio con 6 clases seguida de un refinamiento heterogéneo generó una clase "buena" que

5 contenía 256,375 partículas que correspondían al Fab NPR1-REGN7544 completo en un mapa isotrópico. El refinamiento no uniforme de las partículas de la clase "buena" fue seguido por un refinamiento local que dio como resultado un mapa de resolución de 3.42 Å (FSC=0.143) que se utilizó para la

10 construcción del modelo. En este mapa, se colocaron manualmente modelos de NPR1 (tomado del código PDB 1DP4) y los dos Fabs (tomado de estructuras de anticuerpos Regeneron anteriores). Luego, estos modelos se reconstruyeron manualmente utilizando Coot (v 0.8.2 Laboratorio de Biología Molecular del Consejo de

15 Investigación Médica) y el espacio real se refinó con respecto al mapa utilizando Phenix (v 1.15.2 The PHENIX Industrial Consortium).

Resultados

[0267] Las estructuras de hNPR1 + ANP + REGN7544 Fab y

20 hNPR1 + REGN7544 Fab mostraron que cada monómero NPR1 se une a un Fab REGN7544. El Fab se une a residuos en el lóbulo inferior (C-terminal, más cercano a la membrana celular) del dominio extracelular. Con REGN7544 unido, el dímero NPR1 adopta una conformación inactiva en ausencia de ANP y una conformación

25 activa en presencia de ANP. Estas conformaciones son muy

similares a los estados observados de NPR1 sin anticuerpo unido en presencia o ausencia de ANP; sin embargo, estos estudios se realizaron con dominios extracelulares solubles, no con la forma completa de NPR1 unida a la membrana. Tanto la cadena pesada como la ligera de REGN7544 interactúan con el dominio extracelular NPR1. Los residuos de contacto en el dominio extracelular NPR1 siguen siendo los mismos en presencia o ausencia de ANP. Hay 15 residuos de contacto a través de la cadena pesada y 7 residuos de contacto a través de la cadena ligera. Los residuos en el dominio extracelular NPR1 que interactúan directamente con REGN7544 Fab son Arg143, Leu144, Glu384, Leu401, Val402, Ala103, Ser405, Gly406, Arg407, Lys408, Trp411, Leu413, Gly414, Tyr415 y Pro416.

Ejemplo 13: Evaluación de la capacidad de los vasodilatadores para revertir los cambios inducidos por REGN7544 en la presión arterial

[0268] Se evaluó la capacidad de tres agentes vasodilatadores diferentes (nifedipina (Sigma-Aldrich), enalapril (Sigma-Aldrich) y molsidomina (Sigma-Aldrich)) con diferentes objetivos mecánicos para revertir el aumento de la presión arterial inducido por REGN7544 en ratones humanizados con NPR1. Enalapril, molsidomina y nifedipina, los tres agentes vasodilatadores utilizados, se administraron por vía oral. Enalapril reduce la presión arterial mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que reduce la

presión arterial al disminuir la producción de angiotensina II, un vasoconstrictor, y aumentar los niveles de bradicinina, un péptido que aumenta el diámetro de los vasos sanguíneos. La molsidomina, un donante de óxido nítrico, y la nifedipina, un
 5 bloqueador de los canales de calcio, también reducen la presión arterial.

[0269] El esquema de dosificación para evaluar la reversión de los efectos inducidos por REGN7544 mediante vasodilatadores en ratones humanizados con NPR1 telemedidos se
 10 resume en la siguiente tabla:

Tabla 38

Grupos de dosis				Ratones usados		Duración de estudio
Dosificación Día 0		Dosificación diaria Días 7-13		n	Edad (semanas)	
Artículo de prueba	Dosis Administrada (SC)	Artículo de prueba	Dosis administrada (sonda oral)			
PBS	5 ml/kg	Agua	10ml/kg	6	13 a 15	13 días
REGN7544	25 mg/kg	Agua	10ml/kg	6		
		Nifedipina	20 mg/kg	6		
		Enalapril	25 mg/kg	7		
		Molsidomina	10 mg/kg	7		

PBS, solución salina tamponada con fosfato; SC, subcutáneo

[0270] A ratones machos humanizados con NPR1 telemétricos
 15 de edades de 13 a 15 semanas se les administró una dosis única de 25 mg/kg de REGN7544 (n=28) o control de vehículo (es decir,

PBS) (n=7) mediante inyección subcutánea (SC) el Día 0. A partir del día 7 (169 horas después de la dosis SC), los ratones pretratados con REGN7544 comenzaron a recibir dosis diarias de nifedipina (20 mg/kg), enalapril (25 mg/kg), molsidomina (10 mg/kg) o agua (n= 7/grupo) mediante sonda oral (PO), mientras que todos los ratones pretratados con control de vehículo recibieron agua. Se registró la presión arterial diastólica y sistólica de todos los animales de forma continua 72 horas antes de la administración de REGN7544 o control del vehículo hasta el final del experimento, y estas mediciones se utilizaron para calcular la presión del pulso. Se midió el cambio medio en la presión del pulso normalizada al valor inicial para cada grupo de tratamiento i) entre 149 y 221 horas después de la administración de REGN7544 o control de vehículo y ii) entre 3 días antes de la administración de REGN7544 o control de vehículo hasta el final del experimento.

[0271] Cada vasodilatador probó una presión de pulso (PP) reducida en ratones humanizados con NPR1 pretratados con REGN7544 (Figura 11). De hecho, se demostró que la administración de vasodilatadores revierte los efectos de REGN7544 que aumentan la presión del pulso.

[0272] A ratones machos humanizados con NPR1 telemétricos de edades de 13 a 15 semanas se les administró una dosis única de 25 mg/kg de REGN7544 (n=28) o control de vehículo (es decir, PBS) (n=7) mediante inyección subcutánea (SC) el día 0. A

partir del día 7, los ratones pretratados con REGN7544 comenzaron a recibir dosis diarias de nifedipina (20 mg/kg), enalapril (25 mg/kg), molsidomina (10 mg/kg) o agua (n=7/grupo) mediante sonda oral (PO), mientras que todos los ratones pretratados con control de vehículo recibieron agua. La presión del pulso se registró para todos los animales de forma continua 72 horas antes de la administración de REGN7544 o control del vehículo hasta el final del experimento. El cambio medio en la presión arterial sistólica normalizada al valor inicial para cada grupo de tratamiento se midió entre 3 días antes de la administración de REGN7544 o el control del vehículo hasta el final del experimento.

[0273] Los vasodilatadores disminuyeron la presión arterial sistólica (PAS) en ratones humanizados con NPR1 pretratados con REGN7544 (Figura 12). De hecho, se descubrió que la administración de vasodilatadores revierte el aumento de la presión arterial sistólica inducido por REGN7544.

[0274] A ratones machos humanizados con NPR1 telemétricos de edades de 13 a 15 semanas se les administró una dosis única de 25 mg/kg de REGN7544 (n=28) o control de vehículo (es decir, PBS) (n=7) mediante inyección subcutánea (SC) el día 0. A partir del día 7, los ratones pretratados con REGN7544 comenzaron a recibir dosis diarias de nifedipina (20 mg/kg), enalapril (25 mg/kg), molsidomina (10 mg/kg) o agua (n=7/grupo) mediante sonda oral (PO), mientras que todos los ratones

pretratados con control de vehículo recibieron agua. La presión del pulso se registró para todos los animales de forma continua 72 horas antes de la administración de REGN7544 o control del vehículo hasta el final del experimento. El cambio medio en la frecuencia cardíaca normalizada al valor inicial para cada grupo de tratamiento se midió entre 3 días antes de la administración de REGN7544 o el control del vehículo hasta el final del experimento.

[0275] No se registró ningún efecto observable sobre la frecuencia cardíaca después de la administración de enalapril, molsidomina y nifedipina (datos no mostrados). De hecho, se demostró que la administración de vasodilatadores en presencia de REGN7544 no tiene ningún efecto sobre la frecuencia cardíaca.

[0276] A ratones machos humanizados con NPR1 telemétricos de edades de 13 a 15 semanas se les administró una dosis única de 25 mg/kg de REGN7544 (n=28) o control de vehículo (es decir, PBS) (n=7) mediante inyección subcutánea (SC) el día 0. A partir del día 7, los ratones pretratados con REGN7544 comenzaron a recibir dosis diarias de nifedipina (20 mg/kg), enalapril (25 mg/kg), molsidomina (10 mg/kg) o agua (n=7/grupo) mediante sonda oral (PO), mientras que todos los ratones pretratados con control de vehículo recibieron agua. Se registró la presión arterial sistólica y diastólica para todos los animales de forma continua 72 horas antes de la

administración de REGN7544 o control del vehículo hasta el final del experimento, y estas mediciones se usaron para calcular la presión del pulso. La presión del pulso media para cada grupo de tratamiento se midió entre 3 días antes de la
5 administración de REGN7544 o control del vehículo hasta el final del experimento. La administración de vasodilatadores revirtió los efectos de aumento de la presión del pulso de una dosis SC única de REGN7544 (datos no mostrados).

[0277] A ratones machos humanizados con NPR1 telemétricos
10 de edades de 13 a 15 semanas se les administró una dosis única de 25 mg/kg de REGN7544 (n=28) o control de vehículo (es decir, PBS) (n=7) mediante inyección subcutánea (SC) el día 0. A partir del día 7, los ratones pretratados con REGN7544 comenzaron a recibir dosis diarias de nifedipina (20 mg/kg),
15 enalapril (25 mg/kg), molsidomina (10 mg/kg) o agua (n=7/grupo) mediante sonda oral (PO), mientras que todos los ratones pretratados con control de vehículo recibieron agua. La presión arterial sistólica se registró para todos los animales de forma continua 72 horas antes de la administración de REGN7544 o
20 control del vehículo hasta el final del experimento. La presión arterial sistólica media para cada grupo de tratamiento se midió entre 3 días antes de la administración de REGN7544 o control del vehículo hasta el final del experimento. La administración de vasodilatadores revierte los efectos de

aumento de la presión arterial sistólica de una dosis SC única de REGN7544 (datos no mostrados).

[0278] A ratones machos humanizados con NPR1 telemétricos de edades de 13 a 15 semanas se les administró una dosis única de 25 mg/kg de REGN7544 (n=28) o control de vehículo (es decir, PBS) (n=7) mediante inyección subcutánea (SC) el día 0. A partir del día 7, los ratones pretratados con REGN7544 comenzaron a recibir dosis diarias de nifedipina (20 mg/kg), enalapril (25 mg/kg), molsidomina (10 mg/kg) o agua (n=7/grupo) mediante sonda oral (PO), mientras que todos los ratones pretratados con control de vehículo recibieron agua. La frecuencia cardíaca se registró para todos los animales de forma continua 72 horas antes de la administración de REGN7544 o control del vehículo hasta el final del experimento. La frecuencia cardíaca media para cada grupo de tratamiento se midió entre 3 días antes de la administración de REGN7544 o control del vehículo hasta el final del experimento. La administración de vasodilatadores después de una dosis única de REGN7544 no tuvo ningún efecto compensatorio sobre la frecuencia cardíaca (datos no mostrados).

[0279] A ratones machos humanizados con NPR1 telemétricos de edades de 13 a 15 semanas se les administró una dosis única de 25 mg/kg de REGN7544 (n=28) o control de vehículo (es decir, PBS) (n=7) mediante inyección subcutánea (SC) el día 0. A partir del día 7, los ratones pretratados con REGN7544

comenzaron a recibir dosis diarias de nifedipina (20 mg/kg), enalapril (25 mg/kg), molsidomina (10 mg/kg) o agua (n=7/grupo) mediante sonda oral (PO), mientras que todos los ratones pretratados con control de vehículo recibieron agua. La presión arterial diastólica se registró para todos los animales de forma continua 72 horas antes de la administración de REGN7544 o control del vehículo hasta el final del experimento. La presión arterial diastólica media (i) normalizada al valor inicial y (ii) no normalizada para cada grupo de tratamiento se midió entre 3 días antes de la administración de REGN7544 o control del vehículo hasta el final del experimento. La administración de enalapril revirtió los efectos de aumento de la presión arterial diastólica de una dosis SC única de REGN7544 (datos no mostrados).

[0280] Por lo tanto, se probó la reversibilidad de los efectos hemodinámicos después de una dosis SC de 25 mg/kg de REGN7544 mediante sonda oral de 3 vasodilatadores clínicos. Los tres agentes vasodilatadores diferentes, nifedipina, enalapril y molsidomina, revirtieron el aumento de PP inducido por REGN7544 sin tener ningún efecto significativo observable sobre la frecuencia cardíaca. Los aumentos de PP mediados por REGN7544 se revirtieron por separado mediante cualquiera de los tres vasodilatadores clínicos (nifedipina, enalapril y molsidomina) administrados por sonda oral.

[0281] La presente invención no debe estar limitada en alcance por las modalidades específicas descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la descripción además de las descritas en el presente documento
5 resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Se pretende que dichas modificaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10

15

20

25