

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 620**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 31/704** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2015 PCT/EP2015/050306**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15104360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2015 E 15700118 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3092003**

54 Título: **Anticuerpo anti-netrina 1 novedoso**

30 Prioridad:

**10.01.2014 EP 14305034**

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

**02.07.2020**

73 Titular/es:

**NETRIS PHARMA (100.0%)  
28 rue Laennec Centre Léon Bérard  
69008 Lyon, FR**

72 Inventor/es:

**DELCROS, JEAN-GUY y  
DEAN, YANN**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 770 620 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

Anticuerpo anti-netrina 1 novedoso

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un polipéptido de unión a o anticuerpo para netrina-1 que es útil en la inducción de muerte celular o apoptosis de células tumorales que contienen un receptor de netrina-1, tal como un receptor UNC5 en presencia de netrina-1, en particular el tumor que expresa netrina-1, y su uso para el tratamiento del cáncer.
- 10 **[0002]** La netrina-1 es un miembro de la familia de netrinas y es una referencia de navegación de axones, en un contexto de atracción y repulsión y juega un papel principal en el desarrollo del sistema nervioso. Los receptores principales para la netrina-1 son DCC (Eliminado en Cáncer Colorrectal) y UNC5 (UNC5A, UNC5B, UNC5C, UNC5D en un ser humano, UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3, UNC5H4 en un ratón), donde todos pertenecen a la familia de receptores de dependencia (Keino-Masu, 1996, *Cel* 87: 175-185; Ackerman, 1997, *Nature* 386: 838-842; Hong, 15 1999, *Cel* 97: 927-941; Mehlen, 1998, *Nature* 395: 801-804). Los receptores de dependencia comparten la capacidad de inducir la apoptosis en ausencia de sus ligandos respectivos, donde dicha capacidad es bloqueada tras la unión del ligando respectivo (Mehlen, 2004, *Cell Mol Life Sci* 61: 1854-1866; Bredesen, 2005, *Cell Death Differ* 12: 1031-1043).
- 20 **[0003]** En varios cánceres humanos, se observó la reducción o la pérdida de la expresión de DCC y, por lo tanto, la reducción o la pérdida de la apoptosis inducida por DCC (Kinzler, 1996, *Proc Natl Acad Sci* 100: 4173-4178). Además, se observó también que los genes de UNC5 tienen una regulación por disminución en la mayoría de los tumores colorrectales, indicando que la pérdida del receptor de dependencia UNC5 representa una ventaja selectiva para las células tumorales (Bernet, 2007, *Gastroenterology* 133: 180-1848; Shin, 2007, *Gastroenterology* 133: 1849- 25 1857). Sin embargo, no solo la regulación por disminución de los receptores de dependencia DCC y UNC5 mejora la supervivencia de varias células tumorales, se ha observado la expresión autocrina de su ligando netrina-1. En particular, se ha mostrado que la mayoría de los tumores de mama, por ejemplo, los cánceres de mama metastásicos, muestran una expresión aumentada de netrina-1 (Fitamant, 2008, *Proc Natl Acad Sci* 105: 4850-4855). Hasta el presente, se ha demostrado que los dos subdominios de inmunoglobulina (Ig) de la parte 30 extracelular de UNC5 son los responsables de la unión de la netrina-1, pero no está claro si ambos dominios son necesarios para una unión completa a netrina-1 (Geisbrecht, 2003, *J-Biol. Chem.* 278: 32561-32568; Kruger, 2004, *J. Neur.* 24: 10826-10834).
- [0004]** Tal como se ha demostrado previamente, la neutralización de la netrina-1 por el ectodominio de DCC o una parte del dicho ectodominio (que actúa como una proteína señuelo de netrina-1) puede inducir la apoptosis en las 35 células tumorales que expresan los receptores de dependencia DCC y/o UNC5 (EP-A1-1 989 546). Este ectodominio o una parte de este ectodominio es capaz de reducir metástasis de las células de cáncer de mama en el pulmón (Fitamant et al. 2008). Además, se ha demostrado que este ectodominio o una parte de este ectodominio puede aumentar el porcentaje de muerte celular de las células de cáncer de pulmón de células no pequeñas y de las 40 células de neuroblastoma que expresan altos niveles de netrina-1 (Delloye-Bourgeois, 2009, *J Natl Cancer Inst* 101: 237-247; Delloye-Bourgeois, 2009, *JEM* 206: 833-847). WOW2012025618 describe que las proteínas de fusión presentan un señuelo de DCC mejorado.
- [0005]** El documento EP 1 989 546 (WOW2007099133) describe anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos 45 específicamente contra netrina-1 o receptores de netrina-1, en particular dirigidos al dominio extracelular de los receptores de netrina-1 o al fragmento de netrina-1 capaces de interactuar con el dominio extracelular de dichos receptores de netrina-1, como medicamento. El documento FR2 878 165 describe una secuencia (SEQ ID NO 164) que corresponde a los residuos 341-396 (5aa) de la netrina-1.
- 50 **[0006]** El Solicitante ha determinado ahora que un epítipo sustancialmente lineal o lineal en la netrina-1 que posiblemente corresponda a una región de unión específica de netrina-1 a los receptores, en particular de la clase UNC5, especialmente UNC5B y UNC5A, o alternativamente corresponde a una región cercana a la región de unión específica de la netrina-1 al receptor, cuando está unido a un anticuerpo, evita la interacción de receptor/netrina-1. Esta determinación de un epítipo lineal permite al Solicitante producir los anticuerpos que se unen a netrina-1 e 55 interferir con la interacción netrina-1/receptores, induciendo así la apoptosis o muerte celular de células tumorales que expresan o sobreexpresan la netrina-1 y al menos un receptor de netrina-1, debido al hecho que esta interacción inhibe la unión de netrina-1 a un receptor y la multimerización del receptor. El Solicitante también produjo un anticuerpo monoclonal murino dirigido contra este epítipo y varias formas humanizadas del mismo.
- 60 **[0007]** La secuencia de aminoácidos de longitud completa de netrina-1 se muestra como SEQ ID NO: 1 y un ADNc que la codifica, por lo tanto, se muestra como SEQ ID NO: 2. Un epítipo lineal se ha caracterizado en el segundo dominio de tipo EGF de la netrina-1 y se representa en la SEQ ID NO: 3 y más particularmente en la SEQ ID NO: 35. Un ADNc que codifica este epítipo se muestra en la SEQ ID NO: 4, respectivamente 36.
- 65 **[0008]** Un primer objeto de la presente invención es por lo tanto un polipéptido, tal como se define en las reivindicaciones. El polipéptido representa un epítipo lineal de netrina-1 o un fragmento o variante de dicho epítipo

lineal. Más específicamente, la presente invención se refiere a o describe:

- un polipéptido aislado o purificado de la secuencia de SEQ ID NO: 3,
- una variante de polipéptido que tiene al menos 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3,
- una variante de polipéptido de como máximo 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50 aminoácidos y que comprende la
- 5 secuencia SEQ ID NO: 3 o una variante de la secuencia, tal como se describe anteriormente, tal como una variante de polipéptido que consiste en los 22 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3 desde la posición 9 (A) a la posición 30 (C), incluyendo estos aminoácidos, cuya variante se presenta como SEQ ID NO: 35,
- una variante de polipéptido que consiste en al menos 20, 25 o 30 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3, tal como una variante de polipéptido de la secuencia SEQ ID NO: 35, o una variante de la secuencia, tal como se
- 10 describe anteriormente,
- un polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 35, o variante de la secuencia, tal como se describe anteriormente,
- un polipéptido aislado o purificado codificado por el ADNc de la secuencia de SEQ ID NO: 4 o 36.

**[0009]** Otro objeto de la presente invención es un ADNc, tal como se reivindica. El ADNc codifica dicho polipéptido que representa un epítipo lineal de netrina-1 o un fragmento o variante de dicho epítipo lineal. Más específicamente, la presente invención se refiere a o describe:

- un ADNc de la secuencia SEQ ID NO: 4,
- una variante de ADNc que codifica el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma, en virtud de la degeneración del código genético,
- 20 - una variante de ADNc que codifica una variante de polipéptido, tal como se define anteriormente, especialmente un ADNc que codifica la variante de polipéptido de SEQ ID NO: 35, tal como ADNc de SEQ ID NO: 36,
- una variante de ADNc que tiene al menos 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 4 o 36.

**[0010]** De acuerdo con la presente invención, una variante de polipéptido es capaz de generar un anticuerpo que aún conserva la capacidad de unirse específicamente al epítipo lineal en netrina-1 e inhibir la interacción de netrina-1 a su receptor, en particular UNC5 o DCC, especialmente UNC5B y UNC5A, e inducir la apoptosis o muerte celular de la célula tumoral que expresa o sobreexpresa netrina-1 y un receptor de netrina-1. Una variante de ADNc codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 35 o una variante de polipéptido.

**[0011]** Otro objeto de la presente invención es el uso del polipéptido de la SEQ ID NO: 3 o 35 o una variante del mismo, para producir un anticuerpo monoclonal, y los anticuerpos monoclonales producidos de este modo son también un objeto de la presente invención. La persona experta en la técnica es consciente de los procedimientos que permiten la producción de anticuerpos monoclonales, usando la técnica plasmocitos e hibridoma. La presente invención abarca el uso de estos procedimientos para producir anticuerpos dirigidos específicamente contra el polipéptido de SEQ ID NO: 3 o 35 o una variante del mismo. También está dentro del alcance de la presente invención producir polipéptidos o anticuerpos monoclonales mediante ingeniería genética basada en secuencias de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido o anticuerpo específicos, debido a la determinación y divulgación de las CDR de VH y VL. También está dentro del alcance de la presente invención proporcionar fragmentos de anticuerpos y/o anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpo con una región variable específica al epítipo lineal de la presente invención, un fragmento o una variante del mismo. El término "polipéptido de unión" se usa en el presente documento para abarcar anticuerpos y variantes de anticuerpos, fragmentos y combinación que mantienen la función de unión del anticuerpo.

**[0012]** La presente invención por lo tanto también se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une a netrina-1 que se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o 35 o una variante del mismo, tal como se define en la reivindicación 8. El anticuerpo monoclonal de unión tiene la propiedad de unirse a netrina-1 e inducir la muerte celular o apoptosis de una célula tumoral a través de un receptor UNC5 o DCC. El hecho es que la netrina-1 libre o activa ya no existe más tiempo o está en un nivel insuficiente, de modo que se activa la señalización de apoptosis del receptor de netrina-1.

**[0013]** La presente invención también se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une a netrina-1 que se define por su región o regiones determinantes de complementariedad (CDR(s)), donde el anticuerpo monoclonal de unión tiene la propiedad de unirse a netrina-1 e inducir la muerte celular o apoptosis de una célula tumoral a través de un receptor UNC5 o DCC.

**[0014]** La presente invención se refiere un anticuerpo o un fragmento de unión a epítipo del mismo.

**[0015]** Usando la definición de IMGT, la presente invención da a conocer un polipéptido que se une a netrina-1 que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) que tienen una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 (CDR3-H), SEQ ID NO: 9 (CDR3-L), y preferiblemente ambas.

**[0016]** Más específicamente, el polipéptido puede definirse además por la presencia adicional de CDR1, CDR2 o de CDR1 y CDR2 de VH y/o VL. Por lo tanto, el polipéptido puede comprender una o más CDR que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 9 y la secuencia de YAS; y/o SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 8.

**[0017]** La presente invención da a conocer un polipéptido que comprende una CDR1-H de la secuencia de SEQ ID NO: 5, una CDR2-H de la secuencia de SEQ ID NO: 6, una CDR3-H de la secuencia de SEQ ID NO: 7.

**[0018]** La presente invención da a conocer un polipéptido que comprende una CDR1-L de la secuencia de SEQ ID NO: 8, una CDR2-L de la secuencia de YAS y una CDR3-L de la secuencia de SEQ ID NO: 9.

**[0019]** El anticuerpo monoclonal de la presente invención comprende una CDR1-H de la secuencia de SEQ ID NO: 5, una CDR2-H de la secuencia de SEQ ID NO: 6, una CDR3-H de la secuencia de SEQ ID NO: 7, una CDR1-L de la secuencia de SEQ ID NO: 8, una CDR2-L de la secuencia de YAS y una CDR3-L de la secuencia de SEQ ID NO: 9.

**[0020]** Usando la definición de Kabat, la presente invención da a conocer de este modo un polipéptido que se une a netrina-1 que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) que tienen una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 30 (CDR3-H), SEQ ID NO: 9 (CDR3-L), y preferiblemente ambas.

**[0021]** Más específicamente, el polipéptido puede definirse además por la presencia adicional de CDR1, CDR2 o de la CDR1 y CDR2 de VH y/o VL. Por lo tanto, el polipéptido puede comprender una o más CDR que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 32; y/o SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 31.

**[0022]** La presente invención da a conocer un polipéptido que comprende una CDR1-H de la secuencia de SEQ ID NO: 28, una CDR2-H de la secuencia de SEQ ID NO: 29, una CDR3-H de la secuencia de SEQ ID NO: 30.

**[0023]** La presente invención da a conocer un polipéptido que comprende una CDR1-L de la secuencia de SEQ ID NO: 31, una CDR2-L de la secuencia de SEQ ID NO: 32 y una CDR3-L de la secuencia de SEQ ID NO: 9.

**[0024]** El anticuerpo monoclonal de la presente invención comprende una CDR1-H de la secuencia de SEQ ID NO: 28, una CDR2-H de la secuencia de SEQ ID NO: 29, una CDR3-H de la secuencia de SEQ ID NO: 30, una CDR1-L de la secuencia de SEQ ID NO: 31, una CDR2-L de la secuencia de SEQ ID NO: 32 y una CDR3-L de la secuencia de SEQ ID NO: 9.

**[0025]** Estos polipéptidos son polipéptidos de unión a netrina-1, en los que el polipéptido de unión tiene la propiedad de unirse a netrina-1 e inducir la muerte celular o apoptosis de una célula tumoral a través de un receptor UNC5 o DCC. Estos polipéptidos son preferiblemente anticuerpos, especialmente anticuerpos monoclonales. Varias formas de polipéptidos de unión o anticuerpos (incluyendo fragmentos y combinación de los mismos) se describirán más adelante en este documento.

**[0026]** En una primera serie de realizaciones, el polipéptido o anticuerpo de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10, 11, 12 o 13. Habitualmente, comprende ambas secuencias SEQ ID NO: 10 y 11, o SEQ ID NO: 12 y 13.

**[0027]** En una segunda serie de realizaciones, el polipéptido o anticuerpo está humanizado y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14 a 19 y/o del grupo de SEQ ID NO: 20 a 27. Típicamente, el polipéptido o anticuerpo está humanizado y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14 a 19 y una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 20 a 27.

**[0028]** Las realizaciones específicas son los siguientes anticuerpos humanizados. El primero de esta tabla corresponde al injerto de las CDR murinas en una IgG1 humana. Los otros llamados HUM son anticuerpos monoclonales que tienen regiones estructurales humanas. La tabla también hace referencia para CH y CL de una IgG1 humana. Los otros alotipos también se pueden utilizar.

	VH SEQ ID NO.	Cadena pesada constante	VL SEQ ID NO.	Cadena ligera constante
Injerto de CDR (CDR murinas injertadas en IgG1 humana)	27	IgG1 humana (GenBank: AEL33691.1 modificada con R97K)	19	IgG1 humana (GenBank: CAC20459.1)
HUM01	20	IgG1 humana	14	IgG1 humana
HUM02	21	IgG1 humana	15	IgG1 humana
HUM03	22	IgG1 humana	16	IgG1 humana
HUM04	23	IgG1 humana	17	IgG1 humana
HUM05	24	IgG1 humana	17	IgG1 humana
HUM06	25	IgG1 humana	16	IgG1 humana
HUM07	26	IgG1 humana	17	IgG1 humana

HUM08	22	IgG1 humana	17	IgG1 humana
HUM09	25	IgG1 humana	18	IgG1 humana
HUM010	21	IgG1 humana	16	IgG1 humana

[0029] Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende al menos un polipéptido de unión a o anticuerpo para netrina-1 de acuerdo con la presente invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, el polipéptido o anticuerpo está humanizado.

5

[0030] La presente invención describe un procedimiento de tratamiento de cáncer en el que a un sujeto en necesidad del mismo se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende al menos un polipéptido de unión a o anticuerpo para netrina-1 de acuerdo con la presente invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, el polipéptido o anticuerpo está humanizado.

10

[0031] De este modo, la composición y el procedimiento pueden comprender cualquiera de las características o combinación de características, tal como se describe con respecto al polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento.

15

[0032] Según una característica, el cáncer es uno en el que las células tumorales expresan o sobreexpresan un receptor de netrina-1, en particular de la clase UNC5, especialmente UNC5B y/o UNC5A, y/o DCC. Típicamente, las células tumorales escapan la apoptosis relacionada con el receptor de netrina-1, debido a la unión de netrina-1 a dicho receptor, en particular de la clase UNC5, especialmente UNC5B y/o UNC5A, y/o DCC, en presencia de netrina-1. Según una característica, el cáncer es uno en el que las células tumorales o células estromales expresan o sobreexpresan netrina-1.

20

[0033] Algunas realizaciones de cánceres incluyen cáncer de mama metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, neuroblastoma agresivo, adenocarcinoma de páncreas, melanoma primario, metástasis de melanoma, cáncer de ovario, glioblastoma, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B agresivo, sarcoma, adenocarcinoma renal, cánceres de cabeza y cuello, cánceres testiculares (por ejemplo, carcinoma embrionario, teratoma, tumores de saco vitelino), cánceres renales, cánceres de estómago, cánceres de útero.

25

[0034] Los procedimientos para determinar si una célula dada expresa receptores de dependencia de netrina-1 DCC y/o UNC5 en la superficie o muestra una regulación por incremento significativa de la expresión del gen de netrina-1 son bien conocidos en la técnica y comprenden, pero no se limitan a, IHC (inmunohistoquímica) de FACS (clasificación celular activada por fluorescencia), PCR cuantitativa (por ejemplo, con ADNc cebado con hexámero) o, alternativamente, transferencia Western emparejada con técnicas de detección de proteínas basadas en colorantes cromogénicos (tales como la tinción con plata o con azul Coomassie) o procedimientos de detección basados en fluorescencia y luminiscencia para proteínas en soluciones y en geles, transferencias y microarrays, tales como la inmunotinción, así como la inmunoprecipitación, ELISA, microarrays, y espectrometría de masas. En el contexto de la presente invención, ejemplos de cánceres a tratar se enumeran en el presente documento incluyendo las versiones refractarias de cualquiera de los cánceres mencionados. La sobreexpresión de netrina-1 se puede medir por tanto a través de RT-PCR usando cebadores adecuados como los descritos y proporcionados en este documento, con respecto al tejido normal o a un cáncer similar que no sobreexpresa netrina-1.

35

40

[0035] En una realización de la presente invención, las composiciones y usos son para el tratamiento de cánceres que expresan o sobreexpresan netrina-1, en los que esta expresión o sobreexpresión están relacionadas con el cáncer en sí, o son inducidas por un tratamiento con fármaco quimioterapéutico solo, o ambos.

45

[0036] La presente invención da a conocer un procedimiento de tratamiento contra el cáncer combinado que comprende la administración a un paciente en necesidad del mismo de un fármaco quimioterapéutico y un polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento. El fármaco quimioterapéutico y el polipéptido o anticuerpo están en una cantidad eficaz.

50

[0037] Otro objeto de la presente invención es una composición que comprende un polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento para su uso como un medicamento contra el cáncer que se utiliza en combinación con un fármaco quimioterapéutico en un paciente. La presente invención también se refiere a una composición que comprende un polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento, para su uso como un medicamento contra el cáncer en un paciente que es tratado con un fármaco quimioterapéutico.

55

[0038] Otro objeto de la presente invención es una composición que comprende un fármaco quimioterapéutico para su uso como un medicamento contra el cáncer para su uso en un paciente en combinación con un polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento. La presente invención también se refiere a una composición que comprende un fármaco quimioterapéutico para su uso como un medicamento contra el cáncer en un paciente que es tratado con un polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento.

60

[0039] Otro objeto de la presente invención es una composición o kit de partes que comprende un fármaco

quimioterapéutico y un polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento, para una administración simultánea, separada o secuencial a un paciente.

5 **[0040]** Otro objeto de la presente invención es una composición o kit de partes que comprende un fármaco quimioterapéutico y un polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento, para una administración simultánea, separada o secuencial a un paciente, para su uso como medicamento contra el cáncer o tratamiento contra el cáncer.

10 **[0041]** Otro objeto de la presente invención es una composición que comprende un fármaco quimioterapéutico y un polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento, en un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 **[0042]** Otro objeto de la presente invención es una composición que comprende un fármaco quimioterapéutico y un polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento, en un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso como un medicamento contra el cáncer.

20 **[0043]** Aún otro objeto es el uso de un polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento, para la preparación de un medicamento contra el cáncer destinado a un tratamiento combinado de un paciente con un fármaco quimioterapéutico.

**[0044]** Aún otro objeto es el uso de un fármaco quimioterapéutico para la preparación de un medicamento contra el cáncer destinado a un tratamiento combinado de un paciente con un polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento.

25 **[0045]** Aún otro objeto es el uso de un polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento, y un fármaco quimioterapéutico para la preparación de un medicamento contra el cáncer combinado.

30 **[0046]** Aún otro objeto es el uso de un polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento y un fármaco quimioterapéutico para la preparación de una composición o kit de partes de medicamento contra el cáncer combinado, para una administración simultánea, separada o secuencial a un paciente.

35 **[0047]** De acuerdo con una característica de la presente invención y, tal como se explica más adelante, el fármaco quimioterapéutico es un medicamento que induce una sobreexpresión de netrina-1 en las células cancerosas y el polipéptido o anticuerpo, tal como se describe en el presente documento, promueve la apoptosis o muerte celular inducida por netrina-1 a pesar de esta sobreexpresión.

40 **[0048]** El fármaco quimioterapéutico es, en particular, un fármaco que induce una sobreexpresión de netrina-1 en células de cáncer. La determinación de que un fármaco induce una sobreexpresión de netrina-1 puede llevarse a cabo fácilmente en cualquier célula cancerosa, tal como la línea celular o células de una biopsia. En una realización, el ensayo se realiza en células del cáncer a ser tratado, por ejemplo, de una biopsia. En otra realización, el ensayo se realiza en una célula, tal como una línea celular, que es representativa para el cáncer a tratar. En otra realización, el ensayo se realiza en una línea celular A549 o H460. El ensayo puede comprender la comparación de la expresión del gen de netrina-1 entre las células tratadas con el fármaco quimioterapéutico y las células no tratadas. La expresión se puede medir mediante PCR, especialmente RT-PCR cuantitativa, por ejemplo usando los cebadores  
45 descritos y proporcionados en este documento (SEQ ID NO: 33 y 34), tal como se describe en WO2014041088, todo el contenido del cual el experto en la materia puede referirse. La clasificación de un fármaco en la familia de los que inducen esta sobreexpresión puede simplemente realizarse de acuerdo con el procedimiento descrito en el siguiente Material y procedimiento en una línea celular A549 o H460, tal como se describe WO2014041088.

50 **[0049]** El fármaco quimioterapéutico es especialmente un fármaco citotóxico. En algunas realizaciones preferidas, el fármaco es doxorubicina, 5-fluorouracilo (5FU), paclitaxel (por ejemplo, Taxol), o cisplatino.

55 **[0050]** En una realización, el fármaco es un citotóxico antibiótico. El citotóxico antibiótico puede ser actinomicina, una antraciclina, bleomicina, plicamicina o mitomicina. La antraciclina puede ser doxorubicina, daunorubicina, valrubicina, idarrubicina o epirubicina.

60 **[0051]** En una realización, el fármaco es un agente alquilante. El agente alquilante puede ser un derivado de platino, tal como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino u otros agentes alquilantes, tales como ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, tiotepa. Otras clases incluyen epipodofilotoxinas, por ejemplo etopósido, inhibidores de topoisomerasa (camptotecinas), por ejemplo, irinotecan, topotecan, agentes alquilantes del surco menor del ADN, por ejemplo, trabectedina (YONDELIS), metotrexato, pemetrexed, raltitrexed.

65 **[0052]** En una realización, el fármaco es un taxano u otros agentes que reconocen la tubulina. El taxano puede ser paclitaxel o docetaxel, o eribulina (recientemente aprobado para el cáncer de mama).

**[0053]** En una realización, el fármaco es un agente antineoplásico tal como:

- agentes de hormonoterapia de mama: por ejemplo, tamoxifeno, letrozol, anastrozol, exemestano, faslodex;
- agentes de hormonoterapia de próstata: por ejemplo, agonistas de LHRH, bicalutamida, abiraterona;
- anticuerpos monoclonales: por ejemplo, cetuximab, panitumumab, bevacizumab;
- inhibidores de quinasa: por ejemplo imatinib, nilotinib, dasatinib, erlotinib, gefitinib, afatinib, sunitinib, sorafenib, pazopanib, crizotinib, axitinib.

**[0054]** Definiciones y realizaciones adicionales, variantes y alternativas de la presente invención:

Tal como se usa en el presente documento, una secuencia "al menos 85% idéntica con una secuencia de referencia" es una secuencia que tiene, en toda su longitud, 85%, o más, en particular 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% o 100% de identidad de secuencia con toda la longitud de la secuencia de referencia.

**[0055]** Un porcentaje de "identidad de secuencia" se puede determinar mediante la comparación de las dos secuencias, alineadas de manera óptima sobre una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia de polipéptido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. La alineación óptima de secuencias para la comparación se lleva a cabo mediante alineación global por pares, por ejemplo, utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443. El porcentaje de identidad de secuencia se puede determinar fácilmente, por ejemplo, usando el programa Needle, con la matriz BLOSUM62, y los siguientes parámetros gap-open = 10, gap-extend = 0,5.

**[0056]** En el contexto de la presente invención, una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales alifáticas-hidroxilo: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservativa de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina-triptófano, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina.

**[0057]** A lo largo de la presente solicitud, el término "que comprende" debe interpretarse que abarca todas las características mencionadas específicamente, así como las opcionales, adicionales, no especificadas. Tal como se usa en este documento, el uso del término "que comprende" también describe la realización en la que no hay características aparte de las características presentes específicamente mencionadas (es decir, "que consiste en").

**[0058]** Un "anticuerpo" puede ser un anticuerpo natural o convencional en el que dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ). Hay cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios de secuencias distintas. La cadena ligera incluye dos dominios o regiones, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, referidos colectivamente como CH). Las regiones variables de ambas cadenas pesada (VH) y ligera (VL) determinan el reconocimiento y la especificidad de unión al antígeno. Los dominios de la región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren importantes propiedades biológicas, tales como la asociación de cadena de anticuerpo, la secreción, la movilidad trans-placentaria, la unión del complemento, y la unión a receptores de Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación de los anticuerpos se componen de residuos que son principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los residuos de regiones no hipervariables o, marco o estructurales (FR) influyen en la estructura de dominio general y por lo tanto en el sitio de combinación.

**[0059]** "Regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" se refieren a secuencias de aminoácidos que definen conjuntamente la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. Las cadenas ligeras y pesadas de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, designadas CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L y CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, respectivamente. Un sitio de unión antígeno de un anticuerpo convencional, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de una región V de cadena pesada y cadena ligera.

**[0060]** "Regiones marco" o "regiones estructurales" (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDRs, es decir, a aquellas porciones de regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina que están relativamente conservadas entre diferentes inmunoglobulinas en una sola especie. Las cadenas ligeras y pesadas de una inmunoglobulina tienen cada una cuatro FR, designadas FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L, y FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H, respectivamente.

**[0061]** Tal como se usa en el presente documento, una "región estructural humana" es una región estructural que es sustancialmente idéntica (aproximadamente 85%, o más, en particular 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) a la región estructural de un anticuerpo humano de origen natural.

**[0062]** En el contexto de la presente invención, la definición de CDR/FR en una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina se determina en base a la definición de IMGT (Lefranc et al (2003) Dev Comp Immunol 27 (1): 55-77; www.imgt.org).

**[0063]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos convencionales y fragmentos de los mismos, así como a anticuerpos de dominio único y fragmentos de los mismos, en particular cadena pesada variable de los anticuerpos de dominio único, y anticuerpos quiméricos, humanizados, biespecíficos o multiespecíficos.

**[0064]** Tal como se usa en este documento, anticuerpo o inmunoglobulina también incluye "anticuerpos de dominio único" que se han descrito más recientemente y que son anticuerpos cuyas regiones determinantes de complementariedad son parte de un polipéptido de dominio único. Ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos desprovistos de forma natural de cadenas ligeras, anticuerpos de dominio único derivados de anticuerpos de cuatro cadenas convencionales, anticuerpos de dominio único diseñados. Los anticuerpos de dominio único se pueden derivar de cualquier especie, incluyendo, pero no limitado a ratón, ser humano, camello, llama, cabra, conejo y bovino. Los anticuerpos de dominio único pueden ser anticuerpos de dominio único de origen natural conocidos como anticuerpo de cadena pesada carente de las cadenas ligeras. En particular, las especies de Camelidae, por ejemplo camello, dromedario, llama, alpaca y guanaco, producen anticuerpos de cadena pesada desprovistos de forma natural de cadena ligera. Los anticuerpos de cadena pesada de camélidos también carecen del dominio CH1.

**[0065]** La cadena pesada variable de estos anticuerpos de dominio único desprovistos de cadenas ligeras son conocidas en la técnica como "VHH" o "nanocuerpos". Similar a dominios VH convencionales, los VHH contienen cuatro FRs y tres CDRs. Los nanoanticuerpos tienen ventajas sobre los anticuerpos convencionales: son aproximadamente diez veces más pequeños que las moléculas de IgG, y, como consecuencia, se pueden producir nanoanticuerpos funcionales correctamente plegados mediante expresión in vitro, a la vez que se consigue un alto rendimiento. Además, los nanoanticuerpos son muy estables y resistentes a la acción de proteasas. Las propiedades y producción de nanoanticuerpos han sido revisados por Harmsen y De Haard (Harmsen y De Haard (2007) Appl Microbiol Biotechnol 77: 13-22).

**[0066]** El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de anticuerpo de una única composición de aminoácidos que se dirige contra un antígeno específico, y no debe ser interpretado como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Un anticuerpo monoclonal puede ser producido por un único clon de células B o hibridomas, pero también puede ser recombinante, es decir, producido por ingeniería de proteínas.

**[0067]** "Fragmentos" de anticuerpos (convencionales) comprenden una porción de un anticuerpo intacto, en particular, la región de unión a antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, (dsFv)<sub>2</sub>, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub>, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Un fragmento de un anticuerpo convencional también puede ser un anticuerpo de dominio único, tal como un anticuerpo de cadena pesada o VHH.

**[0068]** El término "Fab" indica un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 Da y la actividad de unión al antígeno, en el que aproximadamente una mitad de la parte N-terminal de la cadena H y toda la cadena L, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, papaína, están unida a través de un enlace disulfuro.

**[0069]** El término "F(ab)<sub>2</sub>" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 Da y la actividad de unión a antígeno, que es ligeramente mayor que el Fab unido mediante un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenido tratando IgG con una proteasa, pepsina.

**[0070]** Un polipéptido Fv de cadena sencilla ("scFv") es un heterodímero VH::VL unido covalentemente que se expresa habitualmente a partir de una fusión de genes que incluyen genes que codifican VH y VL unidos por un enlazador que codifica el péptido. El fragmento scFv humano de la presente invención incluye CDRs que se



mantiene en conformación apropiada, en particular mediante el uso de técnicas de recombinación génica. Los fragmentos de anticuerpos divalentes y multivalentes se pueden formar espontáneamente mediante asociación de scFv monovalentes, o pueden generarse mediante el acoplamiento de scFv monovalentes por un enlazador peptídico, tal como sc(Fv)<sub>2</sub> divalente.

5

**[0071]** "dsFv" es un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro.

**[0072]** "(dsFv)<sub>2</sub>" indica dos dsFv acoplados por un enlazador peptídico.

10 **[0073]** El término "anticuerpo biespecífico" o "BsAb" indica un anticuerpo que combina los sitios de unión a antígeno de dos anticuerpos dentro de una sola molécula. Por lo tanto, BsAbs son capaces de unirse a dos antígenos diferentes simultáneamente. Se ha utilizado ingeniería genética con mayor frecuencia para diseñar, modificar y producir anticuerpos o derivados de anticuerpo con un conjunto deseado de propiedades de unión y funciones efectoras, tal como se describe, por ejemplo, en el documento EP 2 050 764 A1.

15

**[0074]** El término "anticuerpo multiespecífico" indica un anticuerpo que combina los sitios de unión a antígeno de dos o más anticuerpos dentro de una sola molécula.

20 **[0075]** El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

25 **[0076]** En una realización particular, el fragmento de unión a epítipo se selecciona del grupo que consiste en Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, (dsFv)<sub>2</sub>, scFv, sc(fv)<sub>2</sub>, diacuerpos y VHH.

30 **[0077]** Un "anticuerpo quimérico", tal como se usa en el presente documento, es un anticuerpo en el que se altera la región constante, o una porción de la misma, sustituida, o intercambiada, de manera que la región variable está unida a una región constante de una especie diferente, o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo. "Anticuerpo quimérico" se refiere también a un anticuerpo en el que se altera la región variable, o una porción de la misma, sustituida o intercambiada, de manera que la región constante está unida a una región variable de una especie diferente, o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpo.

35 **[0078]** El término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que es inicialmente en su totalidad o parcialmente de origen no humano y que ha sido modificado para reemplazar ciertos aminoácidos, en particular en las regiones estructurales de las cadenas pesadas y ligeras, con el fin de evitar o minimizar una respuesta inmunitaria en los seres humanos. Los dominios constantes de un anticuerpo humanizado son la mayoría de veces dominios CH y CL humanos. En una realización, un anticuerpo humanizado tiene dominios constantes de origen humano. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que contiene una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana, por ejemplo, las CDR.

45 **[0079]** El término "polipéptido" o "polipéptido que se une a netrina-1" se utiliza para abarcar todos estos tipos de anticuerpos, fragmentos o combinación de los mismos.

50 **[0080]** El objetivo de la humanización es una reducción en la inmunogenicidad de un anticuerpo xenogénico, tal como un anticuerpo murino, para su introducción en un ser humano, mientras que se mantiene la completa afinidad y especificidad de unión antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos humanizados, o anticuerpos adaptados para el no rechazo por otros mamíferos, se pueden producir usando varias tecnologías, tales como "resurfacing" y el injerto de CDR. Tal como se utiliza en el presente documento, la tecnología de "resurfacing" utiliza una combinación de modelado molecular, análisis estadístico y mutagénesis para alterar las superficies no-CDR de regiones variables de anticuerpos para asemejarse a las superficies de anticuerpos conocidos del huésped diana.

55 **[0081]** Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de otras técnicas que incluyen el injerto de CDR (EP0239400; WO91/09967; Patentes de Estados Unidos N° 5.530.101 y 5.585.089), el recubrimiento o "resurfacing" (EP0592106; EP0519596; Padlan (1991) Molecular Immunology 28 (4/5): 489-498; Studnicka et al (1994) Protein Engineering 7 (6): 805-814; Roguska et al (1994) Proc Natl Acad Sci USA. 91: 969-973), y el barajado de cadenas (patente de Estados Unidos No. 5.565.332). Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo procedimientos de expresión en fagos. Véanse también las patentes de Estados Unidos Nos. 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806, y 5.814.318; y las solicitudes de patente internacional WO98/46645, WO98/50433, WO98/24893, WO98/16654, WO96/34096, WO96/33735, y WO91/10741.

65 **[0082]** En el contexto de la presente invención, el término "tratar" o "tratamiento", tal como se usa en este documento, significa invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

- [0083]** Por el término "tratamiento de cáncer", tal como se usa en el presente documento, se entiende la inhibición del crecimiento de células malignas de un tumor y/o la progresión de la metástasis de dicho tumor. Dicho tratamiento también puede conducir a la regresión del crecimiento del tumor, es decir, la disminución en el tamaño de un tumor medible. En una realización particular, dicho tratamiento conduce a una regresión parcial del tumor o metástasis. En otra realización particular, dicho tratamiento conduce a la regresión completa del tumor o la metástasis.
- [0084]** Según la presente invención, el término "paciente" o "paciente en necesidad del mismo" está referido a un mamífero humano o no humano afectado o susceptible de ser afectado por un tumor maligno humano.
- [0085]** En una realización particular, el paciente a tratar puede haber sido tratados previamente con otros tratamientos contra el cáncer. En particular, el paciente a tratar puede haber sido tratado previamente con un régimen basado en oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, y/o paclitaxel-docetaxel.
- [0086]** Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" del polipéptido o anticuerpo de la presente invención se entiende una cantidad suficiente del mismo para tratar dicha enfermedad de cáncer en una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total del polipéptido o anticuerpo de la presente invención será decidido por el médico asistente dentro del alcance del juicio médico. El nivel específico de dosis terapéuticamente eficaz para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del polipéptido o anticuerpo específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración, y velocidad de excreción del polipéptido o anticuerpo específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido o anticuerpo específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. En una realización particular, dicha cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o anticuerpo se administra al paciente es una dosis que varía de 5 mg/m<sup>2</sup> a 500 mg/m<sup>2</sup>, más particularmente que va de 150 mg/m<sup>2</sup> a 450 mg/m<sup>2</sup> de área de superficie corporal.
- [0087]** En una realización adicional, el polipéptido o anticuerpo de la presente invención se administra repetidamente según un protocolo que depende del paciente a ser tratado (edad, peso, historial de tratamiento, etc.), que puede ser determinado por un médico experto.
- [0088]** "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción desfavorable cuando se administra a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo sólida, semisólida o líquida no tóxica.
- [0089]** La forma de las composiciones farmacéuticas que incluyen el polipéptido o anticuerpo de la presente invención y la vía de administración, naturalmente, dependerán de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, peso y sexo del paciente, etc.
- [0090]** El polipéptido o anticuerpo de la presente invención se pueden formular para una administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y similares. En una realización particular, el polipéptido o anticuerpo de la presente invención se administra por vía intravenosa
- [0091]** En particular, las composiciones farmacéuticas que incluyen el polipéptido o anticuerpo de la presente invención puede contener vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estos pueden ser, en particular, soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de estas sales), o composiciones en seco, especialmente liofilizadas, que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o de suero fisiológico, permiten la constitución de soluciones inyectables.
- [0092]** Para preparar composiciones farmacéuticas, una cantidad eficaz del polipéptido o anticuerpo de la presente invención se puede disolver o dispersar en un portador farmacéuticamente aceptable o medio acuoso.
- [0093]** Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.
- [0094]** El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos,

agentes estabilizantes, crioprotectores o antioxidantes. La prevención de la acción de microorganismos puede ser provocada por agentes antibacterianos y antifúngicos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio.

5 **[0095]** Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y de liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

15 **[0096]** Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sean terapéuticamente eficaces. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

20 **[0097]** Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido hacerse primero isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclastia o inyectarse en el sitio de infusión propuesto, (véase por ejemplo, "Pharmaceutical Sciences de Remington" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

30

Tabla 1: Descripción de las secuencias:

SEQ ID No:	Descripción	Secuencia
1	Secuencia de aminoácidos (aa) de netrína-1 con péptido señal en negrita y mapeo de epítomos lineal en negrita y subrayado	<b>MMRAVWEALAALAAVAACLVGAVRGGPGLSMFAGQAAQ</b> PDPCSDENGHPRRICIPDFVNAAFGKDVRVSSTCGRPPA RYCVVSEERGEERLRSCHLCNASDPKKAHPPAFLTDLNNP HNLTCWQSENYLQFPHNVTLTLSLGKKFEVTYVSLQFCS PRPESMAIYKSMDYGRTWVFPFQFYSTQCRKMYNRPHRA PITKQNEQEAVCTDSHTDMRPLSGGLIAFSTLDGRPSAH DFDNSPVLQDWVTATDIRVAFSRLHTFGDENEDDSELAR DSYFYAVSDLQVGGRCCKCNGHAARCVRDRDDSLVCDGR HNTAGPECDRCKPFHYDRPWQRATAREANEC <u><b>VACNCN</b></u> <u><b>LHARRCRFMELYKLSGRKSGGVCLNCRHNTAGRHC</b></u> YCKEGYYRDMGKPITHRKACKACDCHPVGAAGKTCNQT TGQCPCCKDGVGTGTCNRCAKGYQQSRSPIAPCIKIPVAPP TTAASSVEEPEDCDSYCKASKGKLNKMKKYCKKDYAVQI HILKADKAGDWWKFTVNIISVYKQGTSRIRRGDQSLWIRS RDIACKCPKIKPLKYLKLLGNAEDSPDQSGIVADKSSLVIQ WRDTWARRLRKFQQREKKGKCKKA

ES 2 770 620 T3

2	Secuencia de ácidos nucleicos de netrina-1	<p>                     ATGATGCGCGCAGTGTGGGAGGCGCTGGCGGCGCTG                      GCGGCGGTGGCGTGCCTGGTGGGCGCGGTGCGCGG                      CGGGCCCGGGCTCAGCATGTTGCGGGCCAGGCGGC                      GCAGCCCGATCCCTGCTCGGACGAGAACGGCCACCC                      GCGCCGCTGCATCCCGACTTTGTCAATGCGGCCTTC                      GGCAAGGACGTGCGCGTGTCCAGCACCTGCGGCCGG                      CCCCCGGCGCGCTACTGCGTGGTGAGCGAGCGCGGC                      GAGGAGCGGCTGCGCTCGTGCCACCTCTGCAACGCGT                      CCGACCCCAAGAAGGCGCACCCGCCCGCCTTCCTCAC                      CGACCTCAACAACCCGCACAACCTGACGTGCTGGCAG                      TCCGAGAACTACCTGCAGTTCCTCCGCACAACGTCACGCT                      CACACTGTCCCTCGGCAAGAAGTTCGAAGTGACCTAC                      GTGAGCCTGCAGTTCTGCTCGCCGCGGCCCGAGTCCA                      TGGCCATCTACAAGTCCATGGACTACGGGCGCACGTG                      GGTGCCCTTCCAGTTCTACTCCACGCAGTGCCGCAAG                      ATGTACAACCGGCCGCACCGCGCGCCCATCACCAAGC                      AGAACGAGCAGGAGGCCGTGTGCACCGACTCGCACAC                      CGACATGCGCCCGCTCTCGGGCGGCCTCATCGCCTTC                      AGCACGCTGGACGGGCGGCCCTCGGCGCACGACTTC                      GACAACCTCGCCCGTGCTGCAGGACTGGGTACGGCCA                      CAGACATCCGCGTGGCCTTCAGCCGCCTGCACACGTT                      CGGCGACGAGAACGAGGACGACTCGGAGCTGGCGCG                      CGACTCGTACTTCTACGCGGTGTCCGACCTGCAGGTG                      GGCGGCCGGTGCAAGTGCAACGGCCACGCGGCCCGC                      TGCGTGCGCGACCGCGACGACAGCCTGGTGTGCGACT                      GCAGGCACAACACGGCCGGCCCGGAGTGCGACCGCT                      GCAAGCCCTTCCACTACGACCGGCCCTGGCAGCGCGC                      CACAGCCCGCGAAGCCAACGAGTGCGTGGCCTGTAAC                      TGCAACCTGCATGCCCCGGCGCTGCCGCTTCAACATGG                      AGCTCTACAAGCTTTCGGGGCGCAAGAGCGGAGGTGT                      CTGCCTCAACTGTGCCACAACACCGCCGGCCGCCAC                      TGCCATTACTGCAAGGAGGGCTACTACCGCGACATGG                 </p>
---	--	---

		GCAAGCCCATCACCCACCGGAAGGCCTGCAAAGCCTG TGATTGCCACCCTGTGGGTGCTGCTGGCAAACCTGC AACCAAACCACCGGCCAGTGTCCCTGCAAGGACGGCG TGACGGGTATCACCTGCAACCGCTGCGCCAAAGGCTA CCAGCAGAGCCGCTCTCCCATCGCCCCCTGCATAAAG ATCCCTGTAGCGCCGCGACGACTGCAGCCAGCAGCG TGGAGGAGCCTGAAGACTGCGATTCTACTGCAAGGC CTCCAAGGGGAAGCTGAAGATTAACATGAAAAAGTACT GCAAGAAGGACTATGCCGTCCAGATCCACATCCTGAA GGCGGACAAGGCGGGGGACTGGTGGAAAGTTCACGGT GAACATCATCTCCGTGTATAAGCAGGGCACGAGCCGC ATCCGCCGCGGTGACCAGAGCCTGTGGATCCGCTCGC GGGACATCGCCTGCAAGTGTCCCAAATCAAGCCCCT CAAGAAGTACCTGCTGCTGGGCAACGCGGAGGACTCT CCGGACCAGAGCGGCATCGTGGCCGATAAAAGCAGCC TGGTGATCCAGTGGCGGGACACGTGGGCGCGGCGGC TGCGCAAGTTCAGCAGCGTGAGAAGAAGGGCAAGTG CAAGAAGGCCTAGCG
3	Secuencia epitópica de aa de netrina-1	VACNCLHARRCRFMELYKLSGRKSGGVCLNCRHNTA GRHCH
4	Secuencia de ADNc epitópico de netrina-1	GTGGCCTGTAACCTGCAACCTGCATGCCCGGCGCTGCC GCTTCAACATGGAGCTCTACAAGCTTTCGGGGCGCAA GAGCGGAGGTGTCTGCCTCAACTGTGCCACAACACC GCCGGCCGCCACTGCCAT
5	Secuencia de aa de CDR1-H (IMGT)	GYTFTSYN
6	Secuencia de aa de CDR2-H (IMGT)	IYPGNGDT
7	Secuencia de aa de CDR3-H (IMGT)	ARGGTGFAY
8	Secuencia de aa de CDR1-L (IMGT)	QSVSND
	Secuencia de aa de CDR2-L (IMGT)	YAS
9	Secuencia de aa de CDR3-L (IMGT et Kabat)	QQDYSSPWT
10	Secuencia de aa de VH de 4C11 de ratón	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPRQGLEWIGAIYYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGTGFAYWGQGLTVTS A

ES 2 770 620 T3

11	Secuencia de aa de VL de 4C11 de ratón	SIVMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKAS <b>QSVSND</b> VAWYQQK PGQSPKLLIY <b>ASN</b> RYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQ AEDLAVYFC <b>QQDYSSPWTF</b> GGGKLEIK
12	Secuencia de aa completa de 4C11 (VH + CH de IgG1 de ratón)	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS <b>GYTFTSYNMHWVK</b> QTPRQGLEWIGAIY <b>PGNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSS</b> TAYMQLSSLTSEDSAVYFC <b>ARGGTGFAYWGQGLVTVS</b> AAKTTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVT VTWNSGSLSSGVHTFFPAVLESDLYTLSSSVTPSSPRPS ETVTCNVAHPASSTKVVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSV FIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDD VEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFK CRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAK DKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMN TNGSYFVYSKLVNQQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPGK
13	Secuencia de aa completa de 4C11 (VL + CL de kappa de ratón)	SIVMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKAS <b>QSVSND</b> VAWYQQK PGQSPKLLIY <b>ASN</b> RYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQ AEDLAVYFC <b>QQDYSSPWTF</b> GGGKLEIKRADAAPTVSIFP PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNG VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEAT HKTSTSPIVKSFNRNEC
14	Secuencia de aa de VL de variante humanizada de 4C11	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKAS <b>QSVSND</b> VAWYQQK PGKAPKLLIY <b>ASN</b> RYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIES EDAAYYFC <b>QQDYSSPWTF</b> GQG
15	Secuencia de aa de VL de variante humanizada de 4C11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKAS <b>QSVSND</b> VAWFQQR PGQSPRRLIY <b>ASN</b> RYTGVPFRFSGSGSGTDFTFTISSLE AEDAATYYC <b>QQDYSSPWTF</b> GQG
16	Secuencia de aa de VL de variante humanizada de 4C11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKAS <b>QSVSND</b> VAWYQQK PGQAPRLLIY <b>ASN</b> RYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIES EDAAYYFC <b>QQDYSSPWTF</b> GQG
17	Secuencia de aa de VL de variante humanizada de 4C11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKAS <b>QSVSND</b> VAWYLQK PGQSPQLLIY <b>ASN</b> RYTGVPFRFSGSGSGTDFTFTISSLE AEDAATYYC <b>QQDYSSPWTF</b> GQG
18	Secuencia de aa de VL de variante humanizada de 4C11	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCKAS <b>QSVSND</b> VAWYQQK PGQAPRLLIY <b>ASN</b> RYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIES EDAAYYFC <b>QQDYSSPWTF</b> GQG
19	Secuencia de aa de VL de variante humanizada de 4C11	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS <b>CRASQSVSND</b> VAWYQQK PGQAPRLLIY <b>ASN</b> RYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQS EDFAVYYC <b>QQDYSSPWTF</b> GQG

ES 2 770 620 T3

20	Secuencia de aa de VH de variante humanizada de 4C11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVR QATGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGTGFAYWGQG
21	Secuencia de aa de VH de variante humanizada de 4C11	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGYTFTSYNMHWIRQ PPGKGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARGGTGFAYWGQG
22	Secuencia de aa de VH de variante humanizada de 4C11	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGYTFTSYNMHWVR QATGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRLTISKDTSKN QVVLTMNTNMDPVDATYYCARGGTGFAYWGQG
23	Secuencia de aa de VH de variante humanizada de 4C11	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYNMHWVR QATGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISRDDSK NTAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGGTGFAYWGQG
24	Secuencia de aa de VH de variante humanizada de 4C11	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYTFTSYNMHWVR QAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGTGFAYWGQG
25	Secuencia de aa de VH de variante humanizada de 4C11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVR QATGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGTGFAYWGQG
26	Secuencia de aa de VH de variante humanizada de 4C11	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGYTFTSYNMHWVR QATGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGTGFAYWGQG
27	Secuencia de aa de VH de variante humanizada de 4C11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVR QAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYAQKFKGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGTGFAYWGQ
28	Secuencia de aa de CDR1-H (Kabat)	SYNMH
29	Secuencia de aa de CDR2-H (Kabat)	AIYPGNGDTSYNQKFKG
30	Secuencia de aa de CDR3-H (Kabat)	GGTGFAY
31	Secuencia de aa de CDR1-L (Kabat)	KASQSVSNDVA
32	Secuencia de aa de CDR2-L (Kabat)	YASNRYT
33	Cebador directo	aaaagtactgcaagaaggactatgc
34	Cebador inverso	ccctgctatacacggagatg
35	Secuencia epitópica de aa de netrina-1	ARRCRFNMELYKLSGRKSGGVC
36	Secuencia de ADNc epitópica de netrina-1	GCCCGGCGCTGCCGCTTCAACATGGAGCTCTACAAGC TTTCGGGGCGCAAGAGCGGAGGTGTCTGC

**[0098]** Las CDRs bajo IMGT se resaltan en negrita en la Tabla 1, cuando sea apropiado.

**[0099]** La presente invención se describirá ahora con más detalle mediante ejemplos que deben considerarse  
5 como realizaciones no limitantes.

Breve descripción de las figuras:

**[0100]**

10 **Figura 1:** ensayo de unión ELISA de 4C11 murino contra Netrina-1 humana. Se incubaron varias concentraciones de 4C11 se incubaron en placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertos con Netrina-1 marcada con FLAG (APOTECH). El 4C11 unido se detectó usando una IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (Jackson Immunoresearch) y un sustrato quimioluminiscente (sustrato de transferencia Western PIERCE ECL). La luminiscencia se leyó en un luminómetro Tecan Infinite F-500.

15 **Figura 2:** Inhibición de la unión de Netrina-1 a UNC5B-Fc por 4C11. Se incubó netrina-1 marcada con FLAG (APOTECH) en presencia de diversas concentraciones de 4C11 en placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertos con UNC5B-Fc (Netris). La Netrina-1 unida se detectó utilizando un anticuerpo anti-FLAG conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma) y un sustrato quimioluminiscente (sustrato de transferencia Western PIERCE  
20 ECL). La luminiscencia se leyó en un luminómetro Tecan Infinite F-500.

**Figura 3:** Mapeo de epítomos lineales de 4C11 se realizó utilizando una matriz de 590 péptidos lineales de 15 aminoácidos que cubre toda la secuencia de Netrina-1 humana con una superposición de péptido-péptido de 14 aminoácidos. La unión de 4C11 en el péptido se reveló usando una IgG anti-ratón marcada con peroxidasa (POD) y  
25 un sustrato quimioluminiscente.

**Figura 4:** Esquema que muestra la secuencia de aminoácidos del epítipo de Netrina-1 (que se encuentra en el segundo dominio de laminina de tipo EGF) reconocido por el anticuerpo murino 4C11.

30 **Figura 5:** Inducción de la caspasa 3 en células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas A549 en presencia del anticuerpo murino 4C11.

**Figura 6:** Inhibición del crecimiento de xenoinjertos humanos en ratones desnudos tratados con el anticuerpo 4C11 murino. Se inyectaron células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano A549 por vía subcutánea a ratones  
35 desnudos atímicos (es decir inmunodeficientes). Una vez que el tumor había alcanzado aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, los ratones (n = 10 por grupo) fueron tratados intraperitonealmente con 5 mg/kg una vez a la semana con 4C11 o un control isotópico (MOPC21).

**Figura 7:** Inhibición del crecimiento de xenoinjertos humanos en ratones desnudos tratados con el anticuerpo 4C11 murino. Se inyectaron células de linfoma de células del manto humano GRANTA-519 por vía subcutánea a ratones  
40 desnudos atímicos (es decir inmunodeficientes). Una vez que el tumor había alcanzado aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, los ratones (n = 10 por grupo) se trataron por vía intraperitoneal con 2 mg/kg una vez a la semana o dos veces a la semana con 4C11 o con el vehículo (PBS).

45 **Figura 8:** Efecto *in vivo* de anticuerpo 4C11 humanizado (hum03) en el crecimiento de osteosarcoma trasplantable de rata. Los tumores de osteosarcoma de rata se trasplantaron en posición paratibial después de la denudación del periostio (n = 7). Las ratas fueron tratadas dos veces a la semana mediante inyección intraperitoneal de 4,4 mg/kg de hum03 4C11 humanizado o un control isotópico con o sin doxorubicina (2 mg/kg) o con PBS. La figura muestra el aumento en veces del tumor en el día 17.

50 **Figura 9:** Análisis de Pepscan del dominio de unión a NET1 del anticuerpo monoclonal 4C11 humanizado anti-netrina 1 (NET1-H-mAb) HUM03. Los datos en bruto de Pepscan obtenidos mediante cribado del mAb 4C11 humanizado contra la biblioteca de péptidos solapante de 590 péptidos lineales (eje x). La intensidad de señal de la interacción se visualiza en el eje y. El pico corresponde a la siguiente secuencia de aminoácidos:  
55 ARRCRFNMELYKLSGRKSGGVC (SEQ ID NO: 35).

**Ejemplo 1: Generación de anticuerpos, cribado y humanización**

**[0101]** Ratones HTP™ recibieron 8 inyecciones (todos los días, dos días; primera inyección en presencia de  
60 adyuvante completo de Freund, los otros con adyuvante incompleto) de 100 µg de Netrina 1-Fc (Adipogen). La fusión de hibridomas se llevó a cabo 2 semanas después de la primera inmunización (ABPro, Lexington, MA). Los sobrenadantes de hibridoma se cribaron para anticuerpos monoclonales específicos anti-netrina 1 utilizando un ensayo de ELISA de antígeno dual (Netrina 1-Fc y proteína quimérica Fc irrelevante). Un ensayo de tipo ELISA secundario se utilizó para seleccionar anticuerpos monoclonales capaces de bloquear la interacción de Netrina 1 con  
65 DCC o UNC5h2. A continuación, se seleccionó un anticuerpo monoclonal murino (4C11 murino o NET1-M-mAb). Este anticuerpo está formado de las secuencias SEQ ID NO: 12 y 13.



**[0102]** La humanización se realizó de la siguiente manera: fragmentos de ADN de doble cadena que codifican secuencias de CDR de la cadena ligera y pesada de 4C11 murino se combinaron con grupos de estructuras humanas. A continuación, los dominios variables de longitud completa fueron clonados en vectores de expresión de mamíferos. Los dominios variables de cadena ligera se clonaron en el marco con una señal de secreción y un dominio constante kappa humano. Los dominios variables de cadena pesada se clonaron en marco con una secuencia líder y un dominio constante de IgG1 humana. La diversidad de la biblioteca y la integridad de los marcos de lectura de LC y HC se comprobaron mediante secuenciación. Clones individuales fueron dispuestos en formato de 96 pocillos y se preparó el ADN plasmídico para la transfección en células CHO. La biblioteca humanizada se transfirió en células CHO en un formato de 96 pocillos. Los sobrenadantes de células CHO transfectadas se recogieron entonces a las 48 horas después de la transfección y se cribaron mediante ensayos de unión a Netrina-1 y ELISA de competición. Los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada de los mejores 10 resultados se secuenciaron, alinearon y analizaron. Se generaron los anticuerpos humanizados HUM01-10, tal como se describe anteriormente.

15

#### **EJEMPLO 2: Producción de MAb y purificación de proteína A**

**[0103]** Los procedimientos para producir anticuerpos monoclonales basados en las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las cadena pesada y cadenas ligeras son conocidos por la persona experta en la técnica. En base a las secuencias descritas en el presente documento, la persona experta en la técnica puede producir diversos anticuerpos murinos, humanizados y completamente humanizados dirigidos contra el epítipo lineal de SEQ ID NO: 3 o 35 o cualquier variante del mismo, tales como el anticuerpo 4C11 murino 4C11, y los anticuerpos humanizados HUM1-10 y HUM1'-10'.

**[0104]** Las células de mamífero son las preferidas como huéspedes para la producción de glicoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad de glicosilar proteínas en la forma más compatible para aplicaciones humanas (Jenkins et al, Nat Biotech 1996; 14: 975-81). Las células huésped de mamífero que podrían usarse incluyen, células humanas Hela, 283, H9 y Jurkat, células de ratón NIH3T3 y C127, células de mono verde africano Cos 1, Cos 7 y CV1, células de codorniz QC1-3, células L de ratón y células de ovario de hámster chino. Las bacterias muy raramente glicosilan las proteínas, y como otro tipo de huéspedes comunes, tales como levaduras, hongos filamentosos, insectos y células de plantas, producen patrones de glicosilación asociados con la rápida depuración del torrente sanguíneo.

**[0105]** Las células de ovario de hámster chino (CHO) permiten la generación consistente de líneas celulares genéticamente estables, altamente productivas. Pueden cultivarse a altas densidades en biorreactores simples utilizando medio libre de suero, y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales de uso común incluyen células de riñón de hámster bebé (BHK), células de mieloma de ratón NSO y SP2/0. La producción a partir de animales transgénicos también se ha probado (Jenkins et al, Nat Biotech 1996; 14: 975-81).

40

**[0106]** Un vector de expresión de mamífero típico contiene el elemento promotor (promotores temprano y tardío de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus, por ejemplo RSV, HTLV1, HIV1 y el promotor temprano del citomegalovirus (MCMV, hCMV), que media en la iniciación de la transcripción del ARNm, la secuencia de codificación de la proteína, y las señales requeridas para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del transcrito (BGH poliA, gen de Herpes timidina quinasa del polio del virus de Herpes simplex (TKpa), poliA tardío de SV40 y 3' UTR\_Beta\_Globin\_poliA). Los elementos adicionales incluyen potenciadores (E $\mu$ , hIE1), secuencias de Kozak, péptido señal y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donantes y aceptores para el empalme de ARN. Los vectores de expresión adecuados para uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pcDNA3 0,1, pcDNA3.3, pOptiVEC, pRSV, pE $\mu$ MCMV, pMCMVHE-UTR-BG, pHCMVHE-UTR-BG, pMCMV-UTR-BG, pHCMV-UTR-BG, pMCMVHE-SV40, pHCMVHE-SV40, pMCMV-SV40, pHCMV -SV40, pMCMVH E-TK, pHCMVHE-TK, pMCMV-TK, pHCMV-TK, pMCMVHE-BGH, pHCMVHE-BGH, pMCMV-BGH, pHCMV-UTR-BGH).

**[0107]** Las células CHO Easy C vacías son cotransfectadas con vector de expresión de MAb para las cadenas ligeras y pesadas siguiendo el procedimiento de transfección transitoria o estable habitual. La secreción de cadenas H y L es permitida por la secuencia líder IgH humana respectiva. Las regiones codificantes para las cadenas ligera y pesada se introducen en el vector de expresión de MAb en el sitio de clonación múltiple. Los transformantes se analizan para orientación correcta y el marco de lectura, el vector de expresión puede ser transfectado en la línea celular CHO.

60

**[0108]** El fluido de cultivo de células recogidas producido a partir de células CHO se carga en la columna de la Proteína A Hi Trap (GE Healthcare, Saint Cyr au Mont d'Or, Francia) que se equilibró con tampón fosfato salino, pH 7,2. Las proteínas no unidas se hacen fluir y se extraen mediante varios lavados con tampón PBS. El MAb se eluyó de la columna de la proteína A usando una etapa de elución de ácido cítrico 0,1 M a pH 3,0. El eluyente de la columna se controla mediante la A280. El pico de MAb se agrupó.

65

**Ejemplo 3: Ensayo de unión de tipo ELISA de anticuerpos 4C11 a Netrina-1 (Figura 1)**

**[0109]** Se incubó una placa blanca de microtitulación de 96 pocillos (Costar 3912 Corning) durante la noche a 4 °C, con 100 ng de netrina-1 marcada con His (R & D 6419-N1) en 100 µl de solución salina de tampón fosfato (PBS). Después de tres lavados con 300 µl de PBS-0,05% de Tween-20 (PBS-T), la placa se bloqueó mediante la adición de 100 µl de PBS-BSA al 3% y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con 300 µl de PBS-T, la placa se incubó con diversas cantidades (de 10 ng a 1200 ng) del anticuerpo anti-netrina-1. Después de tres lavados con 300 µl de PBS-T, se añadieron 100 µl de un anticuerpo secundario pertinente conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (por ejemplo, IgG anti-humano de cabra (Fc) Sigma A0170 o cadena ligera específica (kappa) de IgG anti-ratón de cabra Jackson ImmunoResearch 115-035-174) diluido 1/10000 en PBST-BSA al 3% y la placa se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con 300 µl de PBS-T, se añadieron 100 µl de un sustrato luminiscente de HRP (sustrato de transferencia de western ECL, Pierce). Después de 5 a 10 minutos, la luminiscencia se leyó en un luminómetro Tecan Infinite F-500.

**[0110]** La Figura 1 muestra la interacción típica dependiente de la dosis del anticuerpo murino 4C11 a netrina-1 adsorbida en el ensayo de tipo ELISA.

**[0111]** La concentración de los anticuerpos que permiten la unión del 50% (EC<sub>50</sub>) se calcula a partir de las curvas de unión sigmoidales, tal como se muestra en la Figura 1. La Tabla 1 muestra los valores de EC<sub>50</sub> (en µg/ml y en nM) de los diferentes anticuerpos 4C11 murinos (anticuerpo completo 4C11, así como fragmentos Fab y Fab'2) y humanizados.

Tabla 1: Potencia de las diversas variantes de 4C11 para unirse a netrina-1 (Ejemplo 3) o para impedir la unión de netrina-1 de unión sobre UNC5B (Ejemplo 5):

25

	Datos de potencia			
	Unión (EC <sub>50</sub> )		Inhibición de la unión a ligando (IC <sub>50</sub> )	
	ng/ml	pM	ng/ml	pM
IgG1 murina 4C11	57	380	75	502
IgG2a murina 4C11	63	420	85	567
Fab 4C11	650	13000	844	16880
Fab'2 4C11	35	350	89	890
HUM01	134	894	54	360
HUM03	166	1107	65	434
HUM09	153	1021	71	474
HUM08	134	894	77	514
HUM06	139	927	82	547
HUM05	151	1007	85	567
HUM07	125	834	89	594
HUM10	211	1407	110	734
HUM04	198	1321	199	1327
HUM02	260	1734	215	1434
HUM03 se seleccionó para experimentos adicionales. HUM03 a veces se puede llamar a continuación 4C11 humanizado				

**Ejemplo 4: Ensayo de unión a anticuerpo por resonancia de plasmón superficial**

**[0112]** Las propiedades de unión de los anticuerpos se analizaron mediante Biacore TI 00 (GE Healthcare) con el software Biacore T100 Control Biacore TI 00 Evaluation asociado y el Chip: CM5-Chip como formato de ensayo.

**[0113]** Se capturó anticuerpo murino 4C11 (IgG1) (SEQ ID NO: 12 y 13) a través de moléculas de captura acopladas a amina. Se inyectó una serie con concentraciones crecientes de netrina-1. La superficie del chip con la molécula de captura acoplada a amina sola se utilizó como superficie de control de referencia para la corrección de posibles efectos tampón o la unión no específica de netrina-1.

**[0114]** Moléculas de captura: Los anticuerpos anti-IgG de ratón (de cabra, Jackson Immuno Research).

**[0115]** Acoplamiento con amina de moléculas de captura. El acoplamiento estándar con amina de acuerdo con las instrucciones del fabricante: tampón de desarrollo: tampón HBS-N, activación por mezcla de EDC/NHS, objetivo de densidad de ligando de 10.000 RU; los anticuerpos de captura se diluyeron en tampón de acoplamiento NaAc 10 mM, pH 4,5, c = 30 µg/ml; finalmente los grupos carboxilo activados restantes fueron bloqueados por inyección de etanolamina 1 M.

40

**[0116]** Captura de anticuerpo 4C11: Captura de anticuerpo 4C11 en celdas de flujo de 2 a 4: Flujo de 5 µl/min, tiempo de contacto de 72 segundos, c(anticuerpos IgG anti-ratón) = 5 nM. Tampón de captura: PBS (pH 7,4), Tween 20 al 0,005%

5 Muestra de analito: Se midieron serie de concentraciones clásicas a un caudal 50 µl/min mediante inyección consecutiva de analito en 5 o 6 concentraciones crecientes (c = 2-164 nM). Tampón de desarrollo: 20 mM Hepes pH 7,4, NaCl 600 mM, Tween 20 al 0,005%. El analito se inyectó durante 3 minutos seguido de una fase de disociación de 90s.

10 **[0117]** El análisis semicuantitativo de resonancia de plasmón de superficie (SPR) de la cinética de unión de netrina-1 a 4C11 capturado se realizó mediante análisis BIAcore de la unión del anticuerpo murino 4C11 tal como se proporciona y describe en la presente invención a netrina-1 humana. El anticuerpo 4C11 fue capturado en la superficie del chip a través de moléculas anti-IgG humanas (Fc) acopladas a amina. Se inyectó una serie con concentraciones crecientes de netrina-1 humana y se controló el comportamiento de unión cinética mediante los  
15 cambios en SPR. Los cambios como unidades relativas (RU) frente a un chip de control se registraron en el eje y con el tiempo (eje x). Se observó la curva de asociación y disociación representativa del analito capturado 4C11 a diferentes concentraciones de netrina-1 inyectada humana.

**[0118]** Los parámetros cinéticos se calcularon a continuación utilizando la doble referencia habitual (referencia de control: unión de analito de molécula de captura; celda de flujo: concentración "0" de netrina-1 como blanco) y el  
20 cálculo con la unión 1:1 de cinética de titulación del modelo.

Tabla 2 proporciona los datos de afinidad medidos por SPR (Biacore® T100) a 25 °C en PBS:

	<b>Ka (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Kd (s<sup>-1</sup>)</b>	<b>KD (nM)</b>
Exp 1	1,4 x 10 <sup>5</sup>	1,8 x 10 <sup>5</sup>	13,3
Exp 2	1,4 x 10 <sup>5</sup>	1,8 x 10 <sup>5</sup>	12,7

25

**Ejemplo 5: 4C11 inhibe la unión de netrina 1 a UNC5B (Figura 2)**

**[0119]** Se incubó una placa blanca de microtitulación de 96 pocillos (Costar 3912 Corning) durante la noche a 4 °C, con 100 ng de UNC5B-Fc (R & D 1006-UN-050) o DCC-Fc (R & D 844-DC-050) en 100 µl de solución salina de  
30 tampón fosfato (PBS). Después de tres lavados con 300 µl de PBS-0,05% de Tween-20 (PBS-T), la placa se bloqueó mediante la adición de 100 µl de PBS-BSA al 2% y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con 300 µl de PBS-T, la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, con 100 µl de PBS-BSA al 1% que contenía 50 ng/ml de netrina-1 etiquetada con FLAG (Adipogen) y diversas cantidades (de 0,2 ng a 3000 ng) del anticuerpo 4C11. Después de tres lavados con 300 µl de PBS-T, se añadieron 100 µl de un anticuerpo  
35 monoclonal anti-FLAG M2 conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma A8592) diluido 1/5.000 en PBST-BSA al 1% y la placa se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con 300 µl de PBS-T, se añadieron 100 µl de un sustrato luminiscente de HRP (sustrato de transferencia de western ECL, Pierce). Después de 5 a 10 minutos, la luminiscencia se leyó en un luminómetro Tecan Infinite F-500.

40 **[0120]** La Figura 2 muestra la inhibición dependiente de la dosis típica de la unión de netrina-1 a UNC5B mediante cantidades crecientes de anticuerpo murino 4C11 en un ensayo de tipo ELISA.

**[0121]** La concentración de los anticuerpos que permite una inhibición del 50% (IC<sub>50</sub>) se calcula a partir de la curvas de unión sigmoidales, tal como se muestra en la Figura 5. La Tabla 1 proporciona los valores de IC<sub>50</sub> (en  
45 µg/ml y en nM) de los diferentes anticuerpos 4C11 murino (el anticuerpo completo 4C11, así como fragmentos Fab y Fab'2) y anticuerpos 4C11 humanizados.

**Ejemplo 6: Mapeo de epítomos de netrina-1 de 4C11 murino (Figuras 3 y 4)**

50 **[0122]** El mapeo de epítomos se realizó utilizando una matriz de 590 péptidos lineales de 15 aminoácidos que cubren toda la secuencia de Netrina-1 humana (sin el péptido señal) con una superposición de péptido-péptido de 14 aminoácidos. Los péptidos lineales se sintetizaron usando química de Fmoc estándar y se desprotegeron utilizando ácido trifluórico. Las tarjetas de polipropileno en formato de tarjeta de crédito de 455 pocillos que contenían los péptidos unidos covalentemente se incubaron 30 min a 25 °C en PBST (PBS-1% de Tween 80) que contenían SQ al  
55 5% (SQ, Super-Q, suero de caballo al 4%(v/v), ovoalbúmina al 5% (p/v) en PBST. Después del lavado, los péptidos se incubaron con el 4C11 (1 µg/ml) PBST-0,1% SQ. Después del lavado, los péptidos se incubaron con una dilución 1/1000 de anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (SouthernBiotech) durante una hora a 25 °C. Después del lavado, se añaden el sustrato de peroxidasa 2,2'-etilbenzotiazolina-azino-di-3-sulfonato (ABTS) y 2 microlitros de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 por ciento. Después una hora, se cuantifica el revelado del color con un dispositivo de carga acoplada  
60 (CCD) - cámara y un sistema de procesamiento de imágenes.

**[0123]** La Figura 3 muestra que el 4C11 murino interactúa específicamente con los péptidos incluidos en la SEQ

ID NO: 3: VACNCLHARRCRFMELYKLSGRKSGGVCLNCRHNTAGRHC.

**[0124]** La Figura 4 es una representación que muestra la ubicación del epítipo reconocido por el anticuerpo 4C11 murino. Este epítipo es transportado por el segundo dominio de tipo EGF de Netrina-1.

5 **[0125]** El mapeo de epítipos Pepscan mediante la matriz de "spots" de 590 péptidos lineales de 15 aminoácidos que cubren toda la secuencia de NET1 humana. Tal como se muestra en la figura 9, el anticuerpo HUM03 se une a 8 péptidos solapantes correspondientes a la secuencia de aminoácidos "ARRCRFMELYKLSGRKSGGVC" (SEQ ID NO: 35) que está presente dentro del dominio V-2 de NET1. El epítipo de unión del anticuerpo de este modo se  
10 solapa con el dominio NET1 implicado en la interacción con UNC5B. Para confirmar que el dominio V-2 de NET1 es de hecho responsable de la interacción con HUM03, se generó una colección de mutantes y se realizaron ensayos de unión in vitro de estos mutantes con el anticuerpo, así como con UNC5B. La mutación puntual K358L fue suficiente para disminuir la interacción con el HUM03. La triple mutación R348A-R349A-R351 A redujo la interacción.

15 **Ejemplo 7: Caspasa-3 inducida por 4C11 en células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano A549 humano (Figura 5)**

**[0126]** El día 1, las células se colocaron en placas en medio libre de suero ( $1,8 \times 10^5$  células por pocillo en placas de seis pocillos con 1 ml por pocillo). El día 2, el medio se reemplazó con 1 ml de medio libre de suero fresco que  
20 contenía vehículo (Ctrl), el anticuerpo 4C11 de ratón, o un anticuerpo irrelevante IgG1,k murino (Ab) ( $10 \mu\text{g/ml}$ ). Los tratamientos se realizaron por duplicado. El día 3, las células de los 2 pocillos tratados de forma idéntica se recogieron y se combinaron como un grupo. Después de la centrifugación, los sedimentos celulares se resuspendieron en  $55 \mu\text{l}$  de tampón de lisis proporcionado en el kit de ensayo fluorimétrico Caspasa 3/CPP32 (Gentaur Biovision, Bruselas, Bélgica). A continuación, la apoptosis se controló midiendo la actividad de la caspasa-  
25 3 usando el kit mencionado anteriormente. Todos los valores se normalizaron al control.

**[0127]** La Figura 5 muestra que el anticuerpo 4C11 murino induce la actividad de caspasa 3 en células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón A549 humano.

30 **Ejemplo 8: Inhibición de crecimiento del tumor inducido por 4C11 *in vivo* de A549 (células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano) (Figura 6) y xenoinjertos de células GRANTA (células de linfoma de células del manto humana) (Figura 7).**

**[0128]** Se obtuvieron ratones un/un atímicos hembra de siete semanas de edad (20-22 g de peso corporal) de la  
35 instalación para animales Charles River. Los ratones fueron alojados en jaulas con filtros en la parte superior esterilizadas y se mantiene en una instalación para animales libre de patógenos. Todos los tumores se implantaron mediante inyecciones s.c. de células tumorales ( $10^7$  células A549 o  $10^6$  células GRANTA) en  $200 \mu\text{l}$  de PBS en el flanco derecho de los ratones. El tratamiento con el anticuerpo 4C11 comenzó cuando los tumores se establecieron ( $V \approx 100 \text{ mm}^3$ , aproximadamente 15-20 días después de la inyección). Los ratones recibieron una inyección  
40 intraperitoneal del anticuerpo 4C11 (diferentes dosis y programas), el vehículo (PBS), o un control isotópico (MOPC21) ( $n = 10$  ratones). Los tamaños de los tumores se midieron con un calibrador. Los volúmenes tumorales se calcularon con la fórmula  $v = 0,5 * (\text{longitud} * \text{anchura}^2)$ .

**[0129]** Los ratones con xenoinjertos A549 fueron tratados con 5 mg/kg de 4C11 una vez a la semana, mientras  
45 que los ratones con xenoinjertos GRANTA recibieron una dosis más baja de 4C11 (2 mg/kg) una vez o dos veces a la semana.

**[0130]** Las figuras 6 y 7 mostraron una supresión significativa del crecimiento tumoral de las células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón A549 humano (A) y linfoma de células del manto humano GRANTA humano (B)  
50 xenoinjertados en ratones inmunodeficientes.

**[0131]** El anticuerpo 4C11 muestra una inhibición de A549 y el crecimiento tumoral de GRANTA.

**Ejemplo 9: Sinergia entre 4C11 humanizado (hum03) y doxorubicina en osteosarcoma de rata (Figura 8).**

55 **[0132]** Se ha transformado un osteosarcoma de rata inducido por radiación en un modelo trasplantable injertado en posición paratibial después de la denudación del periostio (ref. Allouche M.et al., 1980, Int. J. Cancer 26, 777-782). Como no se expresó netrina-1 en este tumor, se estimuló la expresión de netrina-1 y sus receptores usando un agente de quimioterapia (Dox, Dorubicina), tal como se ha publicado recientemente (cf Paradisi et al.2013 EMBO  
60 Mol Med (2013) 5, 1821-1834). Las ratas injertadas con el osteosarcoma recibieron dos veces una inyección intraperitoneal de 4C11 humanizado hum03 (4,4 mg/kg) o el vehículo (ctr). Algunos animales recibieron adicionalmente una inyección intraperitoneal de doxorubicina (2 mg/kg). Los tamaños de los tumores se midieron con un calibrador. Los volúmenes tumorales se calcularon con la fórmula  $v = 0,5 * (\text{longitud} * \text{anchura}^2)$ . En paralelo, se  
65 utiliza MRI para seguir el patrón de crecimiento.

**[0133]** La Figura 8 muestra que una inhibición del crecimiento del osteosarcoma se consigue en animales tratados

simultáneamente con 4C11 y doxorubicina.

**Ejemplo 10: Efecto de 4C11 murino en el modelo inflamatorio de cáncer de colon espontáneo generada mediante la inflamación. (modelo de ratón de cáncer colorrectal asociado a IBD (enfermedad inflamatoria intestinal))**

(Cf Ref Proc Natl Acad Sci U.S.A. A. 6 Oct 2009; 106 (40): 17146-51).

**[0134]** Los ratones fueron tratados con AOM + DSS y se trataron con 2 mg/kg de PBS o 4C11 por vía intraperitoneal dos veces a la semana (n = 7), tal como se ha descrito previamente (Ref: Neufert C et al (2007) Nat Protoc 2: 1998-2004). Brevemente, se inyectaron ratones Balb/C de tipo salvaje hembra de 8 semanas de vida libres de patógenos por vía intraperitoneal con 10 mg/kg de peso corporal de AOM disuelto en PBS. El día después, se administró DSS al 2,5% en el agua de bebida durante una semana, seguido de 2 semanas de agua del grifo. Los ratones fueron tratados con DSS durante 1 semana cada 2 semanas hasta la décima semana del experimento y se inyectaron tres veces por semana con 4C11 o con PBS. Los animales fueron sacrificados en el comienzo de la décima semana y el colon fue extraído para análisis histológico. La tabla 3 muestra claramente que el tratamiento de los ratones con el anticuerpo 4C11 previene o ralentiza el desarrollo de adenocarcinomas de colon provocados por situaciones inflamatorias.

**[0135]** Tabla 3: Efecto del mAb anti-Netrina 4C11 en tumores de colon provocados por situaciones inflamatorias *in vivo*. Se generó un modelo de ratón de cáncer colorrectal asociado a IBD (enfermedad inflamatoria intestinal), tal como ya se ha descrito (Proc Natl Acad Sci U.S.A. A. 6 Oct 2009; 106 (40): 17146-51). Los ratones fueron tratados primero con azoximetano (AOM) y sulfato dextrano sódico (DSS) para inducir el cáncer colorrectal. Los ratones se trataron con 2 mg/kg de PBS o 4C11 por vía intraperitoneal dos veces a la semana (n = 7). Los ratones fueron sacrificados. El colon extraído fue fijado en formaldehído para el análisis histológico. La Tabla 3 presenta el porcentaje de ratones que muestran diversas lesiones de colon precancerosas o cancerosas.

Lesión de colon	Tratamiento	
	PBS	4C11
Hiperplasia focal	0%	86%
Adenoma de grado bajo	50%	0%
Adenoma de grado elevado	16,7%	0%
ADK temprana	33,3%	42,8%
ADK	66,7%	14,3%

**Ejemplo 11: Cuantificación de la proteína Netrina-1 en células de cáncer humano:**

**[0136]** Para el análisis de inmunotransferencia, las células se lisaron por sonicación en tampón RIPA modificado (Tris 50 mM-HCl, pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1%, EDTA 1 mM, cóctel de inhibidores de proteasas y DTT 5 mM) y se incubaron 1 hora a 4 °C. Los restos celulares se sedimentaron por centrifugación (10.000 g 15' a 4 °C) y los extractos de proteína (200 µg por carril) se cargaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y se transfirieron sobre láminas de PVDF (Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU.). Los filtros se bloquearon con leche en polvo desnatada al 10% y BSA al 5% en PBS/0,1% de Tween 20 (PBS-T) durante la noche y después se incubaron durante 2 h con anticuerpo policlonal para  $\alpha$ -netrina-1 de conejo (dilución 1:500, clon H104, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) y anticuerpo monoclonal para  $\beta$ -actina de ratón (Santa Cruz Biotechnologies). Después de tres lavados con PBS-T, los filtros se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con HRP (1:10.000, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Reino Unido) durante 1 h. La detección se realizó utilizando el Sistema de quimioluminiscencia West Dura (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.).

**[0137]** Para el estudio de inmunofluorescencia, se separaron las células, se centrifugaron en cubreobjetos con un citocentrifugador (Shandon Cytospin 3, Thermo Scientific) y se fijaron durante 30 minutos con paraformaldehído al 4% (v/v). A continuación, las células se permeabilizaron durante 30 minutos en Triton X-100/PBS al 0,2% y se bloquearon en PBS que contenía BSA al 2% y suero normal de burro al 2%. La netrina-1 endógena se tiñe usando anticuerpo monoclonal de  $\alpha$ -netrina-1 rata (R&D systems) y IgG anti-rata de burro Alexa-488 (Molecular Probes). Los núcleos se contratiñeron mediante la tinción de Hoescht (Sigma).

**Ejemplo 12: Ejemplo de cánceres que sobreexpresan netrina-1 y la expresión de DCC y/o UNC5A y/o B y/o C y/o D para ser candidato para el tratamiento con un UNC5-TRAP o anticuerpo 4C11 humanizado.**

**[0138]** El porcentaje de casos que sobreexpresan netrina-1 se proporciona para cada tipo de cánceres para los que la expresión de netrina-1 y sus receptores ha sido cuantificada.

- 60% de cáncer de mama metastásico (Fitamant et al., PNAS 2008),
- 47% de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Delloye-Bourgeois et al., JNCI 2009),
- 38% de neuroblastoma agresivo (Delloye-Bourgeois et al., J. Exp Med 2009),
- 61% de adenocarcinoma de páncreas (Link et al, Annals of Chir Onco 2007; Dumartin et al, Gastro 2010),

- 100% de melanoma primario (n = 7), metástasis de melanoma (n = 6) (Kaufmann et al., Cellular Oncology 2009),
- 76% de cánceres de ovario (Panastasiou et al O., Oncotarget 2011),
- 65% de glioblastoma,
- 60% de leucemia mieloide aguda y leucemia linfocítica crónica
- 5 - 50% de linfoma agresivo de células  $\beta$ ,
- 30% de sarcoma,
- 40% de adenocarcinoma renal,
- 22% de cánceres de cabeza y cuello,
- cánceres testiculares (36% de carcinoma embrionario, 50% de teratoma, 100% de los tumores de saco vitelino),
- 10 - 50% de cánceres de riñón,
- 26% de cánceres de estómago,
- 19% de cánceres de útero.

**Ejemplo 13. RT-PCR cuantitativa que permite evaluar la expresión o sobreexpresión de netrina-1 de acuerdo con PCT/EP2013/068937:**

**[0139]** Se extrae el ARN total utilizando el kit NucleoSpin® RNA II (Macherey Nagel, Düren, Alemania) según el protocolo del fabricante. Las reacciones de RT-PCR se realizan con el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad). Un  $\mu\text{g}$  de ARN total se transcribe de forma inversa utilizando el siguiente programa: 25 °C durante 5 min, 42 °C durante 30 min y 85 °C durante 5 min. Para estudios de expresión, los transcritos diana se amplifican en un aparato LightCycler® 2.0 (Roche Applied Science), usando el LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Applied Science). La expresión de los genes diana se normaliza a los genes de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y fosfoglicerato quinasa (PGK), utilizados como genes constitutivos. La cantidad de transcritos diana, normalizados a los genes constitutivos, se calcula utilizando el procedimiento de  $C_T$  comparativo. Se lleva a cabo un experimento de validación con el fin de demostrar que las eficiencias de los genes diana y constitutivos son aproximadamente iguales. Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

Cebador directo: aaaagtactgcaagaaggactatgc SEQ ID NO: 33.

Cebador inverso: cctgtctatacacggagatg SEQ ID NO: 34.

**Ejemplo 14. Cuantificación de proteínas Netrina-1 en células de cáncer humano de acuerdo con PCT/EP2013/068937:**

**[0140]** Para el análisis de inmunotransferencia, las células se lisan mediante sonicación en tampón RIPA modificado (Tris 50 mM-HCl, pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0,05%, SDS al 0,1%, EDTA 1 mM, cóctel de inhibidores de proteasa y DTT 5 mM) y se incuban 1 hora a 4 °C. Los restos celulares se sedimentan mediante centrifugación (10.000 g 15' a 4 °C) y los extractos de proteína (200  $\mu\text{g}$  por carril) se cargan en geles al 10% de SDS-poliacrilamida y se transfieren sobre láminas de PVDF (Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU.). Los filtros se bloquean con leche en polvo desnatada al 10% y BSA al 5% en PBS/Tween 20 al 0,1% (PBS-T) durante la noche y después se incuban durante 2 h con anticuerpos policlonales de  $\alpha$ -netrina-1 de conejo (dilución 1:500, clon H104, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) y anticuerpos monoclonales de  $\beta$ -actina de ratón (Santa Cruz Biotechnologies). Después de tres lavados con PBS-T, los filtros se incuban con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con HRP (1:10.000, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Reino Unido) durante 1 h. La detección se realiza utilizando el sistema de quimioluminiscencia West Dura (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.).

**[0141]** Para el estudio de inmunofluorescencia, se separan las células, se centrifugan sobre un cubreobjetos con un citocentrifugador (Shandon Cytospin 3, Thermo Scientific) y se fijan durante 30 minutos con paraformaldehído al 4% (v/v). A continuación, las células se permeabilizaron durante 30 minutos en Triton X-100/PBS al 0,2% y se bloquean en PBS que contiene BSA al 2% y suero normal de burro al 2%. La netrina-1 endógena se tiñe usando anticuerpo monoclonal de  $\alpha$ -netrina-1 rata (R&D systems) y Igg anti-rata de burro Alexa-488 (Molecular Probes). Los núcleos se contratiñen mediante la tinción de Hoescht (Sigma).

**Ejemplo 15: Modelos de xenoinjertos *in vivo***

**[0142]** Se recogieron del cultivo diferentes líneas celulares humanas (líneas de células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón H358 y A549 y líneas celulares de linfoma de células del manto GRANTA-519 y linfoma difuso de células B grandes oci-ly3) en crecimiento exponencial, se lavaron dos veces con PBS estéril, se contaron y 5.10<sup>6</sup> células se resuspendieron en PBS antes de la implantación s.c. en el flanco derecho de ratones Swiss/desnudos hembra de 5 semanas de edad. Los volúmenes tumorales (V) se determinaron mediante la fórmula  $V = 0,5 (\text{longitud} \times \text{ancho}^2)$  con un calibrador. Se establecieron tumores de 100 +/- 20 mm<sup>3</sup> antes de la aleatorización en grupos (10 ratones cada uno). Se inyectaron anticuerpo anti-netrina 1 o un control isotópico po vía i.v. (H358, A549, oci-ly3) o i.p. (GRANTA-519) en ratones a 10 mg/kg dos veces a la semana. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor (% TGI) para cada línea celular injertada en el día (d) indicado en la siguiente tabla y se calculó mediante la fórmula  $\text{TGI} (\%) = (1 - T/C) \times 100$ , donde T indica el promedio del volumen del tumor del grupo de prueba (tratados con los anticuerpos anti-netrina 1) en el día d, y C indica el volumen promedio del grupo tratado con el isotipo de control. Una inhibición del crecimiento tumoral < 50% se considera significativa.

Xenoinjerto de línea celular humana	Anticuerpo	% TGI	Día d después del tratamiento
GRANTE-519	Murino 4C11	63	40
H358	4C11 humanizado HUM03	56	40
A549	4C11 humanizado HUM03	40	47
OCYI3	4C11 humanizado HUM03	33	20

[0143] Los anticuerpos murinos y humanizados de la presente invención tenían efectos inhibidores de crecimiento tumoral eficientes.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NETRIS PHARMA

10 <120> Anticuerpo anti-netrina-1 novedoso

<130> BET 14L3009

<160> 36

15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 604

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

25

<221> SEÑAL

<222> (1)..(24)

<220>

30

<221> MISC\_FEATURE

<222> (339)..(381)

<223> epítipo lineal

<400> 1

35

Met Met Arg Ala Val Trp Glu Ala Leu Ala Ala Leu Ala Ala Val Ala  
1 5 10 15

40

Cys Leu Val Gly Ala Val Arg Gly Gly Pro Gly Leu Ser Met Phe Ala  
20 25 30

45

Gly Gln Ala Ala Gln Pro Asp Pro Cys Ser Asp Glu Asn Gly His Pro  
35 40 45

50

Arg Arg Cys Ile Pro Asp Phe Val Asn Ala Ala Phe Gly Lys Asp Val  
50 55 60

55

Arg Val Ser Ser Thr Cys Gly Arg Pro Pro Ala Arg Tyr Cys Val Val  
65 70 75 80

60

Ser Glu Arg Gly Glu Glu Arg Leu Arg Ser Cys His Leu Cys Asn Ala  
85 90 95

60

Ser Asp Pro Lys Lys Ala His Pro Pro Ala Phe Leu Thr Asp Leu Asn  
100 105 110

ES 2 770 620 T3

Asn Pro His Asn Leu Thr Cys Trp Gln Ser Glu Asn Tyr Leu Gln Phe  
 115 120 125  
 5  
 Pro His Asn Val Thr Leu Thr Leu Ser Leu Gly Lys Lys Phe Glu Val  
 130 135 140  
 10 Thr Tyr Val Ser Leu Gln Phe Cys Ser Pro Arg Pro Glu Ser Met Ala  
 145 150 155 160  
 15 Ile Tyr Lys Ser Met Asp Tyr Gly Arg Thr Trp Val Pro Phe Gln Phe  
 165 170 175  
 20 Tyr Ser Thr Gln Cys Arg Lys Met Tyr Asn Arg Pro His Arg Ala Pro  
 180 185 190  
 Ile Thr Lys Gln Asn Glu Gln Glu Ala Val Cys Thr Asp Ser His Thr  
 195 200 205  
 25 Asp Met Arg Pro Leu Ser Gly Gly Leu Ile Ala Phe Ser Thr Leu Asp  
 210 215 220  
 30 Gly Arg Pro Ser Ala His Asp Phe Asp Asn Ser Pro Val Leu Gln Asp  
 225 230 235 240  
 35 Trp Val Thr Ala Thr Asp Ile Arg Val Ala Phe Ser Arg Leu His Thr  
 245 250 255  
 40 Phe Gly Asp Glu Asn Glu Asp Asp Ser Glu Leu Ala Arg Asp Ser Tyr  
 260 265 270  
 45 Phe Tyr Ala Val Ser Asp Leu Gln Val Gly Gly Arg Cys Lys Cys Asn  
 275 280 285  
 Gly His Ala Ala Arg Cys Val Arg Asp Arg Asp Asp Ser Leu Val Cys  
 290 295 300  
 50 Asp Cys Arg His Asn Thr Ala Gly Pro Glu Cys Asp Arg Cys Lys Pro  
 305 310 315 320  
 55 Phe His Tyr Asp Arg Pro Trp Gln Arg Ala Thr Ala Arg Glu Ala Asn  
 325 330 335  
 60 Glu Cys Val Ala Cys Asn Cys Asn Leu His Ala Arg Arg Cys Arg Phe  
 340 345 350  
 Asn Met Glu Leu Tyr Lys Leu Ser Gly Arg Lys Ser Gly Gly Val Cys  
 355 360 365  
 65 Leu Asn Cys Arg His Asn Thr Ala Gly Arg His Cys His Tyr Cys Lys  
 370 375 380



ES 2 770 620 T3

Glu Gly Tyr Tyr Arg Asp Met Gly Lys Pro Ile Thr His Arg Lys Ala  
 385 390 395 400  
 5 Cys Lys Ala Cys Asp Cys His Pro Val Gly Ala Ala Gly Lys Thr Cys  
 405 410 415  
 10 Asn Gln Thr Thr Gly Gln Cys Pro Cys Lys Asp Gly Val Thr Gly Ile  
 420 425 430  
 15 Thr Cys Asn Arg Cys Ala Lys Gly Tyr Gln Gln Ser Arg Ser Pro Ile  
 435 440 445  
 20 Ala Pro Cys Ile Lys Ile Pro Val Ala Pro Pro Thr Thr Ala Ala Ser  
 450 460  
 Ser Val Glu Glu Pro Glu Asp Cys Asp Ser Tyr Cys Lys Ala Ser Lys  
 465 470 475 480  
 25 Gly Lys Leu Lys Ile Asn Met Lys Lys Tyr Cys Lys Lys Asp Tyr Ala  
 485 490 495  
 30 Val Gln Ile His Ile Leu Lys Ala Asp Lys Ala Gly Asp Trp Trp Lys  
 500 505 510  
 35 Phe Thr Val Asn Ile Ile Ser Val Tyr Lys Gln Gly Thr Ser Arg Ile  
 515 520 525  
 40 Arg Arg Gly Asp Gln Ser Leu Trp Ile Arg Ser Arg Asp Ile Ala Cys  
 530 535 540  
 Lys Cys Pro Lys Ile Lys Pro Leu Lys Lys Tyr Leu Leu Leu Gly Asn  
 545 550 555 560  
 45 Ala Glu Asp Ser Pro Asp Gln Ser Gly Ile Val Ala Asp Lys Ser Ser  
 565 570 575  
 50 Leu Val Ile Gln Trp Arg Asp Thr Trp Ala Arg Arg Leu Arg Lys Phe  
 580 585 590  
 55 Gln Gln Arg Glu Lys Lys Gly Lys Cys Lys Lys Ala  
 595 600

<210> 2  
 <211> 1817  
 60 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 65 atgatgcgcg cagtgtggga ggcgctggcg gcgctggcgg cggtggcgtg cctggtgggc 60  
 gcggtgcgcg gcgggcccgg gctcagcatg ttcgcgggcc aggcggcgca gcccgatccc 120  
 tgctcggacg agaacggcca cccgcgccgc tgcattcccgg actttgtcaa tgcggccttc 180

ES 2 770 620 T3

ggcaaggacg tgcgctgtc cagcacctgc ggccggcccc cggcgcgcta ctgctgtgtg 240  
 agcgaagcgcg gcgaggagcg gctgctctcg tgccacctct gcaacgcgctc cgaccccaag 300  
 5 aaggcgcacc cgcccgcctt cctcaccgac ctcaacaacc cgcacaacct gacgtgctgg 360  
 cagtccgaga actacctgca gttcccgcac aacgtcacgc tcacactgtc cctcggcaag 420  
 10 aagttcgaag tgacctacgt gagcctgcag ttctgctcgc cgcggcccga gtccatggcc 480  
 atctacaagt ccatggacta cgggcgacg tgggtgccct tccagttcta ctccacgcag 540  
 tgccgcaaga tgtacaaccg gccgcaccgc gcgccatca ccaagcagaa cgagcaggag 600  
 15 gccgtgtgca ccgactcgca caccgacatg cgcccgtctt cgggcggcct catcgccttc 660  
 agcacgctgg acgggcggcc ctcggcgcac gacttcgaca actcgcccgt gctgcaggac 720  
 20 tgggtcacgg ccacagacat ccgctgtggc ttccagccgc tgacacggt cggcgacgag 780  
 aacgaggacg actcggagct ggcgcgcgac tcgtacttct acgcggtgtc cgacctgcag 840  
 gtgggcggcc ggtgcaagtg caacggccac gcggcccgt gcgtgcgca ccgcgacgac 900  
 25 agcctggtgt gcgactgcag gcacaacacg gccggcccgg agtgcgaccg ctgcaagccc 960  
 ttccactacg accggccctg gcagcgcgcc acagcccgcg aagccaacga gtgctgtggc 1020  
 30 tgtaactgca acctgcatgc ccggcgctgc cgcttcaaca tggagctcta caagctttcg 1080  
 gggcgcaaga gcggaggtgt ctgcctcaac tgtcgccaca acaccgccgg ccgccactgc 1140  
 cactactgca aggagggcta ctaccgcgac atgggcaagc ccatcaccca ccggaaggcc 1200  
 35 tgcaaagcct gtgattgcca ccctgtgggt gctgctggca aaacctgcaa ccaaaccacc 1260  
 ggccagtgtc cctgcaagga cggcgtgacg ggtatcacct gcaaccgctg cgccaaaggc 1320  
 40 taccagcaga gccgctctcc catcgcccc tgcataaaga tccctgtagc gccgccgacg 1380  
 actgcagcca gcagcgtgga ggagcctgaa gactgcgatt cctactgcaa ggcctccaag 1440  
 gggaaagctga agattaacat gaaaaagtac tgcaagaagg actatgccgt ccagatccac 1500  
 45 atcctgaagg cggacaaggc gggggactgg tggaaagtca cggatgaacat catctccgtg 1560  
 tataagcagg gcacgagccg catccgccgc ggtgaccaga gcctgtggat ccgctcgcgg 1620  
 50 gacatcgctt gcaagtgtcc caaaatcaag cccctcaaga agtacctgct gctgggcaac 1680  
 gcggaggact ctccggacca gagcggcatc gtggccgata aaagcagcct ggtgatccag 1740  
 tggcgggaca cgtgggcgcg gcggctgctc aagttccagc agcgtgagaa gaagggaag 1800  
 55 tgcaagaagg cctagcg 1817

<210> 3  
 60 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 65 Val Ala Cys Asn Cys Asn Leu His Ala Arg Arg Cys Arg Phe Asn Met  
 1 5 10 15

ES 2 770 620 T3

Glu Leu Tyr Lys Leu Ser Gly Arg Lys Ser Gly Gly Val Cys Leu Asn  
 20 25 30

5 Cys Arg His Asn Thr Ala Gly Arg His Cys His  
 35 40

10 <210> 4  
 <211> 129  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 4  
 gtggcctgta actgcaacct gcatgcccgg cgctgcccgt tcaacatgga gctctacaag 60  
 ctttcggggc gcaagagcgg aggtgtctgc ctcaactgtc gccacaacac cgccggccgc 120  
 20 cactgccat 129

<210> 5  
 <211> 8  
 25 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 5

30 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn  
 1 5

<210> 6  
 35 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 6

40 Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr  
 1 5

45 <210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 50 <400> 7

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr  
 1 5

55 <210> 8  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 60 <400> 8

Gln ser val ser Asn Asp  
 1 5

65 <210> 9  
 <211> 9

ES 2 770 620 T3

<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 9

5 Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp Thr  
1 5

10 <210> 10  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (26)..(33)  
<223> CDR según IGMT

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (51)..(58)  
<223> CDR según IGMT

25 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (97)..(105)  
<223> CDR según IGMT

30 <400> 10

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15

35 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

40 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

45 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

50 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

55 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

60 Thr Val Ser Ala  
115

65 <210> 11  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

ES 2 770 620 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <222> (27)..(32)  
 <223> CDR según IGMT

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (50)..(52)  
 <223> CDR según IGMT

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 15 <222> (89)..(97)  
 <223> CDR según IGMT

<400> 11

20 Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly  
 1 5 10 15

25 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 30 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

35 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala  
 65 70 75 80

40 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp  
 85 90 95

45 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 12  
 <211> 440  
 50 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 55 <222> (26)..(33)  
 <223> CDR según IGMT

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 60 <222> (51)..(58)  
 <223> CDR según IGMT

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 65 <222> (97)..(105)  
 <223> CDR según IGMT

ES 2 770 620 T3

<400> 12

1 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 5 1 5 10  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 10 20 25 30  
 10 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 15 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 20 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 25 Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 30 Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala  
 115 120 125  
 35 Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140  
 40 Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser Asp  
 165 170 175  
 45 Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Pro Arg Pro  
 180 185 190  
 50 Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys  
 195 200 205  
 55 Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile  
 210 215 220  
 60 Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val  
 245 250 255  
 65 Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val  
 260 265 270

ES 2 770 620 T3

5 Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln  
 275 280 285  
 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln  
 290 295 300  
 10 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala  
 305 310 315 320  
 15 Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro  
 325 330 335  
 20 Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala  
 340 345 350  
 25 Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu  
 355 360 365  
 30 Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr  
 370 375 380  
 35 Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe  
 405 410 415  
 40 Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys  
 420 425 430  
 45 Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 435 440  
 50 <210> 13  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(32)  
 <223> CDR según IGMT  
 60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (50)..(52)  
 <223> CDR según IGMT  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (89)..(97)  
 <223> CDR según IGMT  
 <400> 13

ES 2 770 620 T3

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly  
 1 5 10  
 5 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30  
 10 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 15 Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
 20 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp  
 85 90 95  
 25 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala  
 100 105 110  
 30 Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly  
 115 120 125  
 35 Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile  
 130 135 140  
 40 Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser  
 165 170 175  
 45 Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr  
 180 185 190  
 50 Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser  
 195 200 205  
 55 Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210

<210> 14  
 <211> 101  
 60 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> variante humanizada  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE



ES 2 770 620 T3

<222> (27)..(32)  
<223> CDR según IGMT

<220>  
5 <221> MISC\_FEATURE  
<222> (50)..(52)  
<223> CDR según IGMT

<220>  
10 <221> MISC\_FEATURE  
<222> (89)..(97)  
<223> CDR según IGMT

<400> 14

15  
1 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
5 10 15

20 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
20 25 30

25 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

30 Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

65 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser  
70 75 80

35 Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp  
85 90 95

40 Thr Phe Gly Gln Gly  
100

<210> 15  
45 <211> 101  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
50 <223> variante humanizada

<220>  
55 <221> MISC\_FEATURE  
<222> (27)..(32)  
<223> CDR según IGMT

<220>  
60 <221> MISC\_FEATURE  
<222> (50)..(52)  
<223> CDR según IGMT

<220>  
65 <221> MISC\_FEATURE  
<222> (89)..(97)  
<223> CDR según IGMT

<400> 15

ES 2 770 620 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 5 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30  
 10 Val Ala Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile  
 35 40 45  
 15 Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 20 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp  
 85 90 95  
 25 Thr Phe Gly Gln Gly  
 100  
 30 <210> 16  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> variante humanizada  
 <220>  
 40 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(32)  
 <223> CDR según IGMT  
 <220>  
 45 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (50)..(52)  
 <223> CDR según IGMT  
 <220>  
 50 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (89)..(97)  
 <223> CDR según IGMT  
 <400> 16  
 55 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 60 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30  
 65 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

ES 2 770 620 T3

50 55 60

5 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser  
65 70 75 80

10 Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp  
85 90 95

15 Thr Phe Gly Gln Gly  
100

15 <210> 17  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> variante humanizada

25 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (27)..(32)  
<223> CDR según IGMT

30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (50)..(52)  
<223> CDR según IGMT

35 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (89)..(97)  
<223> CDR según IGMT

40 <400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

45 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
20 25 30

50 Val Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile  
35 40 45

55 Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

60 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala  
65 70 75 80

65 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly  
100

ES 2 770 620 T3

<210> 18  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> variante humanizada  
  
 10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(32)  
 <223> CDR según IGMT  
  
 15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (50)..(52)  
 <223> CDR según IGMT  
  
 20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (89)..(97)  
 <223> CDR según IGMT  
  
 25  
 <400> 18  
  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 30  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30  
 35  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 40 Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 45 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser  
 65 70 75 80  
 50  
 Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp  
 85 90 95  
 55  
 Thr Phe Gly Gln Gly  
 100  
  
 55  
 <210> 19  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> variante humanizada  
  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(32)  
 <223> CDR según IGMT

ES 2 770 620 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (50)..(52)  
 5 <223> CDR según IGMT  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (89)..(97)  
 10 <223> CDR según IGMT  
  
 <400> 19  
  
 15 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 20 25 30  
  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 25 35 40 45  
  
 Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
  
 30 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80  
  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp  
 35 85 90 95  
  
 Thr Phe Gly Gln Gly  
 40 100  
  
 <210> 20  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> variante humanizada  
  
 50  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (26)..(33)  
 <223> CDR según IGMT  
 55  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (51)..(58)  
 <223> CDR según IGMT  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (97)..(105)  
 <223> CDR según IGMT  
 65  
 <400> 20  
  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

# ES 2 770 620 T3

```

1           5           10           15
5 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
  20                25

10 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
    35                40                45

15 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
   50                55                60

20 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
   65                70                75                80

25 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                90                95

30 Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
   100                105

    <210> 21
    <211> 109
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> variante humanizada
35

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (26)..(33)
40 <223> CDR según IGMT

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (51)..(58)
45 <223> CDR según IGMT

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (97)..(105)
50 <223> CDR según IGMT

    <400> 21

55 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
   1           5           10           15

60 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
      20                25                30

65 Asn Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
    35                40                45

70 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
   50                55                60

```

ES 2 770 620 T3

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

5 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

10 Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105

<210> 22  
15 <211> 109  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> variante humanizada

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
25 <222> (26)..(33)  
<223> CDR según IGMT

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
30 <222> (51)..(58)  
<223> CDR según IGMT

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
35 <222> (97)..(105)  
<223> CDR según IGMT

<400> 22

40 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

45 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

50 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

55 Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val  
65 70 75 80

60 Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

65 Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105

<210> 23

ES 2 770 620 T3

<211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> variante humanizada

<220>  
 10 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (26)..(33)  
 <223> CDR según IGMT

<220>  
 15 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (51)..(58)  
 <223> CDR según IGMT

<220>  
 20 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (97)..(105)  
 <223> CDR según IGMT

<400> 23  
 25 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

30 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

35 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

40 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

45 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

50 Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105

<210> 24  
 55 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 60 <223> variante humanizada

<220>  
 65 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (26)..(33)  
 <223> CDR según IGMT

<220>



ES 2 770 620 T3

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (51)..(58)  
 <223> CDR según IGMT  
 5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (97)..(105)  
 <223> CDR según IGMT  
 10 <400> 24  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 15 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 20 25 30  
 20 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35  
 25 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 30 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80  
 35 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 35 Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105  
 40 <210> 25  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> variante humanizada  
 <220>  
 50 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (26)..(33)  
 <223> CDR según IGMT  
 <220>  
 55 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (51)..(58)  
 <223> CDR según IGMT  
 <220>  
 60 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (97)..(105)  
 <223> CDR según IGMT  
 <400> 25  
 65 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

ES 2 770 620 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

5 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

10 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

15 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

20 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105

25 <210> 26  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> variante humanizada

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (26)..(33)  
 <223> CDR según IGMT

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (51)..(58)  
 <223> CDR según IGMT

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (97)..(105)  
 <223> CDR según IGMT

50 <400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

55 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

60 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

65 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

ES 2 770 620 T3

```

65                70                75                80

5  Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
   85                90

10 Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
   100                105

15 <210> 27
   <211> 108
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

   <220>
   <223> variante humanizada

20
   <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (26)..(33)
   <223> CDR según IGMT

25
   <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (51)..(58)
   <223> CDR según IGMT

30
   <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (97)..(105)
   <223> CDR según IGMT

35 <400> 27

   Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
   1                5                10                15

40 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
   20                25                30

45 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
   35                40                45

50 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
   50                55                60

55 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
   65                70                75                80

60 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
   85                90

65 Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
   100                105

   <210> 28
   <211> 5
   <212> PRT

```

ES 2 770 620 T3

<213> Mus musculus

<400> 28

5 Ser Tyr Asn Met His  
1 5

<210> 29

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

15

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

20 Gly

<210> 30

25 <211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

30

Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr  
1 5

35 <210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

40 <400> 31

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala  
1 5 10

45

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

50

<400> 32

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr  
1 5

55

<210> 33

<211> 25

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador directo para PCR del gen de netrina-1 humano

65 <400> 33

aaaagtactg caagaaggac tatgc

25

ES 2 770 620 T3

<210> 34  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> cebador inverso para PCR del gen de netrina-1 humano  
 <400> 34  
 10 ccctgcttat acacggagat g 21  
  
 <210> 35  
 <211> 22  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 35  
 20 Ala Arg Arg Cys Arg Phe Asn Met Glu Leu Tyr Lys Leu Ser Gly Arg  
 1 5 10 15  
  
 Lys Ser Gly Gly Val Cys  
 25 20  
  
 <210> 36  
 <211> 66  
 30 <212> ADN  
 <213> ADNc  
 <400> 36  
 35 gcccggcgct gccgcttcaa catggagctc tacaagcttt cggggcgcaa gagcggaggt 60  
 gtctgc 66

**REIVINDICACIONES**

1. Polipéptido aislado o purificado  
 - que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 3, o una variante de polipéptido que tiene al menos 85% de identidad con la SEQ ID NO: 3 de longitud completa de, o una variante que consiste en un fragmento de al menos 20 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3, o  
 - codificado por el ADNc de la secuencia de SEQ ID NO: 4, o una variante de la misma en virtud de la degeneración del código genético, o una variante de ADNc que tiene al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO: 4 de longitud completa.
2. Polipéptido, según la reivindicación 1, cuya secuencia es tal como se representa en SEQ ID NO: 35, o una variante de polipéptido que tiene al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO: 35 de longitud completa.
3. Polipéptido, según la reivindicación 1, codificado por el ADNc de la secuencia de SEQ ID NO: 36 o una variante de la misma en virtud de la degeneración del código genético, o una variante de ADNc que tiene al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO: 36 de longitud completa.
4. Polipéptido, según la reivindicación 1, que consiste en un polipéptido que tiene al menos 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3 de longitud completa, o un polipéptido que consiste en un fragmento de al menos 25 o 30 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3.
5. ADNc de la secuencia de SEQ ID NO: 4 o 36, o una variante de las mismas en virtud de la degeneración del código genético, o una variante de ADNc que tiene al menos un 85% de identidad con las SEQ ID NO: 4 o 36 de longitud completa.
6. ADNc, según la reivindicación 5, que tiene al menos 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad con las SEQ ID NO: 4 o 36 de longitud completa.
7. Uso de un polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de un anticuerpo monoclonal.
8. Anticuerpo monoclonal que se une a netrina-1 que:
  - (i) se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o 35 o una variante de polipéptido que tiene al menos un 85% de identidad con la SEQ ID NO: 3 o 35 o una variante de polipéptido que consiste en un fragmento de al menos 20 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3; o
  - (2i) comprende una CDR1-H de la secuencia de SEQ ID NO: 5, una CDR2-H de la secuencia de SEQ ID NO: 6, una CDR3-H de la secuencia de SEQ ID NO: 7, y una CDR1-L de la secuencia de SEQ ID NO: 8, una CDR2-L de la secuencia de YAS y una CDR3-L de la secuencia de SEQ ID NO: 9; o
  - (3i) comprende una CDR1-H de la secuencia de SEQ ID NO: 28, una CDR2-H de la secuencia de SEQ ID NO: 29, una CDR3-H de la secuencia de SEQ ID NO: 30, y una CDR1-L de la secuencia de SEQ ID NO: 31, una CDR2-L de la secuencia de SEQ ID NO: 32 y una CDR3-L de la secuencia de SEQ ID NO: 9,
 en el que el anticuerpo tiene la propiedad de unirse a netrina-1 e inducir la muerte celular o apoptosis de una célula tumoral a través de un receptor UNC5 o un receptor DCC.
9. Anticuerpo monoclonal que se une a netrina-1, según la reivindicación 8, cuyo anticuerpo que se define en (i) se une específicamente a un polipéptido que tiene al menos un 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3.
10. Anticuerpo monoclonal que se une a netrina-1, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, que es un fragmento de unión a un epítipo del mismo.
11. Anticuerpo monoclonal que se une a netrina-1, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 11, 12 o 13, preferiblemente ambas secuencias SEQ ID NO: 10 y 11, o SEQ ID NO: 12 y 13.
12. Anticuerpo monoclonal que se une a netrina-1, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14 a 19 y/o del grupo de SEQ ID NO: 20 a 27, preferiblemente que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 14 a 19 y una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 20 a 27.
13. Anticuerpo monoclonal que se une a netrina-1, según la reivindicación 12, que comprende un par de secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre los pares de SEQ ID NO: 14 y 20; 15 y 21; 16 y 22; 17 y 23; 17 y 24; 16 y 25; 17 y 26; 17 y 22; 18 y 25; y 16 y 21.
14. Anticuerpo monoclonal que se une a netrina-1, según la reivindicación 13, que comprende además un dominio constante kappa humano en la cadena ligera, y un dominio constante de IgG1 humana en la cadena pesada.

15. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, y un vehículo, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 5 16. Composición, según la reivindicación 15, para su uso en el tratamiento de un sujeto contra el cáncer, en la que el cáncer tiene células tumorales que expresan un receptor de netrina-1.
17. Composición, según la reivindicación 15, para su uso en el tratamiento de un sujeto contra el cáncer, en la que el cáncer tiene células tumorales que expresan un receptor de netrina-1 y netrina-1 o células tumorales que expresan  
10 un receptor de netrina-1 dentro de las células del estroma que expresan netrina-1.
18. Composición para su uso, según la reivindicación 16 o 17, en la que el cáncer es uno en el que las células tumorales expresan o sobreexpresan un receptor de netrina-1, en particular de la clase UNC5, especialmente UNC5B y/o UNC5A, y/o DCC.  
15
19. Composición para su uso, según la reivindicación 16, en la que la composición que comprende un anticuerpo monoclonal es para ser utilizado en combinación con un fármaco quimioterapéutico en un paciente.
20. Composición para su uso, según la reivindicación 19, en la que el fármaco quimioterapéutico es doxorrubicina, 5-  
20 fluorouracilo (5FU), paclitaxel o cisplatino.

Figura 1

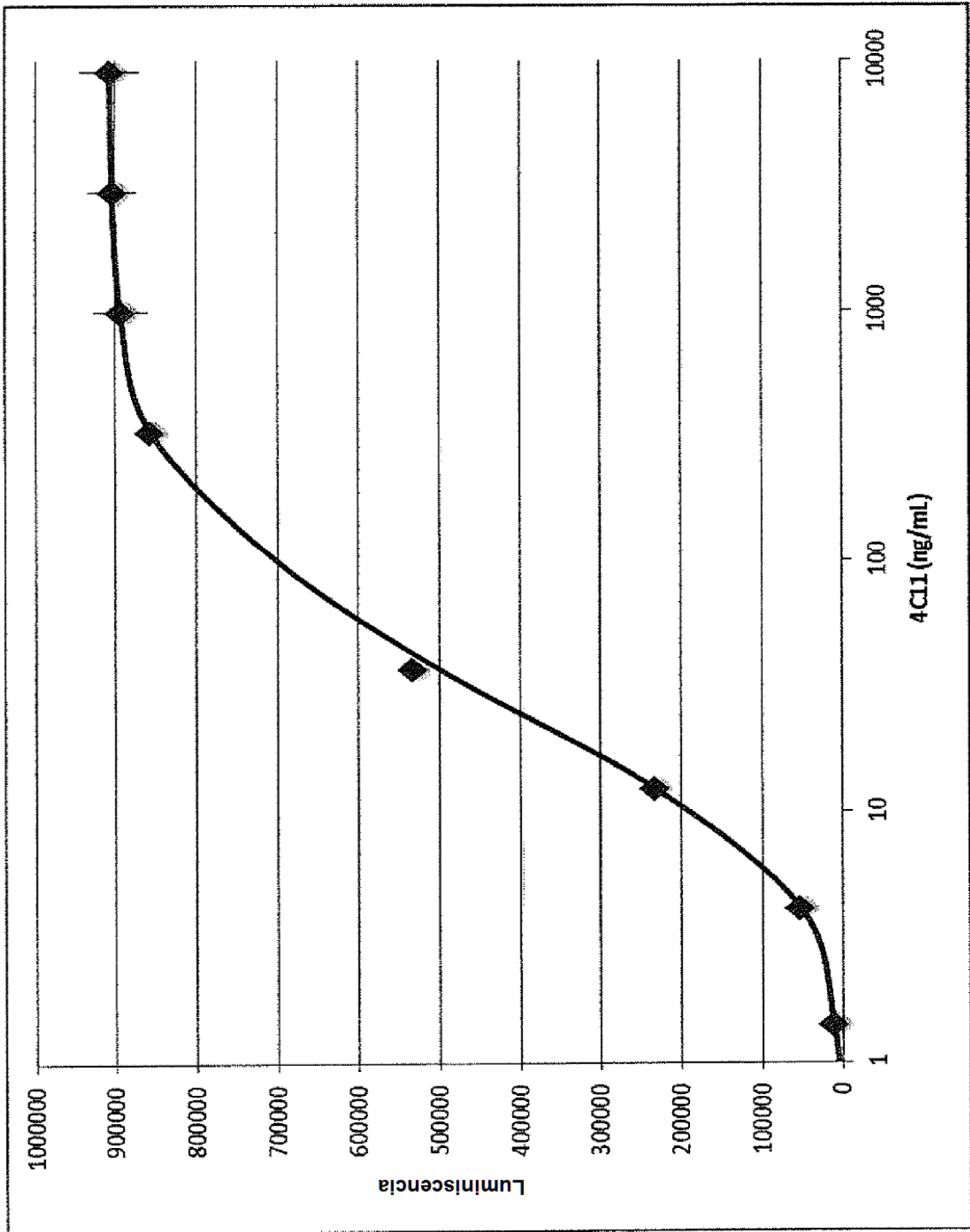




Figura 2

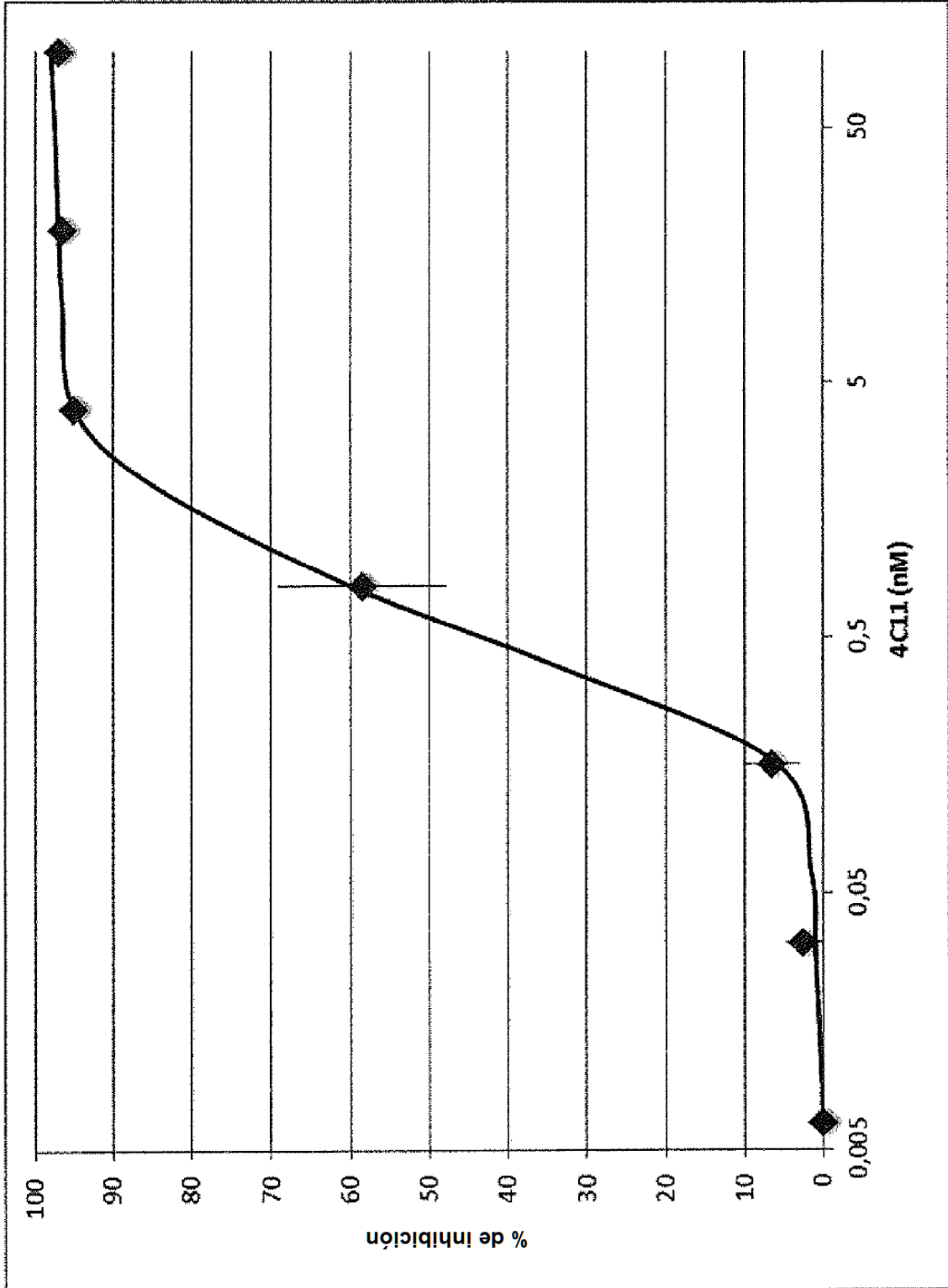


Figura 3

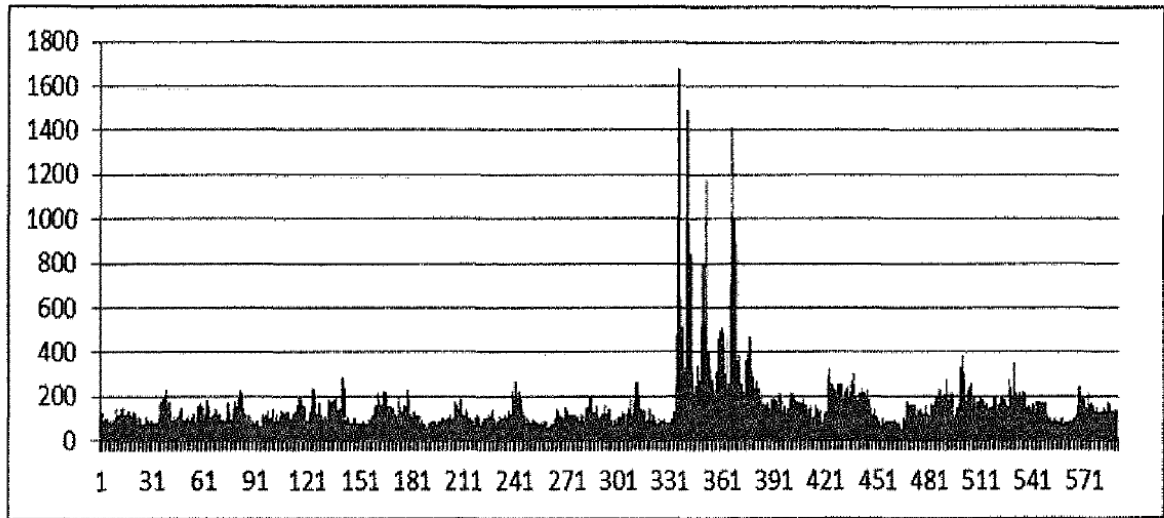


Figura 4

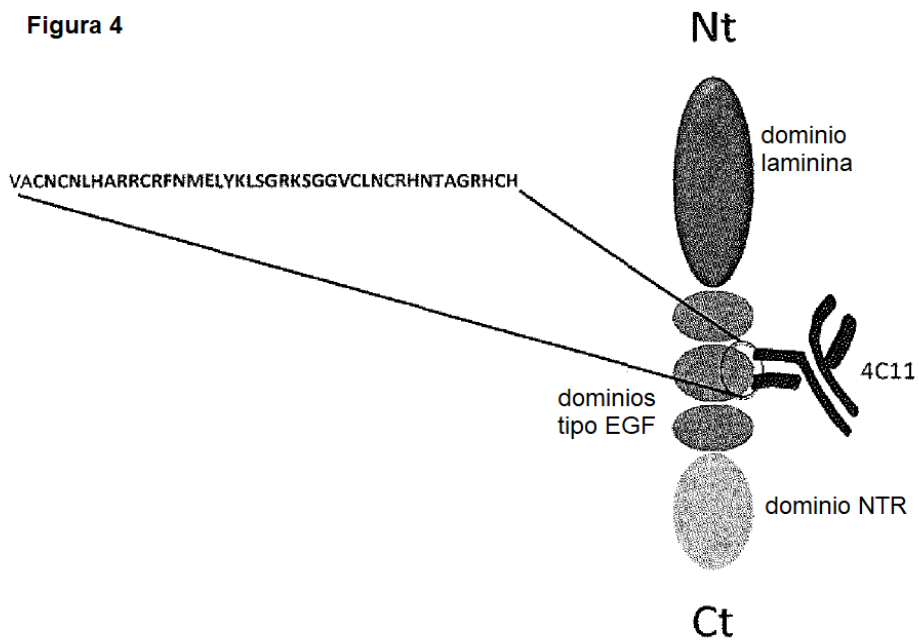


Figura 5

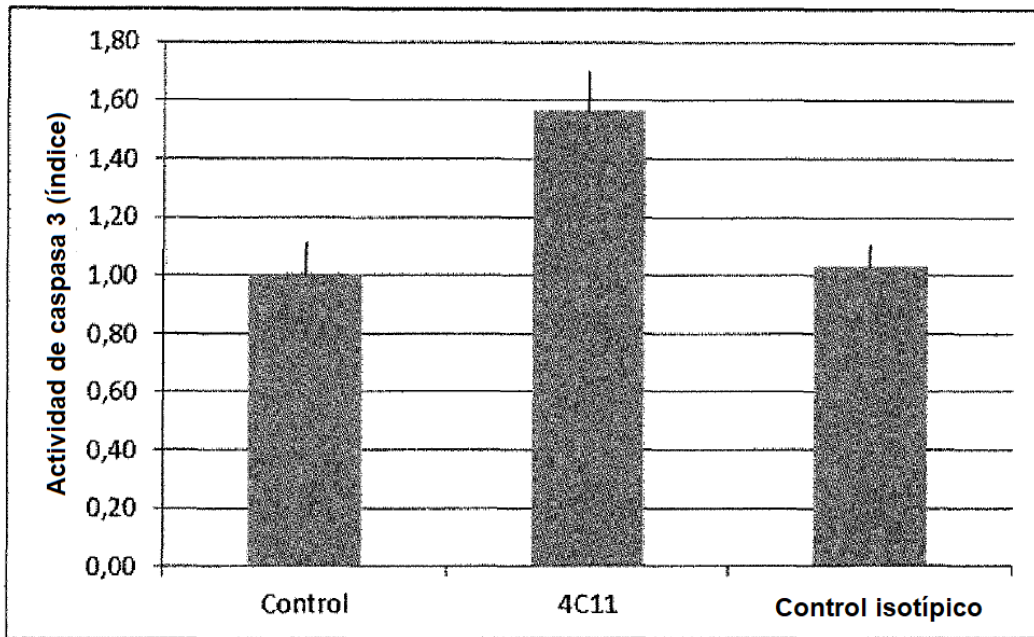


Figura 6

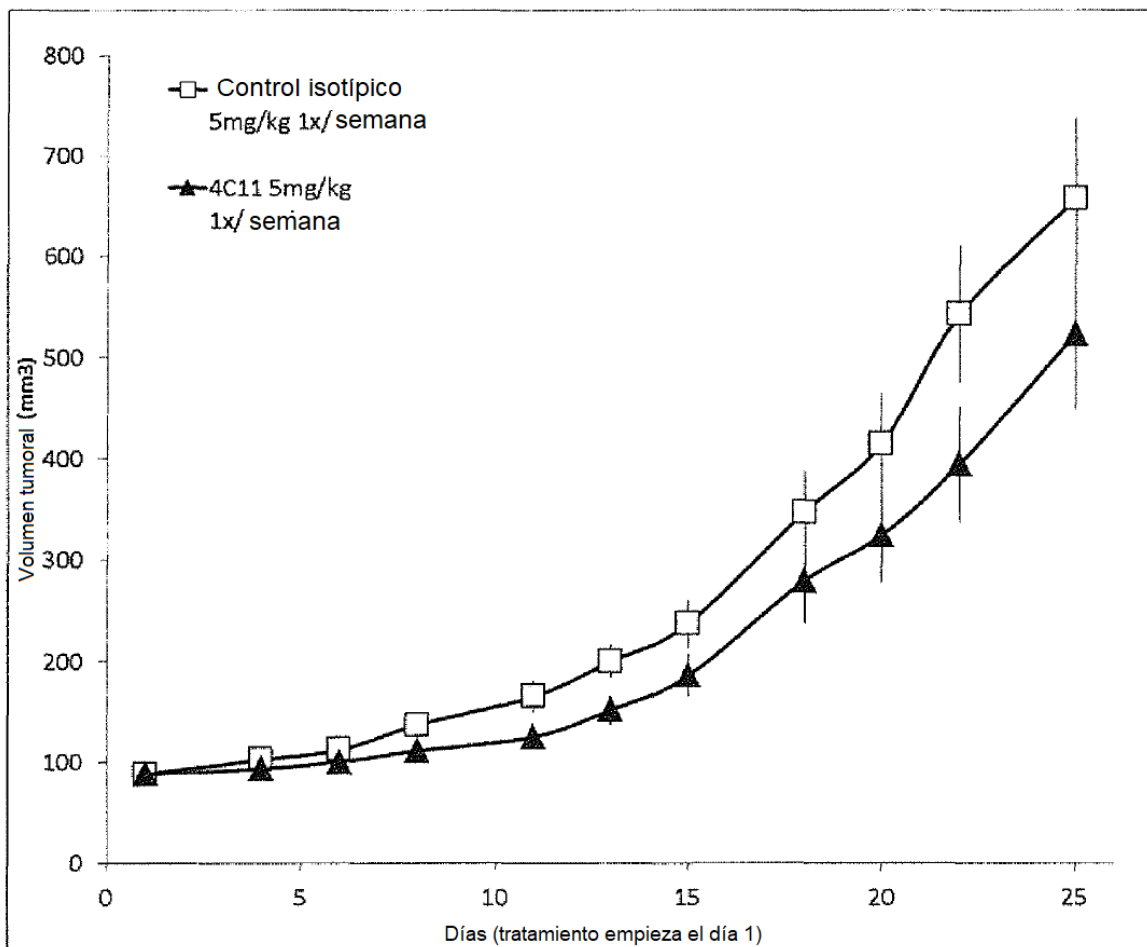


Figura 7

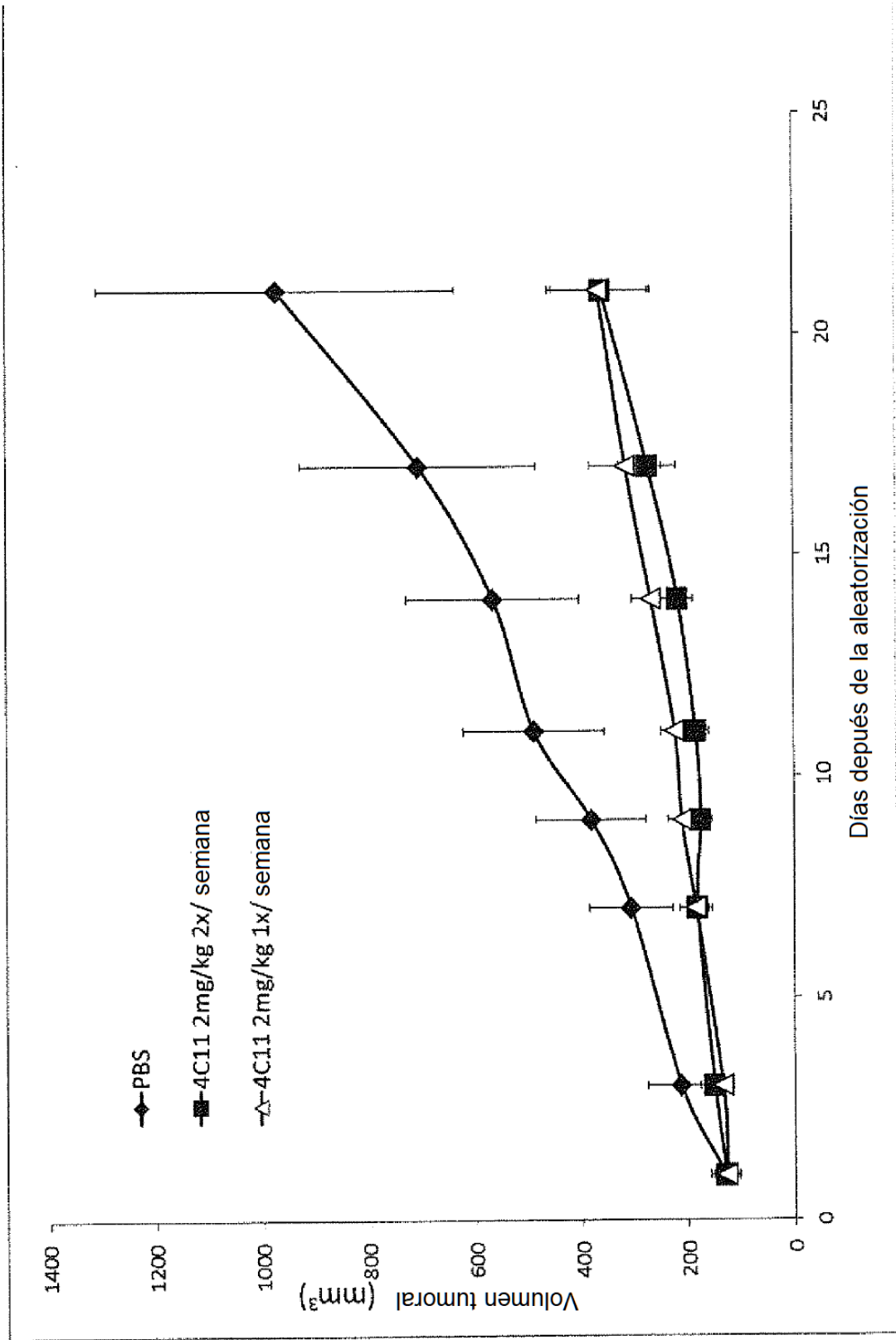


Figura 8

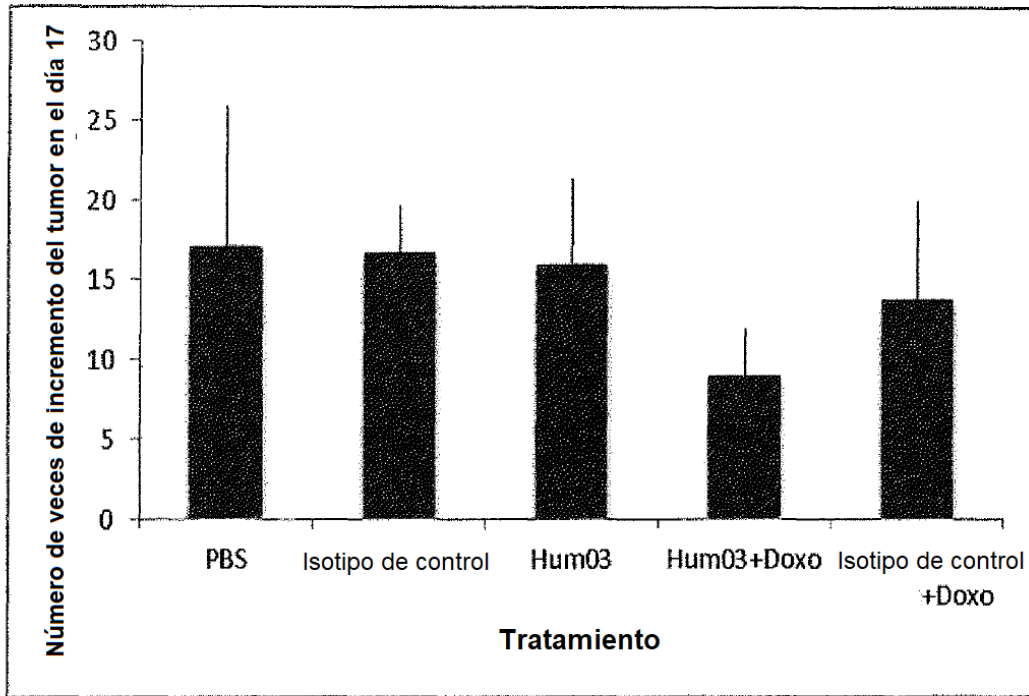


Figura 9

