

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 352**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C12Q 1/18** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**C07K 16/22** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**G01N 33/566** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2007 PCT/EP2007/051920**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2007 WO07099133**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2007 E 07726556 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 1989546**

54 Título: **Cribado para compuestos anti-cáncer usando actividad de netrina-1**

30 Prioridad:

**28.02.2006 US 776926 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.02.2017**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)  
3, RUE MICHEL-ANGE  
75016 PARIS, FR y  
CENTRE LÉON BÉRARD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MEHLEN, PATRICK;  
BERNET, AGNÈS y  
FITAMANT, JULIEN**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 601 352 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Cribado para compuestos anti-cáncer usando actividad de netrina-1.

5 **[0001]** El asunto de la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para el cribado de compuestos anti-cáncer basado en la capacidad de estos compuestos de interactuar con netrina-1 y/o de inhibir la dimerización del dominio intracelular del receptor de netrina-1 expresado en células tumorales. La invención también se refiere a un procedimiento para predecir la presencia de cáncer metastásico, o para determinar la eficiencia de un tratamiento anti-cáncer basado en la medición del nivel de expresión de netrina-1. La invención comprende, además,  
10 kits y compuestos como un medicamento para el tratamiento de un cáncer metastásico tal como cáncer de mama, relacionados con la sobreexpresión de netrina-1 por las células tumorales.

**[0002]** La netrina-1, una proteína relacionada con laminina difusible, ha demostrado desempeñar un papel fundamental en el control de la navegación neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso<sup>31</sup>, interactuando con  
15 sus principales receptores, DCC (delecionado en cáncer colorrectal)<sup>1, 2, 3</sup> y UNC5H<sup>4, 5</sup>. Sin embargo, más recientemente, la netrina-1 ha surgido como una molécula completamente diferente que regula la supervivencia celular. De hecho, los receptores de netrina-1 DCC y UNC5H, -es decir, UNC5H1, UNC5H2 y UNC5H3- pertenecen a la llamada familia de receptores de dependencia<sup>6, 7</sup>. Los receptores de dependencia forman un grupo de receptores que comparten la capacidad de inducir muerte celular cuando se expresan en entornos en los que su  
20 ligando no está disponible<sup>44</sup>. Dichos receptores, que también incluyen RET<sup>8</sup>,  $\beta$ -integrinas<sup>9</sup>, el receptor Patched<sup>10</sup>, neogenina<sup>11</sup>, p75<sup>NTR</sup><sup>12</sup> y el receptor de andrógenos<sup>40</sup>, comparten la propiedad funcional de inducir muerte celular cuando se desprenden de sus ligandos, aunque la presencia de su ligando bloquea esta actividad proapoptótica. Dichos receptores crean, de este modo, estados celulares de dependencia de sus respectivos ligandos<sup>13, 14</sup>.

25 **[0003]** Se ha sugerido que este efecto de dependencia actúa como un mecanismo para eliminar células tumorales que se desarrollarían en entornos de indisponibilidad de ligando: proliferación de células tumorales en un entorno celular con constante y limitada presencia de ligando o migración de células tumorales metastásicas hacia tejidos donde el ligando no se expresa. Una ventaja selectiva para una célula tumoral sería entonces perder la capacidad proapoptótica de sus receptores de dependencia. Se predijo a partir de cribados genéticos que la netrina-  
30 1-UNC6 de *C. elegans* interactuaba con UNC40 y con UNC5<sup>42</sup>. Cuatro ortólogos de UNC5 se identificaron en mamíferos: se descubrió que UNC5H1, H2, H3, H4 y UNC40 eran el ortólogo del DCC (delecionado en cáncer colorrectal) de vertebrados<sup>39</sup>. En esta línea, a principios de los años 1990 se propuso que DCC era un gen supresor de tumores, cuya expresión se pierde en la amplia mayoría de cánceres humanos<sup>15, 16</sup>. Esta hipótesis también encaja con la reciente observación de que los genes de UNC5H son regulados negativamente en la amplia mayoría  
35 de tumores colorrectales, sugiriendo por lo tanto que la pérdida de genes de UNC5H representa una ventaja selectiva para el desarrollo de tumores<sup>17</sup>. Curiosamente, en ratones, tanto la inactivación de UNC5H3 como la sobreexpresión de netrina-1 en el tracto gastrointestinal están asociadas con la progresión del tumor intestinal<sup>18, 19</sup>, demostrando por lo tanto *per se* que la pérdida de receptores de dependencia de netrina-1 en la patología humana es un factor causal para la progresión de tumores. Sin embargo, aunque una serie inicial de informes apoyó el hecho  
40 de que DCC actuaba como un supresor tumoral (para una revisión, véase<sup>29</sup>), han surgido dudas, principalmente debido a la rareza de las mutaciones puntuales en la secuencia codificante de DCC y debido a la falta de predisposición tumoral en ratones hemigénicos para DCC<sup>41</sup>.

**[0004]** Sin embargo, el modelo descrito anteriormente predice que tanto la pérdida de los receptores de netrina-1 como el aumento de expresión del ligando -es decir, expresión autocrina- deben observarse en cánceres  
45 humanos, dado que deben representar ventajas selectivas similares. Esta cuestión es importante no solamente para el conocimiento básico, sino que es crucial para terapia: de hecho, inhibir la interacción extracelular entre receptores de dependencia de netrina-1 y netrina-1 podría representar una estrategia atractiva para desencadenar regresión tumoral.

50 **[0005]** Es particularmente deseable proporcionar medios sencillos y uniformes para identificar y caracterizar nuevos compuestos que pueden usarse para el tratamiento de cáncer.

**[0006]** Sorprendentemente, los inventores han demostrado en primer lugar que, en lugar de perder  
55 receptores de dependencia de netrina-1, la mayoría de los tumores de mama metastásicos mostraban expresión de netrina-1 incrementada, un rasgo que puede ser usado en terapia para desencadenar la muerte del tumor metastásico.

**[0007]** Si la señalización proapoptótica de DCC y/o UNC5H está empezando a ser documentada, una

cuestión importante en esta característica distintiva muerte/vida dictada por DCC, UNC5H y, de forma más general, por los otros receptores de dependencia conocidos, es cómo inhibe la presencia del ligando su actividad proapoptótica<sup>50</sup>.

- 5 **[0008]** En un segundo momento, los inventores analizaron si la multimerización de DCC y/o UNC5H inducida por netrina-1 podría ser la etapa crítica que inhibe la actividad proapoptótica de DCC y/o UNC5H. Sorprendentemente, han demostrado que un receptor de netrina-1, tal como DCC y/o UNC5H multimeriza en respuesta a netrina-1, un proceso suficiente para inhibir la apoptosis.
- 10 **[0009]** En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para seleccionar un compuesto para la prevención o el tratamiento de cáncer, donde dicho procedimiento comprende las siguientes etapas de:
- 15 a) tener un medio que contiene netrina-1, o un fragmento de la misma, y un receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, donde:
- dicha netrina-1, o un fragmento de la misma, y dicho receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, son capaces de interactuar específicamente entre sí para formar un par de unión, y/o
  - dicha netrina-1, o un fragmento de la misma, es capaz de inducir la dimerización o multimerización de dicho receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, particularmente el dominio intracelular de dicho receptor de netrina-1;
- 20 b) poner en contacto dicho medio con el compuesto a poner a prueba;
- 25 c)
- medir la inhibición de la interacción entre netrina-1, o un fragmento de la misma, y dicho receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, y/o
  - determinar si dicho compuesto inhibe la dimerización o multimerización de dicho receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, particularmente la dimerización del dominio intracelular de dicho receptor de netrina-1; y
- 30 d) seleccionar dicho compuesto si:
- la medición en la etapa c) demuestra una inhibición significativa de la interacción entre netrina-1, o un fragmento de la misma, y el receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, en presencia de dicho compuesto, y/o
  - la determinación en la etapa c) demuestra una inhibición significativa de la dimerización o multimerización de dicho receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, en presencia de dicho compuesto, particularmente la dimerización del dominio intracelular de dicho receptor de netrina-1.
- 40 **[0010]** Mediante la expresión interacción entre netrina-1 y su receptor de netrina-1, se pretende designar en la presente solicitud la interacción que da como resultado la ventaja selectiva de que células tumorales escapan de la apoptosis inducida por receptores de dependencia de netrina-1, preferentemente debido a un nivel de netrina-1 elevado.
- 45 **[0011]** De este modo, la inhibición de esta interacción puede obtenerse, por ejemplo, mediante la inhibición completa o parcial de la unión de netrina-1 a su receptor, especialmente en presencia de un ligando competitivo (tal como un anticuerpo que está dirigido a este dominio de membrana extracelular de dicho receptor de netrina-1), o en presencia de un compuesto capaz de formar un complejo específico con la netrina-1 (tal como un dominio de membrana extracelular soluble de su receptor de netrina-1, o parte del mismo).
- 50 **[0012]** En una realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque dicho cáncer a prevenir o tratar es un cáncer donde células tumorales expresan o sobreexpresan netrina-1.
- [0013]** En otra realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque dicho cáncer a prevenir o tratar se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, neuroblastoma, glioma, leucemia mieloide aguda, sarcoma, melanoma, adenocarcinoma de ovario, adenocarcinoma renal, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de útero, adenocarcinoma de estómago, adenocarcinoma de riñón y adenocarcinoma rectal.

**[0014]** En otra realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque dicho cáncer a prevenir o tratar es un cáncer metastásico o agresivo.

5 **[0015]** En el procedimiento de acuerdo con la invención, dicho receptor de netrina-1 se selecciona preferentemente entre el grupo de DCC, UNC5H (particularmente UNC5H1, UNC5H2 y UNC5H3), neogenina y la adenosina A2b, más preferentemente se selecciona entre el grupo de DCC, UNC5H1, UNC5H2 y UNC5H3.

**[0016]** En otra realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque, en la etapa a):

10

- dicho fragmento del receptor de netrina-1 comprende o es el dominio extracelular del receptor de netrina-1, o parte del mismo capaz de interactuar con netrina-1; y/o

- dicho fragmento del receptor de netrina-1 comprende o es el dominio intracelular del receptor de netrina-1, o parte del mismo capaz de dimerizarse o multimerizarse en presencia de netrina-1.

15

**[0017]** En otra realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque dicha netrina-1 y/o dicho receptor de netrina-1 son de mamífero, particularmente de ratón, rata o ser humano.

20 **[0018]** En un aspecto particular del procedimiento de la presente invención, en la etapa a) dicha netrina-1 es de pollo.

**[0019]** En otra realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque dicha netrina-1 y/o dicho receptor de netrina-1 y/o el compuesto a poner a prueba está marcado mediante un marcador capaz de ser medido directa o indirectamente.

25

**[0020]** En otra realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque en la etapa c):

30 - la medida de la inhibición de la interacción entre netrina-1, o un fragmento de la misma, y dicho receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, se lleva a cabo mediante inmunoensayo (particularmente mediante ELISA o mediante ensayo inmunorradiométrico (IRMA)), mediante ensayo de centelleo por proximidad (SPA) o mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET); y/o

35 - la dimerización o multimerización, o su inhibición, de dicho receptor de netrina-1, o fragmento del mismo, particularmente el dominio intracelular, se lleva a cabo mediante inmunoprecipitación o FRET.

**[0021]** En otra realización preferida particular, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque en la etapa a) dicho medio contiene células que expresan en su membrana superficial un receptor de netrina-1 endógeno o uno recombinante, particularmente un dominio extracelular recombinante de dicho receptor de netrina-1.

40

**[0022]** En una realización preferida, dicho receptor de netrina-1 recombinante también comprende el dominio intracelular de dicho receptor de netrina-1.

45 **[0023]** En otra realización preferida particular, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque en la etapa a) dicho medio contiene células tumorales, preferentemente células tumorales metastásicas, que expresan de forma endógena dicho receptor de netrina-1 en la superficie de su membrana y que expresan o sobreexpresan netrina-1, y donde en la etapa c) la inhibición de la interacción entre netrina-1 y su receptor de netrina-1 en presencia del compuesto a poner a prueba, se mide mediante la apoptosis o muerte de células inducida por la presencia del compuesto a poner a prueba, preferentemente analizada usando el procedimiento de tinción con azul de tripano, tal como se indica en los ejemplos a continuación.

50

**[0024]** En una realización preferida, dichas células tumorales se seleccionan entre el grupo que consiste en células 4T1, células CAL51, células T47D, células SKBR7, células IMR32, células GL26 y células H358, especialmente líneas celulares CAL51, tales como la línea celular CAL51-36, que son mucho más susceptibles a muerte celular en respuesta a la presencia de DCC-EC-Fc.

55

**[0025]** La presente invención también se refiere a un procedimiento *in vitro* para seleccionar un compuesto para la prevención o el tratamiento de cáncer, donde dicho procedimiento comprende las siguientes etapas de:

- a) tener un medio que contiene una célula de mamífero que expresa un receptor de netrina-1 endógeno o uno recombinante, o un fragmento del mismo que comprende al menos su dominio intracelular, preferentemente una célula tumoral, más preferentemente una célula que presenta dimerización o multimerización del dominio intracelular de su receptor de netrina-1 o una célula donde el dominio intracelular de su receptor de netrina-1 es capaz de dimerizarse o multimerizarse en presencia de netrina-1;
- b) poner en contacto dicho medio con el compuesto a poner a prueba, conteniendo opcionalmente el medio además netrina-1, o un fragmento de la misma capaz de interactuar con el dominio extracelular del receptor de netrina-1;
- c) determinar si la dimerización o multimerización del dominio intracelular de dicho receptor de netrina-1 se inhibe en presencia de dicho compuesto a poner a prueba;
- d) opcionalmente, determinar (por ejemplo mediante el procedimiento de azul de tripano) si la presencia del compuesto a poner a prueba induce la muerte celular de dicha célula de mamífero; y
- e) seleccionar dicho compuesto si la determinación en la etapa c) demuestra una inhibición significativa de la dimerización o multimerización del dominio intracelular de dicho receptor de netrina-1 y/o si la determinación en la etapa d) demuestra la muerte celular de dicha célula de mamífero.

**[0026]** En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para predecir la presencia de un cáncer metastásico o un cáncer agresivo (tal como neuroblastoma) en un paciente que tiene un tumor primario a partir de una biopsia de dicho paciente que contiene células de tumores primarios, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas de:

- (a) medición del nivel de expresión de netrina-1 en dicha biopsia.

**[0027]** En una realización preferida, el procedimiento para predecir de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque en la etapa a) donde un incremento del nivel de expresión de netrina-1 en dicha biopsia, en comparación con la expresión de netrina-1 en biopsias de tumor primario no metastásico o en biopsias de cáncer no agresivo es indicativo de la presencia de un cáncer metastásico o un cáncer agresivo.

**[0028]** En una realización más preferida, el procedimiento para predecir de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque una relación superior a 2, preferentemente a 2,5, a 3, a 3,5, a 4, a 4,5 y a 5, entre la expresión de netrina-1 en la biopsia a poner a prueba y en la biopsia de referencia no metastásica o no agresiva es indicativa de la presencia de un cáncer metastásico o agresivo.

**[0029]** En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar *in vitro* la eficiencia de un tratamiento anti-cáncer para un paciente o para seleccionar pacientes que responden a un tratamiento anti-cáncer específico, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas de:

- (a) obtener una biopsia de tumor primario de dicho paciente tratado; y  
 (b) medición del nivel de expresión de netrina-1 en dicha biopsia,

donde la eficiencia de dicho tratamiento anti-cáncer se correlaciona con la disminución de la cantidad del nivel de expresión de netrina-1 medida en dicha biopsia, o donde los pacientes que responden a un tratamiento anti-cáncer específico seleccionados son pacientes donde la cantidad del nivel de expresión de netrina-1 medido en su biopsia se ha reducido después de dicho tratamiento específico.

**[0030]** En una realización preferida, el procedimiento para determinar *in vitro* la eficiencia de un tratamiento anti-cáncer para un paciente o para seleccionar pacientes que responden a un tratamiento anti-cáncer específico, se caracteriza porque dicho cáncer indujo una sobreexpresión de netrina-1 y/o es un cáncer metastásico o agresivo.

**[0031]** En una realización preferida, el procedimiento para predicción o para determinar *in vitro* la eficiencia de un tratamiento anti-cáncer para un paciente se caracteriza porque el producto de expresión de netrina-1 medido es el ARN que codifica netrina-1, particularmente medido mediante un procedimiento de PCR inversa en tiempo real cuantitativa, o porque el nivel de expresión de netrina-1 que se mide es la medida del nivel de proteína netrina-1, particularmente mediante un procedimiento que usa anticuerpos específicos capaces de reconocer específicamente dicha proteína netrina-1.

**[0032]** En una realización preferida, el procedimiento para predicción o para determinar *in vitro* la eficiencia de un tratamiento anti-cáncer para un paciente se caracteriza porque el tumor primario es un tumor primario de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón,

neuroblastoma, glioma, leucemia mieloide aguda, sarcoma, melanoma, adenocarcinoma de ovario, adenocarcinoma renal adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de útero, adenocarcinoma de estómago, adenocarcinoma de riñón y adenocarcinoma rectal.

5 **[0033]** En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la selección de un compuesto para la prevención o el tratamiento de cáncer, donde dicho kit comprende:

- una proteína receptora de netrina-1, o un fragmento de la misma capaz de interactuar específicamente con la proteína netrina-1 para formar un par de unión, preferentemente proteína recombinante; y
- 10 - proteína netrina-1, o un fragmento de la misma capaz de interactuar específicamente con dicho receptor de proteína netrina-1 para formar un par de unión, preferentemente proteína recombinante.

**[0034]** Seleccionándose dicho receptor de netrina-1 preferentemente entre el grupo de DCC, UNC5H (particularmente UNC5H1, UNC5H2 y UNC5H3), neogenina y la adenosina A2b, más preferentemente seleccionado  
15 entre el grupo de DCC, UNC5H1, UNC5H2 y UNC5H3, más preferentemente de mamífero tal como de ratón, rata o ser humano.

**[0035]** En una realización preferida, dicho kit comprende:

- 20 - células tumorales que expresan el receptor de netrina-1 y que expresan o sobreexpresan netrina-1, particularmente células de línea celular tumoral metastásica, preferentemente seleccionadas entre el grupo que consiste en células 4T1, células CAL51, células T47D, células SKBR7, células IMR32, GL26 células y células H358, especialmente líneas celulares CAL51, tales como línea celular CAL51-36, que son mucho más susceptibles a la muerte celular en respuesta a la presencia de DCC-EC-Fc.

25 **[0036]** En otro aspecto, la presente invención comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:

- un compuesto que comprende un dominio extracelular del receptor de netrina-1 o fragmento del mismo capaz de  
30 inhibir específicamente la interacción entre la netrina-1 y dicho receptor de netrina-1, y/o capaz de inhibir la dimerización o multimerización de dicho receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, particularmente de inhibir el dominio intracelular de dicho receptor de netrina-1; y
- un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido específicamente contra netrina-1 o el receptor de netrina-1, particularmente dirigido al dominio extracelular de dicho receptor de netrina-1 o al fragmento de netrina-1 capaz de  
35 interactuar con el dominio extracelular de dicho receptor de netrina-1,

como un medicamento.

**[0037]** La secuencia de aminoácidos de netrina-1 humana o el receptor de netrina humana tal como  
40 UNC5H1, UNC5H2 y UNC5H3 (homólogo de Unc-5 1, 2 y 3 equivalente al homólogo de Unc-5 A, B y C) son bien conocidas por el experto en la materia. Ejemplos de estas secuencias de aminoácidos con la localización de su dominio particular pueden encontrarse en el Genbank con el número de entrada AAD09221 o NP\_004813 para netrina-1 humana, NP\_588610 para el receptor de netrina humana homólogo de Unc-5 1, Q8IZJ1 para el receptor de netrina homólogo de Unc-5 2 y 095185 para el homólogo de Unc-5 3.

45 **[0038]** Preferentemente, en los compuestos de la presente invención, dicho dominio extracelular del receptor de netrina-1 o fragmento del mismo se selecciona entre el grupo de DCC, UNC5H (particularmente UNC5H1, UNC5H2 y UNC5H3), neogenina y la adenosina A2b, más preferentemente seleccionada entre el grupo de DCC, UNC5H1, UNC5H2 y UNC5H3, más preferentemente de mamífero tal como de ratón, rata o ser humano.

50 **[0039]** En una realización más preferida, dicho compuesto de acuerdo con la presente invención comprende un dominio extracelular del receptor de netrina-1 de DCC, preferentemente dicho compuesto es DCC-EC-Fc o DCC-5Fbn.

55 **[0040]** En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del nivel de expresión de netrina-1 como marcador para la identificación de cáncer metastásico en un paciente, preferentemente de cáncer de mama o colorrectal metastásico, siendo el más preferido el cáncer de mama metastásico.

**[0041]** En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento para inducir la

apoptosis o la muerte celular de células tumorales que han adquirido la ventajas selectiva de escapar de la apoptosis inducida por receptores de dependencia de netrina-1, preferentemente por un nivel de netrina-1 elevado, en un paciente que comprende administrar un compuesto capaz de inhibir la interacción entre netrina-1 y su receptor de netrina-1, un compuesto capaz de inhibir la dimerización o la multimerización del receptor de netrina-1, un compuesto de acuerdo con la presente invención, o seleccionado mediante el procedimiento de la presente invención, a dicho paciente que lo necesita.

**[0042]** En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la prevención o para el tratamiento de cáncer en un paciente que comprende administrar un compuesto de acuerdo con la presente invención, o seleccionado mediante el procedimiento de la presente invención, a dicho paciente que lo necesita.

**[0043]** La presente invención también comprende el uso de un compuesto de acuerdo con la presente invención, o seleccionado mediante el procedimiento de la presente invención, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de cáncer en mamíferos, incluyendo el ser humano. Preferentemente dicho cáncer es un cáncer metastásico o agresivo.

**[0044]** Más preferentemente, en el procedimiento de tratamiento o en el uso de un compuesto de acuerdo con la presente invención, dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, neuroblastoma, glioma, leucemia mieloide aguda, sarcoma, melanoma, adenocarcinoma de ovario, adenocarcinoma renal adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de útero, adenocarcinoma de estómago, adenocarcinoma de riñón y adenocarcinoma rectal.

**[0045]** Más preferentemente, en el procedimiento de tratamiento o en el uso de un compuesto de acuerdo con la presente invención, las células tumorales primarias de dicho cáncer expresan o sobreexpresan netrina-1.

**[0046]** El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) la proteína netrina-1 o su receptor.

**[0047]** El término "anticuerpo" comprende anticuerpos monoclonales o policlonales pero también anticuerpos quiméricos o humanizados.

**[0048]** Una proteína netrina-1 o receptor de proteína netrina-1 aislado, o un fragmento específico de los mismos, pueden usarse como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen a dicha proteína usando técnicas estándar para preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Puede ser posible usar cualquier fragmento de estas proteínas que contenga al menos un determinante antigénico puede usarse para generar estos anticuerpos específicos.

**[0049]** Un inmunógeno de proteína se usa habitualmente para preparar anticuerpos inmunizando un sujeto adecuado, (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con el inmunógeno. Una preparación inmunógena apropiada puede contener dicha proteína, o fragmento de la misma, y puede incluir además un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, o agente inmunoestimulador similar.

**[0050]** Por lo tanto, el anticuerpo para uso de acuerdo con la invención incluye anticuerpos policlonales, monoclonales quiméricos o humanizados, anticuerpos capaces de unirse selectivamente, o que se unen selectivamente a un epítipo que contiene un polipéptido que comprende un tramo contiguo de al menos 8 a 10 aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de la proteína netrina-1 o su receptor.

**[0051]** Un agente preferido para detectar y cuantificar ARNm o ADNc que codifica la proteína netrina-1, es una sonda de ácido nucleico marcada o cebadores capaces de hibridar con este ARNm o ADNc. La sonda de ácido nucleico puede ser un oligonucleótido de al menos 10, 15, 30, 50 o 100 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente en condiciones rigurosas con el ARNm o ADNc. El cebador de ácido nucleico puede ser un oligonucleótido de al menos 10, 15 o 20 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente en condiciones rigurosas con el ARNm o ADNc, o secuencia complementaria de los mismos.

**[0052]** Un agente preferido para detectar y cuantificar la proteína netrina-1, es un anticuerpo capaz de unirse específicamente a esta proteína, preferentemente un anticuerpo con una marca detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferentemente, monoclonales. Puede usarse un anticuerpo intacto, o un fragmento del

mismo (por ejemplo, Fab o F(ab')<sub>2</sub>). El término "marcado/a", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende abarcar marcado directo de la sonda o anticuerpo acoplado (es decir, enlazando físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como marcado indirecto de la sonda o anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Los ejemplos de marcado indirecto incluyen detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado de forma fluorescente y marcado en el extremo de una sonda de ADN con biotina, de modo que pueda detectarse con estreptavidina marcada de forma fluorescente.

**[0053]** Por ejemplo, técnicas in vitro para la detección del ARNm candidato incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones in situ. Las técnicas in vitro para la detección de la proteína candidata incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencias de Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas in vitro para la detección de ADNc candidato incluyen hibridaciones de Southern.

**[0054]** Cuando la invención abarca kits para cuantificar el nivel de proteína netrina-1, el kit puede comprender un compuesto o agente marcado capaz de cuantificar estas proteínas. Dichos agentes pueden estar envasados en un recipiente adecuado. El kit puede comprender además instrucciones para usar el kit para cuantificar el nivel de la proteína netrina-1 o del transcrito de netrina-1.

**[0055]** En ciertas realizaciones del procedimiento de la presente invención, la determinación de los transcritos de netrina-1 implica el uso de una sonda/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR anclada o RACE PCR, o, como alternativa, en una reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, por ejemplo, Landegran et al., 1988, Science 241: 23-1080; y Nakazawa et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 91: 360-364), o como alternativa RT-PCR en tiempo real cuantitativa. Este procedimiento puede incluir las etapas de recoger una muestra de células de un paciente, aislar ácido nucleico (por ejemplo ARNm) a partir de las células de la muestra, opcionalmente transformar el ARNm en el ADNc correspondiente, poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más cebadores que hibridan específicamente con la netrina-1 o el ARNm o si ADNc correspondiente en condiciones tales que la hibridación y amplificación del ARNm o ADNc de netrina-1 se producen, y cuantificar la presencia de los productos de amplificación. Se prevé que PCR y/o LCR pueden ser deseables para usar como una etapa de amplificación junto con cualquiera de las técnicas usadas para cuantificar la detección de ácido nucleico.

**[0056]** Los procedimientos descritos en el presente documento pueden realizarse, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico envasados previamente que comprenden al menos una sonda de ácido nucleico o conjunto de cebador o reactivo de anticuerpo descrito en el presente documento, que puede usarse convenientemente, por ejemplo, en entornos clínicos para seguir o diagnosticar pacientes.

**[0057]** Finalmente, la presente invención se refiere al uso de oligonucleótidos antisentido o de ARNi (ARN interferente) específicos del ácido nucleico que codifica la proteína netrina-1 para la fabricación de un medicamento destinado a prevenir o a tratar cáncer metastásico o agresivo, preferentemente dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, neuroblastoma, glioma, leucemia mieloide aguda, sarcoma, melanoma, adenocarcinoma de ovario, adenocarcinoma renal adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de útero, adenocarcinoma de estómago, adenocarcinoma de riñón y adenocarcinoma rectal.

**[0058]** El ARN interferente (ARNi) es un fenómeno en el que un ARN bicatenario (ARNbc) suprime específicamente la expresión de un gen que porta su secuencia complementaria. El ARNi se ha convertido, por lo tanto, en una herramienta de investigación útil para muchos organismos. Aunque el mecanismo mediante el cual el ARNbc suprime la expresión génica no se entiende completamente, datos experimentales proporcionan percepciones importantes. Esta tecnología tiene un gran potencial como una herramienta para estudiar la función génica en células de mamífero y puede conducir al desarrollo de agentes farmacológicos basándose en ARNi (ARN interferente pequeño).

**[0059]** Cuando se administra a un paciente, un compuesto de la presente invención se administra preferentemente como componente de una composición que opcionalmente comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede administrarse por vía oral, o mediante cualquier otra vía conveniente, y puede administrarse junto con otro agente biológicamente activo. La administración puede ser sistémica o local. Se conocen diversos sistemas de administración, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., y pueden usarse para administrar el compuesto de la presente invención seleccionado o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

**[0060]** Las vías de administración incluyen, aunque no se limitan a, intradérmica, intramuscular,

intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, oral, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, por vía rectal, por inhalación, o por vía tópica. La vía de administración se deja a discreción del facultativo. En la mayoría de los casos, la administración dará como resultado la liberación del compuesto al torrente sanguíneo o directamente en el tumor primario.

5

**[0061]** Las composiciones que comprenden el compuesto de acuerdo con la invención o seleccionadas mediante los procedimientos de acuerdo con la presente invención, también forman parte de la presente invención. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente una cantidad adecuada de un vehículo farmacéuticamente aceptable para proporcionar la forma para administración apropiada al paciente. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado/a por una agencia reguladora o enumerada por una farmacopea nacional o reconocida para uso en animales, mamíferos, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o transportador con el que se administra un compuesto de la invención. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos farmacéuticos pueden ser solución salina, gelatina, almidón y similares. Además, pueden usarse agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, estearato sódico, monoestearato de glicerol, cloruro sódico, leche desnatada deshidratada, glicerol, propileno, glicol, agua y similares. Composiciones de compuesto de ensayo, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes de pH. Las composiciones de la invención pueden asumir la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, microgránulos, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, espráis, suspensiones, o cualquier otra forma adecuada para uso. Dicha composición está formada generalmente de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada a seres humanos para administración oral o para administración intravenosa. La cantidad del compuesto activo que será eficaz en el tratamiento pueden determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear dependerá también de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del facultativo y las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para administración oral, intranasal, intradérmica o intravenosa son generalmente de aproximadamente 0,01 miligramos a aproximadamente 75 miligramos por kilogramo de peso corporal por día, más preferentemente de aproximadamente 0,5 miligramos a 5 miligramos por kilogramo de peso corporal por día.

35

**[0062]** Se entenderá, aunque la invención se ha descrito junto con las realizaciones anteriores, que la descripción anterior y los siguientes ejemplos pretenden ilustrar y no limitar el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a la que se refiere la invención.

40

#### Leyendas de las figuras

##### **[0063]**

#### 45 **Figuras 1A y 1B: la netrina-1 se sobreexpresa en tumores de mama metastásicos humanos**

**Figura 1A:** perfil de expresión de netrina-1 examinado con PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa. La Q-RT PCR se realizó usando ARN total extraído de 15 biopsias de tumor primario metastásico (barra maciza) y 15 no metastático (barra hueca) con cebadores de netrina-1 humana específicos<sup>26</sup> y cebadores correspondientes al gen TBP humano (proteína de unión a TATA). En este caso se usó TBP como control, dado que muestra una variabilidad débil a nivel del ARNm entre tejidos normal y tumoral de mama, tal como se describe en<sup>25</sup>. La expresión de netrina-1 se da como la relación entre la expresión de netrina-1 en cada muestra y la expresión de netrina-1 promedio en las muestras no metastásicas.

**Figura 1B:** la Q-RT-PCR se realizó usando ARN total extraído de líneas celulares de ratón 67NR y 4T1 con cebadores de netrina-1 de ratón específicos y el gen de ratón RPLP0 como patrón.

#### **Figuras 2A-2D: la expresión forzada de netrina-1 en la línea celular de ratón 67NR conduce al desarrollo de metástasis**

**Figuras 2A y 2B:** células 67NR transfectadas de forma simulada o células 67NR transfectadas de forma estable con netrina-1 (67NR-net) se sometieron a análisis de la expresión de netrina-1. Figura 2A, RT-PCR usando cebadores de netrina-1 de pollo específicos se realizó usando ARN total extraído de 67NR-net1 y 67NR-mock. Figura 2B, se realizó transferencia de Western usando anticuerpos anti-myc (netrina-1 de pollo) o anti-netrina1.

5 **Figura 2C:** microfotografías de los dos clones 67NR-net1 y 67NR-net2 en comparación con 67NR parental y con la línea celular 4T1.

**Figura 2D:** células 4T1 metastásicas, dos clones celulares de control que portan resistencia a puromicina (67NR1 y 67NR2) y dos clones celulares que expresan netrina-1 (67NRnet1 y 67NRnet2) se inyectaron en la almohadilla adiposa de 16 ratones (4 ratones por tipo celular) y se analizó la metástasis en el entorno del pulmón.

10 Microfotografías representativas de nódulos sub-pleurales e intra-parenquimatosos después de la inyección de los clones celulares respectivos (4T1, 67NR1, 67NRnet1, 67NRnet2). IPL: lesión intra-parenquimatoso, UPL: lesiones sub-pleurales.

**Figuras 3A-3D: inducción de muerte de células metastásicas en ratón inhibiendo la interacción netrina-1/receptor**

**Figura 3A:** esquema que representa netrina-1 y sus receptores, DCC y UNC5H.

20 **Figuras 3B, 3C, 3D:** análisis cuantitativo de muerte celular en células 67NR y 4T1 usando DCC-EC-Fc e IL3-EC-Fc inespecífico como control (figura 3B), a diferente concentración (figura 3C) o el dominio DCC-5Fbn más restringido (figura 3D) como competidor para la interacción netrina-1/receptor. La muerte celular se cuantificó mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano (figuras 3B, 3D) o mediante ensayo de actividad caspasa (figura 3C). Se indican las desviaciones estándar (n=3).

**Figuras 4A y 4B: inducción de muerte de células metastásicas humanas inhibiendo la interacción netrina-1/receptor**

**Figura 4A:** medición cuantitativa de muerte de células CAL51 tratadas con diferente concentración de DCC-EC-Fc mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano.

30 **Figura 4B:** Análisis cuantitativo de muerte celular monitorizada mediante exclusión con azul de tripano en la línea celular parental CAL51 o en la línea celular clonal CAL51-36, tratada o no con el competidor DCC-EC-Fc en medios de cultivo.

**Figura 5: la netrina-1 se sobreexpresa en tumores de mama metastásicos humanos**

35 Perfil de expresión de netrina-1 examinado con PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa. La Q-RT PCR se realizó usando ARN total extraído de 51 biopsias tumorales. Estas se obtuvieron a partir de la paciente con tumores localizados en la mama (N0, barra vacía); con solamente implicación del ganglio linfático (N+, barra gris) y con metástasis distante en el diagnóstico (M+, barra maciza). Se usaron cebadores de netrina-1 humana específicos<sup>39</sup> y cebadores correspondientes al gen PBGD humano (proteína de unión a TATA). Se usó PBGD como referencia en este caso, dado que muestra una variabilidad débil a nivel del ARNm entre tejidos normal y tumoral de mama, tal como se describe en<sup>38</sup>. El otro TBP de referencia también se usó con resultados similares (no mostrado). La expresión de netrina-1 se da como la relación entre la expresión de netrina-1 en cada muestra y la expresión de netrina-1 promedio en las muestras N0. Se usó una prueba de importancia estadística no paramétrica (Mann-Whitney), se indica el valor p.

45 **Figuras 6A-6C: inducción de muerte de células metastásicas inhibiendo la interacción netrina-1/receptor**

**Figura 6A:** DCC-EC-Fc desplaza la interacción DCC/netrina-1 y UNC5H2/netrina-1. Ensayo ELISA con DCC-EC-Fc (panel superior) o UNC5H2-EC-Fc (panel inferior) revestido, y cuantificación de netrina-1 unida usando anticuerpo anti-netrina-1 en presencia de una concentración creciente de DCC-EC-Fc.

50 **Figuras 6B y 6C:** Análisis cuantitativo de muerte celular en células 67NR y 4T1 usando DCC-EC-Fc e IL3-EC-Fc inespecífico como control. La muerte celular se cuantificó mediante el ensayo de exclusión con azul de tripano (figura 6B), o mediante el ensayo de actividad caspasa (figura 6C). Se indican las desviaciones estándar (n=3).

**Figuras 7A-7C: Inhibición de la formación de metástasis en ratones mediante tratamiento con DCC-5Fbn**

55 **Figura 7A:** análisis cuantitativo de muerte celular en células 67NR y 4T1 tratadas con DCC-5Fbn. El ensayo MTT se realizó en células 67NR o 4T1 después del tratamiento con dosis crecientes de DCC-5Fbn (µg/ml). Se presenta el porcentaje de supervivencia celular. Se indican las desviaciones estándar (n=3).

**Figuras 7B y 7C:** se inyectaron i.v. células 4T1-luc en ratones BALB/c el día 0 y se inyectaron PBS o DCC-5Fbn

cada dos días, una vez i.v., una vez i.p. comenzando el día 0. Después de 13 días, el desarrollo de metástasis se estudió mediante registro de luminiscencia (figuras 7B, 7C) o mediante examen de los pulmones en un microscopio.

Figura 7B: una imagen representativa de registro de luminiscencia de ratones tratados con PBS (derecha) o tratados con DCC-5Fbn (izquierda).

5 Figura 7C: cuantificación de la señal luminiscente medida mediante el sistema NightOwlB. El número de fotón/píxel/s se cuantificó en cada animal y se da un índice de señal luminiscente a la relación entre el fotón/ratón promedio en ratones tratados con PBS con respecto a la señal promedio detectada en ratones tratados con DCC-5Fbn. Se presentan dos experimentos independientes (se analizaron 20 ratones en el experimento 1, 8 ratones en el experimento 2).

10

Se ha realizado una fotografía macroscópica representativa de un pulmón de ratones tratados con PBS o de ratones tratados con DCC-5Fbn (no mostrada) puede demostrarse en el pulmón de ratones tratados con PBS.

**Figuras 8A y 8B: efecto de DCC-5Fbn sobre líneas celulares e cáncer de mama humanas que expresan netrina-1**

15

**Figura 8A:** expresión de netrina-1 examinada mediante Q-RT PCR usando ARN total extraído de 48 líneas celulares tumorales de mama diferentes. La expresión de netrina-1 se da como la relación entre la expresión de netrina-1 y la expresión del gen de mantenimiento HMBS (hidroximetilbilano sintasa) en cada muestra. También se usó TBP como control en este caso y dio resultados similares. Las dos líneas celulares que han sido seleccionadas por su elevado nivel de netrina-1 se indican mediante asteriscos.

20

**Figura 8B:** inducción de muerte celular mediante DCC-5Fbn en líneas celulares SKBR7 y T47D. La muerte celular se cuantificó mediante ensayo MTT tal como se describe en la figura 4A (panel derecho) o mediante medición de actividad caspasa tal como se describe en la figura 3D (panel izquierdo). Se indican las desviaciones estándar (n=3).

25 **Figuras 9A y 9B: neuroblastoma humano**

**Figura 9A:** la netrina-1 es un marcador de agresividad en neuroblastoma humano. Perfil de expresión de netrina-1 examinado con PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa. La Q-RT PCR se realizó usando ARN total extraído de 101 biopsias de neuroblastoma de estadio 4 o 4s. Los tumores de estadio 4 diagnosticados en pacientes que tenían menos de un año de edad (4<1 año) o de estadio 4 diagnosticados en pacientes que tenían más de un año de edad (4>1 año). Puede observarse que cánceres de mal pronóstico (estadio 4 >1 año) muestran una sobreexpresión significativa de netrina-1. Se usaron pruebas de la t de Student y se indican los valores p.

30

**Figura 9B:** células IMR32 que producen de forma endógena netrina-1 se trataron o no con DCC-5Fbn o como control ILR3 (el ectodominio del receptor de interleucina 3) y se analizaron para muerte celular midiendo la actividad caspasa (parte superior) o midiendo la supervivencia celular mediante un ensayo MTT (abajo). Nótese que aunque IL3R no tiene ningún efecto sobre la muerte de células IMR32, DCC-5Fbn induce una muerte de células IMR32 significativa. Se indican las desviaciones estándar (n=3).

35

**Figuras 10A y 10B: glioma**

40

**Figura 10A:** se sobreexpresa netrina-1 en una gran fracción de glioma. Perfil de expresión de netrina-1 examinado con PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa. La Q-RT PCR se realizó usando ARN total extraído de biopsias de oligodendroglioma de estadio II y estadio III y estadio IV y se comparó con cerebro humano normal.

**Figura 10B:** células GL26 que producen de forma endógena netrina-1 (no mostradas) se trataron o no con DCC-5Fbn en presencia o no de una cantidad en exceso de netrina-1 recombinante y se analizaron para muerte celular midiendo la actividad caspasa (parte superior) o midiendo la supervivencia celular mediante un ensayo MTT (abajo). Nótese que DCC-5Fbn induce una muerte de células GL26 significativa y que su efecto es completamente inhibido por la adición de netrina-1, demostrando de este modo que el efecto de DCC-5Fbn está relacionado directamente con la inhibición de netrina-1 endógena. Se indican las desviaciones estándar (n=3).

45

**Figuras 11A-11C: cáncer de pulmón**

50

**Figura 11A:** la netrina-1 se sobreexpresa en una fracción considerable de cáncer de pulmón humano. Perfil de expresión de netrina-1 examinado con PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa. La Q-RT PCR se realizó usando ARN total extraído de biopsias de cáncer de pulmón y se comparó con tejido normal.

55

**Figura 11B:** H358 y H460, dos líneas celulares de NSCLC, se usaron adicionalmente para ensayos de muerte celular. Células H358 que expresan de forma endógena netrina-1 y células H460 que no consiguen mostrar expresión de netrina-1 detectable se trataron o no con DCC-5Fbn en presencia o no de una cantidad en exceso de netrina-1 recombinante y se analizaron para muerte celular midiendo la actividad caspasa (parte superior) o

mediando la supervivencia celular mediante un ensayo MTT (abajo). Nótese que DCC-5Fbn induce una muerte de células H358 significativa pero no consigue mostrar un efecto sobre células H460. Además, el efecto de muerte observado en células H358 es completamente inhibido por la adición de netrina-1. Junto con el hecho de que las células H460 no son sensibles a DCC-5Fbn, estos datos apoyan que células tumorales de pulmón que expresan netrina-1 experimentan apoptosis en respuesta a DCC-5Fbn. Se indican las desviaciones estándar (n=3).

**Figura 11C:** DCC-5Fbn inhibe el crecimiento de tumor de H358 xenoinjertado en ratones desnudos. Ratones nu/nu atímicos hembra de cinco semanas de edad (20-22 g de peso corporal) se obtuvieron de Charles River. Los ratones se alojaron en jaulas recubiertas con filtro esterilizadas y se mantuvieron en una instalación animal libre de patógenos. Células H358 se implantaron mediante inyección s.c. de  $5 \times 10^6$  células en 200  $\mu$ l de PBS en el flanco izquierdo de los ratones. Cuando los tumores se establecieron, PBS o 20  $\mu$ g de DCC-5Fbn se administraron al interior del tumor (i.t.) todos los días (la duración del tratamiento se indica mediante flechas). Los tamaños del tumor se midieron mediante un calibre durante 41 días. El volumen del tumor se calculó con la fórmula  $v = (0,5 * (\text{longitud} * \text{anchura}^2)) \pm \text{SE}, *$  en 6 ratones tratados con DCC-5Fbn y 4 ratones tratados con PBS. Nótese que, aunque se mostró que los ratones tratados con PBS crecían, los tumores tratados con DCC-5Fbn mostraban una regresión masiva.

#### **Figuras 12A y 12B: la netrina-1 media la multimerización de DCC y UNC5H2**

**Figura 12A:** multimerización de DCC en presencia de netrina-1 en células HEK293T. Lisados de células HEK293T transfectadas transitoriamente con construcciones que expresan HA-DCC y/o c-myc-DCC junto o no con construcción que expresa netrina-1 se sometieron a arrastre "pull-down" de myc (IP  $\alpha$ -myc). La presencia de DCC-HA se reveló con un anticuerpo anti-HA.

**Figura 12B:** dimerización de UNC5H2 en presencia de netrina-1 en células HEK293T. La transfección de células y la preparación de lisado celular se realizaron como en (A) pero con construcciones que expresan HA-Unc5H2 y/o FlagM2-UNC5H2. Los lisados celulares se sometieron a arrastre de FlagM2 (IP  $\alpha$ -Flag). La presencia de HA-UNC5H2 se reveló con un anticuerpo anti-HA. Total: transferencia de Western en lisado antes del arrastre.

#### **Figuras 13A y 13B: validación del sistema químicamente inducible para dimerización de UNC5H2**

**Figura 13A:** representación esquemática de construcción de fusión Fv2e-UNC5H2 que muestra las dos construcciones (una marcada con HA, la otra marcada con c-myc) usadas para validar el sistema de dimerización artificial.

**Figura 13B:** lisados de células HEK293T transfectadas de forma transitoria con Fv2E-UNC5H2 marcado con HA o c-myc con o sin el fármaco de dimerización (AP20187) se sometieron a arrastre de c-myc (IP  $\alpha$ -myc). Total: transferencia de Western en lisado antes del arrastre. La presencia de HA-Fv2E-UNC5H2 se reveló con anticuerpo anti-HA.

#### **Figuras 14A-14C: la dimerización forzada de DCC bloquea su actividad proapoptótica**

**Figura 14A:** la muerte celular inducida por DCC es inhibida por la dimerización inducida por AP20187, según lo medido mediante exclusión con azul de tripano. Las células HEK293T se transfectaron con plásmido de simulacro (Cont.), Fv2E (Fv), Fv2E-DCC-IC (Fv-DCC) con o sin AP20187 (AP). En todas las condiciones, las células también se transfectaron con el marcador superficial pKk. Las células transfectadas que expresan el marcador se marcaron magnéticamente con microperlas MACSelect y se separaron usando un separador MACS y columnas de separación. La exclusión con azul de tripano se ensayó en estas células purificadas.

**Figura 14B:** la muerte celular inducida por UNC5H2 es inhibida mediante dimerización inducida por AP20187, según lo medido mediante exclusión con azul de tripano como en (A). Las células se transfectaron con pMACSKk y Fv2E (Fv), Fv2E-UNC5H2-IC (Fv-UNC5H2) con o sin AP20187 (AP).

**Figura 14C:** la activación de caspasa inducida por UNC5H2 se inhibe mediante dimerización inducida por AP20187, según lo medido mediante actividad caspasa-3 relativa. Las células HEK293T se transfectaron con vector de simulacro pCMV (Cont.), Fv2E (Fv), Fv2E-UNC5H2-IC (Fv-UNC5H2) con o sin AP20187 (AP). El índice de actividad caspasa relativa se presenta como la relación entre la actividad caspasa de la muestra y la medida en células HEK293T transfectadas con pCMV. Se indican las desviaciones estándar (n=3).

#### **Figuras 15A-15C: el quinto dominio de fibronectina soluble recombinante de DCC (DCC-5Fbn) inhibe la multimerización de DCC inducida por netrina-1**

**Figura 15A:** la curva de afinidad de netrina-1 en DCC-5Fbn medida mediante ensayo ELISA muestra que DCC-5Fbn es capaz de unirse a netrina-1. Se aplicó DCC-5Fbn (100 ng) o IL3-R (600 ng) y se añadieron dosis crecientes de

netrina-1 (de 0 a 800 ng). Los valores de IL3 se restaron a los valores de DCC-5Fbn. La Kd aproximada de DCC-5Fbn/netrina-1 se estimó a 5 nM.

**Figura 15B:** ensayo de competición. Como en (A) pero el dominio extracelular completo de DCC (DCC-EC, 125 ng) se aplicó en lugar de DCC-5Fbn y se añadió netrina-1 (50 ng) en presencia de DCC-5Fbn (625 ng) o el DCC-EC completo (125 ng). Nótese que DCC-5Fbn no consigue competir con la interacción DCC/netrina-1.

**Figura 15C:** la multimerización de DCC inducida por netrina-1 es inhibida por DCC-5Fbn. Lisados de células HEK293T transfectadas de forma transitoria con construcciones que expresan HA-DCC y/o c-myc-DCC con o sin netrina-1 (300 ng/ml) y/o DCC-5Fbn (900 ng/ml) se sometieron a arrastre de HA (IP  $\alpha$ -HA). La presencia de c-myc-DCC se reveló con anticuerpo anti-c-myc. Total: transferencia de Western en el lisado antes del arrastre.

**Figuras 16A y 16B: DCC-5Fbn antagoniza efectos de bloqueo de netrina-1 sobre la muerte celular inducida por DCC**

**Figura 16A:** células HEK293T se transfectaron de forma transitoria con un simulacro (Cont.) o una construcción DCC de longitud completa y se incubaron o no con netrina-1 (300 ng/ml) y/o DCC-5Fbn (800 ng/ml). La muerte celular se evaluó mediante tinción con azul de tripano.

**Figura 16B:** células de cáncer de mama metastásico 4T1 se cultivaron en presencia (+ DCC-5Fbn) o ausencia (- DCC-5Fbn) de DCC-5Fbn (300 ng/ml) durante 24 horas y la muerte celular también se midió mediante ensayo de exclusión con azul de tripano. Se indican las desviaciones estándar (n=3).

#### **Ejemplo 1: Materiales y procedimientos**

##### **Línea celular, cultivos celulares, procedimiento de transfección, reactivos e inmunotransferencias:**

**[0064]** Las células 4T1 y 67NR fueron una amable donación de F. Miller (Detroit, MI, EE. UU.). Cal51, MCF7, MDA-MB231, 453, 361, 157, SK-BR3, CAMA-1, T47D se cultivaron usando un procedimiento estándar. Líneas celulares de mama humana enumeradas en la figura 8B y más específicamente líneas celulares T47D y SKB7 se obtuvieron de D. Birnbaun. Células 67NR se transfectaron de forma estable usando la selección de reactivo lipofectamina (Invitrogen) y puromicina (Sigma). Las transfecciones transitorias de células de riñón embrionario humano 293T (HEK293T) se realizaron tal como se ha descrito anteriormente <sup>10</sup> de acuerdo con un procedimiento con fosfato cálcico modificado o usando Lipofectamina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La línea celular 4T1 de cáncer de mama se describió anteriormente <sup>20</sup>. Células 4T1-luc se obtuvieron mediante transfección estable de un vector CMV-luciferasa que porta resistencia a higromicina. Se seleccionaron clones mediante intensidad de luminiscencia usando la luminoskan Ascent Station (Labsystems). Se realizaron inmunotransferencia tal como se ha descrito anteriormente <sup>6</sup> usando anti-c-myc (Sigma; 1/200) anti-FlagM2 (Sigma, 1/200) o anti-HA (Sigma; 1/500). El agente dimerizante artificial AP20187 era de Ariad Pharmaceuticals. El dominio extracelular completo de DCC (DCC-EC), DCC-EC-Fc se obtuvieron de R&D system y Netrina-1 de Apotech corp. Para el análisis de muerte celular, medición de la actividad caspasa e inmunoprecipitación, se usó AP20187 a una concentración final de 10 nM y se usó netrina-1 a una concentración final de 300 ng/ml.

##### **Muestras de tumores de mama humanos:**

**[0065]** 51 muestras de cáncer de mama humano fueron proporcionadas por el banco de tumores del Centre Léon Bérard. Tejido fresco del tumor se obtuvo durante cirugía de mama antes de cualquier terapia sistémica y se ultracongelaron en nitrógeno líquido.

##### **Mutagénesis dirigida y construcciones de plásmidos:**

**[0066]** PNET-1 pCMV y pGNET-1 que codifican netrina-1 de pollo eran tal como se ha descrito anteriormente <sup>6</sup>. pKk se describió <sup>22</sup>. Los mutantes negativos dominantes para DCC (pCR-DCC-IC-D1290N) y para UNC5H (pCR-UNC5H2-IC-D412N) se han descrito anteriormente <sup>6, 27, 7</sup>. HA-DCC se obtuvo introduciendo una marca HA en la plantilla pCMV-DCC <sup>6</sup> mediante el sistema de mutagénesis dirigida QuikChange (Stratagene) usando los siguientes cebadores:

55 DCC-HA F (directo): 5'-CACAGGCTCAGCCTTTTATCCATATGATGTACCGGATTATGCATA  
ACATGTATTTCTGAATG-3' (SEQ ID NO: 1); DCC-HA R (inverso): 5'-CATTTCAGAAA  
TACATGTTATGCATAATCCGGTACATCATATGGATAAAAGGCTGAGCCTGTG-3' (SEQ ID NO: 2).  
c-myc-DCC también se obtuvo introduciendo una marca c-myc en la plantilla pCMV-DCC mediante QuikChange  
usando los siguientes cebadores: DCC-myc F: 5'-

CACAGGCTCAGCCTTTGAGCAGAAGTTGATAAGTGAGGAAGATCTGTAACATG TATTTCTGAATG-3' (SEQ ID NO: 3). DCC-myc R: 5'- CATTTCAGAAATACATGTTAC AGATCTTCCTCACTTCTCAACTTCTGCTCAAAGGCTGAGCCTGTG-3' (SEQ ID NO: 4).

HA-Fv2E que codifica el vector de expresión (en pC4M) del kit Argent Regulated Homodimerization kit es de Ariad Pharmaceuticals. A partir de este plásmido, se construyó el plásmido HA-Fv2E-DCC-IC. Un fragmento de PCR del dominio intracelular de DCC (1122-1447) se obtuvo con los cebadores: F 5'-TATGTGACCGACGCTCTTCAGCCCAGCAGAGA-3' (SEQ ID NO: 5) y R 5'-TATGAATTCTTAGTCGAGTGCCTAGTCTGGTACGTCGTACGGATAAAAGGCTGA GCCTGTGATGGCATTAAAG -3' (SEQ ID NO: 6).

10

**[0067]** El cebador inverso se fusionó a la marca HA en el extremo C-terminal de DCC. El fragmento de PCR se subclonó en HA-Fv2E mediante digestión por restricción con Sall y EcoRI. El c-myc-Fv2E-DCC-IC se obtuvo usando el sistema de mutagénesis dirigida QuikChange (Stratagen) con pC4M-Fv2E-DCC-IC-HA como plantilla y los siguientes cebadores: cebador F: 5'-

15 CTTAATGCCATCACAGGCTCAGCCTTTGAACAGAAACTCATCTCTGAAGAGGAT CTGTAAGAATTCATAAAGGGCAAT-3' (SEQ ID NO: 7) y cebador R: 5'-ATTGCCCTTTATGAATTCTTACAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGTTCAAAG GCTGAGCCTGTGATGGCATTAAAG-3' (SEQ ID NO: 8).

20 **[0068]** HA-UNC5H2 (en pcDNA3.1) ya se ha descrito <sup>7</sup> las construcciones que codifican FlagM2-UNC5H2 se generaron mediante clonación en p3xFlag-CMV7.1 (Sigma) el fragmento de PCR NotI-EcoRI derivado de HA-UNC5H2 como plantilla y los siguientes cebadores: cebador F 5'-GCGCGGCCGAGGGCCCGGAGCGGG-3' (SEQ ID NO: 9) y cebador R 5'-CGGAATTCTCAGCAATCGCCATCAGTGGTC-3' (SEQ ID NO: 10).

25 **[0069]** HA-Fv2E-UNC5H2-IC- y c-myc-Fv2E-UNC5H2-IC en pC4M se generaron mediante amplificación por PCR del dominio intracelular de UNC5H2 usando los siguientes cebadores: UNC5H2-HA F 5'-CGGTGACGTGTACCGGAGAAACTGC-3' (SEQ ID NO: 11) y UNC5H2-HA R 5'-GCGAATTCTCATGCATAATCCGGCACATCATAACGGATAGC AATCGCCATCAGTGGTC-3' (SEQ ID NO: 12), y UNC5H2-myc F 5'-CGGTGACGTGTACCGGAGAAACTGC-3' (SEQ ID NO: 13) y UNC5H2-myc R 5'-GCGAATTCTCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGCAATCGCCATCA GTGGTC-3' (SEQ ID NO: 14) respectivamente. Los fragmentos de PCR se clonaron en HA-Fv2E mediante digestión de restricción Sall y EcoRI.

**[0070]** El ADNc que codifica las proteínas de fusión HA-Fv2E-UNC5H2-IC y c-myc-Fv2E-UNC5H2-IC se subclonó a continuación en pcDNA3.1-TOPO mediante PCR usando los siguientes cebadores: Fv2E F 5'-CCACCATGGGGAGTAGCA-3' (SEQ ID NO: 15) y UNC5H2-HA R 5'-TCATGCATAATCCGGCACATCATAACGGATAGCAATCGCCATCAGTGGTC-3' (SEQ ID NO: 16), y Fv2E F 5'-CCACCATGGGGAGTAGCA-3' (SEQ ID NO: 15) y UNC5H2-myc R 5'-TCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGCAATC GCCATCAGTGGTC-3' (SEQ ID NO: 17) respectivamente y HA-Fv2E-UNC5H2-IC y c-myc-Fv2E-UNC5H2-IC en pC4M como plantillas respectivas.

40

**[0071]** Ps974-DCC-5Fbn que permite la expresión bacteriana del quinto dominio de fibronectina tipo III de DCC se obtuvo insertando un fragmento de ADN de Pst1/BamH1 generado mediante PCR usando pDCC-CMV-S como plantilla.

#### 45 Producción de DCC-5Fbn:

**[0072]** La producción de DCC-5Fbn se realizó usando un procedimiento estándar. En resumen, células BL21 fueron forzadas a expresar DCC-5Fbn en respuesta a imidazol y el lisado de BL21 se sometió a cromatografía de afinidad usando Flag-agarosa (Sigma).

50

#### Inmunoprecipitación:

**[0073]** Se llevaron a cabo coinmunoprecipitaciones en células HEK293T transfectadas con diversas construcciones marcadas tal como se ha descrito anteriormente <sup>27</sup> En resumen, células HEK293T se lisaron en HEPES 50 mM, pH 7,6, NaCl 125 mM, EDTA 5 mM y NP-40 al 0,1% en presencia de inhibidor de proteasa, y se incubaron adicionalmente con anti-HA (Sigma), anticuerpo anti-c-myc (Sigma), anti-FlagM2 (Sigma) y proteína-A Sepharose (Sigma). Los lavados se realizaron en HEPES 50 mM pH 7,6, NaCl 125 mM, EDTA 5 mM.

#### Ensayo de unión y ensayo ELISA de competición:

**[0074]** DCC-5Fbn (100 ng) o IL3-R (R&D systems, 600 ng) se aplicaron sobre una placa maxisorp (Nunc) y se añadieron dosis crecientes de netrina-1 (Apotech) (0 a 800 ng) para el ensayo de unión. DCC-EC (R&D systems, 125 ng) se aplicó sobre una placa maxisorp para el ensayo ELISA de competición. Netrina-1-FlagM2 (50 ng) y el competidor DCC-EC (125ng) o DCC-5Fbn (625ng) se añadieron a continuación simultáneamente. Después de los lavados, para ensayo tanto de unión como el ensayo ELISA de competición, el netrina-1-FlagM2 residual aún fijado se reveló con un anticuerpo anti-FlagM2 (Sigma).

#### Ensayos ELISA con DCC/netrina-1:

10

**[0075]** DCC-EC-Fc (1,25 ng/ml) o UNC5H2-EC-Fc (0,5 ng/ml) se adsorbió sobre una placa maxisorp de 96 pocillos (Nunc) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Netrina-1 marcada con Flag (0,5 ng/ml) se añadió a continuación junto con concentraciones crecientes de DCC-EC-Fc. Después de una incubación de 1 hora, las placas se lavaron exhaustivamente y la netrina-1 unida se detectó mediante inmunomarcado usando un anticuerpo anti-flagM2 (Sigma) y un HRP de cabra anti-ratón (Jackson). La medición colorimétrica se realizó en la estación Victor multimarca (Wallac).

#### Ensayos de muerte celular:

**[0076]** Se cultivaron 67NR, 4T1, CAL51, T47D y SKBR7 en medio pobre en suero y se trataron (o no) con DCC-EC-Fc o DCC-5Fbn durante 24 horas. La muerte celular se analizó usando procedimientos de tinción con azul de tripano tal como se ha descrito anteriormente <sup>6</sup>. El grado de muerte celular se presenta como el porcentaje de células positivas para azul de tripano en las diferentes poblaciones de células. Para seleccionar células transfectadas, las células se co-transfectaron con el marcador superficial pKk y los genes que codifican en plásmido de interés. Las células transfectadas que expresan el marcador se marcaron magnéticamente con microperlas MACSelect y se separaron usando un separador MACS y columnas de Separación (Miltenyi Biotec). La exclusión con azul de tripano se ensayó en estas células purificadas. La supervivencia de las células también se midió mediante ensayo MTT usando el kit de ensayo Vybrant MTT (Molecular Probes) de acuerdo con los procedimientos del fabricante.

30

#### Medición de actividad caspasa:

**[0077]** La actividad caspasa relativa se determinó mediante análisis citométrico de flujo de la siguiente manera:  $2 \times 10^5$  células tratadas se recogieron, se lavaron una vez en 1 ml de PBS, y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de solución de tinción que contenía FITC-VAD-fmk (CaspACE, Promega). Después de incubación durante 60 min a 37°C, las células se lavaron en 1 ml de PBS y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS para análisis por citometría de flujo. Las células teñidas se contaron usando un FACS Calibur (Becton Dickinson) y software de análisis CellQuest con ajustes de excitación y emisión de 488 nm y 525-550 nm (filtro FL1), respectivamente. La actividad caspasa-3 se midió usando el ensayo Caspase-3 de BioVision. La actividad caspasa se presenta como la relación entre la actividad caspasa de la muestra y la medida en células HEK293T transfectadas con pCMV. Para el análisis de la muerte celular y la medición de la actividad caspasa, se añadieron AP20187 y/o netrina-1 y/o DCC-5Fbn en medio de cultivo celular 20 horas y 1 hora antes de recoger las células.

#### RT-PCR cuantitativa:

45

**[0078]** Para ensayar la expresión de netrina-1 en tumores de mama humanos, el ARN total se extrajo de biopsias de pacientes sometidas a cirugía para cáncer de mama usando el kit Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) y 1  $\mu$ g se transcribió de forma inversa usando el kit iScript ADNc Synthesis kit (BioRad). Se realizó RT-PCR cuantitativa en tiempo real en un aparato LightCycler 2.0 (Roche) usando el kit Light Cyclyer FastStart DNA Master SYBERGreen I kit (Roche). Las condiciones de reacción para toda la amplificación óptima, así como selección del cebador de netrina-1, se determinaron como ya se ha descrito anteriormente <sup>18</sup>. Los genes PBGD, TBP humanos y RPLP0 de ratón expresados ubicuamente que mostraban la menor variabilidad en la expresión entre tejidos normal y tumoral de mama <sup>25 28</sup> se usaron como controles internos. Se usaron los siguientes cebadores:

55 PBGD:

- DIR 5'-CTGGAGTTCAGGAGTATTCGGGG-3' (SEQ ID NO: 18),
- INV: 5'-CAGATCCAAGATGTCCTGGTCCTT-3' (SEQ ID NO: 19);
- TBP:
- DIR 5'-CACGAACCCACGGCACTGATT-3' (SEQ ID NO: 20),

- INV: 5' TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC 3' (SEQ ID NO: 21);  
netrina-1 humana-NTN1:

- DIR 5'-TGCAAGAAGGACTATGCCGTC-3' (SEQ ID NO: 22),

- INV: 5'-GCTCGTGCCCTGCTTATACAC-3' (SEQ ID NO: 23);

5 UNC5B:

- DIR 5'-TGCAAGGAGAACCTCATGGTC-3' (SEQ ID NO: 24),

- INV: 5'-GGGCTGGAGGATTACTGGTG-3' (SEQ ID NO: 25);

DCC:

- DIR 5'-AGCCAATGGGAAAATTACTGCTTAC-3' (SEQ ID NO: 26),

10 - INV: 5'-AGGTTGAGATCCATGATTTGATGAG-3' (SEQ ID NO: 27);

UNC5C:

- DIR 5'-GCAAATTGCTGGCTAAATATCAGGAA-3' (SEQ ID NO: 28),

- INV: 5'-GCTCCACTGTGTTTCAGGCTAAATCTT-3' (SEQ ID NO: 29).

### 15 Ratones, inyecciones intravenosas y en la glándula mamaria, medición del desarrollo de metástasis:

**[0079]** Modelo en ratón singénico. Ratones BALB/cByJ hembra de 8-11 semanas de edad de Jackson Laboratory se usaron para cirugía. Para inyección en la glándula mamaria de células 67NR, los ratones se anestesiaron con 2,2,2-tribromoetanol y  $10^6$  células en  $50 \mu\text{l}$  de PBS se inyectaron en la glándula mamaria y los ratones se sacrificaron cuando el tumor superaban los 1,5 cm y causaba impedimento al movimiento del animal. Para inyección intravenosa,  $10^5$  células 4T1-luc tumorales en  $150 \mu\text{l}$  de PBS se inyectaron en una vena caudal y los ratones se sacrificaron el día 13-15 (después de la inyección de células 4T1) o el día 20-23 (después de la inyección de células 67NR) o se analizaron usando registro de luminiscencia. Cuando se sacrificaron los animales, los pulmones se extirparon, se pesaron y se compararon con el peso total del animal, y se contaron los nódulos metastásicos.

#### Xenoinjerto en ratones desnudos:

**[0080]** Ratones atímicos nu/nu de cinco semanas de edad (20-22 g de peso corporal) se obtuvieron de Charles River. Los ratones se alojaron en jaulas recubiertas con filtro esterilizadas y se mantuvieron en una instalación animal libre de patógenos. Líneas celulares de cáncer de mama humano (SKBR7, T47D y H358) se implantaron mediante inyección s.c. de  $5 \cdot 10^6$  células en  $200 \mu\text{l}$  de PBS en el flanco izquierdo de los ratones. Cuando los tumores se establecieron (5 semanas para T47D, 2 semanas para SKBR7 y 5 días para H358), PBS o  $20 \mu\text{g}$  de DCC-5Fbn se administraron al interior del tumor (i.t.) todos los días durante 14 días. Los tamaños del tumor se midieron mediante un calibre. El volumen del tumor se calculó con la fórmula  $v = 0,5 \cdot (\text{longitud} \cdot \text{anchura}^2)$ .

#### Análisis del tumor:

**[0081]** Se prepararon secciones de pulmón de  $4 \mu\text{m}$  de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina-azafrán. Se realizó clasificación y gradación histológica de lesiones neoplásicas a ciegas y de acuerdo con procedimientos estándar. Para imaginología in vivo de metástasis usando células 4T1-luc, la luz resultante de la oxidación bioluminiscente de la luciferina libre de endotoxinas inyectada por vía intra-peritoneal (Promega) ( $120 \text{ mg/kg}$  de peso corporal) se detectó y se cuantificó (10 minutos después de la inyección) con un sistema NightOWL LB 981 NC 100 de Berthold Technologies, usando un sistema de anestesia con isoflurano gaseoso de TEM SEGA.

#### Ejemplo 2: la netrina-1 dicta la metástasis de tumor de mama inhibiendo la apoptosis

**[0082]** En primer lugar se analizó netrina-1 y sus receptores de dependencia -es decir, la expresión de DCC y UNC5H mediante Q-RT-PCR en un panel de 30 tumores primarios de mama, 15 de los cuales fueron sin evolución metastásica conocida, y 15 que fueron metastásicos en el diagnóstico. Aunque DCC era apenas detectable y UNC5H no conseguía mostrar un cambio significativo entre los dos tipos de tumores, netrina-1 parecía estar significativamente más expresada en tumores de mama metastásicos que en tumores de mama no metastásicos (figura 1A).

**[0083]** El 60% de los tumores de mama metastásicos ensayados mostraba una sobreexpresión de netrina-1 (intervalo de 1,4 a 9,6 veces,  $p < 0,015$ ) (Tabla 1).

**Tabla 1:** El porcentaje de muestras que muestran una expresión de netrina-1 mayor que la expresión promedio en biopsias no metastásicas se indica, al igual que el intervalo de sobreexpresión.

n= 15	Metástasis	Sin metástasis
% de tumores de mama que sobreexpresan netrina-1	60	33
Intervalo de sobreexpresión de netrina-1	1,4-9,6	1,6-2,9

**[0084]** En ratones, Miller y colegas desarrollaron un potente modelo para estudiar la biología de tumores metastásicos frente a no metastásicos: a partir de un único tumor mamario primario que se producía de forma natural en un ratón BALB/c, se obtuvieron una serie de líneas celulares que mostraron diferentes potenciales metastásicos cuando se inyectaban en ratones singénicos. En particular, mientras que las células 67NR forman tumores mamarios primarios pero no metástasis, las células 4T1 forman tumores primarios y metástasis, especialmente en el pulmón, la médula ósea y el hígado<sup>20</sup>. Curiosamente, aunque no se conseguía detectar la netrina-1 en células 67NR, la netrina-1 era altamente expresada en células 4T1 (figura 1B).

**[0085]** Para ensayar si el potencial metastásico de células 4T1, en comparación con el de células 67NR, estaba relacionado con la expresión de netrina-1, células 67NR fueron forzadas a expresar de forma estable netrina-1. Células 67NR transfectadas de forma simulada o células 67NR-net que expresan netrina-1 (figuras 2A, 2B) se inyectaron en la glándula mamaria o i.v. y la metástasis se monitorizó mediante examen de anatomía-patología de los pulmones. Ambas líneas celulares no consiguieron formar metástasis cuando se inyectaron en la almohadilla adiposa, lo que sugiere que la presencia de netrina-1 en 67NR no es suficiente para permitir formación de metástasis en el pulmón a partir del sitio primario. Sin embargo, cuando las células se inyectaron i.v., se detectó un incremento significativo de metástasis en los pulmones en las 67NR que expresan netrina-1 (figura 2C).

**[0086]** Véase la tabla 2 que muestra el número de nódulos sub-pleurales (metástasis fuera del pulmón) e intra-parenquimatosos (metástasis en el pulmón).

**Tabla 2:**

	Lesiones subpleurales		Lesiones intraparenquimatosas (metástasis de pulmón)	
	Número de pulmones afectados	Número de nódulo por pulmón (intervalo)	Número de pulmones afectados	Número de nódulos por pulmón (intervalo)
Ratones inyectados con clon:				
67NR1	3	0-5	0	0
67NR2	2	0-2	0	0
67NR-net1	3	0-5	1	0-4
67NR-net2	1	0-3	2	1-2

**[0087]** Por lo tanto, la expresión de netrina-1 parece ser un evento crucial que apoya la formación de metástasis, probablemente favoreciendo células tumorales después de la intravasación.

**[0088]** Dado que la netrina-1 parece ser suficiente para el potencial metastásico de células 67NR después de la intravasación y, dado que la netrina-1 demostró inhibir la muerte celular inducida por los receptores de dependencia de netrina-1<sup>6, 7, 18</sup>, a continuación se investigó si la producción autocrina de netrina-1 proporciona una ventaja selectiva a las células 4T1 inhibiendo la muerte celular inducida por DCC/UNC5H en estas células. Un dominio ubicado en el extremo N de netrina-1 (el llamado dominio de laminina-VI) interactúa con los receptores tanto DCC como UNC5H (figura 3A; <sup>21</sup>), de modo que un dominio extracelular soluble de DCC (DCC-EC-Fc) pueda inhibir la interacción tanto de DCC/netrina-1 como de UNC5H/netrina-1 (no mostrado). A continuación se añadió DCC-EC-Fc a un cultivo de células 4T1 y la muerte celular se monitorizó mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano (figura 3B) o midiendo la actividad caspasa (figura 3C). Tal como se muestra en la figura 3C, la adición de la proteína competidora en el medio de cultivo desencadena la muerte de células 4T1 de manera dependiente de la dosis. Además, este efecto es específico, dado que DCC-EC-Fc no tenían ningún efecto sobre la muerte de células 67NR e IL3R-EC-Fc (el dominio extracelular del receptor de IL3) no conseguía desencadenar la muerte de células 4T1 (figuras 3B, 3C). Este efecto se debía a la inhibición de netrina-1, dado que la adición de una cantidad en exceso de netrina-1, junto con DCC-EC-Fc inhibía la capacidad proapoptótica de DCC-EC-Fc sobre células 4T1 (no mostrado). Para restringir la competencia a un dominio más pequeño, se produjo el quinto dominio de fibronectina de tipo III de DCC, que se sabe que interactúa con netrina-1<sup>21</sup>. La adición de este dominio -DCC-5Fbn- tenía una actividad proapoptótica similar sobre células 4T1 (figura 3D). Por lo tanto, aunque la netrina-1 parece otorgar potencial metastásico a células tumorales en ratones, estas células tumorales metastásicas que expresan netrina-1 pueden

ser inducidas hacia apoptosis mediante inhibición de la interacción netrina-1/receptores.

**[0089]** Para analizar adicionalmente si esto sigue siendo cierto en células tumorales de mama humanas, la expresión de netrina-1 se analizó en un panel de líneas celulares de cáncer de mama metastásicas humanas (véase la tabla 3).

Tabla 3:

Línea celular de carcinoma de mama humana	Expresión transcripcional de netrina-1	Sensibilidad a DCC-EC-Fc
<b>MDA-MB 157</b>	++++	+/-
MCF-7	++++	-
CAMA-1	+++	-
SKBR3	++	ND
SAV-NUDE	++	ND
Cal51	++	+++
MDA-MB231	+	++
MDA-MB453	+	+
T47D	-	ND
T47D*	++	++

\*Llevada a cabo en otra línea celular de T47D

Tabla 3 que muestra las diferentes líneas celulares de mama metastásicas humanas analizadas para la expresión de netrina-1 mediante Q-RT PCR como en las figuras 1A, 1B, y su sensibilidad a DCC-EC-Fc mediante medición de la muerte celular mediante exclusión con azul de tripano. La cantidad relativa de la expresión de netrina-1 y la sensibilidad a DCC-EC-Fc se indican mediante (+), mientras que la ausencia de estos criterios se indica mediante (-). En algunas líneas celulares, el DCC-EC-Fc no se ha determinado (ND).

**[0090]** Como se esperaba, la netrina-1 se expresa en un gran número de líneas celulares metastásicas y algunas de ellas experimentaron apoptosis cuando se cultivan en presencia de DCC-EC-Fc. Como ejemplo, células CAL51 experimentaron apoptosis de manera dependiente de la dosis en respuesta a DCC-Ec-Fc. Como anteriormente, la adición de netrina-1 en exceso revierte el efecto de DCC-EC-Fc, apoyando la opinión de que las proteínas competidoras destruyen estas líneas celulares humanas inhibiendo la interacción netrina-1/receptores de netrina-1. Además, una selección clonal de células CAL51 permitía el establecimiento de una línea celular CAL51-36, que es mucho más susceptible a muerte celular en respuesta a DCC-EC-Fc (figura 4B). Dado que DCC-EC-Fc o DCC-5Fbn pueden representar, como consecuencia, buenas herramientas para desencadenar apoptosis selectiva de células tumorales metastásicas humanas.

**[0091]** En este caso se muestra que la expresión de netrina-1 puede considerarse un marcador de diseminación de un tumor de mama. Más de la mitad de los tumores de mama con propensión a metástasis mostraban expresión de netrina-1 elevada. Tanto el modelo en ratones descrito anteriormente como los datos obtenidos en líneas celulares de cáncer de mama humano apoyan la opinión de que este elevado nivel de netrina-1 es una ventaja selectiva adquirida por la célula cancerosa para escapar a la apoptosis inducida por receptores de dependencia de netrina-1 y, en consecuencia, para sobrevivir independientemente de la disponibilidad de netrina-1. Desde un punto de vista mecanicista, esta expresión autocrina de netrina-1 inhibe la muerte celular inducida por UNC5H. De hecho, DCC era apenas detectable en los dos grupos -metastásico y no metastásico- de cánceres de mama estudiados, sugiriendo por lo tanto que DCC está regulado negativamente pronto durante la tumorigénesis de mama o se expresa solamente débilmente en tejido de mama. Además, la inhibición de apoptosis inducida por UNC5H mediante coexpresión de una forma mutante negativa dominante de la actividad proapoptótica de UNC5H inhibe la muerte de células CAL51 en respuesta a DCC-EC-Fc (no mostrado). Esto puede encajar con la reciente observación de que parte de la actividad proapoptótica de UNC5H2 pasa a través de la activación de la serina/treonina DAPK<sup>22</sup> una proteína implicada en la regulación de metástasis<sup>23</sup>.

**[0092]** Estas observaciones no solamente proporcionan evidencia de la importancia del par ligando/receptor de dependencia en la regulación del desarrollo del tumor, sino que también explican una nueva estrategia terapéutica. De hecho, a día de hoy, no existe ningún tratamiento eficiente para pacientes con cáncer de mama metastásico, una falta de tratamiento que causa la muerte de 400.000 mujeres en el mundo al año<sup>24</sup>. En el presente documento, se propone que un tratamiento basado en la inhibición de la interacción entre netrina-1 y sus receptores

de dependencia podría afectar positivamente a la mitad de las pacientes que padecen cáncer de mama metastásico. Estos tratamientos podrían incluir fármacos químicos, anticuerpos monoclonales o la proteína DCC-5Fbn presentada en el presente documento. Si esto debe considerarse una estrategia que previene la formación de metástasis, que implicaría un tratamiento preventivo a largo plazo en mujeres diagnosticadas con cáncer de mama primario, o como una estrategia que podría usarse para inducir regresión de metástasis aún está por demostrar. Futuros ensayos clínicos deben responder también a este punto.

**[0093]** En el presente documento se describe que, a diferencia de los tumores de mama no metastásicos humanos, la mayoría de los cánceres de mama metastásicos muestra una sobreexpresión de netrina-1. En un modelo en ratones, se demostró que, en células tumorales mamarias no metastásicas, la expresión forzada de netrina-1 se asocia con metástasis en los pulmones. Además, líneas celulares tumorales metastásicas de ratón o humanas, que demostraron expresar de manera elevada netrina-1, experimentan apoptosis cuando la interacción netrina-1/receptores es inhibida por una proteína competidora. Por lo tanto, la netrina-1 es un marcador para cáncer metastásico humano tal como de mama metastásico y la inhibición de la interacción netrina-1/receptores representa un enfoque terapéutico para inducir la muerte de células metastásicas.

**Ejemplo 3: la restauración de ruta de receptores de dependencia de netrina-1 activa la apoptosis en tumores de mama metastásicos**

**[0094]** Netrina-1 y sus receptores de dependencia -es decir, la expresión de DCC, UNC5H2, UNC5H3 se analizaron mediante Q-RT-PCR en un panel de 51 tumores de mama. Esto incluye pacientes cuyos tumores estaban localizados en la mama (N0, 16 pacientes), presentaban implicación nodal (N+, 19 pacientes) o presentaban enfermedad metastásica distante en el momento del diagnóstico (M+, 16 pacientes). Aunque DCC era apenas detectable y la expresión de UNC5H no conseguía presentar cambios significativos entre los diferentes tipos de tumores (no mostrados), la netrina-1 se expresa significativamente más en tumores N+ que en tumores N0 (mediana: 1,8 frente a 0,5, p=0,007) con un intervalo de expresión de netrina-1 mayor en tumores N+ (figura 5 y tabla 4).

**Tabla 4:** El porcentaje de muestras que muestra una expresión de netrina-1 más elevada que la expresión promedio en biopsias N0, 5 veces mayor o 15 veces mayor se indica, al igual que el intervalo de sobreexpresión.

n = 51		N0 localizado en la mama (n=16)	N+ Implicación nodal (n=19)	M+ metástasis distante (n=16)
% de tumores de mama que sobreexpresan netrina-1		31	73,7	93,7
% de tumores de mama que sobreexpresan netrina-1.	Más de 5 veces	0	31,5	62,5
	Más de 15 veces	0	0	37,5
Intervalo de sobre-expresión de Netrina-1		0,02-4,6	0,03-12,8	0,6-111,7

**[0095]** El 31,5% de los tumores N+ muestran al menos un incremento de 5 veces en la expresión de netrina-1 mientras que ningún incremento de este tipo se detectó en ninguno de los tumores N0 puestos a prueba (figura 5 y tabla 4). Una diferencia aún más impactante se observa cuando se compara la expresión de netrina-1 en tumores M+ frente a N0 (mediana: 7,8 frente a 0,5, p<0,0001). En esta línea el 62,5% de los tumores M+ muestran al menos un incremento de 5 veces de la expresión de netrina-1. Una diferencia significativa en la expresión de netrina-1 también existe entre tumores N+ y M+ (mediana: 1,8 frente a 7,8, p=0,009). Además, la sobreexpresión de netrina-1 es mayor en tumores M+ que en tumores N+, dado que el 37,5% de los tumores M+ presentan un incremento de más de 15 veces del nivel de netrina-1, mientras que un incremento de este tipo no se detecta en tumores N+ (figura 5 y tabla 4). Por lo tanto, la regulación positiva de netrina-1 es un marcador de implicación nodal y enfermedad metastásica distante en cáncer de mama humano.

**[0096]** En ratones, Miller y colegas desarrollaron un potente modelo para estudiar la biología de tumores metastásicos frente a no metastásicos: a partir de un único tumor mamario primario que se originaba de forma natural en un ratón BALB/c, se obtuvieron una serie de líneas celulares que mostraban diferentes potenciales metastásicos cuando se inyectaban en ratones singénicos. En particular, aunque las células 67NR forman tumores mamarios primarios pero no metástasis, las células 4T1 forman tumores primarios y metástasis, especialmente en el pulmón, el hígado y la médula ósea<sup>20</sup>. Curiosamente, aunque no se conseguía detectar la netrina-1 en células 67NR, la netrina-1 se expresaba de manera elevada en células 4T1 (figura 1B).

**[0097]** Para ensayar en primer lugar si el potencial metastásico de las células 4T1, en comparación con el de las células 67NR, estaba relacionado con la expresión de netrina-1, células 67NR fueron forzadas a expresar de forma estable netrina-1. Células 67NR transfectadas de forma simulada o células 67NR que expresan netrina-1 (figuras 2A y 2B) se inyectaron en glándulas mamarias y la metástasis se monitorizó mediante examen anatómico-patológico. Ambas líneas celulares no consiguieron formar de forma eficiente metástasis en el hígado o en los pulmones cuando se inyectaron en almohadillas adiposas de ratones (a 19 se les inyectaron células 67NR que expresaban netrina-1 y solamente dos sospechosos de micro-metástasis, uno en el pulmón y uno en el hígado se detectaron) (tabla 5).

10

**Tabla 5:** Metástasis en pulmones e hígado de 67NR inyectadas en la almohadilla plantar frente a células que expresan netrina-1. Un clon de células de control que portan resistencia a puromicina (67NR-mock), un clon de células que expresan netrina-1 (67NRnet1) y una población policlonal de 67NR transfectadas de forma estable con netrina-1 (67NR-net1-policlonal) se inyectaron en la almohadilla adiposa de ratones y la metástasis se analizó en el entorno del pulmón o del hígado.

15

Células inyectadas	Ratones (n)	Tumores primarios	Metástasis	Comentario
67NR-mock	9	9	0	
67NR-net1	7	7	0	Sospecha de 1 micrometástasis en el hígado
67NR-net1 policlonal	12	12	0	Sospecha de 1 micrometástasis en el pulmón

**[0098]** Por lo tanto, la expresión de netrina-1 en células tumorales no es suficiente para permitir la formación de metástasis a partir del sitio primario.

**[0099]** Puesto que la netrina-1 mostró inhibir la muerte celular inducida por receptores de dependencia de netrina-1<sup>6, 7, 18</sup>, a continuación se investigó si la producción autocrina de netrina-1 detectada en células 4T1 metastásicas otorga una ventaja selectiva a estas células, inhibiendo la muerte celular inducida por DCC/UNC5H. Para ensayar esto, se buscó un compuesto que puede valorar netrina-1. Se notificó que un dominio ubicado en el extremo N de netrina-1 (el llamado dominio de laminina-VI) interactúa con los receptores tanto DCC como UNC5H (figura 3A;<sup>21</sup>). Se muestra que un dominio extracelular soluble de DCC (DCC-EC-Fc) puede inhibir la interacción tanto DCC/netrina-1 como UNC5H2/netrina-1, según lo medido mediante ensayo ELISA (figura 6A). DCC-EC-Fc se añadió a continuación a un cultivo de células 4T1 y la muerte celular se monitorizó, mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano (figuras 3B y 6B) o midiendo la actividad caspasa mediante citometría de flujo (figuras 3C y 6C). Tal como se muestra en las figuras 3B, 3C, 6B y 6C la adición de la proteína competidora al medio de cultivo desencadena la muerte de células 4T1 de manera dependiente de la dosis. Este efecto es específico, dado que DCC-EC-Fc no tenía ningún efecto sobre la muerte de células 67NR (figuras 3B, 3C, 6B y 6C) e IL3R-EC-Fc (el dominio extracelular del receptor IL3) no conseguía desencadenar muerte de células 4T1 (figura 3D). Por lo tanto, las células 4T1 sobreviven a la producción autocrina de netrina-1, que bloquea la muerte celular inducida por receptores de netrina-1.

35

**[0100]** Dado que el dominio extracelular completo de DCC parece solamente de modesto interés para uso in vivo y en terapia (DCC-EC-Fc es de aproximadamente 1100 aminoácidos de tamaño), se buscó un polipéptido alternativo a partir del dominio extracelular de DCC, que podría desencadenar apoptosis en células 4T1. Se produjo, en consecuencia, el quinto dominio de fibronectina de tipo III de DCC, DCC-5Fbn, que se sabe que interactúa con netrina-1<sup>21</sup> (figura 3A). Curiosamente, esta proteína de 100 aminoácidos no interfiere en la unión de DCC/netrina-1 o UNC5H/netrina-1, pero afecta a la capacidad de netrina-1 de desencadenar multimerización de estos receptores (véase el ejemplo 4). Dado que la multimerización de DCC y UNC5H es un prerrequisito para la actividad inhibidora de netrina-1 sobre la muerte celular inducida por DCC/UNC5H, la adición de DCC-5Fbn desencadena apoptosis en células que expresan DCC cultivadas en presencia de netrina-1<sup>22</sup> y desencadena la muerte de ambas 4T1 (figura 7A).

45

**[0101]** A continuación se investigó si el efecto de muerte celular observado in vitro puede extenderse in vivo. Para hacer esto, células 4T1 se transfectaron de forma estable con un vector basado en luciferasa y las células 4T1-luc se inyectaron por vía intravenosa (i.v.) en ratones BALB/c sinérgicos. A los ratones se les inyectaron a continuación por vía intraperitoneal (i.p.) e i.v. (1 inyección cada dos días, una vez i.v., una vez i.p.) del día 0 al día 13 con tampón PBS o DCC-5Fbn marcado con Flag (1,25 µg/ratón g/inyección). La formación de metástasis se analizó

50

a continuación usando registro de luminiscencia. Tal como se muestra en las figuras 7B y 7C, cuando se inyectaron i.v., las células 4T1-luc colonizan eficientemente los pulmones. Por el contrario, los ratones tratados con DCC-5Fbn muestran una drástica reducción de metástasis en el pulmón (figuras 7B y 7C). Esta inhibición de la formación de metástasis se confirmó a continuación mediante examen anatómico-patológico de los pulmones, (no mostrado, véase la tabla 6).

**Tabla 6:** el número total de nódulos metastásicos pulmonares en ratones individuales se contaron en un microscopio de disección en las dos poblaciones tratadas (+PBS, +DCC-5Fbn)

Tratamiento	Ratones (n)	Promedio de metástasis por ratón	Intervalo de metástasis por ratón
PBS	10	42,4	0-75
DCC-5Fbn	10	2,6	0-6

- 10 **[0102]** Se obtuvieron resultados similares cuando se realizó inyección i.p. diaria de DCC-5Fbn marcado con GST en lugar de DCC-5Fbn marcado con Flag y GST-FADD en lugar de PBS (no mostrado). Por lo tanto, en ratones, la inhibición mediante DCC-5Fbn de la actividad pro-supervivencia otorgada por la expresión autocrina de netrina-1 está asociada con la prevención de la metástasis.
- 15 **[0103]** La ventaja de supervivencia adquirida a través de la expresión autocrina de netrina-1 no está limitada a células tumorales murinas, dado que se detecta en líneas celulares de cáncer de mama humano. De hecho, se demostró que la netrina-1 se expresaba en una fracción considerable de líneas de cáncer de mama humano (figura 8A) y la adición de DCC-EC-Fc o DCC-5Fbn a cultivos celulares de T47D o SKBR7 de adenocarcinoma de mama humano que expresan de forma natural netrina-1, desencadena la inducción de muerte celular medida mediante
- 20 ensayo de actividad caspasa-3 o ensayo MTT (figura 8B y no mostrado). Este efecto se debe a la inhibición de netrina-1, dado que la adición de una cantidad en exceso de netrina-1, inhibía la capacidad proapoptótica de DCC-EC-Fc/DCC-5Fbn (no mostrado). Para monitorizar el efecto anti-tumoral de DCC-5Fbn, xenoinjertos de células T47D se implantaron en ratones desnudos. Cuando los tumores alcanzaban un tamaño palpable, los ratones fueron tratados a diario con PBS o DCC-5Fbn y el volumen del tumor se determinó durante 18 días. De forma similar a los
- 25 datos obtenidos en el modelo sinérgico anterior, DCC-5Fbn inhibe completamente el crecimiento del tumor (tabla 7).

**Tabla 7:** que muestra el número y el comportamiento de tumores T47D xenoinjertados que han sido tratados con PBS o DCC-5Fbn. Se indican el número de tumores que han aumentado de tamaño más del 40% y el número de tumores que tiene un tamaño reducido (más del 30%)

Tratamiento	Número de ratones	Crecimiento del tumor (> 40 %)	Regresión del tumor (> 30 %)
PBS	4	3	0
DCC-5Fbn	5	0	3

- 30 **[0104]** En el presente documento se muestra que la expresión de netrina-1 puede considerarse un marcador de la capacidad del tumor de mama de diseminarse. La mayoría de los tumores de mama con propensión a metástasis mostraban expresión de netrina-1 elevada. Tanto los datos obtenidos en líneas celulares de cáncer de mama humano/de ratón como los modelos en ratón sinérgicos/de xenoinjerto humano descritos anteriormente
- 35 apoyan la opinión de que este elevado nivel de netrina-1 es una ventaja selectiva adquirida por la célula cancerosa para escapar a la apoptosis inducida por receptores de dependencia de netrina-1 y, en consecuencia, para sobrevivir independientemente de la disponibilidad de netrina-1. Desde un punto de vista mecanicista, en la patología humana, esta expresión autocrina de netrina-1 probablemente inhibe la muerte celular inducida por UNC5H. De hecho, DCC era apenas detectable en los diferentes grupos (N0, N+, M+) de cánceres de mama
- 40 estudiados, lo que sugiere por lo tanto que DCC está regulado negativamente temprano durante la tumorigénesis de mama o se expresa solamente débilmente en tejido de mama. Además, la inhibición de apoptosis inducida por UNC5H mediante coexpresión de una forma mutante negativa dominante de la actividad proapoptótica de UNC5H inhibe la muerte de células de cáncer de mama humano en respuesta a DCC-EC-Fc (no mostrado).
- 45 **[0105]** Por lo tanto, tal como se predijo mediante el modelo de receptor de dependencia, se ha demostrado ahora que una célula tumoral puede escapar a la dependencia del receptor de dependencia de al menos tres maneras. En primer lugar, la expresión del receptor de dependencia puede estar regulada negativamente, tal como se ha descrito exhaustivamente para DCC y más recientemente para UNC5H<sup>15, 17, 19, 29</sup>. En segundo lugar, la señalización de muerte cadena abajo puede detenerse. En esta línea, se demostró recientemente que la actividad
- 50 proapoptótica de UNC5H2 depende de la unión de UNC5H2 a la serina/treonina DAPK<sup>22</sup>, una propiedad que se demostró que está implicada en la regulación de metástasis y regulada negativamente en neoplasia humana<sup>23</sup>. Análogamente, un reciente informe de Stupack y colegas muestra que, en el caso de algunas integrinas que actúan

como receptores de dependencia, la caspasa-8, que desencadena la muerte celular mediada por estas integrinas, es crucial para metástasis de neuroblastoma <sup>30</sup>. En el presente documento se muestra que una tercera ventaja selectiva para la célula tumoral es la auto-producción del ligando de dependencia. Queda una cuestión intrigante en cuando a por qué los tumores de mama con propensión metastásica parecen haber seleccionado preferentemente auto-producción de netrina-1 en lugar de pérdida del receptor, mientras que los tumores colorrectales han seleccionado en su mayoría pérdida de los receptores en lugar de aumento de la expresión de netrina-1 - de hecho, solamente el 7% de los cánceres colorrectales muestran un incremento de la expresión de netrina-1 <sup>18</sup>. Una posible explicación es que la expresión de netrina-1 no solamente otorga un aumento de supervivencia a las células que migran, sino que también posiblemente un aumento en la señalización no apoptótica/positiva de receptores de netrina-1. En esta línea, es importante observar que la netrina-1 se describió originalmente como una señal de guiado <sup>31</sup>, que, incluso aunque completamente sin demostrar, podría desempeñar un papel en el tropismo de células metastásicas. Otros papeles propuestos de netrina-1 incluyen regulación de adhesión y morfogénesis <sup>32-34</sup>, ambos mecanismos que pueden ser de importancia para el desarrollo de metástasis. Análogamente, recientemente se propuso que la netrina-1 desempeña un papel durante la angiogénesis embrionaria e incluso aunque se han publicado resultados conflictivos <sup>36-38</sup>, en esta fase no se puede descartar el papel de la netrina-1 como factor angiogénico que, de algún modo, podría favorecer el desarrollo de metástasis en el sitio secundario. Sin embargo, el aumento de señalización "positiva" mediante expresión autocrina de netrina-1 probablemente no es suficiente per se para promover la metástasis, dado que la expresión forzada de netrina-1 en células no metastásicas no conseguía asociarse con la formación de metástasis.

**[0106]** Estas observaciones no solamente proporcionan evidencia de la importancia de pares de ligando/receptores de dependencia en la regulación del desarrollo de tumores, sino que también explican una nueva estrategia terapéutica. De hecho, a día de hoy, no existe ningún tratamiento eficiente para pacientes con cáncer de mama metastásico, una falta de tratamiento que causa la muerte de 400.000 mujeres en el mundo al año <sup>24</sup>. En el presente documento, se propone que un tratamiento basado en la inhibición de la interacción entre netrina-1 y sus receptores de dependencia podría afectar positivamente a la mitad de las pacientes que padecen cáncer de mama metastásico, tal como cáncer de mama -es decir pacientes que mostrarían elevada expresión de netrina-1 en tumores primarios-. Estos tratamientos podrían incluir fármacos químicos, anticuerpos monoclonales o la proteína DCC-5Fbn presentada en el presente documento.

**Ejemplo 4: expresión de netrina-1 e inhibición de la actividad netrina-1 en otros tumores humanos**

**[0107]** A) La netrina-1 es un marcador de agresividad en neuroblastoma humano (véase la figura 9A, su leyenda y la tabla 8) e inhibir la actividad de netrina-1 promueve la muerte de células de neuroblastoma (véase la figura 10B y su leyenda).

**Tabla 8:** 26 líneas celulares de neuroblastoma (obtenidas directamente a partir de tumores de pacientes en el Centre Léon Bérard (CLB-X) o líneas celulares de neuroblastoma clásicas (IMR32, SHEP, SHSY o SKNAS)) se ensayaron como en (a) para expresión de netrina-1 mediante Q-RT-PCR. El nivel de netrina-1 se indica como (-) sin netrina-1, (+, ++, +++) nivel de netrina-1 bajo a elevado. Puede observarse que una fracción significativa de líneas celulares tienen expresión elevada de netrina-1.

Línea celular	netrina-1
CLB-BAB	-
CLB-BAC	-
CLB-BAR	-
CLB-BARREC	-
CLB-BEL	+
CLB-BOULT	++
CLB-BER2	-
CLB-BERLUD	-

CLB-CAR	-
CLB-ESP	-/+
CLB-GAR	-
CLB-GHE MO	-
CLB-GHE PCT	-
CLB-HUT	+++
CLB-MAR MO	-/+
CLB-MAR LT	+
CLB-PEC	-
CLB-REM	+++
CLB-SED	+
CLB-TRA	-
CLB-VOL	++++
IGRN91	-/+
IMR32	+++
SHEP	-/+
SHSY 5Y	-/+
SKNAS	++++

B) La netrina-1 se sobreexpresa en una gran fracción de glioma (véase la figura 10A y su leyenda) y la inhibición de la actividad netrina-1 promueve la muerte de células de glioma (véase la figura 10B y su leyenda).

C) La netrina-1 se sobreexpresa en cáncer de pulmón humano (véase la figura 11A, su leyenda y la tabla 9) y la inhibición de la actividad netrina-1 promueve la muerte de células de cáncer de pulmón e impide el desarrollo de cáncer de pulmón (véase las figuras 12C y 12D y sus leyendas).

**Tabla 9:** Líneas celulares de cáncer de pulmón derivadas a partir de cáncer de pulmón microcítico (SCLC) o cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) se ensayaron como en (a) para la expresión de netrina-1 mediante Q-RT-PCR. El nivel de netrina-1 se indicaba como (-) sin netrina-1, (+, ++) nivel de netrina-1 de bajo a elevado. Puede observarse que una fracción significativa de líneas celulares tienen elevada expresión de netrina-1.

Línea celular	netrina-1
NSCLC	
A549	
H322	++
H358	++
H460	-
H1299	+
SCLC	
H69	-
H146	+
H196	-

D) Expresión de netrina-1 en otros tumores humanos.

Expresión de netrina-1 examinada mediante Q-RT PCR usando ARN total extraído de diferentes tumores humanos como en las figuras 10A-10B, 11A-11C, 12A-12B. La tabla 10 indica (n) el número de tumores ensayados y el porcentaje de tumores que muestran una sobreexpresión de netrina-1 en cada patología.

5

Tabla 10:

Cánceres	n	sobreexpresión de netrina-1
Adenocarcinoma renal	5	40%
Leucemia mieloide aguda	55	62%
Sarcoma	10	30%
Melanoma	6	50%
Adenocarcinoma de ovario	14	93 %*
Adenocarcinoma pancreático	7	57%
Adenocarcinoma de útero	42	19%
Adenocarcinoma de estómago	27	26%
Adenocarcinoma de riñón	20	50%
Adenocarcinoma rectal	18	17%
*100% de las 7 muestras metastásicas		

#### Ejemplo 5:

10 **[0108]** Para analizar si DCC estaba en su forma monomérica a menos que netrina-1 estuviera presente, se coexpresaron de forma transitoria un DCC de longitud completa marcado con HA con DCC de longitud completa marcado con c-myc en células HEK293T. A continuación se realizó inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti-c-myc y, tal como se muestra en la figura 12A, a pesar de una buena expresión de DCC marcado tanto con HA como con c-myc, HA-DCC estaba incluido solamente modestamente en el arrastre de c-myc-DCC en ausencia de ligando, sugiriendo que DCC, estaba principalmente presente como un monómero cuando se expresaba en HEK293T en ausencia de netrina-1. En las mismas condiciones experimentales, cuando se añadió netrina-1 al medio de cultivo (no mostrado y figura 15C) o cuando una construcción de expresión de netrina-1 se coexpresó con las construcciones que expresan DCC (figura 11A), HA-DCC estaba claramente incluido en el arrastre de c-myc DCC, demostrando por lo tanto que la netrina-1 desencadena la dimerización o multimerización de DCC. Este resultado concuerda con datos de Tessier-Lavigne y colegas que notificaron en primer lugar la multimerización inducida por netrina-1<sup>46</sup>, incluso aunque en las condiciones de cultivo e inmunoprecipitación, DCC presenta un modesto aunque detectable nivel de multimerización en ausencia de netrina-1. Este bajo nivel de multimerización constitutivo, podría atribuirse a la baja afinidad de receptores de DCC por sí mismos en ausencia de ligando o al sistema usado, que se basa en expresión forzada de niveles elevados de receptores transmembrana.

25

**[0109]** A continuación se investigó si los otros receptores de netrina-1 UNC5H comparten un comportamiento similar. Células HEK293T se transfectaron transitoriamente con un UNC5H2 de longitud completa marcado con HA junto con UNC5H2 de longitud completa marcado con Flag en presencia o ausencia de netrina-1. A continuación se realizó inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti-FlagM2. Tal como se muestra en la figura 11B, la presencia de netrina-1 desencadena una inmunoprecipitación eficiente de HA-UNC5H2 con Flag-UNC5H2. Por lo tanto, aunque en ausencia de netrina-1, DCC y UNC5H2 están principalmente en formas monoméricas, tanto DCC como UNC5H2 muestran una propensión incrementada a multimerizar en presencia de netrina-1.

30

**[0110]** Para determinar si la multimerización inducida por netrina-1 es la etapa crucial para inhibir la muerte celular proapoptótica de DCC/UNC5H2, se desarrolló un sistema químico en el que la dimerización de proteínas puede ser inducida por un agente químico. Este sistema se usó con éxito para mostrar tanto el papel de la dimerización de caspasa-8 en la activación de caspasa-8<sup>49</sup> como la importancia de multimerización de p75<sup>ntr</sup> en actividad proapoptótica de p75<sup>ntr</sup><sup>48</sup>. Este sistema se deriva de la capacidad del compuesto Fk1012 de dimerizar de forma cruzada el motivo FkBP. Los dominios intracelulares de DCC y UNC5H2 se fusionaron en su extremo N a motivos Fv2e FkBP derivados y la dimerización se indujo usando el compuesto químico AP20187 (figura 13A). En primer lugar, se analizó si el sistema desarrollado recapitula la multimerización inducida por netrina-1 del dominio intracelular de UNC5H2. Células HEK293T se cotransfectaron con un Fv2e-UNC5H2-IC marcado con HA junto con Fv2e-UNC5H2-IC marcado con c-myc y se realizaron coinmunoprecipitaciones usando un anticuerpo anti-c-myc. Tal como se muestra en la figura 13B, sin adición de AP20187, HA-Fv2e-UNC5H2-IC era apenas detectable en el arrastre de c-myc-Fv2e-UNC5H2-IC, apoyando por lo tanto que Fv2e-UNC5H2-IC se expresa en células HEK293T principalmente como un monómero. Como se esperaba, la adición de AP20187 causó el eficiente arrastre de HA-

45

Fv2e-UNC5H2-IC con c-myc-Fv2e-UNC5H2-IC. Se obtuvieron resultados similares con Fv2e-DCC-IC (no mostrados). Por lo tanto, este sistema de dimerización recapitula la dimerización del dominio intracelular de los receptores de netrina-1 DCC y UNC5H2.

5 **[0111]** Puesto que este sistema de dimerización de DCC/UNC5H2 químicamente inducible parece funcionar adecuadamente para imitar multimerización de DCC/UNC5H2 inducida por netrina-1, a continuación se evaluó si la dimerización de DCC/UNC5H2 era suficiente para inhibir la actividad proapoptótica de DCC/UNC5H2. Células HEK293T fueron forzadas a expresar Fv2e-DCC-IC en presencia o ausencia de AP20187 y la muerte celular se evaluó mediante tinción con azul de tripano, tal como se ha descrito anteriormente, para medir la muerte celular  
10 inducida por DCC<sup>6, 27</sup>. Tal como se muestra en la figura 14A, la expresión de Fv2e-DCC-IC estaba asociada con muerte celular incrementada en comparación con la expresión de los motivos Fv2e sin la fusión DCC-IC. Curiosamente, cuando se añadió AP20187, la muerte celular inducida por Fv2e-DCC-IC se redujo drásticamente (figura 14A). Análogamente, aunque Fv2e-UNC5H2-IC desencadena muerte celular (figura 14B) o activación de caspasa (figura 14C) cuando se expresaba en HEK293T en ausencia de AP20187, la adición del fármaco  
15 dimerizante es suficiente para reducir significativamente la muerte celular inducida por Fv2e-UNC5H2-IC (figura 14B) o la activación de caspasa (figura 14C). Por lo tanto, aunque DCC-IC y UNC5H2-IC monoméricos son proapoptóticos, las formas multiméricas de DCC-IC o UNC5H2-IC ya no presentan actividad proapoptótica. Por lo tanto, la capacidad de netrina-1 para inhibir la actividad proapoptótica de DCC/UNC5H2 está enlazada intrínsecamente a la capacidad de netrina-1 de multimerizar DCC o UNC5H2, dado que este proceso de  
20 multimerización es suficiente para detener la actividad proapoptótica de DCC y UNC5H2.

**[0112]** Un modelo atractivo sería que la forma monomérica de DCC o UNC5H2 tenga una conformación espacial que se somete fácilmente a la escisión por caspasa inicial del dominio intracelular del receptor. Por el contrario, la presencia del ligando causaría multimerización del dominio intracelular, que de algún modo se vuelve  
25 menos accesible a escisión por caspasa. En esta línea, Arakawa y colegas han demostrado que la escisión por caspasa de UNC5H2 es inhibida por la presencia de netrina-1<sup>47</sup>. Hasta ahora, debido a limitaciones técnicas, no se ha podido detectar escisión de DCC o UNC5H2 en células forzadas a expresar las proteínas de fusión Fv2e. Un modelo alternativo a la inhibición de la escisión sería que la multimerización del receptor inducida por netrina-1 desencadena una señal de supervivencia, que de algún modo inhibe una actividad proapoptótica constitutiva de  
30 DCC o UNC5H2 relacionada con escisión de caspasa constitutiva. Sin embargo, no se consiguió demostrar que las rutas de señalización positivas conocidas activadas por DCC tras la unión de netrina-1 están implicadas en la actividad inhibidora de netrina-1 sobre la actividad proapoptótica de DCC. Por ejemplo, netrina-1 induce activación mediada por DCC de ERK-1/2<sup>3</sup>, quinasas que se sabe que presentan un efecto anti-apoptótico. Sin embargo, los inhibidores clásicos de la ruta de ERK-1/2, aunque afectan a la fosforilación de ERK-1/2 inducida por netrina-1, no  
35 consiguieron bloquear el efecto inhibitor de netrina-1 sobre la actividad proapoptótica de DCC (Forcet y Mehlen, no publicado). Por lo tanto, es probable que la multimerización de DCC inducida por netrina-1 afecte a la accesibilidad intracelular de DCC. Sin embargo, aún está por demostrar si esto es cuestión de simple estequiometría, o si el acercamiento de los dominios extracelulares induce un cambio de conformación dentro de los compartimentos intracelulares.  
40

**[0113]** Si los mecanismos que subyacen en la multimerización del receptor inducida por netrina-1 aún están por describir, la observación de que la multimerización de DCC/UNC5H2 inducida por netrina-1 es suficiente para inhibir la muerte celular inducida por DCC/UNC5H2 puede representar una herramienta interesante para activar la actividad proapoptótica de DCC o UNC5H2 in vivo, en tumores en los que netrina-1 se expresa de manera autocrina.  
45 De hecho, se ha demostrado que la sobreexpresión de netrina-1 en el intestino de ratones está asociada con el desarrollo de tumores intestinales debido a la inhibición de la apoptosis<sup>18</sup> y recientemente se observó que la netrina-1 se sobreexpresa en la mayoría de cánceres de mama metastásicos humanos. Además, el mecanismo de la sobreexpresión de netrina-1 parece ser una ventaja selectiva adquirida de células tumorales metastásicas para supervivencia en entornos de ausencia ambiental de netrina-1 (véase los ejemplos 2 y 3). Por lo tanto, inhibir la  
50 dimerización de DCC/UNC5H2 representaría supuestamente una manera interesante de desencadenar apoptosis de células tumorales.

**[0114]** En esta línea, el quinto dominio de fibronectina de DCC ha demostrado ser un dominio de interacción con netrina-1 (figura 15A y <sup>21</sup>), incluso aunque también se han notificado datos conflictivos<sup>43</sup>. En primer lugar se evaluó, por lo tanto, si un quinto dominio de fibronectina soluble recombinante de DCC (DCC-5Fbn) podría unirse a netrina-1 recombinante. El ensayo ELISA demuestra que DCC-5Fbn se une específicamente a netrina-1, al contrario que el dominio extracelular de un receptor no relacionado, IL3-R (figura 15A). La Kd aproximada para DCC-5Fbn/netrina-1 se estimó de forma grosera en 5 nM, ajustándose al orden de magnitud de la Kd de DCC/netrina-1 descrita. A continuación se investigó si este dominio era suficiente para desplazar la interacción DCC/netrina-1. Tal  
55

como se muestra en la figura 15B, usando un ensayo ELISA en el que el dominio extracelular de DCC estaba revestido y se detectó interacción netrina-1/DCC mediante inmunorreactividad de netrina-1, se observó que, aunque como control positivo el dominio extracelular completo de DCC (DCC-EC) era suficiente para desplazar la interacción DCC/netrina-1, DCC-5Fbn no conseguía interferir. Por lo tanto, DCC-5Fbn interactúa con netrina-1 pero no es suficiente para inhibir la interacción DCC/netrina-1. A continuación se investigó si DCC-5Fbn podría influir en la multimerización de DCC. A continuación se realizó coinmunoprecipitación en HEK293T transfectadas de forma transitoria con DCC de longitud completa marcado con HA junto con DCC de longitud completa marcado con c-myc en presencia o ausencia de netrina-1. Tal como también se describe en la figura 1A, la presencia de netrina-1 desencadena la inmunoprecipitación de HA-DCC con c-myc-DCC, demostrando multimerización de DCC inducida por netrina-1 (figura 15C). Sin embargo, cuando las células incubadas con netrina-1 también se trataron simultáneamente con DCC-5Fbn, la interacción HA-DCC/c-myc-DCC volvía a niveles no tratados con netrina-1. Por lo tanto, DCC-5Fbn interactúa con netrina-1 en una región responsable del acercamiento mediado por netrina-1 de dos o más moléculas de DCC y es capaz de inhibir la multimerización de DCC inducida por netrina-1.

**[0115]** A continuación se ensayó si DCC-5Fbn podría desencadenar, en consecuencia, muerte celular inducida por receptores de netrina-1. Para este fin, células HEK293T fueron forzadas a expresar DCC en presencia o ausencia de netrina-1, con o sin DCC-5Fbn, y la muerte celular se determinó mediante ensayo de exclusión con azul de tripano (figura 16A). Tal como se muestra en la figura 16A, aunque DCC desencadena apoptosis en ausencia de netrina-1, una actividad proapoptótica bloqueada por la presencia de netrina-1, la presencia de DCC-5Fbn es suficiente para bloquear la actividad inhibidora de netrina-1, causando de este modo muerte celular inducida por DCC. Dado que el sistema de células HEK293T usa expresión ectópica de netrina-1, a continuación se ensayó DCC-5Fbn en un modelo más relevante biológicamente. Recientemente se demostró que, en comparación con cánceres de mama no metastásicos, la mayoría de cánceres de mama metastásicos humanos sobreexpresa netrina-1. También hemos demostrado que la valoración cuantitativa de netrina-1 sobreexpresada desencadena apoptosis de células tumorales in vitro e inhibición de metástasis en ratones (véase los ejemplos 2 y 3). Muchas líneas celulares de tumor de mama parecen expresar netrina-1 y se ha demostrado que la valoración cuantitativa de netrina-1 células 4T1 de carcinoma de mama de ratones desencadena apoptosis (véase los ejemplos 2 y 3). Tal como se muestra en la figura 16B, la adición de DCC-5Fbn a un cultivo de células 4T1 está asociada con muerte celular incrementada.

**[0116]** En conjunto, se ha demostrado en el presente documento que la multimerización de los receptores de dependencia DCC y UNC5H es un mecanismo suficiente para bloquear su actividad proapoptótica. Curiosamente, el mecanismo inhibidor parece copiar el que se observa con los receptores de muerte. De hecho, se sabe que TNF $\alpha$  o Fas requiere trimerización para inducir apoptosis<sup>45</sup>. Esta diferencia intrínseca puede representar, por lo tanto, un valor añadido para estrategias terapéuticas que usan receptores de dependencia. De hecho, la búsqueda de moléculas terapéuticas en el pasado condujo principalmente a impactos que actúan sobre la inhibición de procesos celulares -por ejemplo, inhibidores de quinasas, inhibidores de IAP- en lugar de activadores. Como consecuencia, la inhibición de multimerización de receptores de netrina-1 mediante el uso de DCC-5Fbn recombinante o mediante cualquier compuesto cribado para interferir en la multimerización del receptor parece una estrategia atractiva para el tratamiento de cánceres en los que se ha adquirido expresión autocrina de netrina-1.

**[0117]** En el presente documento, se demuestra que la netrina-1 desencadena la multimerización de los receptores tanto DCC como UNC5H. Usando un sistema en el que la dimerización es químicamente inducida, se demostró que la multimerización del dominio intracelular de receptores de netrina-1, tales como DCC y UNC5H2, es la etapa crítica para inhibir su actividad proapoptótica. Se propuso, por lo tanto, un modelo en el que receptores de dependencia de netrina-1 monoméricos son proapoptóticos, mientras que su multimerización, inducida por netrina-1, suprime su actividad proapoptótica. Usando esta propiedad, se propone el uso de un dominio específico recombinante de la región extracelular de DCC que (i) interactúa con netrina-1 y (ii) inhibe la multimerización inducida por netrina-1, para desencadenar la apoptosis de células tumorales.

## Referencias

### [0118]

1. Serafini, T. et al. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87, 1001-14 (1996).
2. Keino-Masu, K. et al. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87, 175-85 (1996).
3. Forcet, C. et al. Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* 417, 443-7 (2002).

4. Ackerman, S. L. et al. The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature* 386, 838-42 (1997).
5. Hong, K. et al. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97, 927-41 (1999).
6. Mehlen, P. et al. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 395, 801-4 (1998).
7. Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E. & Mehlen, P. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *Embo J* 20, 2715-22 (2001).
8. Bordeaux, M. C. et al. The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *Embo J* 19, 4056-63 (2000).
9. Stupack, D. G., Puente, X. S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C. M. & Cheresch, D. A. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 155, 459-70 (2001).
10. Thibert, C. et al. Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* 301, 843-6 (2003).
11. Matsunaga, E. et al. RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nat Cell Biol* 6, 749-55 (2004).
12. Rabizadeh, S. et al. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261, 345-8 (1993).
13. Mehlen, P. & Thibert, C. Dependence receptors: between life and death. *Cell Mol. Life Sci* 61, 1854-66 (2004).
14. Bredesen, D. E., Mehlen, P. & Rabizadeh, S. Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death Differ* 12, 1031-43 (2005).
15. Fearon, E. R. et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247, 49-56 (1990).
16. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-70 (1996).
17. Thiebault, K. et al. The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4173-4178 (2003).
18. Mazelin, L. et al. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 431, 80-4 (2004).
19. Bernet, A. et al. The netrin-1 receptor UNC5H3 is a tumor suppressor in colorectal malignancies. submitted (2007).
20. Aslakson, C. J. & Miller, F. R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* 52, 1399-405 (1992).
21. Geisbrecht, B. V., Dowd, K. A., Barfield, R. W., Longo, P. A. & Leahy, D. J. Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin. *J Biol Chem* 278, 32561-8 (2003).
22. Llambi, F. et al. The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *Embo J* 24, 1192-201 (2005).
23. Inbal, B. et al. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 390, 180-4 (1997).
24. Andre, F. et al. Breast cancer with synchronous metastases: trends in survival during a 14-year period. *J Clin Oncol* 22, 3302-8 (2004).
25. de Cremoux, P. et al. Inter-laboratory quality control for hormone-dependent gene expression in human breast tumors using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocr Relat Cancer* 11, 489-95 (2004).
26. Latil, A. et al. Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. *Int J Cancer* 103, 306-15 (2003).
27. Forcet, C., Ye, X., Granger, L., Corset, V., Shin, H., Bredesen, D.E. and Mehlen, P. (2001) The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an.
28. de Kok, J. B. et al. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 85, 154-9 (2005).
29. Mehlen, P. & Fearon, E. R. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 22, 3420-8 (2004).
30. Stupack, D. G. et al. Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature* 439, 95-9 (2006).
31. Serafini, T. et al. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 409-24 (1994).
32. Yebra, M. et al. Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration. *Dev Cell* 5, 695-707 (2003).
33. Srinivasan, K., Strickland, P., Valdes, A., Shin, G. C. & Hinck, L. Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev Cell* 4, 371-82 (2003).
34. Liu, Y. et al. Novel role for Netrins in regulating epithelial behavior during lung branching morphogenesis. *Curr Biol* 14, 897-905 (2004).
35. Park, K. W. et al. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16210-5 (2004).

36. Lu, X. et al. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* 432, 179-86 (2004).
37. Nguyen, A. & Cai, H. Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6530-5 (2006).
- 5 38. Wilson, B. D. et al. Netrins Promote Developmental and Therapeutic Angiogenesis. *Science* (2006).
39. Chan, S.S., Zheng, H., Su, M.W., Wilk, R., Killeen, M.T., Hedgecock, E.M. and Culotti, J.G. (1996) UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell*, 87, 187-195.
- 10 40. Ellerby, L.M., Hackam, A.S., Propp, S.S., Ellerby, H.M., Rabizadeh, S., Cashman, N.R., Trifiro, M.A., Pinsky, L., Wellington, C.L., Salvesen, G.S., Hayden, M.R. and Bredesen, D.E. (1999) Kennedy's disease: caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity. *J Neurochem*, 72, 185-195.
41. Fazeli, A., Dickinson, S.L., Hermiston, M.L., Tighe, R.V., Steen, R.G., Small, C.G., Stoeckli, E.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., Simons, J., Bronson, R.T., Gordon, J.I., Tessier-Lavigne, M. and Weinberg, R.A. (1997) Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature*, 386, 796-804.
- 15 42. Hedgecock, E.M., Culotti, J.G. and Hall, D.H. (1990) The *unc-5*, *unc-6*, and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron*, 4, 61-85.
43. Kruger, R.P., Lee, J., Li, W. and Guan, K.L. (2004) Mapping netrin receptor binding reveals domains of Unc5 regulating its tyrosine phosphorylation. *J Neurosci*, 24, 10826-10834.
- 20 44. Mehlen, P. and Bredesen, D.E. (2004) The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis*, 9, 37-49.
45. Muppidi, J.R., Tschopp, J. and Siegel, R.M. (2004) Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity*, 21, 461-465.
46. Stein, E., Zou, Y., Poo, M. and Tessier-Lavigne, M. (2001) Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation. *Science*, 291, 1976-1982.
- 25 47. Tanikawa, C., Matsuda, K., Fukuda, S., Nakamura, Y. and Arakawa, H. (2003) p 53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol*, 5, 216-223.
48. Wang, J.J., Rabizadeh, S., Tasinato, A., Sperandio, S., Ye, X., Green, M., Assa-Munt, N., Spencer, D. and Bredesen, D.E. (2000) Dimerization-dependent block of the proapoptotic effect of p75(NTR). *J Neurosci Res*, 60, 587-593.
- 30 49. Yang, X., Chang, H.Y. and Baltimore, D. (1998) Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell*, 1, 319-325.
50. Mehlen P. and C. Furne (2005) Netrin-1: when a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci*. 62:2599-616.
51. Bernet A. and P. Mehlen, *Pathologie Biologie* 53(2005): 328-333.
- 35 52. WO 2005/074556.

LISTA DE SECUENCIAS

**[0119]**

- 40 <110> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)  
Centre Léon Bérard  
MEHLEN, Patrick  
BERNET, Agnès
- 45 FITAMANT, Julien
- <120> Inhibición de la actividad netrina-1 y su aplicación al tratamiento o el diagnóstico de cáncer metastásico
- <130> D24201
- 50 <150> US 60/776.926  
<151> 2006-02-28
- <160> 29
- <170> PatentIn versión 3.3
- 55 <210> 1  
<211> 62  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

# ES 2 601 352 T3

<220>

<223> Cebador usado para introducir una marca HA en la plantilla pCMV-DCC

5 <400> 1

cacaggctca gccttttata catatgatgt accggattat gcataacatg tattttctgaa 60  
tg 62

<210> 2

10 <211> 62

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador usado para introducir una marca HA en la plantilla pCMV-DCC

<400> 2

cattcagaaa tacatggtat gcataatcog gtacatcata tggataaaaag gctgagcctg 60  
tg 62

20

<210> 3

<211> 65

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador usado para introducir una marca c-myc en la plantilla pCMV-DCC

<400> 3

cacaggctca gccttttgagc agaagttgat aagtgaggaa gatctgtaac atgtattttct 60  
30 gaatg 65

<210> 4

<211> 65

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador usado para introducir una marca c-myc en la plantilla pCMV-DCC

40 <400> 4

cattcagaaa tacatggtac agatotttct cactttctcaa cttctgctca aaggctgagc 60  
ctgtg 65

<210> 5

45 <211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Cebador usado para obtener un fragmento de PCR del dominio intracelular de DCC (1122-1447)

<400> 5

tatgtcgacc gacgctcttc agcccagcag aga 33

55 <210> 6



# ES 2 601 352 T3

cggaattctc agcaatcgcc atcagtggtc 30

<210> 11  
5 <211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Cebador usado para generar mediante PCR amplificación del dominio intracelular de UNC5H2-HA

<400> 11

cggtcgacgt gtaccggaga aactgc 26

15 <210> 12  
<211> 57  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Cebador usado para generar mediante PCR amplificación del dominio intracelular de UNC5H2-HA

<400> 12

25 cggaattctc atgcataatc cggcacatca tacggatagc aatcgccatc agtggtc 57

<210> 13  
<211> 26  
30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador usado para generar mediante PCR amplificación del dominio intracelular de UNC5H2-myc

35 <400> 13

cggtcgacgt gtaccggaga aactgc 26

40 <210> 14  
<211> 60  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Cebador usado para generar mediante PCR amplificación del dominio intracelular de UNC5H2-myc

<400> 14

50 gcgaattctc acagatcctc ttctgagatg agttttgtt cgcaatcgcc atcagtggtc 60

<210> 15  
<211> 18  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo Fv2E

<400> 15  
 ccacatggg gagtagca 18

5 <210> 16  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador inverso UNC5H2-HA  
 <400> 16

15 tcattgataa tccggcacat catcggata gcaatcgcca tcagtggc 49  
 <210> 17  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador inverso UNC5H2-myc

25 <400> 17  
 tcacagatcc tctctgaga tgagttttg ttcgcaatcg ccatcagtg tc 52  
 <210> 18  
 30 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> Cebador usado para PBGD humano expresado como control interno  
 <400> 18

40 ctggagtcca ggagtattcg ggg 23  
 <210> 19  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Cebador usado para PBGD humano expresado como control interno  
 <400> 19

50 cagatccaag atgtcctggt cctt 24  
 <210> 20  
 <211> 20  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador usado para TBP humano expresado como control interno

<400> 20

5 cacgaaccac ggcactgatt 20

<210> 21  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador usado para TBP humano expresado como control interno

<400> 21

15 ttttctgct gccagtctgg ac 22

<210> 22  
 <211> 21  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador usado para netrina-1-NTN1 humana expresada como control interno

25 <400> 22

tgcaagaagg actatgccgt c 21

30 <210> 23  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Cebador usado para netrina-1-NTN1 humana expresada como control interno

<400> 23

40 gctcgtgccc tgcttataca c 21

<210> 24  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador usado para UNC5B humano expresado como control interno

50 <400> 24

tgcaaggagaa cctcatggtc 20

<210> 25  
 55 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 601 352 T3

<223> Cebador usado para UNC5B humano expresado como control interno

<400> 25

5 gggctggagg attactggtg 20

<210> 26

<211> 25

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador usado para DCC humano expresado como control interno

15 <400> 26

agccaatggg aaaattactg cttac 25

<210> 27

20 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador usado para DCC humano expresado como control interno

<400> 27

aggttgagat ccatgattg atgag 25

30

<210> 28

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador usado para UNC5C humano expresado como control interno

<400> 28

40

gcaaattgct ggctaaatat caggaa 26

<210> 29

<211> 26

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador usado para UNC5C humano expresado como control interno

50

<400> 29

gctccactgt gttcaggcta aatctt 26

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para seleccionar un compuesto para la prevención o el tratamiento de cáncer, seleccionándose dicho cáncer a prevenir o tratar entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, neuroblastoma, glioma, leucemia, sarcoma, melanoma y adenocarcinoma, donde dicho cáncer a prevenir o tratar es un cáncer donde células tumorales expresan o sobreexpresan netrina-1, donde dicho procedimiento comprende las siguientes etapas de:
- 5
- a) tener un medio que contiene netrina-1, o un fragmento de la misma, y un receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, donde:
- 10
- dicha netrina-1, o un fragmento de la misma, y dicho receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, son capaces de interactuar específicamente entre sí para formar un par de unión, y/o
  - dicha netrina-1, o un fragmento de la misma, es capaz de inducir la dimerización o multimerización del dominio intracelular de dicho receptor de netrina-1;
- 15
- b) poner en contacto dicho medio con el compuesto a poner a prueba;
- c)
- medir la inhibición de la interacción entre netrina-1, o un fragmento de la misma, y dicho receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, y/o
  - determinar si dicho compuesto inhibe la dimerización o multimerización de dicho receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, particularmente la dimerización del dominio intracelular de dicho receptor de netrina-1; y
- 20
- d) seleccionar dicho compuesto si:
- la medición en la etapa c) demuestra una inhibición significativa de la interacción entre netrina-1, o un fragmento de la misma, y el receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, en presencia de dicho compuesto, y/o
  - la determinación en la etapa c) demuestra una inhibición significativa de la dimerización o multimerización, en presencia de dicho compuesto, del dominio intracelular de dicho receptor de netrina-1.
- 25
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho adenocarcinoma a prevenir o tratar se selecciona entre el grupo que consiste en adenocarcinoma de ovario, adenocarcinoma renal, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de útero, adenocarcinoma de estómago, adenocarcinoma de riñón y adenocarcinoma rectal.
- 30
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicho cáncer a prevenir o tratar es un cáncer metastásico.
- 35
4. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, donde en la etapa a) dicho receptor de netrina-1 se selecciona entre el grupo de delecionado en cáncer colorrectal (DCC), homólogo de Unc-5 (UNC5H), neogenina y los receptores de adenosina A2b.
- 40
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, donde en la etapa a) dicho receptor de netrina-1 se selecciona entre el grupo de DCC, UNC5H1, UNC5H2 y UNC5H3.
6. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, donde en la etapa a):
- 45
- dicho fragmento del receptor de netrina-1 comprende o es el dominio extracelular del receptor de netrina-1, o parte del mismo capaz de unirse a netrina-1; y/o
  - dicho fragmento del receptor de netrina-1 comprende o es el dominio intracelular del receptor de netrina-1, o parte del mismo capaz de dimerizarse o multimerizarse en presencia de netrina-1.
- 50
7. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, donde en la etapa a) dicha netrina-1 y/o dicho receptor de netrina-1 son de mamífero.
8. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, donde en la etapa a) dicha netrina-1 es de pollo.
- 55
9. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, donde dicha netrina-1 y/o dicho receptor de netrina-1 y/o el compuesto a poner a prueba está marcado mediante un marcador capaz de ser medido directa o indirectamente.

10. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9, donde en la etapa c):
- la medida de la inhibición de la interacción entre netrina-1, o un fragmento de la misma, y dicho receptor de netrina-1, o un fragmento del mismo, se lleva a cabo mediante inmunoensayo (particularmente mediante ensayo 5 inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o mediante ensayo inmunorradiométrico (IRMA)), mediante ensayo de centelleo por proximidad (SPA) o mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET); y/o
  - la dimerización o multimerización, o su inhibición, de dicho receptor de netrina-1, o fragmento del mismo, particularmente el dominio intracelular, se lleva a cabo mediante inmunoprecipitación o FRET.
- 10 11. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, donde en la etapa a) dicho medio contiene células que expresan, en su membrana superficial, un receptor de netrina-1 endógeno o un receptor de netrina-1 recombinante, particularmente al menos el dominio extracelular de un receptor de netrina-1 recombinante.
- 15 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, donde en la etapa a) dicho medio contiene células que expresan el receptor de netrina-1 recombinante.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, donde en la etapa a) dicho medio contiene células tumorales que expresan de forma endógena dicho receptor de netrina-1 en la superficie de su membrana y 20 que expresan o sobreexpresan netrina-1, y donde en la etapa c) la inhibición de la interacción entre netrina-1 y su receptor de netrina-1 en presencia del compuesto a poner a prueba, se mide mediante la apoptosis o muerte de células inducida por la presencia del compuesto a poner a prueba.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, donde en la etapa a) dicho medio contiene 25 células tumorales metastásicas.
15. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 14, para seleccionar un compuesto para la prevención o el tratamiento de cáncer, donde dicho procedimiento comprende las siguientes etapas de:
- 30 a) tener un medio que contiene una célula de mamífero que expresa un receptor de netrina-1 endógeno o uno recombinante, o un fragmento del mismo que comprende al menos su dominio intracelular;
- b) poner en contacto dicho medio con el compuesto a poner a prueba;
- c) determinar si la dimerización o multimerización del dominio intracelular de dicho receptor de netrina-1 se inhibe en presencia de dicho compuesto a poner a prueba; y
- 35 d) seleccionar dicho compuesto si la determinación en la etapa c) demuestra una inhibición significativa de la dimerización o multimerización del dominio intracelular de dicho receptor de netrina-1.
16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicha célula de la etapa (a) es una célula 40 tumoral.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicha célula de la etapa (a) es una célula que presenta dimerización o multimerización del dominio intracelular de su receptor de netrina-1 o una célula donde el dominio intracelular de su receptor de netrina-1 es capaz de dimerizarse o multimerizarse en presencia de netrina- 1.
- 45 18. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, donde en la etapa (b) el medio contiene además netrina-1, o un fragmento de la misma, capaz de unirse al dominio extracelular del receptor de netrina-1.
- 50 19. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, que comprende además determinar si la presencia del compuesto a poner a prueba induce la muerte celular de dicha célula de mamífero; y la etapa (d) comprende la determinación de la muerte celular de dicha célula de mamífero.
20. Un procedimiento in vitro para predecir la presencia de un cáncer metastásico o agresivo en un 55 paciente que tiene un tumor primario a partir de una biopsia de dicho paciente que contiene células de tumores primarios, seleccionándose dicho cáncer entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, neuroblastoma, glioma, leucemia, sarcoma, melanoma y adenocarcinoma, donde dicho cáncer a prevenir o tratar es un cáncer donde células tumorales expresan o sobreexpresan netrina-1, que comprende las siguientes etapas de:

(a) medición del nivel de un producto de expresión de netrina-1 en dicha biopsia, donde dicho producto es (i) ARN que codifica netrina-1 o (ii) proteína netrina-1; y

(b) comparar dicho nivel de producto de expresión con la expresión del nivel de un producto de expresión de netrina-1 en una biopsia de tumor primario no metastásico o en una biopsia de cáncer no agresivo;

5 donde un incremento con una relación superior a 2 entre los niveles de un producto de expresión de netrina-1 en la biopsia a poner a prueba y en la biopsia de referencia no metastásica o no agresiva es indicativo de la presencia de un cáncer metastásico o un cáncer agresivo.

21. Un procedimiento para determinar *in vitro* la eficiencia de un tratamiento anti-cáncer para un paciente  
10 o para seleccionar *in vitro* pacientes que responden a un tratamiento anti-cáncer específico, seleccionándose dicho cáncer entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, neuroblastoma, glioma, leucemia, sarcoma, melanoma y adenocarcinoma, donde dicho cáncer a prevenir o tratar es un cáncer donde células tumorales expresan o sobreexpresan netrina-1, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas de:

15 - medición de un nivel de un producto de expresión de netrina-1 en una biopsia de dicho paciente, donde dicho producto es (i) ARN que codifica netrina-1 o (ii) proteína netrina-1;

donde la eficiencia de dicho tratamiento anti-cáncer está correlacionada con la disminución en una relación de al menos 2 de la cantidad del nivel de un producto de expresión de netrina-1 medido en dicha biopsia, o

20 donde los pacientes que responden a un tratamiento anti-cáncer específico seleccionados son pacientes donde la cantidad del nivel de un producto de expresión de netrina-1 medida en su biopsia se ha reducido en una relación de al menos 2 después de dicho tratamiento específico.

22. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21, donde dicho cáncer inducía una sobreexpresión  
25 de netrina-1 y/o es un cáncer metastásico.

23. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 20 a 22, donde dicho ARN que codifica netrina-1 se mide mediante un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa inversa (PCR) en tiempo real cuantitativa.

30

24. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 20 a 22, donde dicha proteína netrina-1 se mide usando anticuerpos específicos capaces de reconocer específicamente dicha proteína netrina-1.

25. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 20 a 24, donde el tumor primario es un tumor  
35 primario de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, neuroblastoma, glioma, leucemia, sarcoma, melanoma y adenocarcinoma.

26. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, donde dicho adenocarcinoma se selecciona  
40 entre el grupo que consiste en adenocarcinoma de ovario, adenocarcinoma renal, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de útero, adenocarcinoma de estómago, adenocarcinoma de riñón y adenocarcinoma rectal.

27. Uso para la selección de un compuesto para la prevención o el tratamiento de cáncer, seleccionándose dicho cáncer entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, neuroblastoma, glioma, leucemia, sarcoma, melanoma y adenocarcinoma, de un kit que comprende células tumorales que expresan  
45 receptor de netrina-1 y expresan o sobreexpresan netrina-1.

28. Uso de acuerdo con la reivindicación 27, donde las células tumorales son células de una línea celular tumoral.

50 29. Uso de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, que comprende además una proteína netrina-1, o un fragmento de la misma capaz de interactuar específicamente con dicho receptor de proteína netrina-1 para formar un par de unión.

30. Un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:

55

- un compuesto que comprende un dominio extracelular del receptor de netrina-1 o un fragmento del mismo capaz de inhibir específicamente la interacción entre la netrina-1 y dicho receptor de netrina-1, y/o capaz de inhibir la dimerización o multimerización del dominio intracelular de dicho receptor de netrina-1; y

- un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido específicamente contra netrina-1 o el dominio extracelular del

receptor de netrina-1 o a un fragmento de netrina-1 capaz de interactuar con el dominio extracelular de dicho receptor de netrina-1,

5 para uso en un procedimiento in vivo para prevenir o tratar cáncer de mama, cáncer de pulmón, neuroblastoma, glioma, leucemia, sarcoma, melanoma y adenocarcinoma.

31. Un compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 30, donde dicho dominio extracelular del receptor de netrina-1 o fragmento del mismo se selecciona entre el grupo de DCC; UNC5H, neogenina y la adenosina A2b.

10

32. Un compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 30 o 31, donde dicho compuesto que comprende un dominio extracelular del receptor de netrina-1 es de DCC.

33. Un compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 32, donde dicho compuesto es DCC-EC-15 Fc o DCC-5Fbn.

34. Un compuesto para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 33, para uso en un procedimiento para prevenir o tratar un cáncer donde las células tumorales expresan o sobreexpresan netrina-1.

20 35. El compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 30 a 34, o un oligonucleótido antisentido o de ARNi (ARN interferente) que es específico y complementario del ácido nucleico que codifica proteína netrina-1 para uso en un procedimiento in vivo para tratar o prevenir cáncer en mamíferos, incluyendo el ser humano, seleccionándose dicho cáncer entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, neuroblastoma, glioma, leucemia, sarcoma, melanoma y adenocarcinoma, donde dicho cáncer a prevenir o tratar es un cáncer donde células  
25 tumorales expresan o sobreexpresan netrina-1.

36. El uso del compuesto de acuerdo con la reivindicación 35, **caracterizado porque** dicho cáncer es un cáncer metastásico.

30 37. El uso del compuesto de acuerdo con la reivindicación 35 o 33, **caracterizado porque** dicho adenocarcinoma se selecciona entre el grupo que consiste en adenocarcinoma de ovario, adenocarcinoma renal, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma de útero, adenocarcinoma de estómago, adenocarcinoma de riñón y adenocarcinoma rectal.

35 38. El uso del compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 35 a 37, **caracterizado porque** las células tumorales primarias de dicho cáncer expresan o sobreexpresan netrina-1.

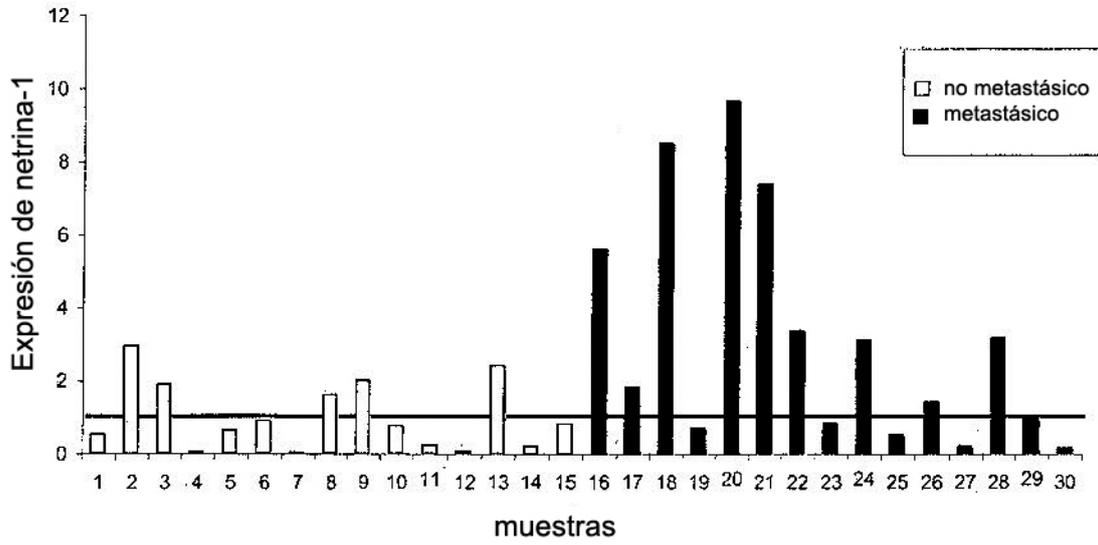


FIGURA 1A

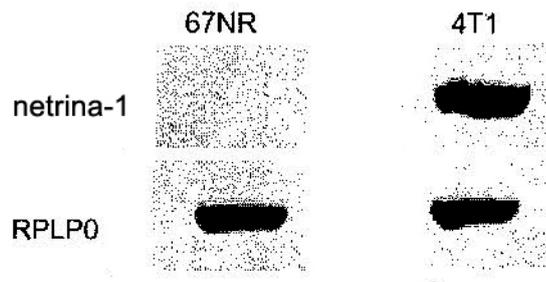


FIGURA 1B

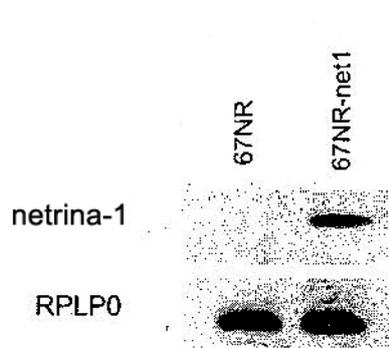


FIGURA 2A

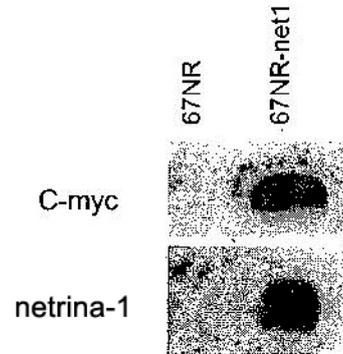


FIGURA 2B

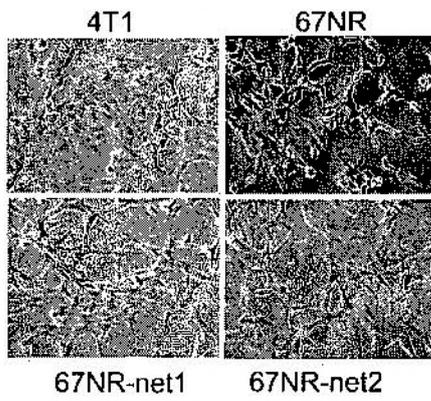


FIGURA 2C

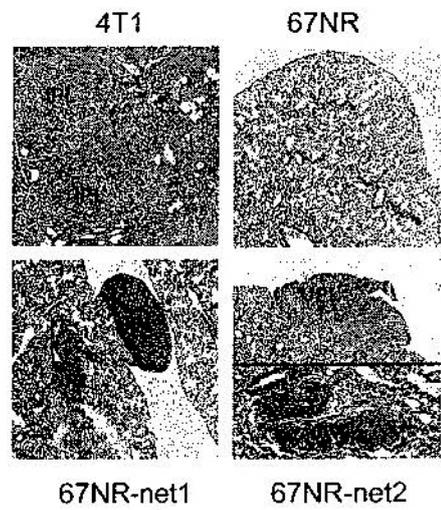


FIGURA 2D

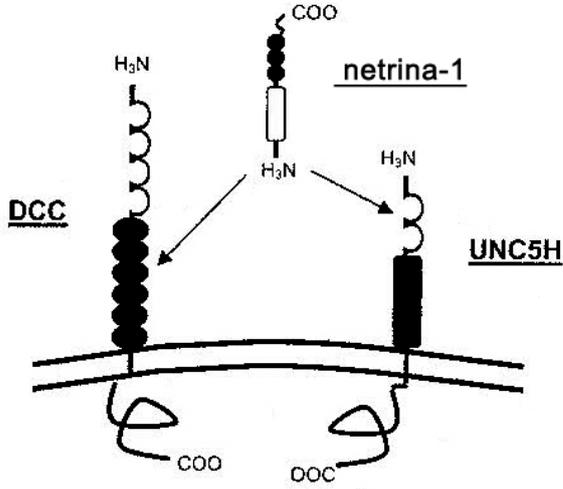


FIGURA 3A

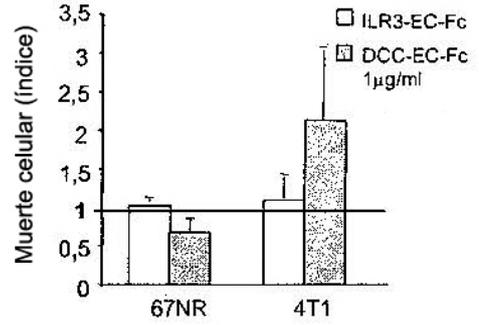


FIGURA 3B

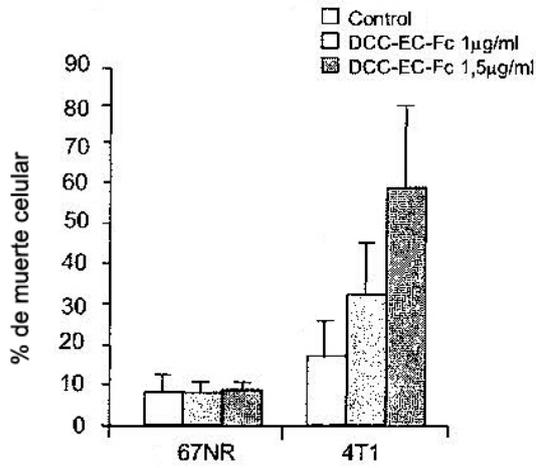


FIGURA 3C

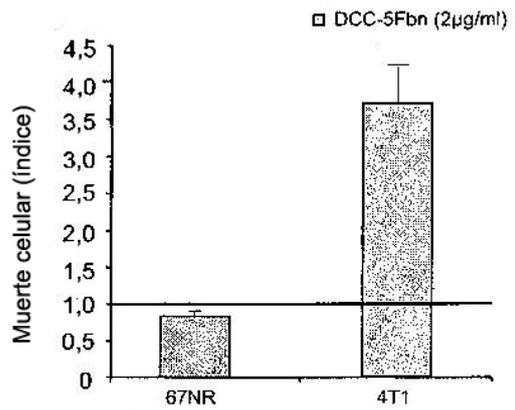
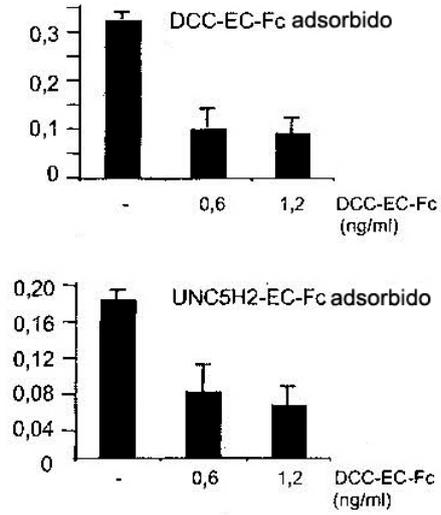
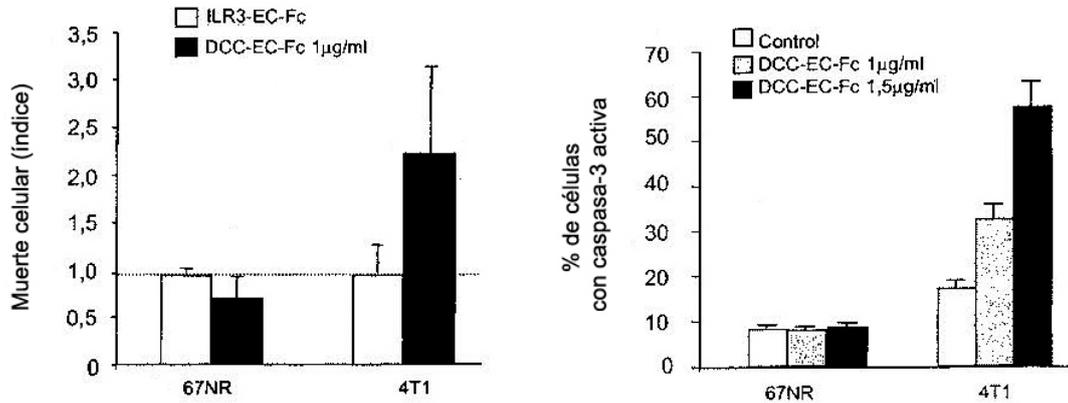


FIGURA 3D





**FIGURA 6A**



**FIGURA 6B**

**FIGURA 6C**

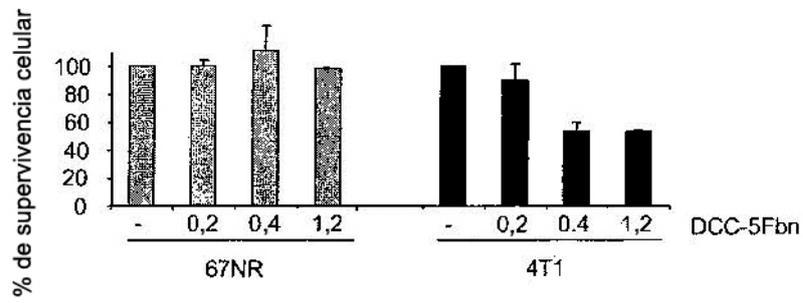


FIGURA 7A

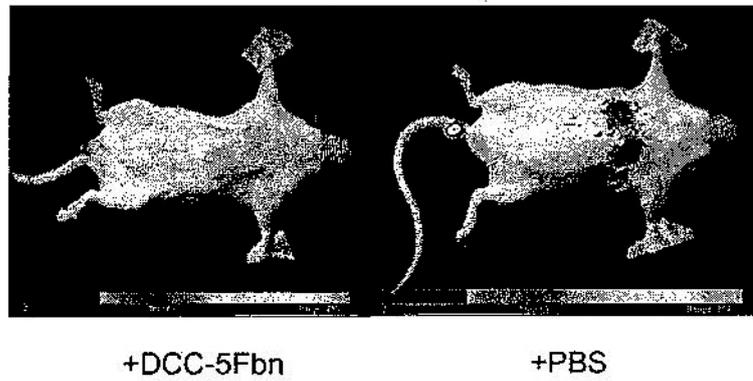


FIGURA 7B

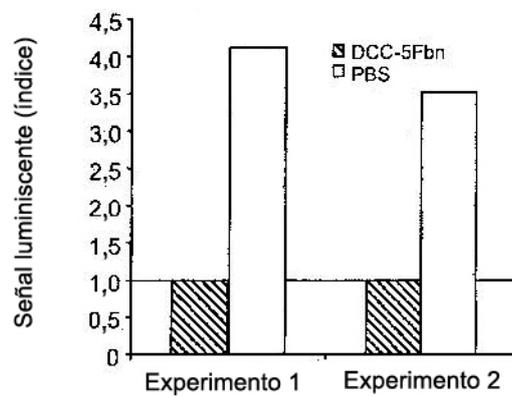


FIGURA 7C

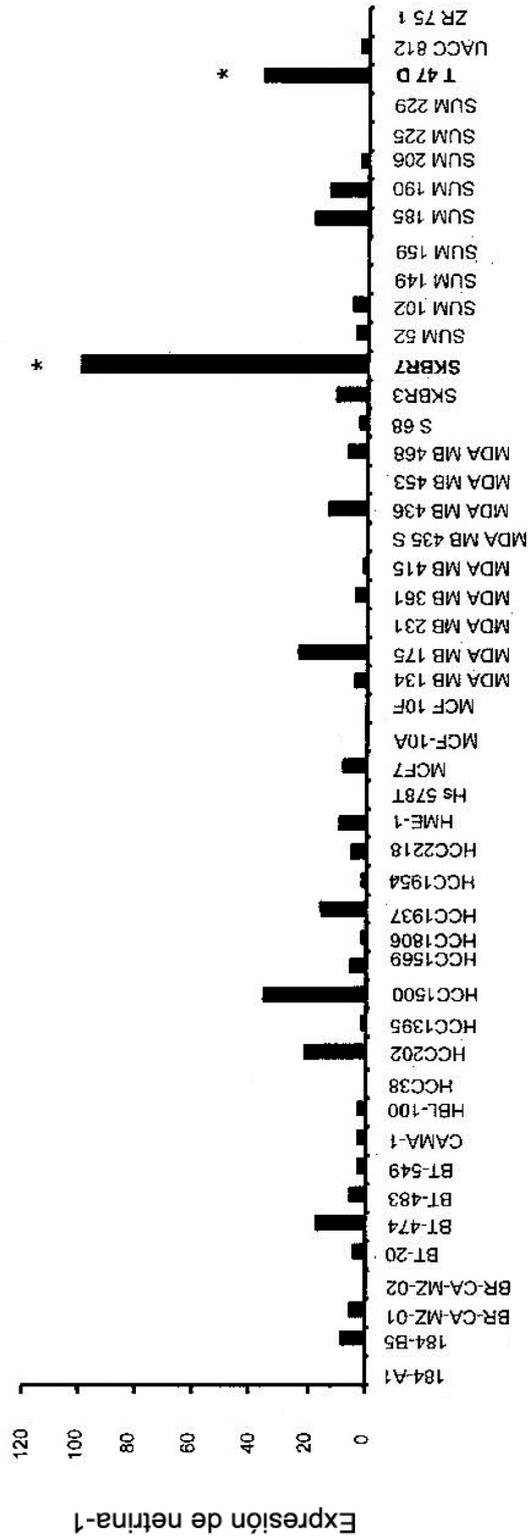


FIGURA 8A

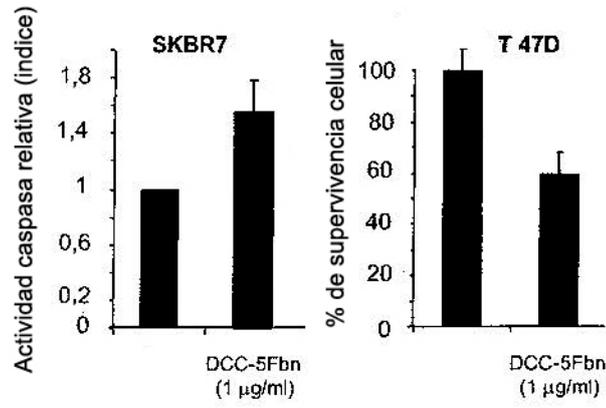


FIGURA 8B

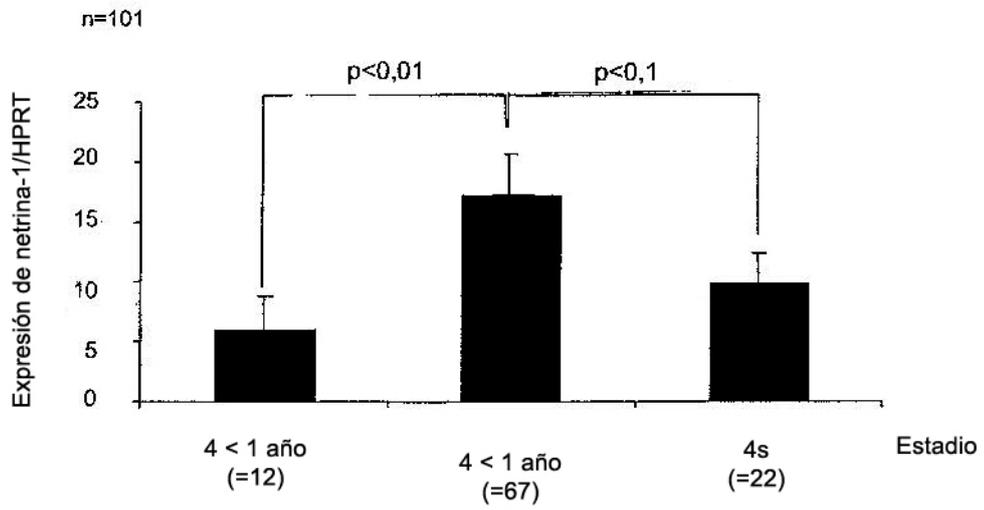
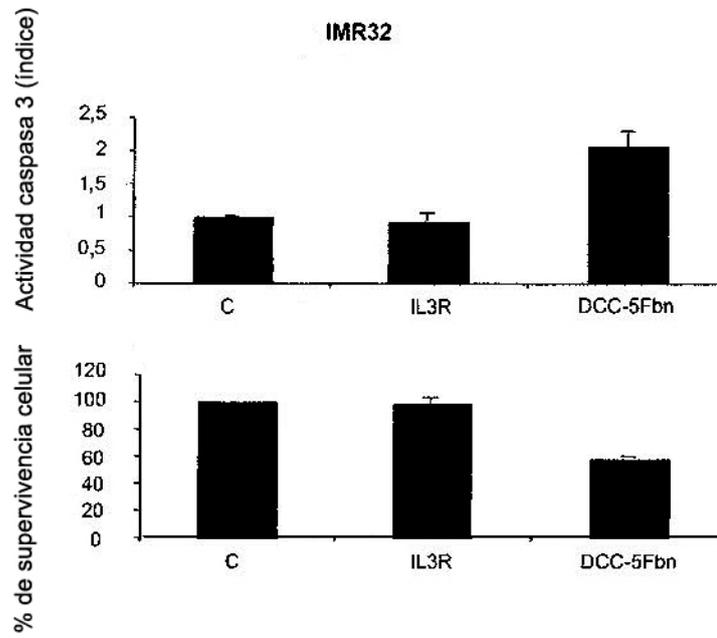


FIGURA 9A



**FIGURA 9B**

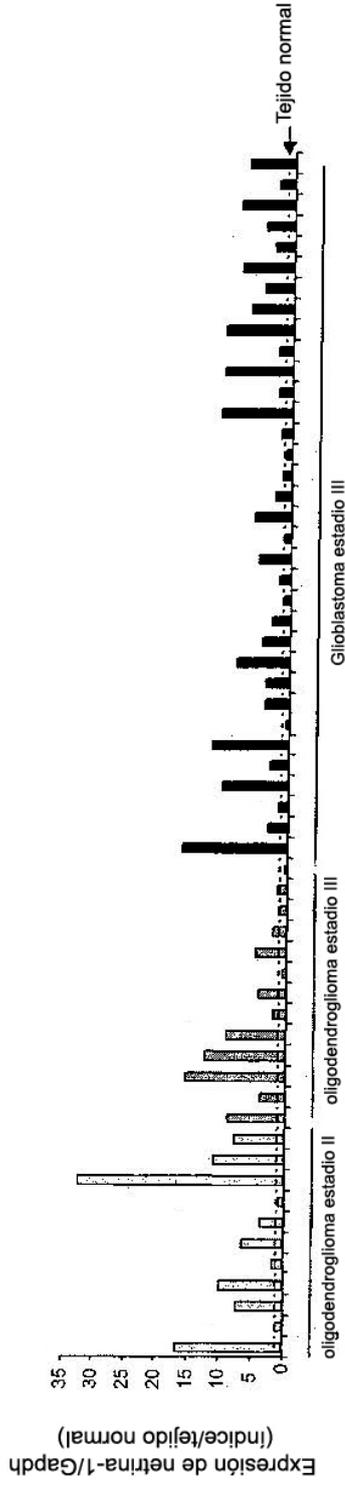


FIGURA 10A

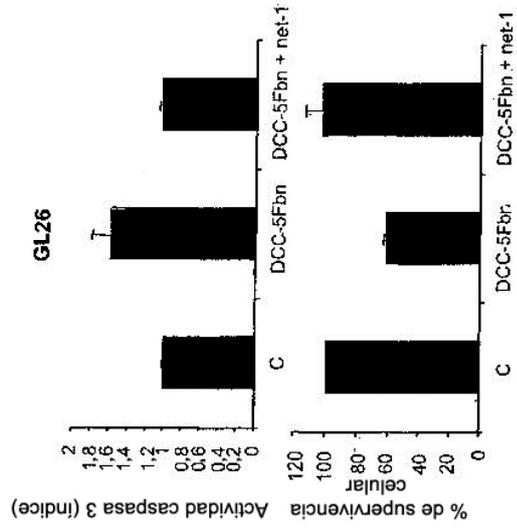


FIGURA 10B

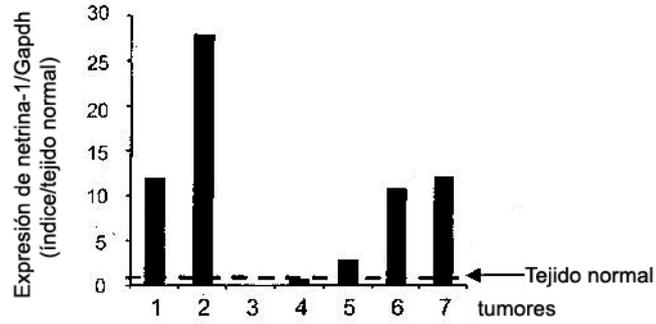


FIGURA 11A

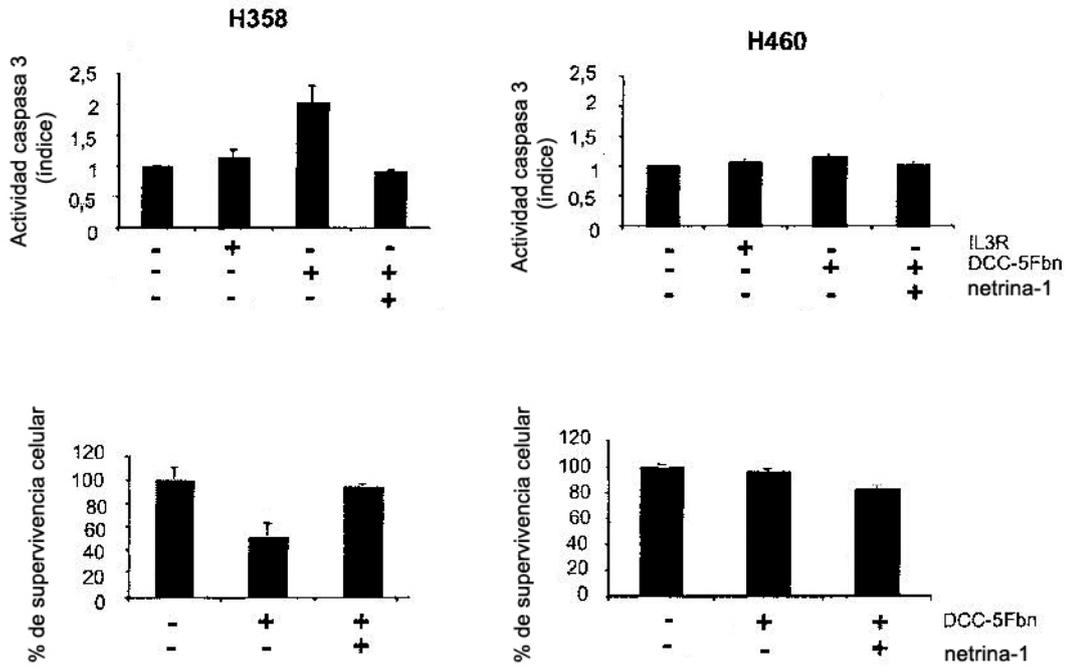


FIGURA 11B

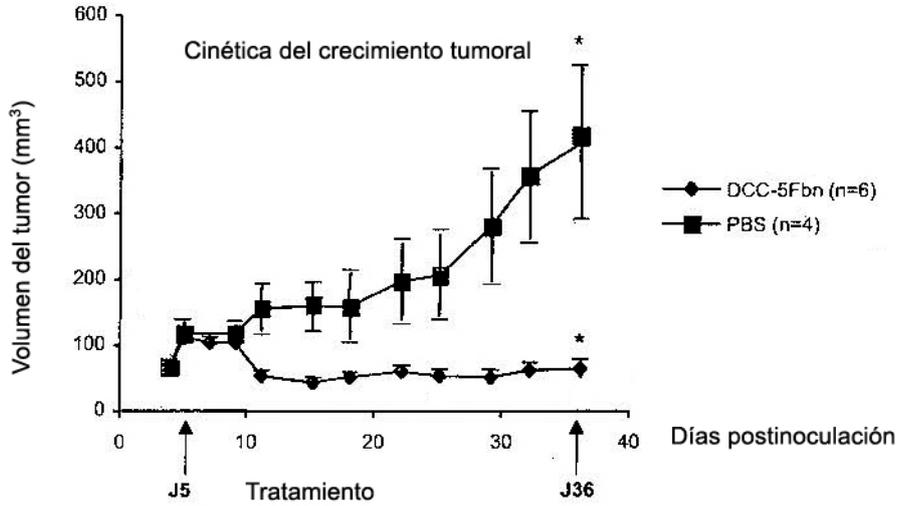


FIGURA 11C

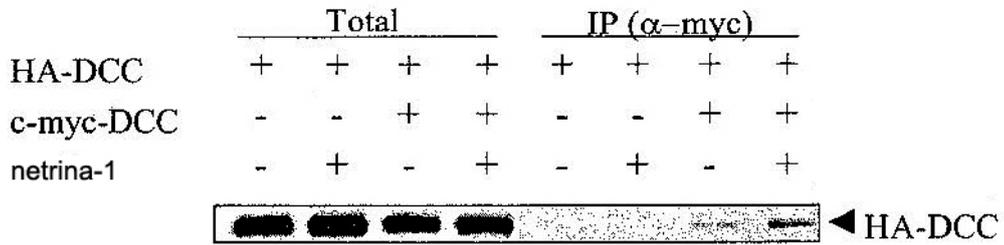


FIGURA 12A

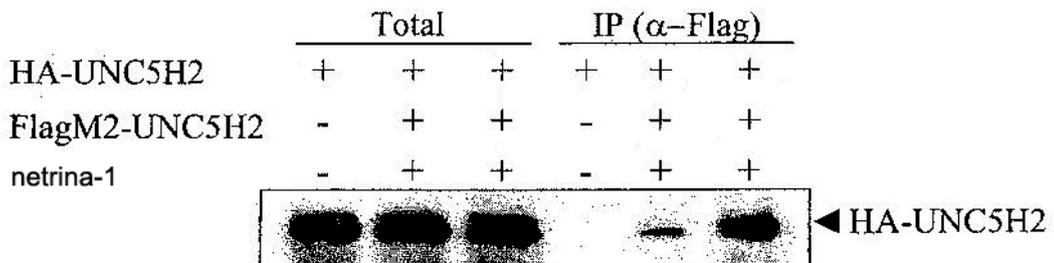


FIGURA 12B

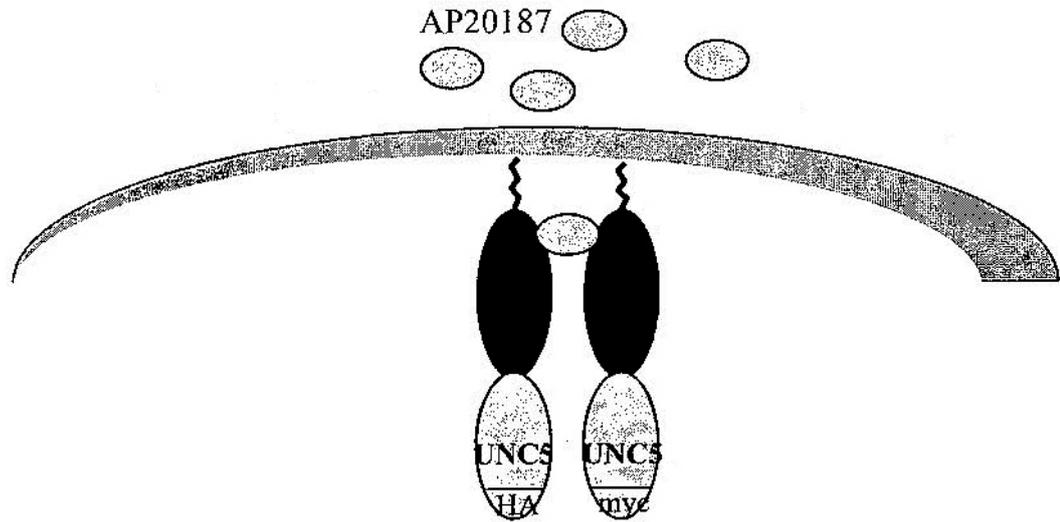


FIGURA 13A

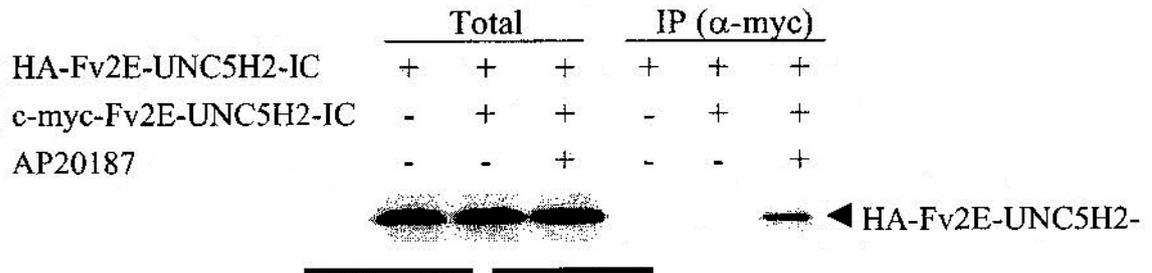


FIGURA 13B

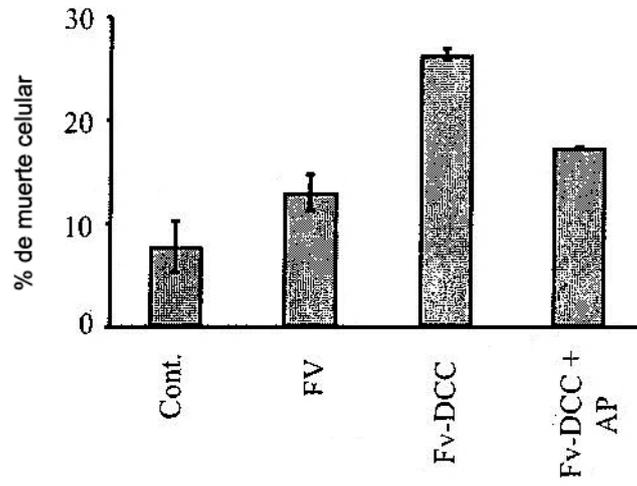


FIGURA 14A

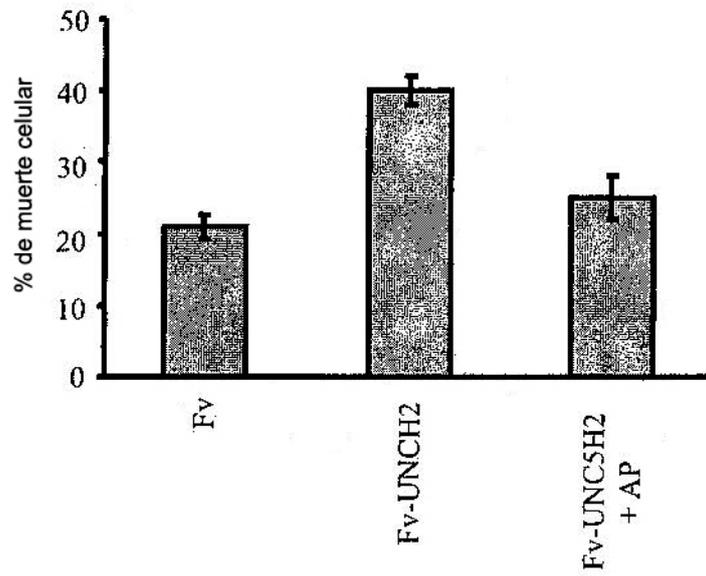


FIGURA 14B

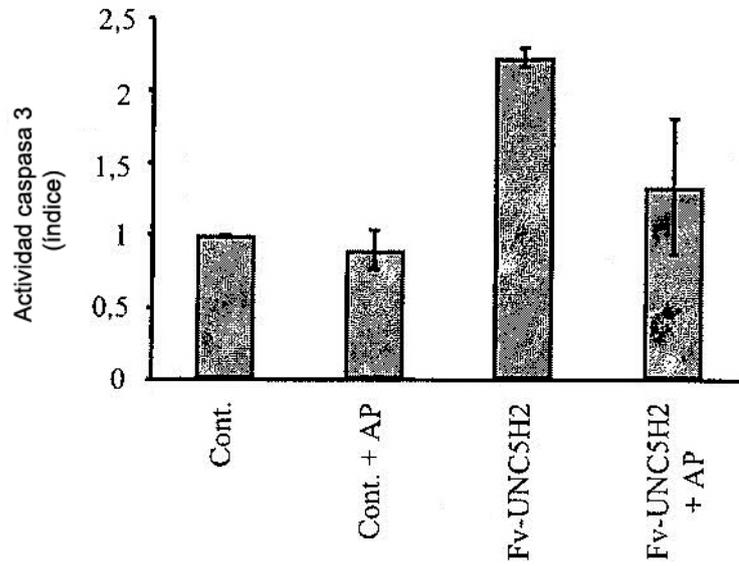


FIGURA 14C

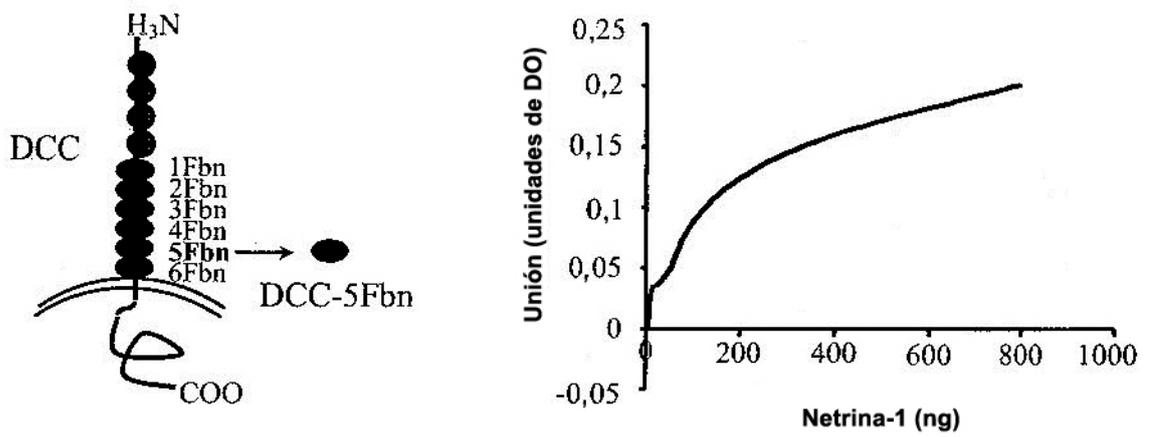


FIGURA 15A

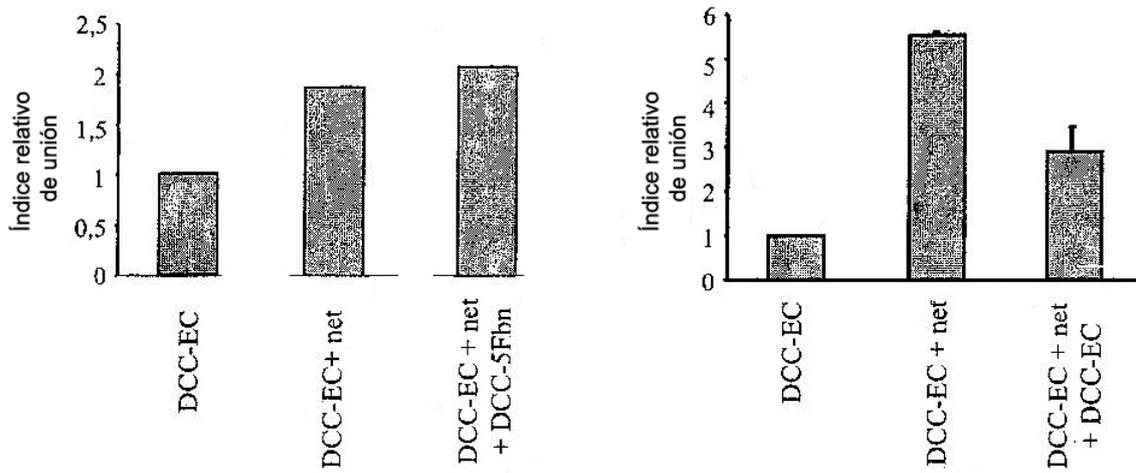


FIGURA 15B

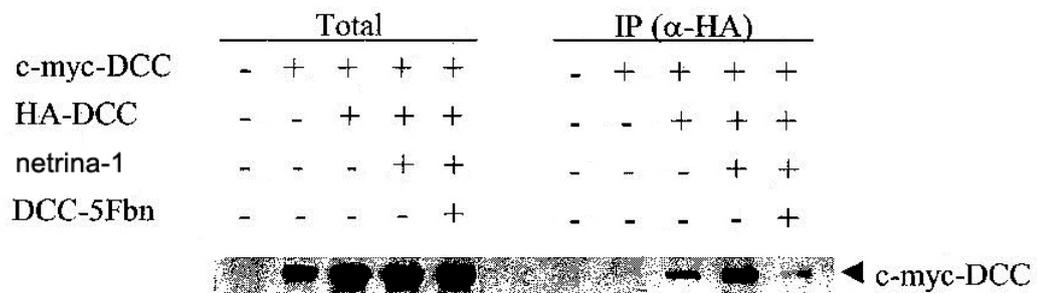


FIGURA 15C

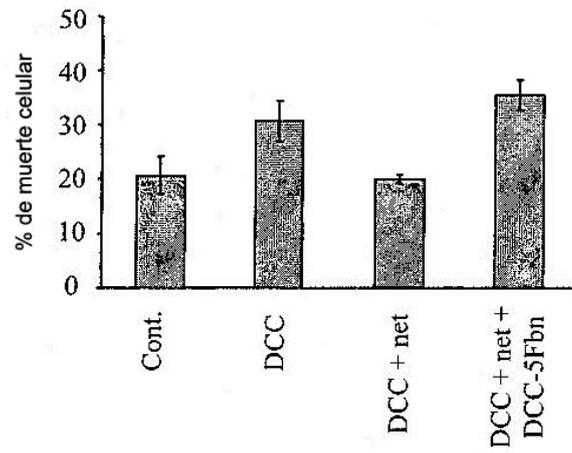


FIGURA 16A

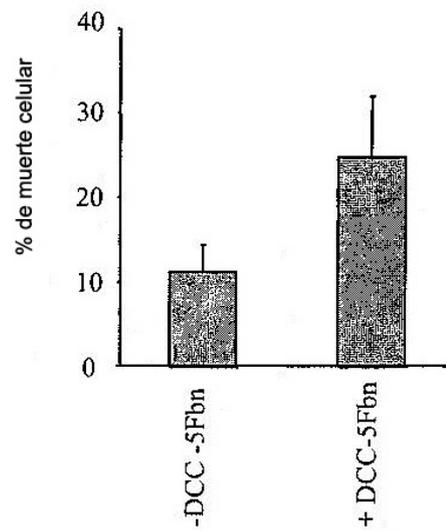


FIGURA 16B