

ANTICUERPOS ANTI-UNC5C

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se relaciona con anticuerpos y fragmentos de estos capaces de unirse al UNC5C, y particularmente, aunque no exclusivamente, a nuevos anticuerpos terapéuticos. También se describen métodos para usar anticuerpos anti-UNC5C en el tratamiento
10 de enfermedades neurodegenerativas.

ANTECEDENTES

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima
15 que la demencia es actualmente la séptima causa principal de muerte entre todas las enfermedades y una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas mayores a nivel mundial.

La enfermedad de Alzheimer (AD, por sus siglas en
20 inglés) es la causa más común de demencia que afecta a 1 de cada 14 individuos mayores de 65 años (Prince, M et al (2014)). La AD es un trastorno neurodegenerativo progresivo con atrofia cerebral que conduce a un deterioro cognitivo progresivo, que incluye dificultad para la memoria a corto
25 plazo, deterioro del habla expresiva, del procesamiento visoespacial y del procesamiento ejecutivo (agilidad

mental) (Knopman, D.S., et al. (2021)). Se están buscando activamente nuevas terapias para la enfermedad de Alzheimer para modificar el curso de la enfermedad. Los candidatos actuales que se dirigen a la inmunidad beta-amiloide, Tau e innata en el cerebro han mostrado en algunos casos efectos farmacodinámicos sobre los mecanismos patológicos en ensayos clínicos, pero aún no han demostrado una modificación convincente de la enfermedad en ensayos clínicos en etapa avanzada hasta la fecha (Golde TE (2022)).

10 La demencia frontotemporal (FTD, por sus siglas en inglés) es una forma común de demencia en menores de 65 años y se espera que aumente su prevalencia a medida que la población envejece (Rosso SM, et al. 2003). La FTD es un término general para un grupo de enfermedades
15 neurodegenerativas caracterizadas por déficits progresivos en el comportamiento, la función ejecutiva y el lenguaje (Bang J, et al. 2015). Si bien nuestra comprensión de la patofisiología ha mejorado considerablemente en la última década, se ha sugerido que el desarrollo de fármacos
20 modificadores de la enfermedad aún está a años de distancia (Panza, F., et al. (2020)).

 La AD y la FTD forman parte de un espectro de demencias con etiología y patología relacionadas que también incluye la enfermedad de Parkinson (PD), la
25 demencia vascular y la encefalopatía traumática crónica (CTE, por sus siglas en inglés).

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es un subtipo de enfermedad de la neurona motora. Se trata de un trastorno neurodegenerativo que afecta principalmente al sistema de neuronas motoras, dando lugar a debilidad muscular y eventual parálisis (Hardiman, O., et al. (2017)). Actualmente no existe un tratamiento efectivo para la ELA. La ELA y la FTD se superponen clínica, radiológica, patológica y genéticamente, y entre 10 y 15 % de los pacientes con ELA reciben además un diagnóstico de FTD (Phukan J, et al. Lancet Neurol. 2007;6(11):994-100). Debido a la superposición mecanicista entre FTD y ELA, ambas enfermedades se consideran dos extremos de un espectro patológico, con síntomas predominantemente cognitivos en un extremo y disfunción de la neurona motora en el otro (Burrell JR et al. 2011).

Sigue existiendo la necesidad de mejorar las terapias modificadoras de enfermedades neurodegenerativas tales como AD, FTD y ELA.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos para UNC5C. Al estudiar las respuestas inmunitarias de individuos que muestran resiliencia a la neurodegeneración a pesar del aumento del riesgo de enfermedad, los presentes inventores identificaron una

secuencia convergente de dominio variable de cadena pesada (VH) que estaba presente en múltiples individuos resilientes y, por lo tanto, es probable que tuviera una función protectora contra la neurodegeneración. Esta VH se
5 emparejó con un dominio variable de cadena ligera (VL) y la deconvolución de diana para el anticuerpo resultante, ATL_5262, reveló que UNC5C era su diana. Pruebas adicionales de este anticuerpo mostraron que este anticuerpo compite con la netrina 1, ligando de UNC5C, por
10 la unión al UNC5C. Los presentes inventores identificaron además anticuerpos candidatos derivados de ATL_5262 mediante la modificación de la secuencia de cadena pesada. Estas modificaciones se realizaron para mejorar aún más las propiedades, sin limitarse a una inmunogenicidad
15 reducida, estabilidad mejorada, potencia de unión mejorada, y propiedades farmacocinéticas mejoradas. Estos nuevos anticuerpos con propiedades mejoradas incluyen anticuerpos que comprenden la cadena pesada de anticuerpos referidos en la presente como ATL_0005262, ATL_0005998,
20 ATL_0006001, ATL_0006002, ATL_0006003, ATL_0006036, ATL_0006039, ATL_0006177, ATL_0006178, ATL_0006187, ATL_0006291, ATL_0006530, ATL_0006531, ATL_0006532, ATL_0006533, ATL_0006534, ATL_0006535, ATL_0006536, ATL_0006537, ATL_0006538 y ATL_0006539. Las cadenas
25 pesadas de anticuerpos referidas en la presente como ATL_0005262; ATL_0006002; ATL_0006036; ATL_0006039,

ATL_0006177 y ATL_0006178 mostraron ser particularmente prometedores. Se espera que los anticuerpos descritos en la presente mejoren o reviertan la neurodegeneración, por ejemplo en enfermedades neurodegenerativas tales como FTD, AD y ELA, al unirse al UNC5C. En particular, es relevante señalar que las cadenas pesadas descritas en la presente y los anticuerpos derivados de estas se identificaron basados en la convergencia en individuos resilientes en cohortes de pacientes considerados, de cualquier otra manera, en riesgo de desarrollar enfermedad neurodegenerativa. Como tal convergencia es extremadamente improbable por casualidad, los anticuerpos están hasta cierto punto “biológicamente validados” como susceptibles de tener funciones terapéuticas.

En un primer aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de este que se une específicamente a la proteína UNC5C o un fragmento de esta, en donde el anticuerpo imita y/o compete con Netrina-1 para unirse al UNC5C, opcionalmente en donde la competencia con Netrina-1 se determina mediante ELISA.

Las modalidades del primer aspecto pueden tener una o más de las siguientes características opcionales.

El anticuerpo aislado puede unirse al UNC5C humano y/o de ratón, por ejemplo, el anticuerpo puede unirse al UNC5C humano con una EC50 de como máximo $9,81 \times 10^{-8}$ M, o como máximo 1×10^{-8} M, o como máximo $5,5 \times 10^{-9}$ M o como

máximo 9,7E-09M según se evalúa mediante ELISA (tal como la unión de rhUNC5C en placa).

El anticuerpo puede reducir la apoptosis mediada por UNC5C. Por ejemplo, el anticuerpo puede reducir la apoptosis neuronal mediada por UNC5C. El anticuerpo puede reducir la apoptosis (mediada por UNC5C) en neuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés). El anticuerpo puede reducir la apoptosis (mediada por UNC5C) en células de neuroblastoma, p. ej., células *SH-SY5Y*. La apoptosis puede medirse midiendo la caspasa 3/7.

El anticuerpo puede unirse selectivamente al UNC5C sobre otro o más receptores de netrina, por ejemplo, el anticuerpo puede unirse selectivamente al UNC5C sobre uno o más (o todos): neogenina, DCC y DSCAM, UNC5A, UNC5B, UNC5. El anticuerpo puede unirse al UNC5C de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 99 y a una variante UNC5C T835M de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 110.

El anticuerpo puede reducir la toxicidad beta-amiloide en las neuronas, por ejemplo, el anticuerpo puede reducir la muerte celular de las neuronas tratadas con beta-amiloide *in vitro* y/o reducir una señal de caspasa 3/7 en respuesta a la citotoxicidad inducida por beta-amiloide. El anticuerpo puede mejorar la salud sináptica. La salud sináptica mejorada puede evaluarse mediante: (i) un aumento de la expresión neuronal de una o más proteínas sinápticas

seleccionadas de: PSD95, sinaptofisina, sinapsina-1, sinaptotagmina-1, neurofilamento-L y GAP-43; y/o (ii) aumento del crecimiento y/o ramificación neuronal; (iii) aumento de la sincronidad de disparo y/o la frecuencia de disparo de las neuronas, p. ej., el anticuerpo puede aumentar el índice de sincronía y la frecuencia de disparo de las neuronas motoras con una mutación TDP43 Q331K.

El anticuerpo puede mejorar la función y/o supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. Una mejora en la función y/o supervivencia de la neurona dopaminérgica puede evaluarse mediante un rescate al menos parcial, por el anticuerpo, de los efectos de la haploinsuficiencia UNC5C o Netrina-1 sobre la inervación por neuronas dopaminérgicas a la corteza prefrontal medial, y/o contenido de dopamina en la corteza prefrontal medial. El anticuerpo puede reducir la neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas. Esto puede evaluarse midiendo la neurodegeneración tras la exposición a una neurotoxina tal como 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

El anticuerpo puede unirse a la región extracelular de UNC5C. En particular, el anticuerpo puede unirse a un epítipo en el dominio de inmunoglobulina N-terminal de UNC5C (también denominado “primer dominio de inmunoglobulina”). El anticuerpo puede unirse a uno o más residuos de UNC5C que están implicados en la unión de Netrina-1 al UNC5C. El anticuerpo puede unirse a un epítipo en UNC5C que comprende uno o más de, o todos, los siguientes residuos: Thr89, Gln90,

Gln102, Lys103, Val107, Asp108, Glu109, Arg110, Val111, Ile118, Arg120 de UNC5C cuando se numeran de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 99, opcionalmente en donde el anticuerpo se une a los residuos Thr89, Gln90, Gln102, Lys103, Val107, Glu109, Ile118, y Arg120 de UNC5C cuando se numeran de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 99.

El anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena pesada (VH) con las siguientes CDR: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 21 o la sec. con núm. de ident.: 22, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23, o un conjunto de CDR que contiene una o dos mutaciones de aminoácidos, opcionalmente sustituciones, en comparación con el conjunto anterior de CDR. Por lo tanto, el anticuerpo puede tener una VH que comprende la CDRH1, CDRH2 y CDRH3 o ATL_5262 o ATL6178, y variantes de estas (p. ej., ATL_6033, 6034, 6035, 6036, 6037, 6038, 6039).

El anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las siguientes secuencias marco: HFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 50, HFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 51, HFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 55 y HFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 62, o secuencias marco con una a cinco mutaciones, por ejemplo sustituciones, en comparación con las secuencias marco

anteriores. Las mutaciones en las secuencias marco pueden seleccionarse de las siguientes posiciones en la numeración IMGT estándar: HFWR2: posiciones 40, 49, HFWR3: posiciones 80, 82, 86 y/o en donde las sustituciones en las secuencias marco se seleccionan de las siguientes posiciones en la numeración IMGT estándar: HFWR2: en la posición 40: T40S, en la posición 49: R49G, HFWR3: en la posición 80: I80V, en la posición 82: T82K, en la posición 86: H86Q. Las mutaciones en las secuencias marco pueden no incluir una mutación en la posición 67 en la numeración IMGT estándar.

El anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las siguientes secuencias marco: HFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 50; HFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 51, 52, 53 o 54; HFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 55, 56, 57, 58 o 61; HFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 62. Por ejemplo, el anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las siguientes secuencias marco: HFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 50; HFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 52; HFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 61; y HFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 62.

El anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia seleccionada que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.: 1 (ATL_5262 VH), 5 (ATL_0006036_VH), 8 (ATL_0006039_VH), 91

(ATL_0006177_VH), y 93 (ATL_0006178_VH). Por ejemplo, el anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de: la sec. con
5 núm. de ident.: 91 (ATL_6177 VH); la sec. con núm. de ident.: 93 (ATL_6178 VH). El anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia seleccionada que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al
10 menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.: 1 (ATL_5262 VH), 5 (ATL_0006036_VH), 8 (ATL_0006039_VH), 91 (ATL_0006177_VH), y 93 (ATL_0006178_VH). Por ejemplo, el anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena pesada
15 (VH) que comprende una secuencia que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de: la sec. con núm. de ident.: 91 (ATL_6177 VH); la sec. con núm. de ident.: 93 (ATL_6178 VH).

20 El anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende CDRH1, CDRH2 y CDRH3 dentro de un marco de línea germinal, siempre que la posición 67 en la numeración IMGT estándar sea Q.

 El anticuerpo puede comprender un dominio
25 variable de cadena pesada (VH) con las siguientes CDR: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec.

con núm. de ident.: 115 o 116, CDRH2 que comprende la
secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:
117 o 118, y CDRH3 que comprende la secuencia de
aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 119 o 120,
5 opcionalmente en donde el anticuerpo comprende un dominio
variable de cadena pesada (VH) con las CDR de ATL_6187 VH
(sec. con núm. de ident.: 115, 117 y 119) o las CDR de
ATL_6191 VH (sec. con núm. de ident.: 116, 118 y 120).

El anticuerpo puede tener un dominio variable de
10 cadena pesada (VH) con las siguientes secuencias marco: HFWR1
de la sec. con núm. de ident.: 50; HFWR2 de la sec. con núm.
de ident.: 52 o 195; HFWR3 de la sec. con núm. de ident.:
196 o 197; HFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 198 o 62: o
secuencias marco que comprenden de 1 a 5 mutaciones, tales
15 como sustituciones, en comparación con estas secuencias
marco. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender un dominio
variable de cadena pesada (VH) con los HFWR de ATL_6187 VH
(sec. con núms. de ident.: 50, 52, 196, 198) o los HFWR de
ATL_6191 VH (sec. con núms. de ident.: 50, 195, 197, 62). El
20 dominio variable de cadena pesada (VH) puede comprender una
secuencia seleccionada que tiene al menos 80 %, al menos
85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de identidad de secuencia
con una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de
ident.: 112 (ATL_0006187 VH) y 113 (ATL_0006191 VH).

25 El anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de
las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo

comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) con las siguientes CDR: CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 24, 27, 30, 31 o 32, CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la
5 sec. con núm. de ident.: 34, y CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 40, 43, 46, 47, o un conjunto de CDR que contiene una, dos o tres mutaciones de aminoácidos, por ejemplo sustituciones comparadas con el conjunto anterior de las CDR. Por lo tanto,
10 el anticuerpo puede tener una VL con las CDR de cualquiera de ATL_5262; 6033; 6034; 6035; 6036; 6037; 6038; 6039; 6177; 6178; 5998; 6001; 6002; y 6003, y homólogos 6187 y 6191.

El anticuerpo aislado puede tener un dominio variable de cadena ligera (VL) con las siguientes secuencias
15 marco: LFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 63; 66; LFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 71; 73; 75; LFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 77; 80; y LFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 85; 87; 89; o un conjunto de las FWR que contiene de una a cinco sustituciones de aminoácidos en comparación
20 con el conjunto anterior de FWR. Por lo tanto, el anticuerpo puede tener una VL con la LFWR de cualquiera de ATL_5262; 6033; 6034; 6035; 6036; 6037; 6038; 6039; 6177; 6178; 5998; 6001; 6002; y 6003, y homólogos ATL6187 y 6191.

El anticuerpo puede tener un dominio variable de
25 cadena ligera (VL) que comprende una secuencia seleccionada que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al

menos 95 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.: 9 (ATL_5262 VL), 12 (ATL_5998 VL), 15 (ATL_6001 VL), 16 (ATL_6002 VL), 17 (ATL_6003 VL). Por ejemplo, el anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de: Sec. de ident.: 9 (ATL_5262 VL), sec. con núm. de ident.: 16 (ATL_6002 VL); y sec. con núm. de ident.: 17 (ATL_6003 VL).

Uno o más (o todos) de los residuos de VH Tyr55, Gly63, Thr64, Thr65, Asn66, Ser74, Arg108, Met110 pueden interactuar con uno o más residuos de UNC5C; y/o uno o más (o todos) de los residuos de VL Tyr38, Ser107, Tyr108, Ser109, Thr114, pueden interactuar con uno o más residuos de UNC5C. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una VH con: (i) en la posición 55: Tyr, en la posición 63: Gly, en la posición 64: Thr, en la posición 65: Thr, en la posición 66: Asn, en la posición 74: Ser, en la posición 108: Arg, y en la posición 110: Met, o (ii) una secuencia con sustituciones conservadoras de aminoácidos en una o más de estas posiciones. El anticuerpo puede comprender una VL con: en la posición 38: Tyr, en la posición 107: Ser, en la posición 108: Tyr, en la posición 109: Ser, en la posición 114: Thr, o una secuencia con sustituciones conservadoras de aminoácidos en una o más de estas posiciones.

El anticuerpo puede tener una VH con al menos 80 % de identidad de secuencia con la VH de la sec. con núm. de ident.: 1 (ATL_5262 VH), y una VL con al menos 80 % de identidad de secuencia con la VL de la sec. con núm. de ident.: 9 (ATL_5262 VL), en donde: (a) el residuo de VH 66 es Asn, opcionalmente en donde Asn66 interactúa con Val 107 de UNC5C; y/o (b) los residuos de VH 55, 66, 108 y 110 son respectivamente Tyr, Asn, Arg y Met, opcionalmente en donde Tyr55, Asn66, Arg108 y/o Met110 interactúan con Glu109 de UNC5C; y/o (c) los residuos de VH 108 son Arg y/o el residuo 110 es Met, opcionalmente en donde Arg108 y/o Met110 interactúan con Ile118 de UNC5C; y/o (d) los residuos de VH 55, 64, 65 son respectivamente Tyr, Thr y Thr, opcionalmente en donde Tyr55, Thr64 y/o Thr65 interaccionan con Arg120 de UNC5C; y/o (e) el residuo de VH 64 es Thr, opcionalmente en donde Thr64 interactúa con Thr89 y/o Arg120 de UNC5C; y/o (f) el residuo de VH 63 es Gly, opcionalmente en donde Gly63 interactúa con Gln90 de UNC5C; y/o (g) el residuo de VH 65 es Thr, opcionalmente en donde Thr65 interactúa con Gln102 y/o Arg120 de UNC5C; y/o (h) el residuo de VH 74 es Ser, opcionalmente en donde Ser74 interactúa con Lys103 de UNC5C; y/o (i) el residuo de VL 114 es Thr, opcionalmente en donde Thr114 interactúa con Val107 y/o Glu109 y/o Arg110 de UNC5C; y/o (j) el residuo de VL 109 es Ser, opcionalmente en donde Ser109 interactúa con Glu109 y/o Arg110 de UNC5C; y/o (k) el

residuo de VL 108 es Tyr, opcionalmente en donde Tyr108 interactúa con Arg110 y/o Val111 de UNC5C; y/o (l) el residuo de VL 107 es Ser, opcionalmente en donde Ser107 interactúa con Val111 de UNC5C; y/o (m) el residuo de VL 38 es Tyr, opcionalmente en donde Tyr38 interactúa con Val111 de UNC5C; en donde los residuos de UNC5C están numerados de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 99.

El anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena pesada (VH) con las siguientes CDR:

10 CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 142-149; CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 150-158, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 159-168. Por ejemplo, el

15 anticuerpo puede comprender una VH con las CDR de cualquiera de los anticuerpos ATL_6530 (sec. con núms. de ident.: 142, 150, 159); ATL_6531 (sec. con núms. de ident.: 143, 151, 160); ATL_6532 (sec. con núms. de ident.: 144, 152, 161); ATL_6533 (sec. con núms. de ident.: 145, 153, 162); ATL_6534 (sec. con núms. de ident.: 144, 152, 163);

20 ATL_6535 (sec. con núms. de ident.: 143, 154, 164); ATL_6536 (sec. con núms. de ident.: 146, 155, 165); ATL_6537 (sec. con núms. de ident.: 147, 156, 166); ATL_6538 (sec. con núms. de ident.: 148, 157, 167);

25 ATL_6539 (sec. con núms. de ident.: 149, 158, 168).

El anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las siguientes secuencias marco: HFWR1 de SEQ ID NO: 199, 202, 205, 209, 212, 213, 216, 220, 224, 227; HFWR2 de las sec. con núms. de ident.: 200, 203, 206, 210, 214, 217, 221, 225, 228; HFWR3 de las sec. con núms. de ident.: 201, 204, 207, 211, 215, 218, 222, 226, 229; HFWR4 de las sec. con núms. de ident.: 62, 208, 219, 223. Por ejemplo, el anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las secuencias marco de cualquiera de los anticuerpos ATL_6530 (sec. con núms. de ident.: 199, 200, 201, 62); ATL_6531 (sec. con núms. de ident.: 202, 203, 204, 62); ATL_6532 (sec. con núms. de ident.: 205, 206, 207, 208); ATL_6533 (sec. con núms. de ident.: 209, 210, 211, 208); ATL_6534 (sec. con núms. de ident.: 212, 206, 207, 208); ATL_6535 (sec. con núms. de ident.: 213, 214, 215, 208); ATL_6536 (sec. con núms. de ident.: 216, 217, 218, 219); ATL_6537 (sec. con núms. de ident.: 220, 221, 222, 223); ATL_6538 (sec. con núms. de ident.: 224, 225, 226, 208); ATL_6539 (sec. con núms. de ident.: 227, 228, 229, 208), tal como un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR y/o las secuencias marco de ATL_6532 o ATL6533.

El anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia seleccionada que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.: 122

(ATL_0006530 VH); 123 (ATL_0006531 VH); 124 (ATL_0006532 VH); 125 (ATL_0006533 VH); 126 (ATL_0006534 VH); 127 (ATL_0006535 VH); 128 (ATL_0006536 VH); 129 (ATL_0006537 VH); 130 (ATL_0006538 VH). Por ejemplo, el anticuerpo puede
5 tener un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de la secuencia con una secuencia seleccionada de: la sec. con núm. de ident.: 124 (ATL_6532
10 VH); la sec. con núm. de ident.: 125 ATL_6533 VH).

El anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena ligera (VL) con las siguientes CDR: CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 169-176; CDRL2 que comprende la
15 secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 177-183; CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 184-193. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una VL con las CDR de cualquiera de los anticuerpos ATL_6530 (sec. con núms. de
20 ident.: 169, 177, 184); ATL_6531 (sec. con núms. de ident.: 170, 178, 185); ATL_6532 (sec. con núms. de ident.: 171, 177, 186); ATL_6533 (sec. con núms. de ident.: 169, 177, 187); ATL_6534 (sec. con núms. de ident.: 169, 177, 188); ATL_6535 (sec. con núms. de ident.: 172, 179, 189);
25 ATL_6536 (sec. con núms. de ident.: 173, 180, 190); ATL_6537 (sec. con núms. de ident.: 174, 181, 191);

ATL_6538 (sec. con núms. de ident.: 175, 182, 192);
ATL_6539 (sec. con núms. de ident.: 176, 183, 193).

El anticuerpo puede tener además un dominio variable de cadena ligera (VL) con las siguientes secuencias marco: LFWR1 de las sec. con núms. de ident.: 230 a 237 y 68; LFWR2 de las sec. con núms. de ident.: 239 a 246; LFWR3 de las sec. con núms. de ident.: 247 a 255; y LFWR4 de las sec. con núms. de ident.: 256 a 258. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una VL con las FWR de cualquiera de los anticuerpos ATL_6530 (sec. con núms. de ident.: 230, 238, 247, 256); ATL_6531 (sec. con núms. de ident.: 231, 239, 248, 257); ATL_6532 (sec. con núms. de ident.: 232, 240, 249, 258); ATL_6533 (sec. con núms. de ident.: 230, 241, 247, 256); ATL_6534 (sec. con núms. de ident.: 233, 238, 250, 256); ATL_6535 (sec. con núms. de ident.: 234, 242, 251, 257); ATL_6536 (sec. con núms. de ident.: 68, 243, 252, 257); ATL_6537 (sec. con núms. de ident.: 235, 244, 253, 256); ATL_6538 (sec. con núms. de ident.: 236, 245, 254, 256); ATL_6539 (sec. con núms. de ident.: 237, 246, 255, 256).

El dominio variable de cadena ligera (VL) puede comprender una secuencia seleccionada que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.: 132-141 (ATL6530-6539 VL). Por ejemplo, el anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que tiene

al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de: la sec. con núm. de ident.: 134 (ATL_0006532); o la sec. con núm. de ident.: 135 (ATL_0006533).

5 El anticuerpo puede comprender una molécula de anticuerpo scFv, un nanocuerpo, una región constante de anticuerpo o un anticuerpo completo.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal y/o en donde el anticuerpo es un anticuerpo completo y/o
10 en donde el anticuerpo es una IgG1 o variante de esta, opcionalmente en donde el anticuerpo es una variante de IgG1 L234A/L235A (LALA).

También se describe de acuerdo con un segundo aspecto un dominio VH aislado de un anticuerpo de acuerdo
15 con cualquier modalidad del primer aspecto o cualquier anticuerpo como se describe en la presente. Por lo tanto, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquier aspecto anterior puede comprender un dominio VH aislado que tiene las características de cualquier modalidad de los aspectos
20 anteriores. También se describe en la presente un dominio VL de anticuerpo aislado de un anticuerpo como se describe en la presente. Por lo tanto, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquier aspecto anterior puede comprender un dominio VL aislado que tiene las características de cualquier
25 modalidad de un anticuerpo como se describe en la presente.

De acuerdo con un tercer aspecto, la descripción proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este, que incluye un dominio VH o VL, como se describe en la presente.

De acuerdo con un cuarto aspecto, la descripción proporciona un vector o conjunto de vectores que comprenden el ácido nucleico de acuerdo con el aspecto anterior.

De acuerdo con un quinto aspecto, la descripción proporciona una célula huésped que comprende el vector o conjunto de vectores de acuerdo con el sexto aspecto, o una célula huésped in vitro transformada con un ácido nucleico del quinto aspecto.

De acuerdo con un sexto aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de este, que incluye un dominio VH de anticuerpo o un dominio VL de anticuerpo, como se describe en la presente, y al menos un componente adicional. La composición puede comprender un excipiente, vehículo o portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un séptimo aspecto, la descripción proporciona un método para producir un anticuerpo o fragmento de este, el método comprende el cultivo de células huésped de acuerdo con el quinto aspecto en condiciones para la producción de dicho anticuerpo o fragmento de este. El método puede comprender además aislar y/o purificar dicho

anticuerpo o fragmento de este. El método puede comprender además formular el anticuerpo o fragmento de este en una composición que incluya al menos un componente adicional.

De acuerdo con un octavo aspecto, la descripción
5 proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo como se describe en la presente.

De acuerdo con un noveno aspecto, la descripción
10 proporciona un método para reducir la apoptosis en una célula que expresa UNC5C, el método comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se describe en la presente. La célula puede ser una neurona. El contacto puede realizarse *in vitro*.

De acuerdo con un décimo aspecto, la descripción
15 proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento de este que se une al UNC5C, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo. El anticuerpo o fragmento de este puede estar de acuerdo con
20 cualquier modalidad como se describe en la presente.

De acuerdo con un undécimo aspecto, la descripción proporciona un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, el método comprende administrar un anticuerpo o fragmento de este que se une al UNC5C en una
25 cantidad terapéuticamente efectiva, a un paciente con la enfermedad o trastorno o en riesgo de desarrollar la

enfermedad o trastorno. El anticuerpo o fragmento de este puede ser un anticuerpo como se describe en la presente.

De acuerdo con un duodécimo aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo o fragmento de este que se une al UNC5C, para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo. El anticuerpo o fragmento de este puede ser un anticuerpo o fragmento de este como se describe en la presente. Un trastorno neurodegenerativo de acuerdo con cualquier aspecto tal como cualquiera de los aspectos 12.°, 13.° o 14.° puede seleccionarse de: demencia frontotemporal (FTD), enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson (PD), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), encefalitis inducida por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), encefalopatía traumática crónica (CTE), demencia vascular, enfermedades priónicas, enfermedad corporal de Lewy, atrofia muscular espinal (SMA), enfermedad de las neuronas motoras (MND), tales como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), parálisis supranuclear progresiva (PSP), ataxias espinocerebelosas (SCA) tipos 1, 2, 6, 7 y 17, enfermedad de Machado-Joseph (MJD/SCA3), atrofia palidolisisiana dentatorubral (DRPLA), atrofia muscular bulbar espinal tipo 1 ligada a X (SMAX1/SBMA), Anderson-Fabry (enfermedad de Fabry ligada a X) y miopatías DNAJB6. Por ejemplo, la enfermedad neurodegenerativa puede seleccionarse de FTD, AD, HD y PD.

La invención incluye la combinación de los aspectos y características preferidas descritas, excepto cuando tal combinación sea claramente inadmisible o expresamente evitada.

5 Por lo tanto, también se describe en modalidades del primer aspecto, un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de este que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) con las siguientes CDR: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 21 o la sec. con núm. de ident.: 22, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23. El anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena
10 pesada (VH) con las CDR con una o dos sustituciones de aminoácidos en comparación con las siguientes CDR: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 21 o la sec. con núm. de ident.: 22, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23.

También se describe de acuerdo con un aspecto adicional, un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de este que se une específicamente a la proteína UNC5C o
25 un fragmento de esta, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) con las siguientes

CDR: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 21 o la sec. con núm. de ident.: 22, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23, o un conjunto de las CDR que contiene una o dos sustituciones de aminoácidos en comparación con el conjunto anterior de las CDR. Por lo tanto, el anticuerpo puede tener una VH que comprende la CDRH1, CDRH2 y CDRH3 o ATL_5262 o ATL6178, y variantes de estas (p. ej., ATL_6033, 6034, 6035, 6036, 6037, 6038, 6039). El anticuerpo puede imitar y/o competir con Netrina-1 para unirse al UNC5C. El anticuerpo puede tener cualquiera de las características descritas anteriormente en relación con el primer aspecto.

También se describe de acuerdo con un aspecto adicional un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de este que se une específicamente a la proteína UNC5C o un fragmento de esta, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) con las siguientes CDR: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 115 o 116; CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 117 o 118; y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 119 o 120. El anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR de ATL_6187 VH (sec. con núms. de

ident.: 115, 117 y 119) o las CDR de ATL_6191 VH (sec. con
núms. de ident.: 116, 118 y 120). El anticuerpo puede
imitar y/o competir con Netrina-1 para unirse al UNC5C. El
anticuerpo puede tener cualquiera de las características
5 descritas anteriormente en relación con el primer aspecto.

También se describe de acuerdo con un aspecto
adicional un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de
este que se une específicamente a la proteína UNC5C o un
fragmento de esta, en donde el anticuerpo comprende un
10 dominio variable de cadena pesada (VH) con las siguientes
CDR: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las
sec. con núms. de ident.: 142-149; CDRH2 que comprende la
secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:
150-158, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos
15 de las sec. con núms. de ident.: 174-183. El anticuerpo puede
comprender una VH con las CDR de cualquiera de los anticuerpos
ATL_6530 (sec. con núms. de ident.: 142, 150, 159); ATL_6531
(sec. con núms. de ident.: 143, 151, 160); ATL_6532 (sec.
con núms. de ident.: 144, 152, 161); ATL_6533 (sec. con núms.
20 de ident.: 145, 153, 162); ATL_6534 (sec. con núms. de ident.:
144, 152, 163); ATL_6535 (sec. con núms. de ident.: 143, 154,
164); ATL_6536 (sec. con núms. de ident.: 146, 155, 165);
ATL_6537 (sec. con núms. de ident.: 147, 156, 166); ATL_6538
(sec. con núms. de ident.: 148, 157, 167); ATL_6539 (sec.
25 con núms. de ident.: 149, 158, 168). El anticuerpo puede
imitar y/o competir con Netrina-1 para unirse al UNC5C. El

anticuerpo puede tener cualquiera de las características descritas anteriormente en relación con el primer aspecto.

De acuerdo con un tercer aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de este que se une específicamente a la proteína UNC5C o un fragmento de esta, para usar en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo. El anticuerpo puede imitar y/o competir con Netrina-1 para unirse al UNC5C. El anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena pesada (VH) con las siguientes CDR: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 21 o la sec. con núm. de ident.: 22, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23. El anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR con una o dos sustituciones de aminoácidos en comparación con las siguientes CDR: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 21 o la sec. con núm. de ident.: 22, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23. El anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena pesada (VH) con las siguientes CDR: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 115 o 116; CDRH2 que comprende la secuencia

de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 117 o 118; y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 119 o 120. El anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena pesada (VH) con las siguientes CDR: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 142-149; CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 150-158, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 174-183.

10 Las modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores pueden tener una cualquiera o más de las siguientes características opcionales.

El anticuerpo puede unirse al mismo sitio de unión en UNC5C que Netrina-1. El anticuerpo puede tener un epítopo que al menos parcialmente se superpone al sitio de unión de Netrina-1. El anticuerpo de cualquier aspecto puede comprender un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR que tienen al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % de identidad de secuencia con las siguientes CDR: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 21 o la sec. con núm. de ident.: 22, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23. El anticuerpo puede tener las CDRH que tienen las mismas longitudes que esas CDRH. El anticuerpo de cualquier

aspecto puede comprender un dominio variable de cadena pesada (VH) con la CDR de la cadena pesada de anticuerpos ATL_5262, ATL_0006036, ATL_0006039, ATL_0006177 o ATL_0006178, o un conjunto de las CDR con una, dos o tres sustituciones de aminoácidos o al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % de identidad de secuencia con estas CDR. La una o dos sustituciones pueden comprender o consistir en una sustitución en el siguiente residuo dentro de las CDR, usando la numeración estándar de IMGT: 58 en CDRH2. La sustitución puede ser N58Y. El anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las siguientes secuencias marco: HFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 50, HFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 51, HFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 55 y HFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 62, o secuencias marco con una a cinco sustituciones en comparación con las secuencias marco anteriores. Las sustituciones en las secuencias marco pueden seleccionarse de las siguientes posiciones en la numeración IMGT estándar: HFWR2: posiciones 40, 49, HFWR3: posiciones 80, 82, 86. Las sustituciones en las secuencias marco pueden seleccionarse de las siguientes posiciones en la numeración IMGT estándar: HFWR2: en la posición 40: T40S, en la posición 49: R49G, HFWR3: en la posición 80: I80V, en la posición 82: T82K, en la posición 86: H86Q. Las sustituciones en las secuencias marco no pueden incluir una sustitución en la posición 67 en la numeración estándar

IMGT. En otras palabras, la Q en la posición 67 puede mantenerse. Los presentes inventores han descubierto que el mantenimiento de la Q en la posición 67 en HFWR3 mejoraba la afinidad de unión al UNC5C. Los presentes
5 inventores han descubierto que eliminando la N en la posición 58 de la secuencia CDRH2 podría eliminarse una posible característica en la secuencia (posición que puede ser problemática durante la producción del anticuerpo). Los presentes inventores han descubierto que eliminando la
10 T en la posición 82 en el HFWR3 redujo el riesgo de isomerización del aspartato. Han descubierto además que reemplazar esta T con K mejoró la afinidad de unión del anticuerpo al UNC5C. Los presentes inventores han descubierto que las sustituciones en las posiciones 40, 49
15 (en HFWR2), 80, 86 (en HFWR3), particularmente para reemplazarlos con los residuos en la secuencia de línea germinal correspondiente, pueden reducir la inmunogenicidad, mejorar la expresión y estabilidad de anticuerpos. El anticuerpo puede tener un dominio variable
20 de cadena pesada (VH) con las siguientes secuencias marco: HFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 50; HFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 51, 52, 53 o 54; HFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 55, 56, 57, 58 o 61; HFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 62. El anticuerpo puede tener un dominio
25 variable de cadena pesada (VH) con las siguientes secuencias marco: HFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 50;

HFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 52; HFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 61; y HFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 62.

El anticuerpo puede tener un dominio variable de
5 cadena pesada (VH) que comprende una secuencia
seleccionada que tiene al menos 95 % de identidad de
secuencia con una secuencia seleccionada de las sec. con
núms. de ident.: 1 (ATL_5262 VH), 5 (ATL_0006036_VH), 8
(ATL_0006039_VH), 91 (ATL_0006177_VH), y 93
10 (ATL_0006178_VH). El anticuerpo puede tener un dominio
variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia
que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con una
secuencia seleccionada de: Sec. de ident.: 91 (ATL_6177
VH) y SEQ ID NO:93 (ATL_6178 VH). Se espera que ATL_6177
15 y ATL_6178 tengan estabilidad y potencia de unión mejoradas
en comparación con otros anticuerpos descritos en la
presente, debido a la secuencia particular de la VH de
estos anticuerpos (sec. con núms. de ident.: 91 y 93 en la
Tabla 1, o como se describe en la Figura 22A). ATL_5262 VH
20 se describe en la Tabla 1, o como se describe en la Figura
21A. Como se describe a continuación y en la Figura 21A,
ATL_5262 VH tiene la misma secuencia que ATL_0005996_VH,
ATL_0005997_VH, ATL_0005998_VH, ATL_0005999_VH,
ATL_0006000_VH, ATL_0006001_VH, ATL_0006002_VH,
25 ATL_0006003_VH, ATL_0006004_VH y ATL_0006005_VH. El
anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena

pesada que tiene una secuencia seleccionada de las sec.
con núms. de ident.: 1 (ATL_5262 VH), 5 (ATL_0006036_VH),
8 (ATL_0006039_VH), 91 (ATL_0006177_VH), y 93
(ATL_0006178_VH). El anticuerpo puede tener un dominio
5 variable de cadena pesada (VH) que comprende CDRH1, CDRH2
y CDRH3 dentro de un marco de línea germinal, siempre que
la posición 67 en la numeración IMGT estándar sea Q.

El anticuerpo puede unirse al UNC5C humano y/o de
ratón. El anticuerpo puede unirse al UNC5C humano con una
10 EC50 de como máximo $9,81E-08$ M, o como máximo $1E-08$ M, o como
máximo $5,5E-09$ M según se evalúa mediante ELISA (tal como la
unión de rhUNC5C en placa). El anticuerpo puede reducir la
apoptosis mediada por UNC5C. El anticuerpo puede reducir la
apoptosis neuronal mediada por UNC5C. El anticuerpo puede
15 reducir la apoptosis en neuronas derivadas de células madre
pluripotentes inducidas (iPSC). La reducción de la apoptosis
se puede verificar por comparación con un control adecuado
(p. ej., solo vehículo, anticuerpo de control que no se une
al UNC5C, etc.) en un ensayo de caspasa 3/7 como se describe
20 en la presente. El anticuerpo puede tener un efecto sobre
la salud sináptica. Por ejemplo, el anticuerpo puede
aumentar la plasticidad sináptica. Por lo tanto, el
anticuerpo puede aumentar una o más medidas de salud
sináptica (que incluye, pero sin limitarse a p. ej.,
25 plasticidad), tales como el número de procesos por célula,
la longitud del crecimiento de neuritas y/o la ramificación.

Los anticuerpos de acuerdo con la descripción pueden mejorar la supervivencia neuronal y/o las funciones sinápticas. Por ejemplo, los anticuerpos de la descripción pueden reducir la toxicidad amiloide. Los anticuerpos de la descripción pueden reducir la muerte celular de las neuronas tratadas con amiloide *in vitro*. La muerte celular puede medirse midiendo una señal de caspasa 3/7 en respuesta a la citotoxicidad inducida por beta amiloide. Los anticuerpos de la descripción pueden aumentar la expresión de una o más proteínas sinápticas, tales como, p. ej., GAP-43. Los anticuerpos de la descripción pueden rescatar al menos parcialmente la muerte celular neuronal y el daño axonal causado por la depleción de netrina-1. Los anticuerpos de la descripción pueden mejorar la conectividad neuronal y/o la velocidad de activación y/o la sincronía en las neuronas motoras. Los anticuerpos de la descripción pueden mejorar la conectividad neuronal y/o la velocidad de activación y/o sincronía en las neuronas motoras de sujetos con ELA. Los anticuerpos de la descripción pueden mejorar la función y/o supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. Por ejemplo, los anticuerpos de la descripción pueden rescatar al menos parcialmente los efectos de la haploinsuficiencia de UNC5C o netrina-1 en la inervación de neuronas dopaminérgicas a la corteza prefrontal medial, y/o el contenido de dopamina en la corteza prefrontal medial. Esto puede evaluarse

determinando una mayor respuesta a la anfetamina en ratones haploinsuficientes de Netrina 1 tratados con anticuerpos de la descripción. Los anticuerpos de la descripción pueden reducir la neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas.

5 Esto puede evaluarse midiendo la neurodegeneración tras la exposición a una neurotoxina tal como la 6-hidroxidopamina (6-OHDA, por sus siglas en inglés), como se evidencia por un menor uso de la pata contralateral. Por lo tanto, también se describen en la presente métodos para mejorar

10 la supervivencia y/o función (que incluye la función sináptica) de neuronas motoras y/o dopaminérgicas en un sujeto que lo necesita, los métodos comprenden administrar un anticuerpo de la descripción en una cantidad terapéuticamente efectiva. Similarmente, también se

15 describen en la presente métodos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con disfunción o muerte de neurona motora y/o neurona dopaminérgica, los métodos comprenden administrar un anticuerpo de la descripción en una cantidad terapéuticamente efectiva.

20 El anticuerpo puede unirse selectivamente al UNC5C sobre un otro o más receptores de netrina. El anticuerpo puede unirse selectivamente al UNC5C sobre uno o más (o todos): neogenina, DCC y DSCAM, UNC5A, UNC5B, UNC5. La unión selectiva puede referirse a la unión preferencial (p. ej.,

25 EC50 inferior) para una especie (p. ej., UNC5C) sobre otra (p. ej., otro receptor de netrina), o a una unión no

detectable a dianas comparativas (p. ej., otros receptores de netrina). La unión selectiva puede verificarse mediante análisis de interferometría de biocapa como se describe en la presente. El anticuerpo puede unirse al UNC5C monomérico y/o UNC5C dimerico y/o UNC5C homodimerico. El anticuerpo puede unirse al UNC5C monomérico.

El anticuerpo puede comprender una molécula de anticuerpo scFv, un nanocuerpo, una región constante de anticuerpo o un anticuerpo completo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo completo. El anticuerpo puede ser una IgG1 o una variante de esta, opcionalmente en donde el anticuerpo es una variante de IgG1 L234A/L235A (LALA).

El anticuerpo puede comprender además un dominio variable de cadena ligera (VL) con las siguientes CDR: CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 24, 31 o 32, CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 34, y CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 40, 47, o un conjunto de las CDR que contiene una, dos o tres sustituciones de aminoácidos en comparación con el conjunto anterior de las CDR. El anticuerpo de cualquier aspecto puede comprender un dominio variable de cadena ligera (VL) con las CDR que tienen al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % de identidad de secuencia con las siguientes CDR: CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 24, 31 o 32, CDRL2 que comprende la

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 34,
y CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec.
con núm. de ident.: 40 o 47. El anticuerpo puede tener las
CDRL que tienen las mismas longitudes que esas CDRL. El
5 anticuerpo de cualquier aspecto puede comprender un dominio
variable de cadena ligera (VL) con la CDR de la cadena ligera
de anticuerpos ATL_5262, ATL_0006002 o ATL_0006003, o un
conjunto de las CDR con una, dos, tres sustituciones de
aminoácidos o al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % de
10 identidad de secuencia con estas CDR. El anticuerpo de
cualquier aspecto puede comprender un dominio variable de
cadena ligera (VL) con la CDR de la cadena ligera de
anticuerpos ATL_5262 o ATL_0006002, o un conjunto de las CDR
con una, dos, tres sustituciones de aminoácidos o al menos
15 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % de identidad de secuencia con
estas CDR. Las CDRL1, CDRL2 y CDRL3 del dominio VL pueden
estar dentro de un marco de línea germinal. El anticuerpo
puede comprender además un dominio variable de cadena ligera
(VL) con las siguientes regiones marco: LFWR1 que comprende
20 cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las sec. con
núms. de ident.: 63 a 70, LFWR2 que comprende cualquiera de
las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:
71 a 76, LFWR3 que comprende cualquiera de las secuencias de
aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 77 a 84, y LFWR2
25 que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de
las sec. con núms. de ident.: 85 a 90, o un conjunto de las

FWR que contiene de uno a cinco sustituciones de aminoácidos en comparación con el conjunto anterior de las FWR. El anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena ligera (VL) con las siguientes secuencias marco: LFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 63; LFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 71; LFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 77; y LFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 85 o 87; o un conjunto de las FWR que contiene de una a cinco sustituciones de aminoácidos en comparación con el conjunto anterior de FWR.

El anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia seleccionada que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de las sec. con núms. de ident.: 9 (ATL_5262 VL), o 10 a 19. El anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena ligera (VL) con las siguientes secuencias marco: LFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 63; LFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 71; LFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 77; y LFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 85 o 87; o un conjunto de las FWR que contiene de una a cinco sustituciones de aminoácidos en comparación con el conjunto anterior de FWR. El anticuerpo puede tener un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de: Sec. de ident.: 9 (ATL_5262 VL), 16 (ATL_6002 VL) y SEQ ID NO:17 (ATL_6003 VL).

SUMARIO DE LAS FIGURAS

A continuación, se analizarán modalidades y experimentos que ilustran los principios de la invención con referencia a las figuras adjuntas en las que:

La **Figura 1** muestra esquemáticamente un proceso de descubrimiento de anticuerpos no sesgado.

La **Figura 2** muestra los resultados de los ensayos ELISA para la unión de anticuerpos identificados en individuos resilientes a FTD al UNC5C recombinante. El conjunto de anticuerpos ensayados consistió en 18 anticuerpos identificados de una cohorte FTD, un anticuerpo de una cohorte de Huntington y un anticuerpo anti-PDL1, previamente usado como control positivo en un ensayo de deconvolución diana Retrogenix. El anticuerpo ATL_5262 se une al UNC5C. Las barras azules indican señales de absorbancia sin procesar a UNC5C recombinante y las barras naranjas representan señales de absorbancia a una proteína irrelevante, la lisozima. La figura muestra la absorbancia a 450 nm. Las barras de etiquetas anti-Fc muestran los resultados para un pocillo tratado con anti-Fc con HRP que controla que el UNC5C esté recubierto correctamente en la placa de ensayo.

La **Figura 3** muestra la presencia de anticuerpos UNC5C en sujetos que son resilientes a la neurodegeneración en diferentes cohortes de enfermedades neurodegenerativas.

A. Se encontraron anticuerpos UNC5C en centenarios

resilientes (sujetos >100 años de edad sin síntomas de neurodegeneración); pacientes resilientes con enfermedad de Alzheimer (AD) (un sujeto resiliente de la enfermedad de Alzheimer que muestra una progresión cognitiva lenta),
5 pacientes con demencia frontotemporal (FTD) (tres sujetos con resiliencia para FTD, portadores de mutaciones de alto riesgo y edad avanzada pero sin progresión a FTD), pacientes con enfermedad de Parkinson (PD) (trastorno de conducta del sueño REM prodrómico (RBD, por sus siglas en inglés) pero
10 sin diagnóstico de Parkinson) y controles cognitivamente sanos (predominantemente individuos mayores de 60 años de edad). Se buscaron repertorios de secuencias VH que contuvieran el mismo gen V y el mismo gen J que ATL5262 y como máximo 2 errores de coincidencia de aminoácidos en la
15 región de unión. Los puntos representan el número de secuencias coincidentes por repertorio y el color indica los isotipos de las secuencias identificadas. La mayoría de las secuencias coincidentes cambian de clase a IgG1, lo que respalda una función similar para estos anticuerpos en
20 todos los individuos. El sujeto con PD no clasificado SU_0001278 se incluyó inicialmente como un control saludable para esta cohorte, pero posteriormente se eliminó debido a que se sospecha que tenía un trastorno de conducta del sueño REM, que es un marcador prodrómico de PD. Al no
25 tener diagnóstico de PD, es potencialmente resiliente.

La **Figura 4** muestra los resultados de un ensayo de competencia de Netrina 1. Las placas ELISA se recubrieron con rhUNC5C (UNC5C humano recombinante) y se preincubaron con Netrina 1 recombinante etiquetada con His antes de añadir ATL_5262 o anticuerpo de control ATL_5338. **A.** La Netrina 1 se detectó usando un anticuerpo HRP anti-His (peroxidasa de rábano picante). **B.** El anticuerpo (ATL_5262 o control) se detectó mediante detección anti-F(ab)'2-HRP. Los ensayos se configuraron por duplicado, mediante los cuales en una 5
10 réplica se detectó la unión de Netrina 1 con anti-His con HRP (A) y la segunda réplica se usó para determinar la unión al anticuerpo ATL_0005262 usando la detección anti-Fab'2-HRP. B. La figura muestra absorbancia a 450 nm.

La **Figura 5** muestra los resultados de un ensayo 15
de competencia de Netrina 1 dependiente de la concentración. Las placas ELISA se recubrieron con rhUNC5C y se preincubaron con una serie de diluciones de 12 puntos de Netrina 1 recombinante etiquetada con His (comenzando a 3 nm) antes de añadir ATL_5262. La Netrina 1 se detectó 20
usando detección HRP anti-His y se muestra en la figura como “señal Netrina 1 (+ ATL_5262)”. ATL_5262 se detectó usando detección anti-F(ab)'2-HRP y se muestra en la figura como “señal ATL_0005262 (+ Netrina1)”. Los pocillos de control contenían Netrina 1 solamente. Datos representados 25
como porcentaje de la señal de absorbancia máxima.

La **Figura 6** muestra los resultados de un ensayo de competencia de Netrina 1. Las placas ELISA se recubrieron con rhUNC5C y se preincubaron con ATL_5262 o anticuerpo de control ATL_5338 antes de añadir Netrina 1 recombinante etiquetada con His. La Netrina 1 se detectó usando detección HRP anti-His y se muestra en la figura como “señal Netrina (+ ATL_0005262)” o “señal Netrina (+ ATL_00005338)”. ATL_5262 se detectó usando la detección anti-F(ab)’2-HRP. La figura muestra la absorbancia a 450 nm.

10 La **Figura 7** muestra la unión de ATL_5262 al UNC5C humano recombinante (rh) (**A**), ratón recombinante (rm) UNC5C (**B**) y a lisozima (**C**), usando ELISA. La figura muestra la absorbancia a 450 nm.

La **Figura 8** muestra (**A**) una alineación VH de homólogos ATL_5262 y ATL_5262 identificados a través de cohortes de neurodegeneración en individuos resilientes. La figura muestra la numeración IMGT. (**A**) muestra secuencias de anticuerpos descritos en la presente (en particular, VH de ATL_0005262, sec. con núm. de ident.: 1; LCDR3 de ATL_0006187, sec. con núm. de ident.: 112; VH de ATL_0006191, sec. con núm. de ident.: 113), con posiciones variables en la cadena pesada resaltadas. (B-1 a B-4) muestran las secuencias de la cadena pesada de los anticuerpos en (**A**), así como ATL_6178 (VH de ATL_6178, sec. con núm. de ident.: 93), alineadas por la numeración de posición IMGT. ATL_5262 y ATL_6178 tienen el mismo VL.

15
20
25

Se identificaron homólogos basados solo en VH, por lo que solo se muestran las secuencias VH.

La **Figura 9** ilustra un flujo de trabajo para un estudio de estabilidad de 2 semanas y 4 semanas y un estudio de estabilidad de congelación-descongelación (FT, por sus siglas en inglés) (tres ciclos de FT) para ATL_5262. El análisis de control de calidad (QC) se realizó usando cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión por tamaño (SEC-HPLC, por sus siglas en inglés), electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés); electroforesis capilar con dodecil sulfato de sodio (CE-SDS, por sus siglas en inglés); enfoque isoeléctrico capilar (cIEF, por sus siglas en inglés); dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés); y ELISA de unión.

La **Figura 10** muestra los resultados de un ensayo de desplazamiento térmico para ATL_5262 a 1 (izquierda) y 5 mg/ml (derecha) (relación de proteína desplegada a plegada en función de la temperatura).

En la **Figura 11** se muestran electroferogramas de las variantes de carga de ATL_5262 probadas por cIEF dos semanas (**A**) y 4 semanas (**B**) después del almacenamiento a las temperaturas indicadas (-80 °C, 4 °C y 40 °C). **C** es una versión ampliada de **A** y **B** que muestra las especies ácidas en el lado izquierdo de los gráficos.

La **Figura 12** muestra cromatogramas SEC-HPLC para ATL_5262 después de 2 semanas (Figura 11A) o 4 semanas (Figura 11B) a las temperaturas indicadas (-80 °C, 4 °C y 40 °C).

En la **Figura 13** se muestran los resultados de una SDS-PAGE para ATL_5262 después de 2 semanas (**A**) o 4 semanas (**B**) a las temperaturas indicadas (-80 °C, 4 °C y 40 °C) o después de un estudio de tres ciclos de FT (**B**). FT = congelación-descongelación; NIST = control de mAb NIST; R = reducido; NR = no reducido.

La **Figura 14** muestra los resultados de CE-SDS para ATL_5262 después de 2 semanas (**A**) muestras no reducidas y (**C**) reducidas) o 4 semanas (**B**) no reducidas y (**D**) muestras reducidas a las temperaturas indicadas (-80, +4 y +40C).

La **Figura 15** muestra los resultados de una prueba ELISA que prueba la unión de ATL_5262 a rhUNC5C después de 2 semanas (**A**) o 4 semanas (**B**) a las temperaturas indicadas (-80 °C, 4 °C y 40 °C) o después de un estudio de tres ciclos de FT (**B**).

La **Figura 16** muestra los resultados de una prueba ELISA que prueba la unión de diferentes variantes de VH de ATL_5262 a rhUNC5C. ATL_5338 se incluyó como control negativo. La figura muestra la absorbancia a 450 nm.

La **Figura 17** muestra los resultados de una prueba ELISA que prueba la unión de diferentes variantes de VH de ATL_5262 a rhUNC5C (**A**), rmUNC5C (**B**) y lisozima (**C**). ATL_5338 se incluyó como control negativo. Se incluyeron

ATL_6002 y ATL_6003 (variantes de emparejamiento VL) para comparación. La figura muestra la absorbancia a 450 nm.

La **Figura 18** muestra los resultados de una prueba ELISA que prueba la unión de diferentes variantes de VH de
5 ATL_5262 a rhUNC5C etiquetado con Fc **(A)**, o rhUNC5C etiquetado con His **(B)**. ATL_5338 se incluyó como control negativo. Se incluyeron ATL_6002 y ATL_6003 (variantes de emparejamiento VL) para comparación. La figura muestra la absorbancia a 450 nm.

10 La **Figura 19** muestra los resultados de una prueba ELISA que prueba la unión de diferentes variantes de VH de ATL_5262 a rhUNC5C **(A)**, rmUNC5C **(B)** y lisozima **(C)**. ATL_5338 se incluyó como control negativo. La figura muestra la absorbancia a 450 nm.

15 La **Figura 20** muestra los resultados de un estudio farmacocinético *in vivo* en ratones que evalúa los niveles de anticuerpos en suero **(A)**, y CSF **(B)** después de la administración de dosis escalonadas de ATL_5262 o un anticuerpo de control, ATL_5338.

20 La **Figura 21** muestra secuencias de anticuerpos descritas en la presente, con posiciones variables en la cadena pesada resaltadas. **A.** Cadenas pesadas, alineadas por la numeración de posición IMGT. VH de ATL_0005262, 5996, 5997, 5998, 5999, 6000, 6001, 6002, 6003, 6004, 6005: sec.
25 con núm. de ident.: 1; VH de ATL_0006033: sec. con núm. de ident.: 2; VH de ATL_6034: sec. con núm. de ident.: 3 de

ATL_0006035: sec. con núm. de ident.: 4 de ATL_0006036: sec. con núm. de ident.: 5; VH de ATL_0006037: sec. con núm. de ident.: 6; VH de ATL_0006038: sec. con núm. de ident.: 7; VH de ATL_0006039: sec. con núm. de ident.: 8; VH de ATL_0006177: sec. con núm. de ident.: 91; VH de ATL_0006178: Sec. con núm. de ident.: 93 **B.** Cadenas ligeras, alineadas por la numeración de posición IMGT. VL de ATL_0005262: sec. con núm. de ident.: 9; VL de ATL_0005996: sec. con núm. de ident.: 10; VL de ATL_0005997: Sec. con núm. de ident.: 11; 10 VL de ATL_0005998: sec. con núm. de ident.: 12; VL de ATL_0005999: sec. con núm. de ident.: 13; VL de ATL_0006000: sec. con núm. de ident.: 14; VL de ATL_0006001: sec. con núm. de ident.: 15; VL de ATL_0006002: sec. con núm. de ident.: 16; VL de ATL_0006003: sec. con núm. de ident.: 17; 15 VL de ATL_0006004: sec. con núm. de ident.: 18; VL de ATL_0006005: sec. con núm. de ident.: 19; VL de ATL_0006033, 6034, 6035, 6036, 6037, 6038, 6039, 6177: sec. con núm. de ident.: 92; VL de ATL_0006178: Sec. con núm. de ident.: 94

La **Figura 22** muestra la producción de caspasa 3/7 en respuesta a la toxicidad beta amiloide 1-42 en las células SHSY5Y en las condiciones indicadas.

La **Figura 23** muestra los resultados de un western blot que muestra la expresión proteica de las proteínas sinápticas indicadas (Neurofilamento-L, Sinaptofisina, PSD95 Sinapsina-1, Sinaptotagmina-1) después del

tratamiento de neuronas dopaminérgicas derivadas del iPS humanas con ATL6178.

La **Figura 24** muestra los resultados de un ensayo de la depleción de Netrina-1 usando neuronas motoras espinales derivadas de iPSC humanas pretratadas con ATLX1282 y ATL-5262. **(A)** Resultados de imágenes de ensayos de células vivas/muertas y gráfico que muestra la cuantificación. Los datos se representaron como el promedio de células vivas con relación al recuento total de células (suma de calceína AM positiva y homodímero de etidio positivo). Se realizó un ANOVA unidireccional con prueba de comparaciones múltiples de Tukey con cuatro pocillos seleccionados al azar * $P < .05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Las barras de error representan la media $\pm$ SEM.

(B) Imágenes de microscopía fluorescente que muestran tinción para DAPI y la proteína sináptica GAP43. **(C)** Imágenes de microscopía fluorescente muestran el crecimiento de neuritas en cultivos microfluídicos con neuronas motoras espinales BrainXell eGFP y cuantificación del promedio del número total de axones (fibras nerviosas) (=suma del recuento de fibras). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ en comparación con el control de isotipo y el grupo anti-Netrina1, prueba t no pareada de dos colas, $n = 3-4$ unidades independientes

La **Figura 25** muestra los resultados de un ensayo multielectrodo (MEA, por sus siglas en inglés) usando una

línea celular de neurona motora ALS TDP43 iCell tratada con AT LX-1282. **(A)** Gráfico que muestra el número de electrodos activos en los grupos indicados. **(B)** Gráfico que muestra el porcentaje de ráfaga en los grupos experimentales indicados. **(C)** Gráfico que muestra la resistencia media (izquierda) y el número de electrodos cubiertos (derecha) como medida de viabilidad. **(D)** Gráfico que muestra el índice de sincronía (arriba) y la tasa media de disparo (abajo). El ANOVA tridireccional (modelo de efectos mixtos) con Tukey post-hoc para múltiples comparaciones. Las barras de error representan SEM. n=4-6 pocillos/grupo de tratamiento.

La **Figura 26** muestra el rescate mediado por AT LX-1282 de locomoción inducida por AMPH en ratones haploinsuficientes de Netrina 1. Los datos muestran los resultados de un ensayo de locomoción en ratones haploinsuficientes de Netrina 1 que demuestran el rescate mediado por AT LX-1282 de la locomoción inducida por amfetamina (AMPH). El gráfico muestra la distancia recorrida por ratones en los grupos indicados 10 días después del tratamiento con anticuerpo o control (anticuerpo antifluoresceína, ATL5338 (LALA)). Se usó solución salina como control para el tratamiento con AMPH y ratones silvestres como un control para ratones haploinsuficientes de Netrina 1. **** $P < 0,0001$ ANOVA unidireccional con prueba de comparaciones múltiples de Sidák.

En la **Figura 27** se muestra el porcentaje de toques contralaterales mostrados por ratas 26 días después de 6-OHDA o tratamiento salino. A los ratones se les administró el control de isotipo (ATL5338) o ATLX1282 por vía intraperitoneal una vez a la semana. *** $P < 0,001$ ANOVA unidireccional con prueba de comparaciones múltiples de Sídák.

La **Figura 28** muestra los resultados de un ensayo de interferometría de biocapa para evaluar la unión de ATL_5262 y ATL_6178 a diferentes receptores de Netrina 1 y proteínas relacionadas. Para cada par antígeno-anticuerpo alineado, el gráfico muestra la respuesta del sensor corregida por referencia al final de la etapa de asociación medida (señal promedio de 25-30 segundos) de un ensayo cinético BLI. El antígeno se cargó como ligando y se sumergió en el anticuerpo como analito durante la asociación y en el regulador de ensayo durante la disociación.

La **Figura 29** muestra los resultados de un ensayo de competencia de netrina-1 que demuestra que la unión de ATLX-1282 y ATL_5262 al tejido cerebral de ratón se bloquea mediante Netrina-1. **(A)** El gráfico muestra el efecto de la Netrina-1 en competencia con ATL_5262 en tejidos con alta expresión de UNC5C ("Región de alta expresión" = tejido cerebral de ratón) o tejidos de control con expresión nula o baja de UNC5C ("Hígado control" = tejido hepático de

ratón). (B) Imágenes de secciones de tejido con luz fluorescente y transmitida (20X), que muestran la unión de ATL_5262 al tejido cerebral de ratón o al tejido hepático de control en diversas condiciones de bloqueo (sin bloqueo de netrina; bloqueo de netrina-1; bloqueo de clusterina (control)). (C) Efecto del bloqueo de Netrina-1 y Netrina-4 en competencia con ATLX-1282 en secciones cerebrales de ratones sin tratamiento previo. (D) Efecto del bloqueo de Netrina-1 y Netrina-4 en competencia con ATLX-1282 en secciones cerebrales de ratones sin tratamiento previo (es decir, no tratadas), o tejido de control hepático (“Hígado control”). (E) Imágenes representativas de secciones de tejido con luz fluorescente y transmitida que muestran el efecto de bloqueo de Netrina-4 y Netrina-1 de la unión de ATLX-1282 (lo que resulta en una tinción reducida) en secciones cerebrales de ratones sin tratamiento previo.

La **Figura 30** muestra los resultados de un ensayo de citometría de flujo que muestra la unión de ATL5262 y ATLX-1282 al UNC5C y la variante UNC5C T835M (variante AD) sobreexpresada en células HEK-293. (A) Cuantificación de la unión al UNC5C medida por el % de células IgG+ (detección del anticuerpo). (B) Cuantificación de la unión al UNC5C medida por la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) de IgG.

La **Figura 31** muestra la estructura cristalina de rayos X de un fragmento Fab ATL_5262 unido a dominios Ig

UNC5C humanos. (A) muestra una vista en boceto del complejo Fab-UNC5C completo. (B)-(F) muestran vistas en primer plano de las interacciones específicas entre ATL_5262 y UNC5C como se muestra en (A). (G) muestra una alineación proteica de los miembros B de la familia UNC5 humana (sec. con núm. de ident.: 260), A (sec. con núm. de ident.: 261) y D (sec. con núm. de ident.: 262) a la región del dominio 1 tipo IgG UNC5C humano que interactúa con ATL_5262 (sec. con núm. de ident.: 259).

10 La **Figura 32** muestra secuencias de anticuerpos descritas en la presente, con posiciones variables en la cadena pesada resaltadas. **A.** (A-1 a A-4) Cadenas pesadas, alineadas por la numeración de posición IMGT. VH de ATL_0005262: sec. con núm. de ident.: 1; VH de ATL_0006178: 15 sec. con núm. de ident.: 93; VH de ATL_0006530: sec. con núm. de ident.: 122; VH de ATL_0006531: sec. con núm. de ident.: 123; VH de ATL_0006532: sec. con núm. de ident.: 124; VH de ATL_0006533: sec. con núm. de ident.: 125; VH de ATL_0006534: sec. con núm. de ident.: 126; VH de ATL_0006535: 20 sec. con núm. de ident.: 127; VH de ATL_0006536: sec. con núm. de ident.: 128; VH de ATL_0006537: sec. con núm. de ident.: 129; VH de ATL_0006538: sec. con núm. de ident.: 130; VH de ATL_0006539: sec. con núm. de ident.: 131. **B.** (B-1 a B-4) Cadenas ligeras, alineadas por la numeración de posición 25 IMGT. VL de ATL_0005262: sec. con núm. de ident.: 9; VL de ATL_0006178: sec. con núm. de ident.: 92; VL de ATL_0006530:

sec. con núm. de ident.: 132; VL de ATL_0006531: sec. con
núm. de ident.: 133; VL de ATL_0006532: sec. con núm. de
ident.: 134; VL de ATL_0006533: sec. con núm. de ident.: 135;
VL de ATL_0006534: sec. con núm. de ident.: 136; VL de
5 ATL_0006535: sec. con núm. de ident.: 137; VL de ATL_0006536:
sec. con núm. de ident.: 138; VL de ATL_0006537: sec. con
núm. de ident.: 139; VL de ATL_0006538: sec. con núm. de
ident.: 140; VL de ATL_0006539: Sec. con núm. de ident.: 141

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A continuación, se analizarán aspectos y modalidades de la presente invención con referencia a las
5 figuras adjuntas. Aspectos y modalidades adicionales serán evidentes para aquellos expertos en la técnica.

En la presente se describen anticuerpos y fragmentos de estos que son capaces de unirse específicamente a la proteína UNC5C o un fragmento de esta. Como se usa en
10 la presente, un anticuerpo capaz de “unirse específicamente” o “unirse específicamente” a una diana es uno capaz de unirse a través de la asociación del sitio de reconocimiento de epítomos con un epítopo dentro de la diana. Es distinta de la unión no específica, por ejemplo, la unión mediada por
15 Fc, las interacciones iónicas y/o hidrofóbicas. En otras palabras, un anticuerpo que se une específicamente a una diana reconoce y se une a una estructura proteica específica dentro de ella en lugar de a proteínas en general.

La presente descripción se refiere a anticuerpos
20 descritos en la presente usando referencias especificadas como “ATL_000xxxx”, “ATL_xxxx” o “xxxx”, donde “xxxx” es un número de referencia de cuatro dígitos específico para un anticuerpo descrito en la presente. Todas las notaciones anteriores se usan indistintamente para referirse al mismo
25 anticuerpo o una porción de este (p. ej., una VH, VL o parte de esta, del anticuerpo). Por ejemplo, el anticuerpo

ATL_0005262 se denomina indistintamente en la presente ATL_5262 y 5262.

Vinculación a UNC5C

5 El receptor C de netrina Unc-5 (UNC5C) pertenece a la familia UNC5 de receptores de netrina de membrana celular, los cuales forman parte de la superfamilia de inmunoglobulinas (Leonardo, E., et al. (1997)). Los miembros de la familia UNC5 tienen dos dominios de Ig extracelulares
10 y dos dominios de trombospondina tipo 1 (TSP-1, por sus siglas en inglés). El extremo c intracelular consiste en un dominio de zonula occludens 5 (ZU5, por sus siglas en inglés), un dominio de unión a DCC y un dominio de muerte implicado en la regulación de la apoptosis (Ackerman SL, Knowles BB.
15 1998). Se han identificado cuatro subtipos de UNC5, a saber UNC5 A-D (denominado UNC5 H1-4 en otras especies de mamíferos), que se expresan ampliamente en el sistema nervioso central (SNC) (Rajasekharan, S., Kennedy, T.E. (2009)). Los receptores adicionales de netrina incluyen la
20 molécula de adhesión celular del síndrome de Down (DSCAM, por sus siglas en inglés), neogenina, eliminación en el cáncer colorrectal (DCC, por sus siglas en inglés) y CD146 (también conocida como molécula de adhesión celular de melanoma (MCAM o MEL-CAM, por sus siglas en inglés)). Estos
25 receptores difieren en el número de dominios Ig n-terminales, inclusión de dominios de fibronectina tipo III y dominios

intracelulares. Para una descripción general de los receptores de netrina de la membrana celular, ver Dun et al., 2017. Los anticuerpos descritos en la presente son capaces de unirse específicamente al UNC5C sobre otros receptores de netrina tales como neogenina, DCC, DSCAM, UNC5A, UNC5B y UNC5D. La unión de un anticuerpo a una proteína candidata se puede verificar, por ejemplo, mediante análisis de interferometría de biocapa como se describe en la presente.

UNC5C es un receptor de dependencia responsable de la regulación de la apoptosis neuronal, y si UNC5C promueve o inhibe la apoptosis depende de su unión a la netrina-1 (Lambi et al (2001); Poliak S, et al. 2015). Los receptores de UNC5 tienen dominios de muerte intracelular. Este dominio puede interactuar con la proteína quinasa 1 asociada a la muerte (DAPK1, por sus siglas en inglés) para inducir apoptosis en ausencia de unión al ligando, mientras que los receptores permanecen en forma monomérica. La mutación T835M en el dominio de muerte de UNC5C aumenta aún más la apoptosis. Este aumento de la señal permitió determinar la participación de la proteína quinasa 1 asociada a la muerte/proteína quinasa D/quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK1)/JNK/NADPH (Hashimoto et al 2016 Signal Transduction 291(23), 12282-12293)). La muerte celular inducida por UNC5 aumenta por la escisión de la caspasa en su dominio de muerte intracelular, lo que puede conducir a un bucle de retroalimentación una vez que se inicia la apoptosis. Todos

los receptores Unc5 se escinden por la caspasa-3 *in vitro* (Llambi et al 2001). También se ha propuesto que la escisión de UNC5C por LGMN aumenta la apoptosis neuronal mediada por UNC5C, relevante para la enfermedad de Alzheimer (Chen et al 5 2021). Sin embargo, en presencia de la netrina-1, UNC5C forma un dímero y promueve la supervivencia neuronal, migración, y diferenciación, es decir, tiene papel antiapoptótico. La multimerización de los receptores UNC5 es suficiente para prevenir la activación de la vía de señal apoptótica (Mille 10 et al 2009 Cell Death and Differentiation 16, 1344-1351) y la Netrina-1 inhibe directamente la apoptosis en las neuronas (Llambi et al 2001). También se ha mostrado que UNC5C forma heterodímeros con DCC o DSCAM (Boyer and Gupton, 2018). Los anticuerpos descritos en la presente pueden unirse al UNC5C 15 monomérico y UNC5C dimérico. Los anticuerpos descritos en la presente pueden unirse al UNC5C homodimérico.

El UNC5C se ha implicado en la enfermedad de Alzheimer, donde se encontró que el UNC5C truncado, que da como resultado una mayor apoptosis neuronal, se asocia con 20 una patología de EA acelerada en ratones (Chen et al., 2021). Además, varios SNP en UNC5C se unen al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (AD). Por ejemplo, el SNP T835M predispone a la AD y aumenta la apoptosis neuronal (Li Q, et al. 2018). El UNC5C también se ha implicado en 25 la enfermedad de Parkinson (PD), donde se mostró que la

escisión de UNC5C causa pérdida neuronal en un modelo de PD en ratones (Chen et al. 2022).

La Netrina-1 es una de varias netrinas, todos miembros de la superfamilia laminina. Las netrinas son proteínas secretadas que dirigen la extensión axonal y la migración celular durante el desarrollo neural y regulan la adhesión celular, la maduración de la morfología celular, la supervivencia celular y la tumorigénesis (Rajasekharan, et al. (2009)). Son proteínas bifuncionales que actúan como atrayentes para algunos tipos de células y como repelentes para otros. La familia de receptores de UNC-5 media la respuesta repelente a la netrina. La netrina 1 consiste en un dominio similar a la laminina en el N-terminal (LN, también conocido como dominio VI), seguido de tres repeticiones del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (EGF1, EGF2 y EGF3, también conocido como dominio V), y un dominio similar a la netrina C-terminal (NTR) que comparte homología con dominios encontrados en el complemento y otras proteínas (Dun et al. 2017).

En modalidades, los anticuerpos descritos en la presente se unen específicamente al UNC5C e imita y/o compite con la Netrina-1 para unirse al UNC5C. La competencia con la unión de Netrina-1 puede evaluarse mediante ensayos ELISA como se describe en la presente. Por lo tanto, los anticuerpos descritos en la presente pueden competir por el mismo sitio de unión en UNC5C que

Netrina-1. Los anticuerpos descritos en la presente pueden unirse al mismo sitio de unión en UNC5C que Netrina-1. Un anticuerpo que imita a la netrina-1 puede referirse al anticuerpo que interactúa con UNC5C de una manera que imita el efecto de la Netrina-1 en la estructura y/o actividad de UNC5C. Un anticuerpo que compite con la netrina-1 para unirse al UNC5C puede referirse a que la unión del anticuerpo al UNC5C depende de la presencia o ausencia de Netrina-1, y/o que la unión de Netrina-1 al UNC5C depende de la presencia o ausencia del anticuerpo. Un anticuerpo que compite con la netrina-1 para unirse al UNC5C puede referirse a la unión del anticuerpo al UNC5C que está inhibida por Netrina-1. Por ejemplo, un anticuerpo que compite con netrina-1 para unirse al UNC5C puede referirse a que la unión del anticuerpo al UNC5C se inhibe al menos parcialmente en presencia de Netrina-1. Esto puede evaluarse, por ejemplo, usando un ensayo ELISA, tal como se describe en la presente. Por ejemplo, UNC5C puede preincubarse con Netrina-1 antes de la incubación con el anticuerpo, y la cantidad de anticuerpo unido puede compararse con una condición de control sin preincubación de Netrina-1. Una reducción en la cantidad de anticuerpo unido puede indicar que el anticuerpo compite con Netrina-1 por la unión al UNC5C. En modalidades, una señal indicativa de la presencia del anticuerpo unido al UNC5C puede reducirse en al menos 50 %, al menos 60 %, al menos

70 %, al menos 80 % o al menos 90 % en presencia de Netrina-1 (tal como, p. ej., después de la preincubación con 200 microg/l de Netrina-1). En modalidades, la unión del anticuerpo al UNC5C puede reducirse en al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % en presencia de Netrina-1 (tal como, p. ej., después de la preincubación con 200 microg/l de Netrina-1).

Los anticuerpos como se describen en la presente pueden ser tales que la unión del anticuerpo al UNC5C sea inhibida por Netrina-1 de una manera dependiente de la concentración. Esto puede evaluarse, por ejemplo, usando un ensayo ELISA como se describe en la presente, o cualquier otro ensayo de unión en combinación con incubación con una pluralidad de concentraciones diferentes de Netrina-1 (p. ej., una serie de dilución de Netrina-1). Una reducción en la unión del anticuerpo al UNC5C en presencia de Netrina-1 (p. ej., cuando el anticuerpo se incuba con UNC5C después de la preincubación con Netrina-1), que depende de la concentración de Netrina-1, puede considerarse indicativa de la inhibición dependiente de la concentración de Netrina-1 de la unión del anticuerpo al UNC5C. En modalidades, una señal indicativa de la presencia del anticuerpo unido al UNC5C puede reducirse en al menos 50 % en presencia de al menos 10^{-8} M de Netrina-1 (tal como, p. ej., después de la preincubación con 10^{-8} M de Netrina-1). En modalidades, la unión del anticuerpo al UNC5C puede reducirse en al menos

50 % en presencia de al menos 10^{-8} M de Netrina-1 (tal como, p. ej., después de la preincubación con 10^{-8} M de Netrina-1). En modalidades, una señal indicativa de la presencia del anticuerpo unido al UNC5C puede reducirse en al menos 80 % en presencia de al menos 10^{-7} M de Netrina-1 (tal como, p. ej., después de la preincubación con 10^{-7} M de Netrina-1). En modalidades, la unión del anticuerpo al UNC5C puede reducirse en al menos 80 % en presencia de al menos 10^{-7} M de Netrina-1 (tal como, p. ej., después de la preincubación con 10^{-7} M de Netrina-1). En modalidades, una señal indicativa de la presencia del anticuerpo unido al UNC5C puede reducirse en al menos 90 % o al menos 95 % en presencia de al menos 5×10^{-7} o 1×10^{-6} M de Netrina-1 (tal como, p. ej., después de la preincubación con 5×10^{-7} o 1×10^{-6} M de Netrina-1). En modalidades, la unión del anticuerpo al UNC5C puede reducirse en al menos 90 % o al menos 95 % en presencia de al menos 5×10^{-7} o 1×10^{-6} M de Netrina-1 (tal como, p. ej., después de la preincubación con 5×10^{-7} o 1×10^{-6} M de Netrina-1). Cualquier preincubación puede ser durante una cantidad de tiempo adecuada, tal como, p. ej., alrededor de 30 minutos.

Los anticuerpos descritos en la presente pueden tener un sitio de unión que al menos parcialmente se superpone con el sitio de unión de netrina-1. Los anticuerpos descritos en la presente pueden causar la dimerización de UNC5C.

El gen humano que codifica UNC5C (ident. del gen: 8633) está presente en 4q22.3 y consiste en 20 exones. Las

secuencias codificantes y de aminoácidos UNC5C no humano de referencia están disponibles en bases de datos públicas.

La secuencia de UNC5C humano está disponible bajo el identificador Uniprot O95185. Comprende 931 aminoácidos.

5 Los aminoácidos 62-159 forman un dominio similar a Ig, los aminoácidos 161-256 forman un dominio tipo C2 similar a Ig, los aminoácidos 260-314 y 316-368 forman dominios TSP tipo 11 y TSP tipo 12, los aminoácidos 530-673 forman un dominio ZU5 y los aminoácidos 850-929 forman un dominio de muerte.

10 La proteína se escinde en los aminoácidos 415-416 por la caspasa-3. Se proporciona una secuencia de aminoácidos UNC5C humano de referencia como la sec. con núm. de ident.: 99.

La secuencia de UNC5C de ratón está disponible con el identificador Uniprot O08747. Comprende 931

15 aminoácidos. Los aminoácidos 62-159 forman un dominio similar a Ig (también denominado en la presente como el primer dominio de inmunoglobulina o dominio de inmunoglobulina N terminal), los aminoácidos 161-256 forman un dominio tipo C2 similar a Ig (también referido en la

20 presente como el segundo dominio de inmunoglobulina), los aminoácidos 260-314 y 316-368 forman los dominios TSP tipo 1 y TSP tipo 1 2, los aminoácidos 530-673 forman un dominio ZU-95 y los aminoácidos 850-95 29 forman un dominio de muerte. La proteína se escinde en los aminoácidos 415-416

25 por la caspasa-3. Se proporciona una secuencia de aminoácidos UNC5C de ratón de referencia como la sec. con

núm. de ident.: 100. Sin embargo, como se usa en la presente, el término “UNC5C” comprende truncamientos, derivados y variantes de la secuencia de UNC5C proporcionada en la presente, y puede referirse a cualquier

5 proteína con al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia. Los anticuerpos descritos en la presente son capaces de unirse específicamente a un péptido o proteína que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 99 (que incluye una proteína

10 UNC5C de longitud completa que comprende dicha secuencia, o un fragmento de dicha proteína que comprende dicha secuencia), o un fragmento de esta, tal como, p. ej., un fragmento que comprende o consiste de los aminoácidos 41-

380 del UNC5C humano o murino (ratón) (tal como, p. ej.,

15 la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 101 o 102) o una secuencia homóloga correspondiente. Los anticuerpos descritos en la presente son capaces de unirse específicamente a un péptido o proteína que comprende el dominio extracelular de UNC5C o una parte de este, tal como,

20 p. ej., una parte que comprende los aminoácidos 41 a 380 del UNC5C humano o murino, o una secuencia homóloga correspondiente. Los anticuerpos descritos en la presente son capaces de unirse específicamente al UNC5C humano y al UNC5C T835M mutante humano. Los anticuerpos descritos en

25 la presente pueden unirse a formas mutantes del UNC5C humano que comprenden una o más mutaciones que no están en la

región extracelular de la proteína. El anticuerpo puede unirse a un epítipo ubicado en la región extracelular de UNC5C. En particular, el anticuerpo puede unirse al dominio de inmunoglobulina N-terminal de UNC5C (también denominado “primer dominio de inmunoglobulina”). El anticuerpo puede unirse a uno o más residuos de UNC5C que están implicados en la unión de Netrina-1 al UNC5C. Por lo tanto, el anticuerpo puede unirse a uno o más residuos de UNC5C ubicados en el primer dominio de inmunoglobulina de UNC5C.

Los anticuerpos descritos en la presente se unen al UNC5C (p. ej., ratón y/o humano) con alta afinidad. La unión de alta afinidad puede evaluarse midiendo el valor de EC50, la concentración a la que el anticuerpo produce una unión semimáxima, por ejemplo mediante ELISA como se describe en la presente. Por ejemplo, la afinidad del anticuerpo puede evaluarse mediante la unión al UNC5C humano recombinante unido a placa como se describe en la presente. Alta afinidad como se menciona en la presente significa un valor de EC50 de como máximo 1E-06 M (es decir, 1000 nM), como máximo 2 E-06 M, como máximo 3 E-06 M, como máximo 4 E-06, como máximo 5 E-06 M, como máximo 6 E-06 M, como máximo 7 E-06 M, como máximo 8 E-06 M, como máximo 9 E-06 M, como máximo 1 E-07 M (es decir, 100 nM), como máximo 5 E-07 M, como máximo 1 E-08 M, como máximo 2 E-08 M, como máximo 3 E-08 M, como máximo 4 E-08 M, como máximo 5 E-08 M, como máximo 6 E-08 M, como máximo 7 E-08 M, como máximo 8 E-08 M, como máximo 9 E-08 M,

como máximo 1 E-09 M, como máximo 2 E-09 M, como máximo 3 E-09 M, como máximo 4 E-09 M, como máximo 5 E-09 M, como máximo 6 E-09 M, como máximo 7 E-09 M; como máximo 8 E-09 M, como máximo 9 E-09 M, como máximo 1E-10 M, como máximo 2 E-10 M, como máximo 3 E-10 M, como máximo 4 E-10 M, como máximo 5 E-10 M, como máximo 6 E-10 M, como máximo 7 E-10 M, como máximo 8 E-10 M, como máximo 9 E-10 M, como máximo 1 E-11M, como máximo 2 E-11M, como máximo 3 E-11M, como máximo 4 E-11M, como máximo 5 E-11M, como máximo 6 E-11M, como máximo 7 E-11M, como máximo 8 E-11M, como máximo 9 E-11M, como máximo 1 E-12M, como máximo 2 E-12M, como máximo 3 E-12M, como máximo 4 E-12M, 5 E-12M, como máximo 6 E-12M, como máximo 7 E-12M, como máximo 8 E-12M, como máximo 9 E-12M o 1 E-13M. En algunos casos, los anticuerpos descritos en la presente se unen al UNC5C con una EC50 de como máximo 100 nM, como se evalúa mediante ELISA (p. ej., como se describe en la presente).

En algunas modalidades, el anticuerpo se une al UNC5C humano con una EC50 de como máximo 1E-08M, como máximo 1,1E-08M, como máximo 2,24E-08, como máximo 2,40E-08, como máximo 9,81E-08 M, como máximo 4,52E-09, como máximo 5,5E-09M, como máximo 9,62E-09M, como máximo 5,50E-10, como máximo 7,10E-10, como máximo 1,00E-11, como máximo 1,30E-11, como máximo 3,90E-11, como máximo 2,80E-12, o como máximo 9,20E-12.

En algunas modalidades, el anticuerpo se une al UNC5C humano con una EC50 de aproximadamente 1,1E-08M,

aproximadamente $2,24\text{E}-08$, aproximadamente $2,40\text{E}-08$,
aproximadamente $9,81\text{E}-08$ M, aproximadamente $4,52\text{E}-09$,
aproximadamente $5,5\text{E}-09\text{M}$, aproximadamente $8,00\text{E}-09$,
aproximadamente $9,62\text{E}-09\text{M}$, aproximadamente $5,50\text{E}-10$,
5 aproximadamente $7,10\text{E}-10$, aproximadamente $1,00\text{E}-11$,
aproximadamente $1,30\text{E}-11$, aproximadamente $3,90\text{E}-11$,
aproximadamente $2,80\text{E}-12$, aproximadamente $9,20\text{E}-12$.

En algunas modalidades, el valor de EC50 está entre
 $1\text{E}-07$ M y $1\text{E}-13\text{M}$; $5\text{E}-07$ M y $1\text{E}-13\text{M}$; $1\text{E}-08$ M y $1\text{E}-13\text{M}$; $5\text{E}-08$
10 M y $1\text{E}-13\text{M}$; $1\text{E}-09$ M y $1\text{E}-13\text{M}$; $5\text{E}-09$ M y $1\text{E}-13\text{M}$; $1\text{E}-10$ M y
 $1\text{E}-13\text{M}$; $5\text{E}-10$ M y $1\text{E}-13\text{M}$; $1\text{E}-11$ M y $1\text{E}-13\text{M}$; $5\text{E}-11$ M y $1\text{E}-$
 13M ; $1\text{E}-12$ M y $1\text{E}-13\text{M}$; $5\text{E}-12$ M y $1\text{E}-13\text{M}$; entre $1\text{E}-07$ M y $1\text{E}-$
 12M , $5\text{E}-07$ M y $1\text{E}-12\text{M}$; $1\text{E}-08$ M y $1\text{E}-12\text{M}$; $5\text{E}-08$ M y $1\text{E}-12\text{M}$;
 $1\text{E}-09$ M y $1\text{E}-12\text{M}$; $5\text{E}-09$ M y $1\text{E}-12\text{M}$; $1\text{E}-10$ M y $1\text{E}-12\text{M}$; $5\text{E}-10$
15 M y $1\text{E}-12\text{M}$; $1\text{E}-11$ M y $1\text{E}-12\text{M}$; $5\text{E}-11$ M y $1\text{E}-12\text{M}$; $1\text{E}-07$ M y
 $1\text{E}-11\text{M}$, $5\text{E}-07$ M y $1\text{E}-11\text{M}$; $1\text{E}-08$ M y $1\text{E}-11\text{M}$; $5\text{E}-08$ M y $1\text{E}-$
 11M ; $1\text{E}-09$ M y $1\text{E}-11\text{M}$; $5\text{E}-09$ M y $1\text{E}-11\text{M}$; $1\text{E}-10$ M y $1\text{E}-11\text{M}$;
 $5\text{E}-10$ M y $1\text{E}-1\text{M}$; $1\text{E}-07$ M y $1\text{E}-10\text{M}$, $5\text{E}-07$ M y $1\text{E}-10\text{M}$; $1\text{E}-08$ M
y $1\text{E}-10\text{M}$; $5\text{E}-08$ M y $1\text{E}-10\text{M}$; $1\text{E}-09$ M y $1\text{E}-10\text{M}$; $5\text{E}-09$ M y $1\text{E}-$
20 10M ; $1\text{E}-07$ M y $1\text{E}-09\text{M}$, $5\text{E}-07$ M y $1\text{E}-09\text{M}$; $1\text{E}-08$ M y $1\text{E}-09\text{M}$;
 $5\text{E}-08$ M y $1\text{E}-09\text{M}$; $1\text{E}-07$ M y $1\text{E}-08\text{M}$, $5\text{E}-07$ M y $1\text{E}-08\text{M}$.

En algunas modalidades, los anticuerpos
descritos en la presente son capaces de unirse
específicamente a una proteína UNC5C o fragmentos de
25 proteína que comprenden o consisten en una secuencia de
aminoácidos variante de UNC5C. En algunas modalidades, la

proteína o fragmento variante de UNC5C comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % de identidad con la sec. con núm. de ident.:

5 99. En algunas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente son capaces de unirse específicamente a un fragmento de UNC5C que comprende al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de la secuencia de aminoácidos de UNC5C, o una secuencia variante de UNC5C.

10 El UNC5C puede ser UNC5C humano o UNC5C de ratón. Adecuadamente, el UNC5C puede ser UNC5C humano. UNC5C puede referirse al UNC5C humano, a menos que el contexto lo indique de cualquier otra manera. En otras modalidades, por ejemplo, cuando el individuo a tratar es un mamífero
15 no humano, UNC5C puede ser UNC5C no humano.

Propiedades estructurales

Los anticuerpos de la presente descripción pueden dirigirse específicamente a un único epítopo en la proteína
20 UNC5C. El término epítopo, también conocido como determinante antigénico, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o fragmento de esta. Los determinantes epitópicos, o antigénicos,
25 usualmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos

o cadenas laterales de azúcar, y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características específicas de carga.

Los anticuerpos descritos en la presente pueden
5 unirse a un epítipo discontinuo de UNC5C. Los anticuerpos descritos en la presente pueden unirse a un epítipo que comprende uno o más de, o todos, los siguientes residuos de UNC5C proporcionados como la sec. con núm. de ident.: 99: Thr89, Gln90, Gln102, Lys103, Val107, Asp108, Glu109, Arg110,
10 Val111, Ile118, Arg120 o residuos correspondientes en una secuencia homóloga. En algunas modalidades, p. ej., en los casos en los que el anticuerpo es un anticuerpo único de cadena pesada, el anticuerpo se une a los residuos Thr89, Gln90, Gln102, Lys103, Val107, Glu109, Ile118 y Arg120.

15 En modalidades, uno o más de (o todos) de los residuos de VH 55, 63, 64, 65, 66, 74, 108, 110 en la numeración IMGT interactúan con uno o más residuos en el epítipo. En modalidades, uno o más de (o todos) de los residuos VH 55 (Tyr), 63 (Gly), 64 (T, H o S, más
20 específicamente Thr), 65 (T o S, más específicamente Thr), 66 (Asn), 74 (Ser), 108 (Arg), 110 (Met) en la numeración IMGT interactúan con uno o más residuos en el epítipo. Todos estos residuos se conservan a través de la VH de los anticuerpos 5262, 5996, 5997, 5998, 5999, 6000, 6001, 6002,
25 6003, 6004, 6005, 6033, 6034, 6035, 6036, 6037, 6038, 6039, 6177, 6178. Todos estos residuos aparte de 64 (Thr) y/o 65

(Thr) se conservan a través de la VH de los anticuerpos 6187 (donde la posición 64 es H y la posición 65 es T), 6191 (donde la posición 64 es S y la posición 65 es S). Esto indica que las sustituciones en estas posiciones serían posibles mientras se mantiene la unión al epítipo. Por lo tanto, en modalidades, uno o más de (o todos) de los residuos VH 55 (Tyr), 63 (Gly), 64 (Thr o sustitución conservadora, p. ej., H o S), 65 (Thr o sustitución conservadora, p. ej., S), 66 (Asn), 74 (Ser), 108 (Arg), 110 (Met) en la numeración IMGT interactúan con uno o más residuos en el epítipo. En modalidades, uno o más de (o todos) los residuos VL 38, 107, 108, 109 y 114 en la numeración IMGT interactúan con uno o más residuos en el epítipo. En modalidades, uno o más de (o todos) los residuos VL 38 (Y, D, L o T, tal como Tyr en modalidades específicas), 107 (S, Y, F o W, tal como Ser en modalidades específicas), 108 (Y, D, T o G, tal como Tyr en modalidades específicas), 109 (S, D, K o ausente, tal como Ser en modalidades específicas), 114 (T, N, S, R, G o A, tal como Thr en modalidades específicas) en la numeración IMGT interactúan con uno o más residuos en el epítipo. La posición 38 es Tyr en los anticuerpos 5262, 6178, 6530, 6531, 6533, 6534, 6537, 6539, D en el anticuerpo 6335, L en el anticuerpo 6336 y T en el anticuerpo 6538. La posición 107 es S en los anticuerpos 5262 y 6178 (misma VL), Y en los anticuerpos 6530, 6532, 6533, 6534, 6535 y 6536, F en 6531, y W en los anticuerpos 6537, 6538 y 6539. La posición 108 es Y en los

anticuerpos 5262 y 6178, D en los anticuerpos 6530, 6532, 6533, 6534, 6535, 6537 y 6538, T en los anticuerpos 6531 y 6536, y G en el anticuerpo 6539. La posición 109 es S en los anticuerpos 5262, 6178, 6530, 6533, 6534, 6535, 6536 y 6537, D en los anticuerpos 6531 y 6538, K en el anticuerpo 6532 y ausente en el anticuerpo 6539. La posición 114 es T en los anticuerpos 5262, 6178 y 6536, N en los anticuerpos 6530, 6533 y 6538, S en los anticuerpos 6531 y 6537, R en el anticuerpo 6532, G en el anticuerpo 6534, A en el anticuerpo 6535. Por lo tanto, en modalidades, la VH de un anticuerpo como se describe en la presente tiene: en el residuo 55: Tyr, en el residuo 63: Gly, en el residuo 64: T, H o S, más específicamente Thr, en el residuo 65: T o S, más específicamente Thr, en el residuo 66: Asn, en el residuo 74: Ser, en el residuo 108: Arg, en el residuo 110: Met, donde todas las posiciones están en la numeración IMGT. Además, en modalidades, la VL de un anticuerpo como se describe en la presente tiene: en el residuo 38: Y, D, L o T, tal como Tyr en modalidades específicas, en el residuo 107: S, Y, F o W, tal como Ser en modalidades específicas, en el residuo 108: Y, D, T o G, tal como Tyr en modalidades específicas, en el residuo 109: S, D, K o ausente (delección), tal como Ser en modalidades específicas, en el residuo 114: T, N, S, R, G o A, tal como Thr en modalidades específicas, donde todas las posiciones están en la numeración IMGT. Cualquiera de los aminoácidos en cualquiera de estas

posiciones se puede combinar entre sí, y todas las combinaciones resultantes se prevén explícitamente.

En algunos casos, (a) el residuo de VH 64 (p. ej., Thr) de los anticuerpos descritos en la presente interactúa con Thr 89 del epítipo discontinuo; y/o (b) el residuo de VH 63(p. ej., Gly) de los anticuerpos descritos en la presente interactúa con Gln 90 del epítipo discontinuo; y/o (c) el residuo de VH 65 (p. ej., Thr) de los anticuerpos descritos en la presente interactúa con Gln 102 del epítipo discontinuo; y/o (d) el residuo de VH 74 (p. ej., Ser) de los anticuerpos descritos en la presente interactúa con Lys103 del epítipo discontinuo; y/o (e) el residuo de VH 66 (Asn) de los anticuerpos descritos en la presente interactúa con Val 107 del epítipo discontinuo; y/o (f) los residuos de VH 55 (p. ej., Tyr), 66 (p. ej., Asn), 108 (p. ej., Arg) y/o 110 (p. ej., Met) de anticuerpos descritos en la presente interactúan con Glu109 del epítipo discontinuo; y/o (g) los residuos de VH 108(p. ej., Arg), y/o 110 (p. ej., Met) de los anticuerpos descritos en la presente interactúan con Ile118 del epítipo discontinuo; y/o (h) el residuo de VH 55 (p. ej., Tyr), 64 (p. ej., Thr) y/o 65 (p. ej., Thr) de los anticuerpos descritos en la presente interactúa con Arg120 del epítipo discontinuo. En algunos casos, (i) el residuo de VL 114 (p. ej., Thr) de los anticuerpos descritos en la presente interactúa con Val107 y/o Asp108, y/o Glu109 del epítipo discontinuo; y/o (j) el residuo de VL 109 (p. ej.,

Ser) de los anticuerpos descritos en la presente interactúa con Glu109 y/o Arg110 del epítipo discontinuo; y/o (k) el residuo de VL 108 (p. ej., Tyr) de los anticuerpos descritos en la presente interactúa con Arg110 y/o Val111 del epítipo discontinuo; en donde los residuos de UNC5C son aquellos en las posiciones especificadas en la sec. con núm. de ident.: 99 o posiciones correspondientes en una secuencia homóloga. El experto en la técnica estará familiarizado con los métodos para mapear epítopos, que incluyen, pero sin limitarse a, la cocrystalografía de rayos X como se describe en la presente; la microscopía electrónica criogénica como se describe, por ejemplo, en Renaud et al., 2018; las estrategias de mutagénesis, tal como la mutagénesis por escaneo de alanina como se describe, por ejemplo, en Cunningham et al., 1989.

Un “dominio de unión a antígeno” describe la parte de una molécula que se une a todo o parte del antígeno diana. Un anticuerpo comprende generalmente seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR); tres en la región VH: HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y tres en la región VL: LCDR1, LCDR2, y LCDR3. Las seis CDR juntas definen el parátipo del dominio de unión al antígeno, que es la parte del dominio de unión al antígeno que se une al antígeno diana. El parátipo de un anticuerpo como se describe en la presente puede incluir los siguientes residuos de VH: 55 (p. ej., Tyr), 63 (p. ej., Gly), 64 (p. ej., Thr, His o Ser), 65 (p. ej., Thr o Ser), 66 (p. ej., Asn), 74 (p. ej.,

Ser), 108 (p. ej., Arg), 110 (p. ej., Met) en la numeración IMGT. El parátipo de un anticuerpo como se describe en la presente puede incluir los siguientes residuos de VL: 38 (p. ej., Tyr, D, L o T), 107 (p. ej., Ser, Y, F o W), 108 (p. ej., Tyr, D, T o G), 109 (p. ej., Ser, D, K o (delección)), 114 (p. ej., Thr, N, S, R, G o A) en la numeración IMGT. Por lo tanto, un anticuerpo de acuerdo con cualquier modalidad de la presente descripción puede comprender una VH con los siguientes residuos: en la posición 55: Tyr, en la posición 63: Gly, en la posición 64: Thr, en la posición 65: Thr, en la posición 66: Asn, en la posición 74: Ser, en la posición 108: Arg, en la posición 110: Met en la numeración IMGT. Además, un anticuerpo de acuerdo con cualquier modalidad de la presente descripción puede comprender una VL con los siguientes residuos: en la posición 38: Tyr, en la posición 107: Ser, en la posición 108: Tyr, en la posición 109: Ser, en la posición 114: Thr en la numeración IMGT. La presente descripción se relaciona principalmente con moléculas de anticuerpo, ya sea el anticuerpo completo (p. ej., IgG, tal como IgG1) o fragmentos del anticuerpo (p. ej., fragmento variable monocatenario (scFv, por sus siglas en inglés), fragmentos de anticuerpo (Fab, por sus siglas en inglés) o fragmentos de anticuerpo bivalente (F(ab')₂), anticuerpo de dominio único (sdAb, por sus siglas en inglés). Se proporcionan regiones de unión al antígeno del anticuerpo

(también denominadas “porciones de unión al antígeno”), al igual que los dominios variables de cadena pesada (VH) y dominios variables de cadena ligera (VL) del anticuerpo. Dentro de los dominios VH y VL se proporcionan regiones determinantes de complementariedad (CDR), que pueden proporcionarse dentro de diferentes regiones marco (FR), para formar dominios VH o VL, según sea el caso. Un sitio de unión al antígeno puede consistir en un dominio VH de anticuerpo y/o un dominio VL. Por lo tanto, un anticuerpo de acuerdo con la presente descripción puede ser una molécula de anticuerpo scFv, un nanocuerpo o un anticuerpo completo. El anticuerpo puede comprender una región constante de anticuerpo. La región constante del anticuerpo puede ser una región constante humana, tal como una región constante IgG1 humana. El anticuerpo puede ser un anticuerpo completo. El anticuerpo puede ser una IgG, tal como una IgG1 o una variante de esta. El anticuerpo puede ser una variante de IgG1 L234A/L235A (LALA).

Los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden proporcionarse en forma aislada. El término “anticuerpo” comprende un fragmento o derivado de este, o un anticuerpo sintético o fragmento de anticuerpo sintético.

La porción de unión a antígenos puede ser una parte de un anticuerpo (p. ej., un fragmento Fab) o un fragmento de anticuerpo sintético (p. ej., un scFv). Los

anticuerpos adecuados para antígenos seleccionados pueden prepararse mediante técnicas conocidas, por ejemplo, las descritas en “Monoclonal Antibodies: A manual of techniques”, H Zola (CRC Press, 1988) y en “Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications”, J G R Hurrell (CRC Press, 1982). Los anticuerpos quiméricos se analizan por Neuberger et al (1988, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 25 792-5 799).

Un anticuerpo o fragmento de este puede ser un anticuerpo monoclonal (mAb, por sus siglas en inglés). Los mAb son poblaciones homogéneas de anticuerpos dirigidos específicamente a un único epítipo en un antígeno.

También pueden proporcionarse fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, al igual que anticuerpos diseñados genéticamente y fragmentos de anticuerpos. Los dominios VH y VL del anticuerpo están involucrados en el reconocimiento de antígenos, un hecho reconocido por primera vez por los primeros experimentos de digestión de proteasas. Se encontró una confirmación adicional mediante la “humanización” de anticuerpos de roedores. Los dominios variables de origen de roedor pueden fusionarse con dominios constantes de origen humano, de tal manera que el anticuerpo resultante retenga la especificidad antigénica del anticuerpo parental de roedor (Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sc. USA 81, 6851-6855).

Esa especificidad antigénica es conferida por dominios variables y es independiente de los dominios constantes como se conoce a partir de experimentos que implican la expresión bacteriana de fragmentos de anticuerpos, todos conteniendo uno o más dominios variables. Estas moléculas incluyen moléculas similares a Fab (Better et al (1988) Science 240, 1041); moléculas Fv (Skerra et al (1988) Science 240, 1038); moléculas de Fv monocatenario (ScFv) donde los dominios asociados VH y VL se unen mediante un oligopéptido flexible (Bird et al (1988) Science 242, 423; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879) y anticuerpos de dominio único (dAb) que comprenden dominios V aislados (Ward et al (1989) Nature 341, 544). Una revisión general de las técnicas implicadas en la síntesis de fragmentos de anticuerpos que retienen sus sitios de unión específicos se encuentra en Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293- 299.

La expresión “moléculas de ScFv” se refiere a moléculas en donde los dominios asociados VH y VL se unen covalentemente, p. ej., mediante un oligopéptido flexible. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv, ScFv y sdAb se pueden expresar todos y ser secretados a partir de E. coli, lo que permite la producción fácil de grandes cantidades de dichos fragmentos.

Los anticuerpos enteros, y los fragmentos F(ab')₂ son “bivalentes”. El término “bivalente” significa

que dichos anticuerpos y fragmentos $F(ab')_2$ tienen dos sitios de combinación de antígenos. En contraste, los fragmentos Fab, Fv, ScFv y dAb son monovalentes, teniendo solo un sitio de combinación de antígenos.

5 Los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden estar etiquetados de manera detectable o, al menos, ser capaces de ser detectados. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar etiquetado con un átomo radiactivo o una molécula coloreada o una molécula fluorescente o una
10 molécula que se puede detectar fácilmente de cualquier otra manera. Las moléculas detectables adecuadas incluyen proteínas fluorescentes, luciferasa, sustratos enzimáticos y radioetiquetas. La entidad de unión (anticuerpo o fragmento de este) puede estar directamente etiquetada con
15 una etiqueta detectable o puede estar etiquetada indirectamente. Por ejemplo, la entidad de unión puede ser un anticuerpo no etiquetado que se puede detectar por otro anticuerpo que está etiquetado. Alternativamente, el segundo anticuerpo puede tener biotina unida y la unión de la
20 estreptavidina etiquetada a la biotina se usa para etiquetar indirectamente el primer anticuerpo.

Un “fragmento” de un anticuerpo puede comprender cualquier número de residuos de un anticuerpo “parental”, conservando al mismo tiempo la capacidad de unión a la
25 diana. Un fragmento puede carecer de función efectora, por ejemplo puede ser completamente incapaz de unirse o mostrar

una unión disminuida al receptor Fc, con relación al progenitor. Un fragmento es típicamente más pequeño que el anticuerpo parental. Un fragmento puede comprender 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de los aminoácidos contiguos o no contiguos del anticuerpo parental. Un fragmento puede comprender 50, 100, 150, 200, 250, 300 o más aminoácidos contiguos o no contiguos del anticuerpo parental. Un fragmento puede comprender delecciones en la región Fc, o de la región Fc. Un fragmento puede retener las CDR y/o los dominios variables del anticuerpo parental, inalterados. En algunas modalidades, un fragmento es un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂.

Las secuencias CDR se describen en la presente usando la numeración IMGT (Lefranc, M.-P., Immunology Today, 18, 509 (1997)).

Los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR del dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo ATL_5262, ATL_6036, ATL_6039, ATL_6177 o ATL_6178. Los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener las siguientes CDR de cadena pesada:

CDRH1: sec. con núm. de ident.: 20; CDRH2: sec. con núm. de ident.: 21 o sec. con núm. de ident.: 22; y CDRH3: Sec. con núm. de ident.: 23.

La descripción proporciona además anticuerpos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) con las

CDR de la VH de los anticuerpos ATL_6187 o ATL_6191: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 115 o la sec. con núm. de ident.: 116, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 117 o la sec. con núm. de ident.: 118, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 119 o la sec. con núm. de ident.: 120. En particular, los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR del dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo ATL_6187, es decir, CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 115, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 117, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 119. Además, los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR del dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo ATL_6191, es decir, CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 116, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 118, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 120. En un anticuerpo de acuerdo con la presente descripción, al menos una de las secuencias CDR 1-3 de VL puede variar. Por ejemplo,

una variante puede tener las CDR de VH que tienen hasta 3 mutaciones de aminoácidos sobre las CDR de VH anteriores.

La descripción proporciona además anticuerpos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR de la VH de los anticuerpos ATL_6530; ATL_6531; ATL_6532; ATL_6533; ATL_6534; ATL_6535; ATL_6536; ATL_6537; ATL_6538; ATL_6539: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 142-149, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 150-158, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 159-168. En particular, los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR del dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo ATL_6530, es decir, CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 142, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 150, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 159. En particular, los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR del dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo ATL_6531, es decir, CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 143, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 151, y CDRH3 que comprende la

secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 160.

En particular, los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR del dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo ATL_6532, es decir, CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 144, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 152, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 161.

En particular, los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR del dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo ATL_6533, es decir, CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 145, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 153, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 162.

En particular, los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR del dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo ATL_6534, es decir, CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 144, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 152, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 163.

En particular, los anticuerpos de acuerdo con la presente

descripción pueden tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR del dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo ATL_6535, es decir, CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 143, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 154, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 164. En particular, los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR del dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo ATL_6536, es decir, CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 146, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 155, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 165. En particular, los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR del dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo ATL_6537, es decir, CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 147, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 156, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 166.

En particular, los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR del dominio variable de cadena

pesada (VH) del anticuerpo ATL_6538, es decir, CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 148, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 157, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 167. En particular, los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las CDR del dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo ATL_6539, es decir, CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 149, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 158, y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 168. En un anticuerpo de acuerdo con la presente descripción, al menos una de las secuencias CDR 1-3 de VL puede variar. Por ejemplo, una variante puede tener las CDR de VH que tienen hasta 3 mutaciones de aminoácidos sobre las CDR de VH anteriores.

En un anticuerpo de acuerdo con la presente descripción, al menos una de las secuencias CDR 1-3 de VL puede variar. Es decir, el conjunto anterior de las CDR puede comprender una, dos o tres mutaciones. Las mutaciones como se usan en la presente se refieren a sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos. Las mutaciones pueden introducirse mediante técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Una variante puede tener una o dos mutaciones de aminoácidos,

tales como sustituciones en comparación con el conjunto de CDR1-3 de VH descrito anteriormente. En algunas modalidades, un anticuerpo de acuerdo con la descripción comprende las CDR con secuencias que tienen una o dos mutaciones, tales como sustituciones en comparación con las secuencias de CDR de VH de cualquier anticuerpo descrito en la presente. Por ejemplo, un anticuerpo de acuerdo con la descripción puede comprender las CDR de VH con las secuencias de cualquier anticuerpo anterior, excepto que una o dos de las CDRH comprenden una sustitución, donde el número total de sustituciones a través de las CDRH no excede 2. En modalidades, una variante puede tener una, dos o tres, preferentemente como máximo una o dos sustituciones en cada una de una o más de las CDR1-3 de VH descritas anteriormente.

Las regiones CDRH1 de cualquier anticuerpo o fragmento descrito en la presente pueden tener una longitud de 8 aminoácidos. Las regiones CDRH2 de cualquier anticuerpo o fragmento descrito en la presente pueden tener una longitud de 7 aminoácidos. Las regiones CDRH3 de cualquier anticuerpo o fragmento descrito en la presente pueden tener una longitud de 13 aminoácidos. En modalidades, una variante puede tener las CDR de VH que tienen al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % de identidad de secuencia con cualquier conjunto de las CDR de VH descritas en la presente. Por ejemplo, una variante con una longitud combinada de CDRH 1-3 de 28 aminoácidos puede tener hasta 8, hasta 5 o hasta 2

sustituciones de aminoácidos en comparación con un conjunto de las CDR de VH descritas en la presente. En modalidades, una variante puede tener una o dos sustituciones que comprenden o consisten en una sustitución en la posición 58
5 en CDRH2. La sustitución puede ser N58Y.

Un anticuerpo de acuerdo con la presente descripción puede tener una VH con las siguientes CDRH: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20, CDRH2 que comprende la secuencia
10 de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 21 y CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23. Estas son las CDR de VH de ATL_5262 y todas las variantes de estas, excepto ATL_6178 (es decir ATL_6033, 6034, 6035, 6036, 6037, 6038, 6039, 6177).

15 Un anticuerpo de acuerdo con la presente descripción puede tener una VH con las siguientes CDRH: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 22 y CDRH3
20 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 23. Estas son las CDR de VH de ATL_6178

Un anticuerpo de acuerdo con la presente descripción puede tener una VH con las siguientes CDRH: CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec.
25 con núm. de ident.: 144, CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 152 y CDRH3

que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con
núm. de ident.: 161. Estas son las CDR de VH o ATL_6532.
Estas son las CDR de ATL_6533. Los anticuerpos de acuerdo
con la presente descripción pueden tener un dominio
5 variable de cadena ligera (VL) con las CDR del dominio
variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo ATL_5262
(idéntico a los de ATL_6178), ATL_6002, o ATL_6003, o
ATL6187, o más específicamente ATL_5262, o ATL_6002. Los
anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden
10 tener las siguientes CDR de cadena ligera:

CDRL1: sec. con núm. de ident.: 31 o 32,

CDRL2: sec. con núm. de ident.: 34, y

CDRL3: sec. con núm. de ident.: 40 o 47 o 121.

En un anticuerpo de acuerdo con la presente
15 descripción, al menos una de las secuencias CDR 1-3 de VL
puede variar. Una variante puede tener 1, 2 o 3 mutaciones
de aminoácidos, tales como sustituciones en comparación con
el conjunto de CDR1-3 de VL descrito anteriormente. En
algunas modalidades, un anticuerpo de acuerdo con la
20 descripción comprende las CDR con secuencias que tienen
entre 1 y 3 mutaciones, tales como sustituciones en
comparación con las secuencias de CDR de VL de cualquier
anticuerpo descrito en la presente. Por ejemplo, un
anticuerpo de acuerdo con la descripción puede comprender
25 las CDR de VL con las secuencias de cualquier anticuerpo
anterior, excepto que de una a 3 de las CDRL comprenden una

sustitución, donde el número total de sustituciones a través de las CDRL no exceden de 3. En modalidades, una variante puede tener una, dos o tres, preferentemente como máximo una o dos sustituciones en cada una de una o más de las CDR1-3 de VL descritas anteriormente. Las regiones CDRL1 de cualquier anticuerpo o fragmento descrito en la presente pueden tener una longitud de entre 6 y 12 aminoácidos, preferentemente 6 aminoácidos. Las regiones CDRL2 de cualquier anticuerpo o fragmento descrito en la presente pueden tener una longitud de 3 aminoácidos. Las regiones CDRL3 de cualquier anticuerpo o fragmento descrito en la presente pueden tener una longitud de 9 o 10 aminoácidos, preferentemente 9. En modalidades, una variante puede tener las CDR de VL que tienen al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % de identidad de secuencia con cualquier conjunto de las CDR de VL descritas en la presente. Por ejemplo, una variante con una longitud combinada de CDRL 1-3 de 18 aminoácidos (tal como, p. ej., una variante de las CDRL ATL_0005262 o ATL0006003) puede tener hasta 5, hasta 3, o hasta 1 sustitución de aminoácidos en comparación con un conjunto de las CDR de VL descritas en la presente.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener una VL con las siguientes CDRL: CDRL1: sec. con núm. de ident.: 24, CDRL2: sec. con núm. de ident.: 34, CDRL3: Sec. con núm. de ident.: 40 Estas

son las CDR de VL de los anticuerpos ATL_5262; 6033; 6034; 6035; 6036; 6037; 6038; 6039; 6177; 6178, 6187 y 6191.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener una VL que comprende:

- 5 (a) las secuencias marco de ATL_5262 (y 6002, 6003, 6187, 6191): LFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 63; LFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 71; LFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 77; y LFWR4 de la sec. con núm. de
10 ident.: 85;
- (b) las secuencias marco de ATL_5996: LFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 64; LFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 71; LFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 78; y LFWR4 de la sec.
15 con núm. de ident.: 86;
- (c) las secuencias marco de ATL_5997: LFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 65; LFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 72; LFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 79; y LFWR4 de la sec.
20 con núm. de ident.: 87;
- (d) las secuencias marco de ATL_5998: LFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 66; LFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 73; LFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 80; y LFWR4 de la sec.
25 con núm. de ident.: 87;

- 5 (e) las secuencias marco de ATL_5999: LFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 67; LFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 73; LFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 81; y LFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 87;
- 10 (f) las secuencias marco de ATL_6000: LFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 68; LFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 74; LFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 82; y LFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 88;
- 15 (g) las secuencias marco de ATL_6001: LFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 63; LFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 75; LFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 77; y LFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 89;
- 20 (h) las secuencias marco de ATL_6004: LFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 69; LFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 72; LFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 83; y LFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 85;
- 25 (i) las secuencias marco de ATL_6005: LFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 70; LFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 76; LFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 84; y LFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 90;

(j) o secuencias marco que comprenden hasta 5 o hasta 10 mutaciones, tales como sustituciones, en comparación con las secuencias anteriores.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener una VL que comprende las secuencias marco de cualquiera de ATL_6530, ATL_6531, ATL_6532, ATL_6533, ATL_6534, ATL_6535, ATL_6536, ATL_6537, ATL_6538, ATL_6539.

Las CDR 1-3 de VH y opcionalmente las CDR 1-3 de VL de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente también pueden ser particularmente útiles junto con varias regiones marco diferentes. En consecuencia, las cadenas ligeras y/o pesadas que tienen las CDR 1-3 como se describió anteriormente pueden poseer una región marco alternativa. Las regiones marco adecuadas son conocidas en la técnica y se describen por ejemplo en M. Lefranc & G. Le Franc (2001) "The Immunoglobulin Facts Book", Academic Press.

Un anticuerpo de la descripción puede tener la CDRH1, CDRH2 y CDRH3 del dominio VH dentro de un marco de línea germinal. En algunas modalidades, el anticuerpo de la descripción tiene un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende CDRH1, CDRH2 y CDRH3 dentro de un marco de línea germinal, siempre que la posición 67 en la numeración IMGT estándar sea Q.

Un anticuerpo de la descripción puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) con las secuencias

marco FWRH1, FWRH2, FWRH3 y FWRH4 de cualquiera de las variantes ATL_5262 (es decir, anticuerpos ATL_0005996, ATL_0005997, ATL_0005998, ATL_0005999, ATL_0006000, ATL_0006001, ATL_0006002, ATL_0006003, ATL_0006004, 5 ATL_0006005, ATL_0006036, ATL_0006039, ATL_0006177, ATL_0006178).

Un anticuerpo de acuerdo con la descripción puede tener una VH con las siguientes secuencias marco: HFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 50; HFWR2 de la sec. con núm. de 10 ident.: 51; HFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 55; y HFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 62; o secuencias marco que comprenden de una a cinco mutaciones, tales como sustituciones, en comparación con estas secuencias marco.

Las mutaciones en las secuencias de FWRH pueden 15 incluir una o más de, o todas de: (i) HFWR2: posiciones 40, 49, (ii) HFWR3: posiciones 80, 82, 86. En algunas modalidades, las mutaciones en las secuencias marco son sustituciones y se seleccionan de las siguientes posiciones en la numeración IMGT estándar: (i) HFWR2: en 20 las posiciones 40: T40S, en la posición 49: R49G, (ii) HFWR3: en la posición 80: I80V, en la posición 82: T82K, en la posición 86: H86Q; en la numeración IMGT estándar.

Las mutaciones en las secuencias de FWRH no pueden incluir una sustitución en la posición 67 en la 25 numeración IMGT estándar.

Un anticuerpo de acuerdo con la descripción puede tener una VH con las siguientes secuencias marco: HFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 50; HFWR2 de las sec. con núms. de ident.: 51-54; HFWR3 de las sec. con núms. de ident.: 55-61; y HFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 62.

El anticuerpo de acuerdo con la presente descripción puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende las siguientes secuencias marco:

HFWR1 de ATL_6187 o ATL_6191:
10 QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVS (sec. con núm. de ident.: 50);

HFWR2 de ATL_6187 o ATL_6191: WSWIRQPPGKGLEWIGY
(sec. con núm. de ident.: 52) o WSWIRQTPGKGLEWIGY
(sec. con núm. de ident.: 195);

15 HFWR3 de ATL_6187 o ATL_6191:
NQNP SLKSRVTMSVDSSKSLKLT SVTAADTAVYYC (sec.
con núm. de ident.: 196) o
NYNP SLKSRVTISVDTFKNQFSLKLT SVTAADTAVYYC (sec.
con núm. de ident.: 197);

20 HFWR4 de ATL_6187 o ATL_6191: WGQGILVIVSS (sec.
con núm. de ident.: 198) o WGQGTLVTVSS (sec. con
núm. de ident.: 62), o

secuencias marco que comprenden de una a diez o
de una a 5 mutaciones, tales como sustituciones,
25 en comparación con estas secuencias marco.

Las mutaciones en la FWRH pueden incluir uno o más, o todos, de:

- En HFWR1: posición 25, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución V25Q;
- 5 - En HFWR2: posición 43, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución I42V; posición 49 opcionalmente en donde la mutación es la sustitución R49A;
- 10 - En HFWR3: posición 68, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución N68S; posición 78, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución I78M; posición 81, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución D81Y; posición 83, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución S83F; posición 84, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución K84T; posición 87, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución F87L;
- 15 - En HFWR4: posición 122, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución I122K; posición 125, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución T125I.
- 20

El anticuerpo de acuerdo con la presente descripción puede tener un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias marco de
25 cualquiera de los anticuerpos ATL_6530, 6531, 6532, 6533,

6534, 6535, 656, 6537, 6538 o 6539, o secuencias marco que comprenden de una a cinco mutaciones, tales como sustituciones, en comparación con estas secuencias marco. Por lo tanto, los anticuerpos de acuerdo con la presente
5 descripción pueden tener una VH que comprende

(a) HFWR1 de QVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAAS sec. con
núm. de ident.: 199; HFWR2 de
MNWVRQAPGKGLEWVSS sec. con núm. de ident.:
200; HFWR3 de
10 YYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC sec.
con núm. de ident.: 201; HFWR4 de WGQGTLLTVSS
sec. con núm. de ident.: 62, (secuencias
marco de ATL_6530);

(b) HFWR1 de EVQLVESGGVVQPGGSLRLSCAAS sec. con
15 núm. de ident.: 202; HFWR2 de
MHWVRQAPGKGLEWVSL sec. con núm. de ident.:
203; HFWR3 de
YYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC sec.
con núm. de ident.: 204; HFWR4 de WGQGTLLTVSS
20 sec. con núm. de ident.: 62, (secuencias
marco de ATL_6531)

(c) HFWR1 de QVTLKESGAEVKKPGASVKVSCAS sec. con
núm. de ident.: 205; HFWR2 de
MHWVRQAPGQGLEWMGR sec. con núm. de ident.:
25 206; HFWR3 de
NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC sec.

sec. con núm. de ident.: 208, (secuencias
marco de ATL_6535)

(g) HFWR1 de EVQLLESAGGVVQLGRSLRLSCAAS sec. con
núm. de ident.: 216; HFWR2 de
5 MHWVRQAPGKGLEWVAI sec. con núm. de ident.:
217; HFWR3 de
YYAGSVGGRFTISRDN SKNTLYLQMDSLRSDDTAVYYC sec.
con núm. de ident.: 218; HFWR4 de WGHGTMVTVSS
sec. con núm. de ident.: 219, (secuencias
10 marco de ATL_6536)

(h) HFWR1 de QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS sec. con
núm. de ident.: 220; HFWR2 de
IGWVRQMPGKGLEWMGI sec. con núm. de ident.:
221; HFWR3 de
15 RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYVC sec.
con núm. de ident.: 222; HFWR4 de WGQGTTVTVSS
sec. con núm. de ident.: 223, (secuencias
marco de ATL_6537)

(i) HFWR1 de QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVS sec. con
núm. de ident.: 224; HFWR2 de
20 WSWVRQPPGKGLEWIGE sec. con núm. de ident.:
225; HFWR3 de
NYNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC sec.
con núm. de ident.: 226; HFWR4 de WGQGTLLVTVSS
25 sec. con núm. de ident.: 62, (secuencias
marco de ATL_6538)

(j) HFWR1 de QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSAS sec. con
 núm. de ident.: 227; HFWR2 de
 MSWVRQAPGKGLEWVST sec. con núm. de ident.:
 228; HFWR3 de
 5 YYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC sec.
 con núm. de ident.: 229; HFWR4 de WGQGTMVTVSS
 sec. con núm. de ident.: 208, (secuencias
 marco de ATL_6539)

(k) o secuencias marco que comprenden de una a
 10 cinco mutaciones, tales como sustituciones,
 en comparación con estas secuencias marco.

Las mutaciones en la FWRH pueden incluir
 mutaciones en una o más, o todas, de posiciones:

- En HFWR1: 1, opcionalmente en donde la
 15 mutación es la sustitución Q1E; 1,
 opcionalmente en donde la mutación es la
 sustitución Q3T; 6, opcionalmente en donde
 la mutación es la sustitución E6Q; 7,
 opcionalmente en donde la mutación es la
 20 sustitución S7T; 12, opcionalmente en donde
 la mutación es la sustitución L12V; 13,
 opcionalmente en donde la mutación es la
 sustitución V13K; 15, opcionalmente en donde
 la mutación es la sustitución P15L; 16,
 25 opcionalmente en donde la mutación es la
 sustitución S16G; 19, opcionalmente en donde

la mutación es la sustitución L19V; 21, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución L21V; 22, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución S22T;

5 - En HFWR2: 48, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución K48Q;

 - En HFWR3: 74, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución S74G; 75, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución R75Q; 76, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución V76F; 78, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución I78M; 79, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución S79T; 83, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución S83A; 84, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución K84I; 85, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución N85S; 89, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución L89M; 93, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución S93R; 96, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución A96S;

10 - En HFWR4: 120, opcionalmente en donde la mutación es la sustitución Q120H.

15

20

25

En esta memoria descriptiva, los anticuerpos pueden tener regiones VH (y opcionalmente VL) que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene un alto porcentaje de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos VH y/o VL descritas anteriormente.

Por ejemplo, los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción incluyen anticuerpos que se unen al UNC5C y tienen una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, más preferentemente una de al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región VH de cualquier anticuerpo descrito en la presente, tal como ATL_5262, ATL_6036, ATL_6039, ATL_6177, ATL_6178, ATL_6187, ATL_6191, ATL_6530-6539 (sec. con núm. de ident.: 1, 5, 8, 91, 93, 112, 113, 122-131). Nótese que cualquier secuencia obtenida aplicando una o más sustituciones conservativas de aminoácidos a una secuencia como se describe en la presente también está comprendida, siempre que la identidad de secuencia global esté dentro de los rangos proporcionados y que el anticuerpo resultante aún se una al UNC5C y compita con/imita la unión de netrina-1 al UNC5C.

Un anticuerpo de la descripción puede tener la CDRL1, CDRL2 y CDRL3 del dominio VL dentro de un marco de línea germinal. Un anticuerpo de la descripción puede tener un dominio variable de cadena ligera (VL) con las

secuencias marco LFWR1, LFWR2, LFWR3 y LFWR4 de cualquiera de las variantes de ATL_5262, que incluyen ATL_5262, ATL_6036, ATL_6039, ATL_6177 o ATL_6178.

En consecuencia, el anticuerpo de la descripción
5 puede tener un dominio variable de cadena ligera (VL) con las siguientes secuencias marco: LFWR1 de la sec. con núm. de ident.: 63; LFWR2 de la sec. con núm. de ident.: 71; LFWR3 de la sec. con núm. de ident.: 77; y LFWR4 de la sec. con núm. de ident.: 85 o 87; o un conjunto de las FWR
10 que contiene de una a cinco mutaciones de aminoácidos, tales como sustituciones, en comparación con el conjunto anterior de FWR.

Alternativamente o adicionalmente, los anticuerpos de la descripción pueden tener una región VL
15 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, con mayor preferencia una de al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región VL de cualquier anticuerpo descrito en la
20 presente, tal como ATL_5262, ATL_5998, ATL_6001, ATL_6002, ATL_6003, ATL_6177, ATL_6178, ATL_6187, ATL_6191, ATL6530-6539 (sec. con núms. de ident.: 9, 12, 15, 16, 17, 92, 94, 114, 132-141). Por ejemplo, los anticuerpos de la descripción pueden tener una región VL que comprende una
25 secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, con mayor preferencia una de al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región VL de cualquier anticuerpo descrito en la presente, tal como ATL_5262, ATL_5998, ATL_6001, ATL_6002, ATL_6003, ATL_6177, ATL_6178, ATL_6187, ATL_6191, ATL6530-6539 (sec. con núms. de ident.: 9, 12, 15, 16, 17, 92, 94, 114, 132-141).

96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región VL del anticuerpo ATL_5262 o ATL_6002 (sec. con núms. de ident.: 9, 16). Por ejemplo, los anticuerpos de la descripción
5 pueden tener una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, con mayor preferencia una de al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la región VL del anticuerpo
10 ATL_5262, o ATL_6178 (sec. con núms. de ident.: 9, 94).

Los anticuerpos de la descripción pueden tener una región VL tipo L o tipo K.

Los anticuerpos descritos en la presente pueden comprender: un dominio variable de cadena pesada (VH) que
15 comprende una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la identidad de secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1 y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende
20 una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la identidad de secuencia a la sec. con núm. de ident.: 9.

Los anticuerpos descritos en la presente pueden
25 comprender: un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos

75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la identidad de secuencia de la sec. con núm. de ident.: 93 y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la identidad de secuencia a la sec. con núm. de ident.: 94.

Los anticuerpos descritos en la presente incluyen anticuerpos que tienen un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia del VH de cualquier anticuerpo descrito en la presente y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de la VH de cualquier anticuerpo descrito en la presente. En particular, los anticuerpos descritos en la presente incluyen anticuerpos que tienen: (i) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de la VH de ATL_5262, ATL_6177, ATL_6178, ATL_6033, ATL_6034, ATL_6035, ATL_6036, ATL_6037, ATL_6038, ATL_6039, ATL_5998, ATL_6001, ATL_6002, ATL_6003, ATL_6187, ATL_6191, ATL_6530, ATL_6531, ATL_6532, ATL_6533, ATL_6534, ATL_6535, ATL_6536, ATL_6537, ATL_6538, ATL_6539, y (ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de la VL de ATL_5262, ATL_6177, ATL_6178, ATL_6033, ATL_6034, ATL_6035, ATL_6036, ATL_6037, ATL_6038, ATL_6039, ATL_5998, ATL_6001, ATL_6002, ATL_6003, ATL_6187, ATL_6191, ATL_6530,

ATL_6531, ATL_6532, ATL_6533, ATL_6534, ATL_6535, ATL_6536,
ATL_6537, ATL_6538, ATL_6539. En particular, también se
describen anticuerpos que tienen: (i) un dominio variable
de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de la VH
5 de ATL_5262, ATL_6177, ATL_6178, ATL_6033, ATL_6034,
ATL6035, ATL_6036, ATL_6037, ATL_6038, ATL_6039, ATL_5998,
ATL_6001, ATL_6002, ATL_6003, ATL_6187, ATL_6191, y (ii)
un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una
secuencia de la VL de ATL_5262, ATL_6177, ATL_6178,
10 ATL_6033, ATL_6034, ATL6035, ATL_6036, ATL_6037, ATL_6038,
ATL_6039, ATL_5998, ATL_6001, ATL_6002, ATL_6003, ATL_6187,
ATL_6191. Además, también se describen anticuerpos que
tienen: (i) un dominio variable de cadena pesada (VH) que
comprende una secuencia de la VH de ATL_6530, ATL_6531,
15 ATL_6532, ATL_6533, ATL_6534, ATL_6535, ATL_6536, ATL_6537,
ATL_6538, ATL_6539, y (ii) un dominio variable de cadena
ligera (VL) que comprende una secuencia de la VL de
ATL_6530, ATL_6531, ATL_6532, ATL_6533, ATL_6534, ATL_6535,
ATL_6536, ATL_6537, ATL_6538, ATL_6539.

20 Los anticuerpos de la descripción se derivan de
anticuerpos humanos y, por lo tanto, pueden denominarse
anticuerpos humanos. Los anticuerpos de la descripción se
obtuvieron emparejando un dominio VH humano con un dominio
VL usando un modelo basado en transformadores. Por lo tanto,
25 los anticuerpos de la descripción pueden diferir de los
anticuerpos de origen natural al menos por su

emparejamiento VH-VL. Los anticuerpos de la descripción pueden comprender secuencias VH y/o VL humanas. Los anticuerpos de la descripción pueden formularse como anticuerpos IgG1 humanos o variantes de estos. Los anticuerpos de la descripción pueden tener una secuencia marco humana y/o un dominio Fc humano.

La identidad porcentual global de una región variable o secuencia de cadena pesada/ligera de longitud completa puede combinarse con secuencias CDR específicas de este anticuerpo.

El porcentaje (%) de identidad de secuencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos en una secuencia comparativa después de alinear las secuencias e introducir espacios si es necesario, para lograr la identidad de secuencia máxima, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La identidad de secuencia se calcula preferentemente sobre toda la longitud de las secuencias respectivas. Cuando las secuencias alineadas son de diferente longitud, la identidad de secuencia de la secuencia de comparación más corta puede determinarse en toda la longitud de la secuencia dada más larga o, donde la secuencia de comparación es más larga que la secuencia dada, la identidad de secuencia de la secuencia de comparación puede determinarse en toda la longitud de la secuencia dada

más corta. La identidad de secuencia puede definirse con referencia al algoritmo GAP (paquete Wisconsin GCG, Accelrys Inc, San Diego USA). GAP usa el algoritmo Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas que maximiza el número de coincidencias y minimiza el número de espacios. Generalmente, pueden usarse parámetros predeterminados, con una penalización de creación de espacios = 12 y penalización de extensión de espacios = 4. Puede preferir el uso de GAP pero pueden usarse otros algoritmos, p. ej., BLAST (que usa el método de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (que usa el método de Pearson y Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), SSEARCH (Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197;), HMMER3 (Johnson LS et al BMC Bioinformatics. 2010 Aug 18; 11():431) o el programa TBLASTN, de Altschul et al. (1990) supra, empleando generalmente parámetros predeterminados (ver por ejemplo Pearson Curr Prot Bioinformatics (2013) Chapt 3 Uniy 3.1 doi:10.1002/0471250953.bi0301s42). En particular, puede usarse el algoritmo psi-Blast (Altschul et al. Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402). La identidad de secuencia y la similitud también pueden determinarse usando el software Genomequest™ (Gene-IT, Worcester MA USA). Las comparaciones de secuencia se hacen preferentemente a lo largo de toda la longitud de las secuencias relevantes que se van a comparar.

Los anticuerpos de la presente descripción pueden comprender una o más sustituciones dentro del marco de la región VH y/o VL. Como se usa en la presente, “sustitución” se refiere al intercambio de un aminoácido por otro en una
5 posición específica, con relación a la misma posición en una molécula inicial. En algunas modalidades, las moléculas iniciales son anticuerpos ejemplificados en la presente, por ejemplo ATL_5262, ATL_6177, ATL_6178, ATL_6002 o ATL_6003 (secuencias VH de las sec. con núms. de ident.: 1, 91, 93;
10 secuencias VL de las sec. con núms. de ident.: 9, 16, 17).

En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de estos de acuerdo con la presente descripción son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. En algunas modalidades, los anticuerpos de la presente
15 descripción son anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción pueden tener una cadena scFV que se une a un receptor en el cerebro, tal como el receptor de transferrina (Yu et al., Sci Transl Med. 2014 Nov 5;6(261):261ra154.), así como una cadena scFv
20 que se une al UNC5C como se describe en la presente. En algunas modalidades, los anticuerpos de acuerdo con la descripción comprenden un anticuerpo o fragmento de este que se une al UNC5C como se describe en la presente (tal como, *p. ej.*, un anticuerpo, scFV, sdAb, etc.), y una entidad de
25 unión adicional que se une a otra diana. La otra diana puede ser un receptor en el cerebro, tal como el receptor de

transferencia. La entidad de unión adicional puede ser un anticuerpo, un scFv, un nanocuerpo o un aptámero. Las dos entidades de unión de una molécula biespecífica de este tipo pueden formar una proteína de fusión.

5 También se describen en la presente anticuerpos de dominio único (sdAb), conocidos de cualquier otra manera como nanocuerpos, que comprenden las CDR de cadena pesada y/o la secuencia VH de cualquier anticuerpo descrito en la presente. Por lo tanto, también se describen en la presente
10 anticuerpos o moléculas de fusión que comprenden un nanocuerpo que se une al UNC5C como se describe en la presente, y un nanocuerpo que se une a un receptor en el cerebro. También se describen en la presente anticuerpos de moléculas de fusión que comprenden una cadena o nanocuerpo
15 scFV que se une al UNC5C como se describe en la presente, y un aptámero que se une a un receptor en el cerebro.

Se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno o polipéptido como se describe en la presente. También se
20 proporciona un vector que comprende un ácido nucleico descrito en la presente, y una célula huésped que comprende el vector. Por ejemplo, la célula huésped puede ser un eucariótico, o mamífero, *p. ej.*, ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), célula o puede ser una célula
25 procariótica, *p. ej.*, *E. coli*. En algunas modalidades, el vector es un vector viral, por ejemplo, un bacteriófago.

Además se proporcionan métodos para fabricar un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo como se describe en la presente, el método comprende el cultivo de una célula huésped como se describe en la presente en condiciones
5 adecuadas para la expresión de un vector que codifica el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, y aislar y/o purificar el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo. El método comprende además formular el anticuerpo o fragmento de anticuerpo en una composición que incluye al menos un componente adicional.

10

Usos terapéuticos y efectos in vitro/in vivo

Los anticuerpos descritos en la presente pueden reducir la apoptosis mediada por UNC5C. Por ejemplo, los anticuerpos descritos en la presente pueden reducir la
15 apoptosis mediada por UNC5C en neuronas, p. ej., neuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC); y/o en células de neuroblastoma, tales como las células SH-SY5Y. El experto en la técnica estará familiarizado con los métodos para medir la apoptosis, tales como para medir
20 la producción de caspasa 3/7 como se describe en la presente, o medir la viabilidad celular, p. ej., mediante tinción de la célula con un marcador de células vivas o muertas, tal como DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol).

Como se describió anteriormente, se ha
25 descubierto que los anticuerpos de la descripción imitan/compiten con la unión de netrina-1 al UNC5C. Los

niveles de netrina 1 se correlacionan con la gravedad de la demencia y la netrina 1 disminuye en pacientes con deterioro cognitivo leve y AD (Ju T, et al. 2022).

Se ha mostrado que la Netrina-1 protege contra la neurotoxicidad inducida por β -amiloide a través del mecanismo dependiente de NF- κ B/Nrf2 (Zamani et al., 2020). Los anticuerpos descritos en la presente pueden reducir la neurotoxicidad inducida por β -amiloide. Esto puede evaluarse midiendo la apoptosis, por ejemplo midiendo la producción de caspasa 3/7, en neuronas tratadas con β -amiloide como se describe en la presente.

Se ha mostrado que la Netrina-1 está involucrada en la plasticidad sináptica, es decir, la capacidad de las neuronas para provocar cambios en las conexiones entre redes neuronales en respuesta a estímulos, en adultos. El UNC5C es un receptor de netrina 1 que juega un papel en el crecimiento y guía axonal. Si bien este ha sido el mecanismo más estudiado en desarrollo, podría ser importante para prevenir la degeneración neuronal. Por lo tanto, los anticuerpos y fragmentos de estos como se describe en la presente pueden ser efectivos y/o pueden usarse para promover la salud sináptica, p. ej., promoviendo la plasticidad sináptica, que puede evaluarse cuantificando el efecto del anticuerpo sobre el número de procesos por célula, la longitud del crecimiento de neurita

y la ramificación. Por ejemplo, pueden usarse métodos como se describe en la presente y en Spiijkers et al., 2021.

También puede evaluarse un efecto en la promoción de la salud sináptica cuantificando la expresión de proteínas sinápticas, por ejemplo, usando Western Blot. Las proteínas sinápticas pueden seleccionarse del grupo que consiste en: PSD95, sinaptofisina, sinapsina-1, sinaptotagmina-1, neurofilamento-L, y/o GAP-43, con una mayor expresión en cualquiera o todas estas indicando una mejor salud sináptica.

Medir la sincronicidad y la tasa de activación de las neuronas, por ejemplo, usando medios de evaluación electrofisiológica familiares para el experto en la técnica, tales como la medición del potencial del campo extracelular usando electrodos, es otra manera de evaluar la salud sináptica, con una mayor sincronicidad que indica una salud sináptica mejorada (p. ej., mayores conexiones sinápticas).

Los anticuerpos descritos en la presente también pueden mejorar la función neuronal, tal como la actividad neuronal y/o el potencial de ráfaga. La función neuronal puede determinarse midiendo el potencial de campo extracelular neuronal, por ejemplo usando matrices de microelectrodos como se describe en la presente.

Los anticuerpos de acuerdo con la descripción pueden mejorar la supervivencia neuronal y/o las funciones sinápticas. Por ejemplo, los anticuerpos de la descripción pueden reducir la toxicidad amiloide. Los anticuerpos de

la descripción pueden reducir la muerte celular de las neuronas tratadas con amiloide *in vitro*. La muerte celular puede medirse midiendo una señal de caspasa 3/7 en respuesta a la citotoxicidad inducida por beta amiloide.

5 Los anticuerpos de la descripción pueden aumentar la expresión de una o más proteínas sinápticas, tales como, p. ej., GAP-43. Los anticuerpos de la descripción pueden rescatar al menos parcialmente la muerte celular neuronal y el daño axonal causado por la depleción de netrina-1.

10 Los anticuerpos de la descripción pueden mejorar la conectividad neuronal y/o la velocidad de activación y/o la sincronía en las neuronas motoras. Los anticuerpos de la descripción pueden mejorar la conectividad neuronal y/o la velocidad de activación y/o sincronía en las neuronas

15 motoras de sujetos con ELA. Los anticuerpos de la descripción pueden mejorar la función y/o supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. Por ejemplo, los anticuerpos de la descripción pueden rescatar al menos parcialmente los efectos de la haploinsuficiencia de UNC5C o netrina-1

20 en la inervación de neuronas dopaminérgicas a la corteza prefrontal medial, y/o el contenido de dopamina en la corteza prefrontal medial. Esto puede evaluarse determinando una mayor respuesta a la anfetamina en ratones haploinsuficientes de Netrina 1 tratados con anticuerpos

25 de la descripción. Los anticuerpos de la descripción pueden reducir la neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas.

Esto puede evaluarse midiendo la neurodegeneración tras la exposición a una neurotoxina tal como la 6-hidroxidopamina (6-OHDA, por sus siglas en inglés), como se evidencia por un menor uso de la pata contralateral. Por lo tanto, también se describen en la presente métodos para mejorar la supervivencia y/o función (que incluye la función sináptica) de neuronas motoras y/o dopaminérgicas en un sujeto que lo necesite, los métodos comprenden administrar un anticuerpo de la descripción en una cantidad terapéuticamente efectiva ta. Similarmente, también se describen en la presente métodos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con disfunción o muerte de neurona motora y/o neurona dopaminérgica, los métodos comprenden administrar un anticuerpo de la descripción en una cantidad terapéuticamente efectiva ta.

Los anticuerpos y fragmentos de estos descritos pueden usarse en terapia.

Un sujeto a ser tratado o diagnosticado puede ser cualquier animal o ser humano. El sujeto es preferentemente mamífero, con mayor preferencia humano. El sujeto puede ser macho o hembra. El sujeto puede ser un paciente. Los usos terapéuticos pueden ser en humanos o animales (uso veterinario).

Los medicamentos y composiciones farmacéuticas de acuerdo con aspectos de la presente invención pueden formularse para su administración mediante varias vías, que

incluyen, pero sin limitarse a, parenteral, intravenosa, intraarterial, intramuscular, oral y nasal. Los medicamentos y composiciones pueden formularse para inyección.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse usando un “portador” farmacéuticamente aceptable compuesto de materiales que se consideran seguros y efectivos. “Farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que “generalmente se consideran seguras”, *p. ej.*, que son fisiológicamente tolerables y que típicamente no producen una reacción alérgica o similar adversa, tales como malestar gástrico y lo similar, cuando se administran a un ser humano. En algunas modalidades, esta expresión se refiere a entidades moleculares y composiciones aprobadas por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal de los EE. UU., tal como la lista GRAS en virtud de la sección 5 204(s) y 409 de la Ley federal de alimentos, medicamentos y cosméticos, que está sujeta a revisión previa a la comercialización y aprobación por parte de la FDA o listas similares, la Farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para usar en animales, y más particularmente en humanos. El término “portador” se refiere a diluyentes, aglutinantes, lubricantes y desintegrantes. Aquellos con experiencia en la técnica están familiarizados con tales portadores y

métodos farmacéuticos para elaborar composiciones farmacéuticas usando tales portadores.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente pueden incluir uno o más excipientes, *p. ej.*,
5 disolventes, potenciadores de solubilidad, agentes de suspensión, agentes reguladores, agentes de isotonicidad, antioxidantes o conservantes antimicrobianos. Cuando se usan, los excipientes de las composiciones no afectarán adversamente a la estabilidad, biodisponibilidad, seguridad
10 y/o eficacia de los ingredientes activos, *es decir*, los anticuerpos anti-CFH usados en la composición. Por lo tanto, el experto en la técnica apreciará que se proporcionan composiciones en donde no existe incompatibilidad entre ninguno de los componentes de la
15 forma de dosificación. Los excipientes pueden seleccionarse del grupo que consiste en agentes reguladores, agentes solubilizantes, agentes de tonicidad, agentes quelantes, antioxidantes, agentes antimicrobianos y conservantes.

La administración es preferentemente en una
20 “cantidad terapéuticamente efectiva”, esto es suficiente para mostrar beneficio al individuo. La cantidad real administrada, y la velocidad y el tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de la enfermedad que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, *p. ej.*,
25 las decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los médicos generales y otros médicos

y, típicamente, tiene en cuenta el trastorno a tratar, la condición del paciente individual, el lugar de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos. Los ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

Las afecciones tratables de acuerdo con la presente descripción incluyen cualquiera en la que UNC5C desempeñe un papel, que incluye trastornos neurodegenerativos, y en particular aquellos caracterizados por un aumento de la apoptosis neuronal, disminución de la salud sináptica y/o plasticidad sináptica alterada (p. ej., plasticidad sináptica reducida o anormal). Los anticuerpos de la presente descripción se identificaron originalmente a través del análisis de pacientes con demencia frontotemporal (FTD) resiliente. Estos anticuerpos se encontraron posteriormente en otros individuos resilientes y de control con enfermedad de Alzheimer (AD); enfermedad de Parkinson (PD); y en centenarios resilientes, lo que indica relevancia más allá de la FTD para otras enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, también se describen en la presente anticuerpos de la descripción para usar como un medicamento. También se describen anticuerpos de la descripción para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad

neurodegenerativa. También se describen en la presente anticuerpos de la descripción para usar en la fabricación de un medicamento, tal como un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo. También se describe en la presente un método para tratar a un sujeto que ha sido diagnosticado que tiene o está en riesgo de tener un trastorno neurodegenerativo, el método comprende administrar un anticuerpo como se describe en la presente en una cantidad terapéuticamente efectiva al sujeto. Una enfermedad o trastorno neurodegenerativo puede comprender uno o más de los siguientes: FTD, AD, HD, enfermedad de Parkinson (PD), encefalitis inducida por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), encefalopatía traumática crónica (CTE), demencia vascular, enfermedades priónicas, enfermedad corporal de Lewy, atrofia muscular espinal (SMA); enfermedad de las neuronas motoras (MND), tales como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), parálisis supranuclear progresiva (PSP), ataxias espinocerebelosas (SCA) tipos 1, 2, 6, 7 y 17, enfermedad de Machado-Joseph (MJD/SCA3), atrofia palidolisisiana dentatorubral (DRPLA), atrofia muscular bulbar espinal tipo 1 ligada a X (SMA1/SBMA), Anderson-Fabry (enfermedad de Fabry ligada a X) y miopatías DNAJB6. En modalidades, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de FTD, AD, HD, MND, tal como ELA, y PD. En modalidades, la enfermedad

neurodegenerativa es una MND, tal como ELA. En modalidades, la enfermedad neurodegenerativa es FTD, AD, HD o PD.

Los anticuerpos de la descripción pueden usarse en terapia con otros agentes terapéuticos. Como se usa en la presente, un “agente terapéutico adicional” es un compuesto, proteína, vector, anticuerpo, célula o entidad adicional con un efecto terapéutico. Los anticuerpos pueden coadministrarse con un agente terapéutico adicional. Los anticuerpos pueden coformularse con un agente terapéutico adicional. Los anticuerpos pueden administrarse secuencialmente antes o después de un agente terapéutico adicional.

Los anticuerpos descritos en la presente pueden usarse como biomarcadores que indican que es probable que un sujeto responda a la terapia usando un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se describe en la presente. Un método para determinar si es probable que un sujeto responda al tratamiento con un anticuerpo o fragmento de este como se describe en la presente, el método comprende obtener datos de secuencia BCR del sujeto y determinar, usando dichos datos de secuencia, si el repertorio BCR del sujeto comprende uno o más anticuerpos que son probables que se unan al UNC5C (p. ej., anticuerpos como se describe en la presente, tales como, p. ej., anticuerpos que tienen al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de homología con cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico descrito en la presente), en donde un

sujeto cuyo repertorio BCR no comprende uno o más anticuerpos que son probables que se unan al UNC5C es probable que responda al tratamiento con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este como se describe en la presente.

5 Por lo tanto, también se describe en la presente un método para tratar a un sujeto que ha sido diagnosticado que tiene o es probable que tenga una enfermedad en la que UNC5C desempeña un papel (p. ej., un trastorno neurodegenerativo), el método comprende: obtener datos de
10 secuencia BCR del sujeto; determinar, usando dichos datos de secuencia, si el repertorio BCR del sujeto comprende uno o más anticuerpos que es probable que se unan al UNC5C; y administrar a un sujeto cuyo repertorio BCR no comprende uno o más anticuerpos que probablemente se unan al UNC5C una
15 cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este como se describe en la presente.

 Algunos métodos de la presente descripción implican una muestra que contiene células. La muestra puede
20 ser un cultivo de células cultivadas *in vitro*. Por ejemplo, el cultivo puede comprender una suspensión de células o células cultivadas en una placa o plato de cultivo.

 Pueden realizarse métodos de acuerdo con la presente descripción, o pueden estar presentes productos, *in*
25 *vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. El término “*in vitro*” pretende comprender experimentos con materiales, sustancias

biológicas, células y/o tejidos en condiciones de laboratorio o en cultivo, mientras que el término “*in vivo*” pretende comprender experimentos y procedimientos con organismos multicelulares intactos. “*Ex vivo*” se refiere a algo presente
5 o que tiene lugar fuera de un organismo, p. ej., fuera del cuerpo humano o animal, que puede estar en tejido (p. ej., órganos completos) o células tomadas del organismo.

De acuerdo con algunos aspectos de la presente descripción, se proporciona un kit de partes que comprende
10 un anticuerpo de acuerdo con la presente invención. En algunas modalidades, el kit comprende un anticuerpo de acuerdo con la presente invención y uno o más de: reactivos para usar en inmunoquímica; los anticuerpos inmovilizados a un soporte sólido; los medios para etiquetar los
15 anticuerpos; los medios para unir los anticuerpos a una entidad citotóxica; otro agente terapéutico.

Las características descritas en la descripción anterior, o en las siguientes reivindicaciones, o en las figuras adjuntas, expresadas en sus formas específicas o
20 en términos de un medio para realizar la función descrita, o un método o proceso para obtener los resultados descritos, según corresponda, pueden utilizarse, por separado, o en cualquier combinación de tales características, para realizar la invención en diversas formas de estas.

25 Si bien la invención se ha descrito junto con las modalidades ilustrativas descritas anteriormente,

muchas modificaciones y variaciones equivalentes serán evidentes para los expertos en la técnica cuando se dé esta descripción. En consecuencia, las modalidades ilustrativas de la invención expuestas anteriormente se
5 consideran ilustrativas y no limitantes. Pueden realizarse diversos cambios en las modalidades descritas sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

Para evitar cualquier duda, se proporcionan las explicaciones teóricas en la presente proporcionadas con
10 el fin de mejorar la comprensión de un lector. Los inventores no desean limitarse por ninguna de estas explicaciones teóricas.

Los encabezados de sección usados en la presente son sólo para fines organizativos y no deben interpretarse
15 como limitantes de la materia descrita.

A lo largo de esta memoria descriptiva, que incluyen las reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera, se entenderá que la palabra “comprender” e “incluir”, y variaciones tales
20 como “comprende”, “que comprende” e “incluye” se entenderán como que implican la inclusión de un entero o etapa o grupo de enteros o etapas indicadas, pero no la exclusión de cualquier otro entero o etapa o grupo de enteros o etapas.

Debe observarse que, como se usa en la memoria
25 descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “uno” y “una” y “el/la” incluyen referentes

plurales a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera. Los rangos pueden expresarse en la presente como desde “aproximadamente” un valor particular, y/o hasta “aproximadamente” otro valor particular. Cuando
5 se expresa tal rango, otra modalidad incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. Similarmente, cuando los valores se expresan como aproximaciones, por el uso del antecedente “aproximadamente”, se entenderá que el valor particular
10 forma otra modalidad. El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico es opcional y significa por ejemplo +/- 10 %.

Todas las referencias citadas en la presente se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.
15 Para las técnicas estándar de biología molecular, ver Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

20 Secuencias

La secuencia ilustrativa de anticuerpos descrita en la presente se proporciona en la Figura 21, 8B, 32 (alineada por la numeración de posición IMGT) y en la tabla siguiente.

25

Sec. con número de ident.	Descripción	Secuencia
1	ATL_5262 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWTWIRQP PGKRLEWIGYIHNSGTTNQNPSLKSRTISIDTSKNHFSL KLSSVTAADTAVYYCARGRGMATLPFDYWGQGTLLTVSS
2	ATL_6033 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQP PGKGLEWIGYIHNSGTTNPNPSLKSRTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGRGMATLPFDYWGQGTLLTVSS
3	ATL_6034 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWTWIRQP PGKGLEWIGYIHNSGTTNPNPSLKSRTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGRGMATLPFDYWGQGTLLTVSS
4	ATL_6035 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQP PGKRLEWIGYIHNSGTTNPNPSLKSRTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGRGMATLPFDYWGQGTLLTVSS
5	ATL_6036 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQP PGKGLEWIGYIHNSGTTNQNPSLKSRTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGRGMATLPFDYWGQGTLLTVSS
6	ATL_6037 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQP PGKGLEWIGYIHNSGTTNPNPSLKSRTISIDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGRGMATLPFDYWGQGTLLTVSS
7	ATL_6038 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQP PGKGLEWIGYIHNSGTTNPNPSLKSRTISVDTSKNHFSL KLSSVTAADTAVYYCARGRGMATLPFDYWGQGTLLTVSS
8	ATL_6039 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWTWIRQP PGKRLEWIGYIHNSGTTNQNPSLKSRTISIDTSKNHFSL KLSSVTAADTAVYYCARGRGMATLPFDYWGQGTLLTVSS
9	ATL_5262 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK
10	ATL_5996 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKP GKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQP EDIATYYCQQYDNLPTFTFGQGTKVEIR
11	ATL_5997 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQK PGQAPRLLIYAASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPWTFTFGQGTKVEIK
12	ATL_5998 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSKNKNYLA WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFTFGQGTKVEIK
13	ATL_5999 VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP DDFATYYCQQYSSYSPFTFGQGTKVEIK
14	ATL_6000 VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGL QTEDEAEYYCSSYTSSSTFVFGPGTKVTVL
15	ATL_6001 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQQSYSTPPTFGPGTKVDIK
16	ATL_6002 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQQSYTTPFTFGQGTKVEIK
17	ATL_6003 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK

18	ATL_6004 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERVTLSCRASQNIISNYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFAVYCHQYGSIPLTFGGGTKVEIK
19	ATL_6005 VL	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWFQQ HPGKAPKLLIYEVTKRPSGVPDRFSGSKSGNAASLTVSGL QAEDEADYYCSSLYAGSNLLFGGGTKLTVL
20	CDRH1 (todas las variantes ATL_5262)	GGSISSYF
21	CDRH2 (todas las variantes ATL_5262 excepto ATL_6178)	IHNSGTT
22	CDRH2 ATL_6178	IHYSGTT
23	CDRH3 (todas las variantes ATL_5262)	ARGRGMATLPFDY
24	CDRL1 (ATL_5262: 6033; 6034; 6035; 6036; 6037; 6038; 6039; 6177; 6178)	QSISSY
25	CDRL1 (ATL_5996)	QDITNY
26	CDRL1 (ATL_5997)	QSVSSTY
27	CDRL1 (ATL_5998)	QSVLYSSKNKNY
28	CDRL1 (ATL_5999)	QSISSW
29	CDRL1 (ATL_6000: ATL_6005)	SSDVGGYNY
30	CDRL1 (ATL_6001)	QSIISNY
31	CDRL1 (ATL_6002)	QSIISRY
32	CDRL1 (ATL_6003)	QTISNY
33	CDRL1 (ATL_6004)	QNIISNY
34	CDRL2 (ATL_5262; 5997; 5998; 6001; 6002; 6003; 6033; 6034; 6035; 6036; 6037; 6038; 6039; 6177; 6178)	AAS
35	CDRL2 (ATL_5996)	DAS
36	CDRL2 (ATL_5999)	KAS
37	CDRL2 (ATL_6000)	DVS
38	CDRL2 (ATL_6004)	GAS
39	CDRL2 (ATL_6005)	EVT
40	CDRL3 (ATL_5262: 6003; 6033; 6034; 6035; 6036; 6037; 6038; 6039; 6177; 6178)	QQSYSTPLT
41	CDR3L (ATL_5996)	QQYDNLPLYT
42	CDR3L (ATL_5997)	QQYGSSPWT
43	CDR3L (ATL_5998)	QQYYSTPWT
44	CDR3L (ATL_5999)	QQYSSYSPT

45	CDR3L (ATL_6000)	SSYTSSSTFV
46	CDR3L (ATL_6001)	QQSYSTPPT
47	CDR3L (ATL_6002)	QQSYTTPLT
48	CDR3L (ATL_6004)	HQYGSIPLT
49	CDR3L (ATL_6005)	SSYAGSNNLL
50	HFWR1 (todas las variantes ATL_5262 y homólogos 6187 y 6191)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS
51	HFWR2 (ATL_5262: 5996; 5997; 5998; 5999; 6000; 6001; 6002; 6003; 6004; 6005; 6039)	WTWIRQPPGKRLEWIGY
52	HFWR2 (ATL_6033: 6036; 6037; 6038; 6177; 6178; 6187)	WSWIRQPPGKGLEWIGY
53	HFWR2 (ATL_6034)	WTWIRQPPGKGLEWIGY
54	HFWR2 (ATL_6035)	WSWIRQPPGKRLEWIGY
55	HFWR3 (ATL_5262: 5996; 5997; 5998; 5999; 6000; 6001; 6002; 6003; 6004; 6005;)	NQNPSLKSRTVISIDTSKNHFSLKLSSVTAADTAVYYC
56	HFWR3 (ATL_6033: 6034; 6035)	NYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
57	HFWR3 (ATL_6036)	NQNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
58	HFWR3 (ATL_6037)	NYNPSLKSRTVISIDTSKNHFSLKLSSVTAADTAVYYC
59	HFWR3 (ATL_6038)	NYNPSLKSRTVISVDTSKNHFSKLSSVTAADTAVYYC
60	HFWR3 (ATL_6039)	NQNPSLKSRTVISIDTSKNHFSLKLSSVTAADTAVYYC
61	HFWR3 (ATL_6177: 6178)	NQNPSLKSRTVISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
62	HFWR4 (todas las variantes ATL_5262 y homólogo ATL_0006191, anticuerpos de presentación de fagos 6530, 6531, 6538)	WGQGTIVTVSS
63	LFWR1 (ATL_5262: 6001; 6002; 6003; 6033; 6034; 6035; 6036; 6037; 6038; 6039; 6177; 6178)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS
64	LFWR1 (ATL_5996)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQAS
65	LFWR1 (ATL_5997)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS
66	LFWR1 (ATL_5998)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS
67	LFWR1 (ATL_5999)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS
68	LFWR1 (ATL_6000, 6536)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT
69	LFWR1 (ATL_6004)	EIVLTQSPGTLSLSPGERVTLSCRAS
70	LFWR1 (ATL_6005)	QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGT

71	LFWR2 (ATL_5262: 5996; 6002; 6003; 6033; 6034; 6035; 6036; 6037; 6038; 6039; 6177; 6178)	LNWYQQKPGKAPKLLIY
72	LFWR2 (ATL_5997, 6004)	LAWYQQKPGQAPRLLIY
73	LFWR2 (ATL_5998: 5999)	LAWYQQKPGKAPKLLIY
74	LFWR2 (ATL_6000)	VSWYQQHPGKAPKLMIY
75	LFWR2 (ATL_6001)	LNWYQQKPGKAPNLLIY
76	LFWR2 (ATL_6005)	VSWFQQHPGKAPKLIY
77	LFWR3 (ATL_5262: 6001; 6002; 6003; 6033; 6034; 6035; 6036; 6037; 6038; 6039; 6177; 6178)	SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
78	LFWR3 (ATL_5996)	NLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC
79	LFWR3 (ATL_5997)	SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
80	LFWR3 (ATL_5998)	SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC
81	LFWR3 (ATL_5999)	SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC
82	LFWR3 (ATL_6000)	NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEAEYYC
83	LFWR3 (ATL_6004)	SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYC
84	LFWR3 (ATL_6005)	KRPSGVPRFSGSKSGNAASLTVSGLQAEDEADYYC
85	LFWR4 (ATL_5262: 6003; 6004; 6033; 6034; 6035; 6036; 6037; 6038; 6039; 6177; 6178)	FGGGTKVEIK
86	LFWR4 (ATL_5996)	FGQGTKVEIR
87	LFWR4 (ATL_5997: 5998; 5999; 6002)	FGQGTKVEIK
88	LFWR4 (ATL_6000)	FGPGTKVTVL
89	LFWR4 (ATL_6001)	FGPGTKVDIK
90	LFWR4 (ATL_6005)	FGGGTKLTVL
91	ATL_6177 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQP PGKGLEWIGYIHNSGTTNQNPSLKSRTISVDKSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGRGMATLPFDYWQGTLTVSS
92	ATL_6177 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK
93	ATL_6178 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYFWSWIRQP PGKGLEWIGYIHNSGTTNQNPSLKSRTISVDKSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGRGMATLPFDYWQGTLTVSS
94	ATL_6178 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK
95	ATL_5338 VH	EVKLDDETGGGLVQGRPMKLSVASGFTFSDYWMNWVRQS PEKGLEWVAQIRNKPYNYYETIYSDSVKGRFTISRDDSKSS VYLQMNNLRVEDMGIIYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSS

96	ATL_5338 VL	DVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVNSNGNTYLRW YLQKPGQSPKVLIIYKVSNRVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVYFCSQSTHPWTFGGGTKLEIK
97	rmUNC5C (etiqueta His y FLAG N-terminal + aminoácidos 41-380 de la secuencia UNC5C murina, dominio extracelular). Producción interna a partir de células HEK293F	GSHHHHHHGSYKDDDDKGSQDDEFFHELPETFPSPPEPLP HFLIEPEEAYIVKNKPVNLYCKASPATQIYFKCNSEWVHQKD HVVDERVDETSGLIVREVSIISRQQVEELFGPEDYWCQCV WSSAGTTKSRKAYVRIAYLRKTFEQEPLGKEVSLEQEVLLQC RPPEGIPVAEVEWLKNEDIIDPAEDRNFYITIDHNLI IKQAR LSDTANYTCVAKNIVAKRKSTTATVIVYVNGGWSTWTEWSVC NSRCGRGYQKRTRCTNPAPLNGGAFCEGQSVQKIACCTTLCF VDGRWTSWSKWSTCGTECTHWRRRECTAPAPKNGGKDCDGLV LQSKNCTDGLCMQAAPDSDDVALYGS
98	rhUNC5C (etiqueta His y FLAG N-terminal + aminoácidos 41- 380 de la secuencia UNC5C humana, dominio extracelular). Producción interna a partir de células HEK293F.	GSHHHHHHGSYKDDDDKGSQDDDFHELPETFPSPPEPLP HFLIEPEEAYIVKNKPVNLYCKASPATQIYFKCNSEWVHQKD HIVDERVDETSGLIVREVSIISRQQVEELFGPEDYWCQCV WSSAGTTKSRKAYVRIAYLRKTFEQEPLGKEVSLEQEVLLQC RPPEGIPVAEVEWLKNEDIIDPVEDRNFYITIDHNLI IKQAR LSDTANYTCVAKNIVAKRKSTTATVIVYVNGGWSTWTEWSVC NSRCGRGYQKRTRCTNPAPLNGGAFCEGQSVQKIACCTTLCF VDGRWTPWSKWSTCGTECTHWRRRECTAPAPKNGGKDCDGLV LQSKNCTDGLCMQTAPDSDDVALYGS
99	>SP 095185 UNC5C_Receptor de netrína humana UNC5C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UNC5C PE=1 SV=2	MRKGLRATAARCGGLGLGYLLQMLVLPALALLSASGTGSAA QDDDFHELPETFPSPPEPLPHFLIEPEEAYIVKNKPVN LYCKASPATQIYFKCNSEWVHQKDHIIVDERVDETSGLIVR EVSIEISRQQVEELFGPEDYWCQCVWSSAGTTKSRKAYV RIAYLRKTFEQEPLGKEVSLEQEVLLQCRPPEGIPVAEVE WLKNEDIIDPVEDRNFYITIDHNLI IKQARLSDTANYTCV AKNIVAKRKSTTATVIVYVNGGWSTWTEWSVCNSRCGRGY QKRTRCTNPAPLNGGAFCEGQSVQKIACCTTLCFVDGRWT PWSKWSTCGTECTHWRRRECTAPAPKNGGKDCDGLVQSK NCTDGLCMQTAPDSDDVALYVGIVIAVIVCLAISVVVALF VYRKNHRDFESDIIDSSALNGGFQPVNIKAARQDLLAVPP DLTSAAAMYRGVPYALHDVSDKIPMTNSPILDPNLKIK VYNTSGAVTPQDDLSEFTSKLSPQMTQSLENEALS LKNQ SLARQTDPSCTAFGSFNSLGGHLIVPNSGVSLIPAGAI PQGRVYEMYVTVHRKETMRPPMDDSQTLTLPVVS CGPPGAL LTRPVVLTMHHCADPNTEDWKILLKNQAAQGWEDVVLVVG EENFTTPCYIQLDAEACHILTENLSTYALVGHSTTKAAAK RLKLAI FGPLCCSSLEYSIRVYCLDDTQDALKEILHLERQ MGGQLLEEPKALHFKGSTHNLRLSIH DIAHSLWKSLLAK YQEIPFYHVWSGSQRNLHCTFTLERFSLNTVELVCKLCVR QVEGEGQIFQLNCTVSEPTGIDLPLDPANTITVTGFS AFSIPLP IRQKLCSSLDAPQTRGHDWRMLAHKLNLDRIYLN YFATKSSPTGVILDLWEAQNFDPGNLSMLAAVLEEMGRHE TVVSLAAEGQY
100	>sp 008747 UNC5C_Receptor de netrína de ratón UNC5C OS = Mus musculus OX=10090 GN=Unc5c PE=1 SV=1	MRKGLRATAARCGGLGLGYLLQMLVLPALALLSASGTGSAA QDDEFFHELPETFPSPPEPLPHFLIEPEEAYIVKNKPVN LYCKASPATQIYFKCNSEWVHQKDHVVDERVDETSGLIVR EVSIEISRQQVEELFGPEDYWCQCVWSSAGTTKSRKAYV RIAYLRKTFEQEPLGKEVSLEQEVLLQCRPPEGIPVAEVE WLKNEDIIDPAEDRNFYITIDHNLI IKQARLSDTANYTCV AKNIVAKRKSTTATVIVYVNGGWSTWTEWSVCNSRCGRGY QKRTRCTNPAPLNGGAFCEGQSVQKIACCTTLCFVDGRWT SWSKWSTCGTECTHWRRRECTAPAPKNGGKDCDGLVQSK NCTDGLCMQAAPDSDDVALYVGIVIAVTVCLAITVVVALF VYRKNHRDFESDIIDSSALNGGFQPVNIKAARQDLLAVPP DLTSAAAMYRGVPYALHDVSDKIPMTNSPILDPNLKIK VYNSSGAVTPQDDLAEFSSKLS PQMTQSLENEALNLKNQ SLARQTDPSCTAFGTFNLSLGGHLIIPNSGVSLIPAGAI PQGRVYEMYVTVHRKENMRPPMEDSQTLTLPVVS CGPPGAL LTRPVILTLHHCADPSTEDWKIQLKNQAVQGWEDVVVVG EENFTTPCYIQLDAEACHILTENLSTYALVGQSTTKAAAK RLKLAI FGPLCCSSLEYSIRVYCLDDTQDALKEVLQLERQ MGGQLLEEPKALHFKGSIHNLRLSIH DIAHSLWKSLLAK YQEIPFYHIWSGSQRNLHCTFTLERLSLNTVELVCKLCVR

		QVEGEGQIFQLNCTVSEEP T G I D L P L L D P A S T I T T V T G P S A F S I P L P I R Q K L C S S L D A P Q T R G H D W R M L A H K N L N D R Y L N Y F A T K S S P T G V I L D L W E A Q N F P D G N L S M L A A V L E E M G R H E T V V S L A A E G Q Y
101	rmUNC5C (aminoácidos 41-380 de la secuencia UNC5C murina, correspondiente al dominio extracelular). Producción interna a partir de células HEK293F.	Q D D E F F H E L P E T F P S D P P E P L P H F L I E P E E A Y I V K N K P V N L Y C K A S P A T Q I Y F K C N S E W V H Q K D H V D E R V D E T S G L I V R E V S I E I S R Q Q V E E L F G P E D Y W C Q C V A W S S A G T T K S R K A Y V R I A Y L R K T F E Q E P L G K E V S L E Q E V L L Q C R P P E G I P V A E V E W L K N E D I I D P A E D R N F Y I T I D H N L I I K Q A R L S D T A N Y T C V A K N I V A K R K S T T A T V I V Y V N G G W S T W T E W S V C N S R C G R G Y Q K R T R T C T N P A P L N G G A F C E G Q S V Q K I A C T T L C P V D G R W T S W S K W S T C G T E C T H W R R R E C T A P A P K N G G K D C D G L V L Q S K N C T D G L C M Q A A P D S D D V A L Y
102	rhUNC5C (aminoácidos 41- 380 de la secuencia UNC5C humana, correspondientes al dominio extracelular). Producción interna a partir de células HEK293F.	Q D D D F F H E L P E T F P S D P P E P L P H F L I E P E E A Y I V K N K P V N L Y C K A S P A T Q I Y F K C N S E W V H Q K D H I V D E R V D E T S G L I V R E V S I E I S R Q Q V E E L F G P E D Y W C Q C V A W S S A G T T K S R K A Y V R I A Y L R K T F E Q E P L G K E V S L E Q E V L L Q C R P P E G I P V A E V E W L K N E D I I D P V E D R N F Y I T I D H N L I I K Q A R L S D T A N Y T C V A K N I V A K R K S T T A T V I V Y V N G G W S T W T E W S V C N S R C G R G Y Q K R T R T C T N P A P L N G G A F C E G Q S V Q K I A C T T L C P V D G R W T P W S K W S T C G T E C T H W R R R E C T A P A P K N G G K D C D G L V L Q S K N C T D G L C M Q T A P D S D D V A L Y
103	UNC5C de rata recombinante (His N-terminal y etiqueta FLAG) Producción interna a partir de células HEK293F.	G S H H H H H G S D Y K D D D D K G S Q D D D F F H E L P E T F P S D P P E P L P H F L I E P E E A Y I V K N K P V N L Y C K A S P A T Q I Y F K C N S E W V H Q K D H V D E R V D E T S G L I V R E V S I E I S R Q Q V E E L F G P E D Y W C Q C V A W S S A G T T K S R K A Y V R I A Y L R K T F E Q E P L G K E V S L E Q E V L L Q C R P P E G I P M A E V E W L K N E D I I D P V E D R N F Y I T I D H N L I I K Q A R L S D T A N Y T C V A K N I V A K R K S T T A T V I V Y V N G G W S T W A E W S V C N S R C G R G Y Q K R T R T C T N P A P L N G G A F C E G Q S V Q K I A C T T L C P V D G R W T S W S K W S T C G T E C T H W R R R E C T A P A P K N G G K D C D G L V L Q S K N C T D G L C M Q A A P D S D D V A L Y G S
104	UNC5C de cyno recombinante (His N-terminal y etiqueta FLAG) Producción interna a partir de células HEK293F.	G S H H H H H G S D Y K D D D D K G S Q D D D F F H E L P E T F P S D P P E P L P H F L I E P E E A Y I V K N K P V N L Y C K A S P A T Q I Y F K C N S E W V H Q K D H I V D E R V D E T S G L I V R E V S I E I S R Q Q V E E L F G P E D Y W C Q C V A W S S A G T T K S R K A Y V R I A Y L R K T F E Q E P L G K E V S L E Q E V L L Q C R P P E G I P V A E V E W L K N E D I I D P V E D R N F Y I T I D H N L I I K Q A R L S D T A N Y T C V A K N I V A K R K S T T A T V I V Y V N G G W S T W T E W S V C N S R C G R G Y Q K R T R T C T N P A P L N G G A F C E G Q S V Q K I A C T T L C P V D G R W T P W S K W S T C G T E C T H W R R R E C T A P A P K N G G K D C D G L V L Q S K N C T D G L C M Q T A P D S D D V A L Y G S
105	UNC5A recombinante humano	G S H H H H H G S D Y K D D D D K G S Q Q S A T V A N P V P G A N P D L L P H F L V E P E D V Y I V K N K P V L L V C K A V P A T Q I F F K C N G E W V R Q V D H V I E R S T D G S S G L P T M E V R I N V S R Q Q V E K V F G L E E Y W C Q C V A W S S G T T K S Q K A Y I R I A Y L R K N F E Q E P L A K E V S L E Q G I V L P C R P P E G I P P A E V E W L R N E D L V D P S L D P N V Y I T R E H S L V V R Q A R L A D T A N Y T C V A K N I V A R R R S A S A A V I V Y V D G S W S P W S K W S A C G L D C T H W R S R E C S D P A P R N G G E E C Q G T D L D T R N C T S D L C V H T A S G P E D V A L Y G S
106	UNC5B recombinante humano	G S H H H H H G S D Y K D D D D K G S G T D S G S E V L P D S F P S A P A E P L P Y F L Q E P Q D A Y I V K N K P V E L R C R A F P A T Q I Y F K C N G E W V S Q N D H V T Q E G L D E A T G L R V R E V Q I E V S R Q Q V E E L F G L E D Y W C Q C V A W S S A G T T K S R R A Y V R I A Y L R K N F D Q E P L G K E V P L D H E V L L Q C R P P E G V P V A E V E W L K N E D I D P T Q D T N F L L T I D H N L I I R Q A R L S D T A N Y T C V A K N I V A K R R S T T A T V I V Y V N G G W S S W A E W S P C S N R C G R G W Q K R T R T C T N P A P L N G G A F C E G Q A F Q K T A C T T I C P V D G A W T E W S K W S A C S T E C A H W R S R E C M A P P P Q N G G R D C S G T L L D S K N C T D G L C M Q N K K T L S D P N S H L L E A S G D A A L Y G S
107	UNC5C recombinante humano versión 1	G S Q D D D F F H E L P E T F P S D P P E P L P H F L I E P E E A Y I V K N K P V N L Y C K A S P A T Q I Y F K C N S E W V H Q K D H I V D E R V D E T S G L I V R E V S I E I S R Q Q V E E L F G P E D Y W C Q C V A W S S A G T T K S R K A Y V R I A Y L R K T F E Q E P L G K E V S L E Q E V L L Q C R P P E G I P V A E

		VEWLKNEIDIIDPVEDRNFYITIDHNLI IKQARLSDTANYT CVAKNIVAKRKSTTATVIVYVNGGWSTWTEWSVCNSRCGR GYQKRTRTCTNPAPLNGGAFCEGQSVQKIACTTLCVPDGR WTPWSKWSTCGTECTHWRRECTAPAPKNGGKDCDGLVLQ SKNCTDGLCMQTAPDSDDVALYGSKHHHHH
108	UNC5D recombinante humano	GSHHHHHHGS DYKDDDDKGSARGTDNGEALPESIPSAPGT LPHFIEEPDDAYIIKSNPIALRCKARPAMQIFFKCNGEVW HQNEHVSEETLDESSGLKVREVFINVTRQQVEDFHGPEDY WCQCVAWSHLGTSKSRKASVRIAYLRKNFEQDPQGREVPI EGMIVLHCRPPEGVPAAEVEWLKNEEPIDSEQDENIDTRA DHNLIIRQARLSDSGNYTCMAANIVAKRRSLSATVVVYN GGSSWTEWSACNVRCGRGWQKRSRTCTNPAPLNGGAFCE GMSVQKITCTSLCPVDGSEWVSEWSVCSPECEHLRIEC TAPPPRNGGKFCEGLSQESENCTDGLCILDKKPLHEIKPQ SIENASDGS
109	DCC recombinante humana	GSHHHHHHGS DYKDDDDKGS HLQVTGFQIKAF TALRFLSEP SDAVTMRGGNVLLDCSAESDRGVPIKWKDGIHLALGMDE RKQQLSNGSLLIQNILHSRHHKPDGLYQCEASLGDSGSI SRTAKVAVAGPLRFLSQTESVTAFMGDTVLLKCEVIGEMP TIHWQKNQD LTPIPGDSRVVLP SGALQISRLQPGDIGIY RCSARNPASSRTGNEAEVRILSDPGLHRQLYFLQRP SNVVA IEGKDAVLECCVSGYPPPSFTWLRGEEVIQLRSKKYSLLGG SNLLISNVTDDDSGMYTCVVTYKNENISASAE LTVLVPPWF LNHPSNLYAYESMDIEFECTVSGKPVPTVNMKNGDVVIPS DYFQIVGGSNLRILGVVKSDEGFYQCV AENEAGNAQTSAL IVPKPAIPSSSVLPSAPRDVVPVLVSSRFVRLSWRPAAEAK GNIQTFTVFFSREGDNRRERALNTQPGSLQLTVGNLKPEAM YTFRVVAYNEWGPGESSQPIKVATQPELQVPGPVENLQAVS TSPTSILITWEPPAYANGPVQGYRLFCTEVSTGKEQNIEVD GLSYKLEGLKKFTEYS LRFLAYNRYGPGVSTDDITVVTLS VPSAPPQNVSLVVNSRSIKVSWLPPPSGTQNGFITGYKIR HRKTRRGEMETLEPNNLWYLF TGLEKGSQYSFQVSAMTVN GTGPPSNWYTAETPENDLDESQVPDQPS SLHVRPQTNCIIM SWTPPLPNIVVRGYIIGYGVGSFYAETVRVDSKQRYYSIE RLESSSHYVISLKAENNAGEGVPLYESATTRSITDPTDPVD YYPLLD DFTSVPDLSTPMLPPVGVAVALTHDAVRVSWAD NSVPKNQKTSEVRLYTVRWRTSFSASAKYKSED TTSLSYTA TGLKPNTMYEFSVMVTKNRRS TWSMTAHATTYEAASTAP KDLTVITREGKPRAVIVSWQPPLEANGKITAYILFYTL DKN IPIDDWIMETISGDR LTHQIMDLNLD TMYFRIQARN SKGV GPLSDPILFRTLKVEHPDKMANDQGRHGDGGYWPVD TNLID RSTLNEPPIGQMHPHGSVTPQKNSNGS
110	Variante de UNC5C humano T835M	MRKGLRATAARCGLGLGYLLQMLVLPALALLSASGTGSAAQ DDDFHHELPETFPSPDPEPLPHFLIEPEEAYIVKNKPVNLY CKASPATQIYFKCNSEWVHQKDHI VDERVDETSGLIVREVS IEISRQQVEELFGPEDYWCQCVAWSSAGTTKSRKAYVRIAY LRKTFEQEPLGKEVSLEQEVLLQCRPPEGIPVAEVEWLKNE DIIDPVEDRNFYITIDHNLI IKQARLSDTANYT CVAKNIVA KRKSTTATVIVYVNGGWSTWTEWSVCNSRCGRGYQKRTRTC TNAPLNGGAFCEGQSVQKIACTTLCVPDGRWTPWSKWSTC GTECTHWRRECTAPAPKNGGKDCDGLVLQSKNCTDGLCMQ TAPDSDDVALYVGIVIAIVIVCLAISVVVALFVYRKNHRDFE SDIIDSSALNGGFQPVNIKAARQDLLAVPPDLTSAAMYRG PVYALHDVSDKIPMTNSPILDPLPNLKIKVYNTSGAVTPQD DLSEFTSKLSPQMTQSLLENEALSLKNQSLARQTDPSCTAF GSFNSLGGHLIVPNSGVSLIPAGAI PQGRVYEMYVTVHRK ETMRPPMDDSQTLLTPVVSCGPPGALLTRPVVLTMMHCADP NTEDWKILLKNQAAQGQWEDVVVVGEE NFTTPCYIQLDAEA CHILTENLSTYALVGHSTTKAAAKRLKLAIFGPLCCSSLEY SIRVYCLDDTQDALKEILHLERQMGGQLLEEPKALHFKGST HNLRLSIHDIAHSLWKSLLAKYQEIPFYHVWSGSQRNLHC TFTLERFSLNTVELVCKLCVRQVEGEGQIFQLNCTVSEEP GIDLPLDPANTITMVTGPSAFSIPLP I RQKLCSSLDAPQT RGHDWRMLAHKLNLD RYLN YFATKSSPTGVILDLWEAQNFP DGNLSMLAAVLEEMGRHETTVVSLAAEGQY

111	Fragmento de UNC5C humano ACB_429	GSDPPEPLPHFLIEPEEAYIVKNKPNLYCKASPATQIYF KCNSEWVHQKDHIVDERVDETSGLIVREVSIEISRQQVEE LFGPEDYWCQCVAWSSAGTTKSRKAYVRIAYLRKTFEQEP LGKEVSLEQEVLLQCRPPEGIPVAEVEWLKNEDIIDPVED RNFYITIDHNLI IKQARLSDTANYTCVAKNIVAKRKSTTA TVIVYVGSHHHHHH
112	ATL_0006187 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSTGSYYWSWIRQP PGKGLEWIGYTHYSGHTNQNP SLKSRVTMSVDSSKSLSL KLTSVTAADTAVYYCARGRGMATLPFDSWGQGLVTVSS
113	ATL_0006191 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIGSYFWSWIRQT PGKGLEWIGYIHYSGSSNYPNPSLKSRTISVDTFKNQFSL KLTSVTAADTAVYYCARGRGMATLPFDYWGQGLTVTVSS
114	ATL_0006187 VL;ATL_0006191 VL (secuencia duplicada, sec. con núms. de ident.: 9, 92, 94)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLP EDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKEIK
115	HCDR1_ATL_0006187	GGSTGSYY
116	HCDR1_ATL_0006191	GGSIGSYF
117	HCDR2_ATL_0006187	THYSGHT
118	HCDR2_ATL_0006191	IHYSGSS
119	HCDR3_ATL_0006187	ARGRGMATLPFDS
120	HCDR3_ATL_0006191	ARGRGMATLPFDY
24	LCDR1_ATL_0006187;LCD R1_ATL_0006191	QSISSY
34	LCDR2_ATL_0006187; LCDR2_ATL_0006191	AAS
121	LCDR3_ATL_0006187; LCDR3_ATL_0006191 (secuencia duplicada sec. con núm. de ident.: 40)	QQSYSTPLT
122	ATL_0006530 VH	QVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPG KGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDPYSGYEFVSEPYFDYWGQGLTVTVSS
123	ATL_0006531 VH	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKDSIQLWSFDYWGQGLTVTVSS
124	ATL_0006532 VH	QVTLKESGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGRINPNSSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCAREEDCSSTSCYGAFDIWDGQGTMTVTVSS
125	ATL_0006533 VH	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPG KGLEWVSYISSSSSYTNYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGGGGMDVWGQGTMTVTVSS
126	ATL_0006534 VH	QVQLVESGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGRINPNSSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCAREGDDSSGWLGGAFDIWDGQGTMTVTVSS
127	ATL_0006535 VH	EVQLLETGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKDSYGDYFRGYYYGMDVWGQGTMTVTVSS
128	ATL_0006536 VH	EVQLLESAGGVVQLGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPG KGLEWVAIIYFDGRNKYYAGSVGGRTISRDNKNTLYLQMD SLRSDDTAVYYCARLPFPWLRVDGLDVWGHGTMVTVSS

129	ATL_0006537 VH	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYYCARQRRGSGTRGMDVWGQGTTVTVSS
130	ATL_0006538 VH	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTLCAVSGGSISSSNWWSWVRQ PPGKGLEWIGEIIYHSGSTNYNPSLKS RVTISVDKSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGRGGSYYFDYWGQGT LTVTVSS
131	ATL_0006539 VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFINYAMSWVRQAPG KGLEWVSTISGSGASIIYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCAK GAYYDSSGYALDAFDI WGQGTMTVTVSS
132	ATL_0006530 VL	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQR PGSAPT TVIYEDNQRP SGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISG LKTEDEADYYCQSYDSSNHVVF GGGTKVTVL
133	ATL_0006531 VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGARSDVGGYDYVSWFQQ HPGKVPKLMIIYDVNNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYCSSFTDSSSTYVFGTGTKVTVL
134	ATL_0006532 VL	QSVLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIVSNYVQWYQQR PGSSPTTVIYEDNQRP SGVPDRFSGSIDRSSNSASLTISG LKTEDEGDYYCQSYDKTSRVILFGE GTKVTVL
135	ATL_0006533 VL	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQR PGSAPT TVIYEDNQRP SGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISG LKTEDEADYYCQSYDSSNHVVF GGGTKVTVL
136	ATL_0006534 VL	NFMLTQPHSVLESPGKTVTIPCTRSSGSIASNYVQWYQQR PGSAPTAVIFEDNVRPSGV PDRFSGSDSSSNSASLTISG LKTEDEGDFYCQSYDSSGHVVF GGGTKVTVL
137	ATL_0006535 VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQ LPGTAPKLLIYGNSNRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAITGL QAEDEADYYCQSYDSSLSASVYVFGTGTKVTVL
138	ATL_0006536 VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGNYNLWSWYQQ YPGKAPKLLIYEVIKRP SGISGRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYCSSYTSSSTDYVFGTGTKVTVL
139	ATL_0006537 VL	QAGLTQPPSVSVSPGQTASITCSGKKLGDKYTSWYQQKPG QSPLVIYQDNKRPSGV PGRFSGSNSGNTATLTISGTQPM DEADYYCQAWDSSTVIFGGGTKVTVL
140	ATL_0006538 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQV PGTAPKLLIYSNNQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAISGLQ SEDEADYYCAAWDDSLNGWVF GGGTKVTVL
141	ATL_0006539 VL	QSVLTQPPSVSVSAGQTASITCSGDMLGKKYASWYQHKPG QSPVLVIYQDARRPSGISERFSGSSSGNTATLTISGTQAM DEADYYCQAWGSTAVFGGGTKVTVL
142	HCDR1_ATL_0006530	GFTFSSYS
143	HCDR1_ATL_0006531;HCD R1_ATL_0006535	GFTFDDYA
144	HCDR1_ATL_0006532;HCD R1_ATL_0006534	GYTFTGY Y
145	HCDR1_ATL_0006533	GFTFSDYY
146	HCDR1_ATL_0006536	GFTFSNYG
147	HCDR1_ATL_0006537	GYSFTSYW
148	HCDR1_ATL_0006538	GGSISSSNW
149	HCDR1_ATL_0006539	GFTFINYA
150	HCDR2_ATL_0006530	ISSSSSYI
151	HCDR2_ATL_0006531	ISWDGGST
152	HCDR2_ATL_0006532;HCD R2_ATL_0006534	INPNSSGT

153	HCDR2_ATL_0006533	ISSSSSYT
154	HCDR2_ATL_0006535	ISWNSSGSI
155	HCDR2_ATL_0006536	IYFDGRNK
156	HCDR2_ATL_0006537	IYPGDSDT
157	HCDR2_ATL_0006538	IYHSGST
158	HCDR2_ATL_0006539	ISGSGASI
159	HCDR3_ATL_0006530	ARDPYSGYEFVSEPYFDY
160	HCDR3_ATL_0006531	AKDSIQLWSFDY
161	HCDR3_ATL_0006532	AREEDCSSTSCYGDAFDI
162	HCDR3_ATL_0006533	ARGGGGMDV
163	HCDR3_ATL_0006534	AREGDDSSGWLGGAFDI
164	HCDR3_ATL_0006535	AKDSYGDYFRGYYYGMDV
165	HCDR3_ATL_0006536	ARPLFPWLRVDGLDV
166	HCDR3_ATL_0006537	ARQRRGSGTRGMDV
167	HCDR3_ATL_0006538	ARGRGGSYFYDY
168	HCDR3_ATL_0006539	AKGAYDSSGGYYALDAFDI
169	LCDR1_ATL_0006530;LCD R1_ATL_0006533;LCDR1_ ATL_0006534	SGSIASNY
170	LCDR1_ATL_0006531	RSDVGGYDY
171	LCDR1_ATL_0006532	SGSIVSNY
172	LCDR1_ATL_0006535	SSNIGAGYD
173	LCDR1_ATL_0006536	SSDVGNYNL
174	LCDR1_ATL_0006537	KLGDKY
175	LCDR1_ATL_0006538	SSNIGSNT
176	LCDR1_ATL_0006539	MLGGKY
177	LCDR2_ATL_0006530;LCD R2_ATL_0006532;LCDR2_ ATL_0006533;LCDR2_ATL_ _0006534	EDN
178	LCDR2_ATL_0006531	DVN
179	LCDR2_ATL_0006535	GNS
180	LCDR2_ATL_0006536	EVI
181	LCDR2_ATL_0006537	QDN
182	LCDR2_ATL_0006538	SNN
183	LCDR2_ATL_0006539	QDA
184	LCDR3_ATL_0006530	QSYDSSNHVV
185	LCDR3_ATL_0006531	SSFTDSSTYV
186	LCDR3_ATL_0006532	QSYDKTSRVIL
187	LCDR3_ATL_0006533	QSYDSSNHVV
188	LCDR3_ATL_0006534	QSYDSSGHVV
189	LCDR3_ATL_0006535	QSYDSSLASYSV
190	LCDR3_ATL_0006536	SSYTSSSTDYV

191	LCDR3_ATL_0006537	QAWDSSTVI
192	LCDR3_ATL_0006538	AAWDDSLNGWV
193	LCDR3_ATL_0006539	QAWGSTAV
194	UNC5C humano versión 2	GSQDDDFHHELPETFPSDPPEPLPHFLIEPEEAYIVKNKP VNLYCKASPATQIYFKCNSEVWHQKDHIWDERVDETSGLI VREVSIEISRQQVEELFGPEDYWCQCAWSSAGTTKSRKA YVRIAYLRKTFEQEPLGKEVSLEQEVLLQCRPPEGIPVAE VEWLKNEIDIIPVEDRNFYITIDHNLIQARLSDTANYT CVAKNIVAKRKSTTATVIVYVNGGWSTWTEWSVCNSRCGR GYQKRTRTCTNPAPLNGGAFCEGQSVQKIACITLCPVDGR WTPWSKWSTCGTECTHWRRECTAPAPKNGGKDCDGLVLQ SKNCTDGLCMQTAPSDDDVALYGSHHHHHH
195	HFWR2_ATL_0006191	WSWIRQTPGKGLEWIGY
196	HFWR3_ATL0006187	NQNPSLSKSRVTMSVDSKSQLSLKLTSVTAADTAVYYC
197	HFWR3_ATL0006191	NYNPSLSKSRVTISVDTFKNQFSLKLTSVTAADTAVYYC
198	HFWR4_ATL0006187	WGQGILVIVSS
199	HFWR1_ATL_0006530	QVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAAS
200	HFWR2_ATL_0006530	MNWVRQAPGKGLEWVSS
201	HFWR3_ATL_0006530	YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
202	HFWR1_ATL_0006531	EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAAS
203	HFWR2_ATL_0006531	MHWVRQAPGKGLEWVSL
204	HFWR3_ATL_0006531	YYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC
205	HFWR1_ATL_0006532	QVTLKESGAEVKKPGASVKVSCKAS
206	HFWR2_ATL_0006532, 6534	MHWVRQAPGQGLEWMGR
207	HFWR3_ATL_0006532, 6534	NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC
208	HFWR4_ATL_0006532, 6533, 6534, 6535, 6539	WGQGTMTVTVSS
209	HFWR1_ATL_0006533	QVQLQQSGGGLVKPGGSLRLSCAAS
210	HFWR2_ATL_0006533	MSWIRQAPGKGLEWVSY
211	HFWR3_ATL_0006533	NYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
212	HFWR1_ATL_0006534	QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKAS
213	HFWR1_ATL_0006535	EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAAS
214	HFWR2_ATL_0006535	MHWVRQAPGKGLEWVSG
215	HFWR3_ATL_0006535	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC
216	HFWR1_ATL_0006536	EVQLLESAGGVVQLGRSLRLSCAAS
217	HFWR2_ATL_0006536	MHWVRQAPGKGLEWVAI
218	HFWR3_ATL_0006536	YYAGSVGGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRSDDTAVYYC
219	HFWR4_ATL_0006536	WGHGTMVTVSS
220	HFWR1_ATL_0006537	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS
221	HFWR2_ATL_0006537	IGWVRQMPGKGLEWMGI
222	HFWR3_ATL_0006537	RYSFSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC
223	HFWR4_ATL_0006537	WGQGTMTVTVSS
224	HFWR1_ATL_0006538	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVS

225	HFWR2_ATL_0006538	WSWVRQPPGKGLEWIGE
226	HFWR3_ATL_0006538	NYNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
227	HFWR1_ATL_0006539	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSAS
228	HFWR2_ATL_0006539	MSWVRQAPGKGLEWVST
229	HFWR3_ATL_0006539	YYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC
230	LFWR1_ATL_0006530, 6533	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGS
231	LFWR1_ATL_0006531	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGA
232	LFWR1_ATL_0006532	QSVLTQPHSVSESPGKTVTISCTRS
233	LFWR1_ATL_0006534	NFMLTQPHSVLESPGKTVTIPCTRS
234	LFWR1_ATL_0006535	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGS
235	LFWR1_ATL_0006537	QAGLTQPPSVSVSPGQTASITCSGK
236	LFWR1_ATL_0006538	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS
237	LFWR1_ATL_0006539	QSVLTQPPSVSVSAGQTASITCSGD
238	LFWR2_ATL_0006530, 6533	VQWYQQRPGSAPTTVIY
239	LFWR2_ATL_0006531	VSWFQQHPGKVPKLLMIY
240	LFWR2_ATL_0006532	VQWYQQRPGSSPTTVIY
241	LFWR2_ATL_0006534	VQWYQQRPGSAPTAVIF
242	LFWR2_ATL_0006535	VHWYQQLPGTAPKLLIY
243	LFWR2_ATL_0006536	VSWYQQYPGKAPKLLIY
244	LFWR2_ATL_0006537	TSWYQQKPGQSPLLVIY
245	LFWR2_ATL_0006538	VNWWYQQVPGTAPKLLIY
246	LFWR2_ATL_0006539	ASWYQHKPGQSPVLVIY
247	LFWR3_ATL_0006530, 6533	QRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYC
248	LFWR3_ATL_0006531	NRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC
249	LFWR3_ATL_0006532	QRPSGVPDRFSGSIDRSSSNSASLTISGLKTEDEGDYYC
250	LFWR3_ATL_0006534	VRPSGVPDRFSGSVDSSSNSASLTISGLKTEDEGDFYC
251	LFWR3_ATL_0006535	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC
252	LFWR3_ATL_0006536	KRPSGISGRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC
253	LFWR3_ATL_0006537	KRPSGVPGRFSGSNSGNTATLTISGTQPMDEADYYC
254	LFWR3_ATL_0006538	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC
255	LFWR3_ATL_0006539	RRPSGISERFSGSSSGNTATLTISGTQAMDEADYYC
256	LFWR4_ATL_0006530, 6533, 6534, 6537, 6538, 6539	FGGGTKVTVL
257	LFWR4_ATL_0006531, 6535, 6536	FGTGTKVTVL
258	LFWR4_ATL_0006532	FGEGTKVTVL
259	Región de UNC5C_HS- o95185-1 que interactúa con ATL_5262	YCKASPATQIYFKCNSEWVHQKD HIVDERVDETSGLIVREV

260	Región de UNC5B_Hs-Q8IZJ1-1 que es homóloga a la sec. con núm. de ident.: 259	RCRAFPATQIYFKCNGEWSQNDHVTQEGLDEATGLRVREV
261	Región de UNC5A_Hs-Q6ZN44-1 que es homóloga a la sec. con núm. de ident.: 259	VCKAVPATQIFFKCNGEWRQVDHVIERSTDGSSGLPTMEV
262	Región de UNC5D_Hs-Q6UXZ4-1 que es homóloga a la sec. con núm. de ident.: 259	RCKARPAMQIFFKCNGEWHQNEHVSEETLDESSGLKVREV

Tabla 1. Secuencias a las que se hace referencia en la

presente. VH = dominio variable de cadena pesada; VL =

dominio variable de cadena ligera; CDR = región

determinante de complementariedad, CDRL se refiere a las

5 CDR en el dominio variable de cadena ligera (numeradas 1,

2 o 3 de N-ter); CDRH se refiere a las CDR en el dominio

variable de cadena pesada (numeradas 1, 2 o 3 de N-ter));

FWR = región del marco; LFWR se refiere a un FWR en la

cadena ligera (numerado 1, 2, 3 o 4 de N-ter), mientras

10 que HFWR se refiere a un FWR en la cadena pesada

(numerado 1, 2, 3 o 4 de N-ter). “ATL ” se usa como un

identificador de anticuerpos.

Ejemplos

15 Estos ejemplos demuestran la identificación de

anticuerpos terapéuticos potenciales de una cohorte de

sujetos que tienen o se consideran en riesgo de desarrollar

demencia frontotemporal o enfermedad de Parkinson (PD)

(Ejemplo 1), así como su caracterización *in vitro* e *in*

20 *vivo* (Ejemplos 2-5, 7-19) y optimización (Ejemplo 6).

Posteriormente se identificaron anticuerpos adicionales que muestran propiedades similares a las del Ejemplo 1 y 6 (Ejemplo 20).

5 Materiales y métodos

ELISA de UNC5C humano y de ratón

Antígeno humano recombinante de UNC5C (Fc etiquetada de R&D System, núm. 1005-UN; o producción interna a partir de células HEK293F con etiqueta His o FLAG N-terminal (sec. con núm. de ident.: 98): se usó antígeno humano interno para confirmar que los resultados no fueron impulsados por la Fc etiquetada) o antígeno de ratón (producción interna a partir de células HEK393F con etiqueta His o FLAG N-terminal (sec. con núm. de ident.: 97: el dominio extracelular UNC5C murino expresado comprende AA 41-380 de la secuencia UNC5C murina); antígeno de rata (sec. con núm. de ident.: 103); o antígeno de cyno (sec. con núm. de ident.: 104) se absorbieron directamente en una placa ELISA a 3 µg/ml (50 µl por pocillo) y se incubaron durante la noche a 4 °C. La placa se lavó con PBS. Las placas se bloquearon con 200 µl/pocillo de solución de bloqueo (1 % de BSA p/v en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de esto, se retiró la solución de bloqueo y los anticuerpos a evaluar se diluyeron en series de dilución (1 µM a 0,05 nM) en solución de bloqueo (1 % de BSA p/v en PBS) y se aplicaron a la placa. Las placas se

incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con PBS/0,1 % de Tween. Se añadió anti-IgG humana con HRP (Jackson ImmunoResearch; núm. 109 -035-097) a la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente para detectar la unión al anticuerpo. La placa se lavó con PBS/0,1 % de Tween y solución TMB (Life Technology; núm. 002023) añadida. Las placas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de la solución de parada (ácido sulfúrico 0,5 M). La absorbancia se leyó en el lector de placas Molecular Devices FilterMaxF5 a 450 nm. El análisis se realizó usando un algoritmo de ajuste de curva de ajuste no lineal sobre prisma GraphPad y se calculó la EC50.

Deconvolución de diana mediante proteómica de Retrogenix

El grupo de 20 anticuerpos usados en esta pantalla fueron 18 anticuerpos identificados a partir del análisis de cohorte de muestra de FTD, un anticuerpo de una cohorte de Huntington y un anticuerpo anti-PDL1 de control positivo. Se mezclaron los anticuerpos en proporciones iguales (concentraciones) para crear el grupo. El grupo de anticuerpos se cribó a 4 ug/ml, por lo que cada anticuerpo individual dentro del grupo se cribó a 0,2 ug/ml. Se realizó un cribado del grupo de anticuerpos para detectar su unión a células HEK293 fijadas en portaobjetos que expresan la “genoteca Retrogenix” que comprende duplicados de 6019 proteínas de membrana plasmática humana, proteínas humanas

secretadas y proteínas humanas secretadas ancladas a la superficie celular y 397 heterodímeros humanos. Los cribados se realizaron por duplicado. La unión de anticuerpos se detecta usando un anticuerpo secundario etiquetado con AlexaFluor647 y portaobjetos de exploración. UN5C se identificó como un aglutinante débil en una réplica y un aglutinante muy débil en la segunda réplica.

Siguiendo este resultado, cada anticuerpo del grupo se probó individualmente para la unión a la proteína rhUN5C mediante ELISA.

Ensayo de competencia de Netrina-1

El antígeno humano recombinante UN5C (R&D Systems; núm. 1005 -UN) o el antígeno de ratón (producción interna) se absorbieron directamente en una placa ELISA a 3 µg/ml (50 µl por pocillo) y se incubaron durante la noche a 4 °C. La placa se lavó con PBS. Las placas se bloquearon con 200 µl/pocillo de solución de bloqueo (1 % de BSA p/v en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la Netrina 1 humana recombinante con etiqueta His C-terminal (R&D Systems; núm. 6419-N1) o vehículo se añadió a la placa para una etapa de preincubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. La concentración de netrina 1 fue de 200 µg/ml para el ensayo de competencia de un solo punto y en un rango de dilución de 200 µg/ml a 0,003 µg/ml. El ensayo se configuró

en pocillos replicados para poder detectar tanto la unión al anticuerpo ATL_0005262 como la unión a Netrina 1. Se aplicó ATL_0005262 (a 4 µg/ml) a los pocillos que contenían Netrina 1 y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se lavó la placa con PBS/0,1 % de Tween. Se añadió anti-IgG humana con HRP a la placa (Jackson ImmunoResearch;núm. 109-035-097) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente para detectar la unión del anticuerpo al UNC5C. Se añadió anti-His con HRP (Invitrogen núm. MA1-21315-HRP) a los pocillos para detectar la unión de Netrina 1 al UNC5C. La placa se lavó con PBS/0,1 % de Tween y solución de TMB (LifeTechnology; núm. 002023) añadida. Las placas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de la solución de parada (ácido sulfúrico 0,5 M). Absorbancia leída en el lector de placas Molecular Devices FilterMaxF5 a 450 nm.

Para el experimento inverso para determinar si la Netrina-1 podría desplazar ATL_0005252, el antígeno humano recombinante UNC5C (R&D Systems; núm. 1005-UN) se absorbió directamente en la placa ELISA a 3 µg/ml (50 µl por pocillo) y se incubó durante la noche a 4 °C. La placa se lavó con PBS. Las placas se bloquearon con 200 µl/pocillo de solución de bloqueo (1 % de BSA p/v en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron a las placas ATL_0005262 o el anticuerpo de control negativo ATL_0005338 en una curva de dilución triple de 12 puntos a

partir de 666 nM. Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió Netrina 1 a los pocillos a una concentración final de 75 nM, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. El ensayo se configuró en pocillos replicados para poder detectar tanto la unión al anticuerpo ATL_0005262 como la unión a Netrina 1. Después, se lavó la placa con PBS/0,1 % de Tween. Se añadió anti-IgG humana con HRP a la placa (Jackson ImmunoResearch;núm. 109-035-097) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente para detectar la unión del anticuerpo al UNC5C. Se añadió anti-His con HRP (Invitrogen núm. MA1-21315-HRP) a los pocillos para detectar la unión de Netrina 1 al UNC5C. La placa se lavó con PBS/0,1 % de Tween y solución de TMB (LifeTechnology; núm. 002023) añadida. Las placas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de la solución de parada (ácido sulfúrico 0,5 M). Absorbancia leída en el lector de placas Molecular Devices FilterMaxF5 a 450 nm.

20 Ensayo de interferometría biocapa

La interacción de unión de ATL_5262 o ATL_6178 con diferentes receptores de netrina-1 se evaluó mediante interferometría biocapa (BLI, por sus siglas en inglés) usando un instrumento Octet Red 96e. Los antígenos recombinantes purificados se adquirieron de un proveedor comercial o se prepararon y purificaron internamente y los

detalles se muestran en la **Tabla 2**. Los antígenos humanos recombinantes detallados en la tabla a continuación fueron capturados mediante la etiqueta His en los biosensores Sartorius Octet HIS1K en el regulador de ensayo (regulador 5 cinético Cytiva HBS-EP+). Los sensores cargados se equilibraron con el regulador de ensayo y después se sumergieron en el analito de anticuerpo (ATLX-1282, ATL5262 hIgG1-LALA) y se midió la respuesta (asociación). Entonces, se sumergieron los sensores en regulador de unión 10 y se midió la respuesta (disociación).

Los biosensores se hidrataron y acondicionaron antes de su uso mediante inmersión en regulador de ensayo y regulador de regeneración (10 mM de glicina, pH 1,5, Cytiva), y se llevaron al equilibrio en regulador de ensayo 15 antes de la carga.

La señal de unión de un anticuerpo de control sumergida en la misma muestra se restó de los datos sin procesar. Se recolectaron los datos de referencia a partir de sensores cargados sumergidos en un analito de anticuerpo 20 de control de concentración equivalente.

Nombre del antígeno	Especie	Código de acceso UniProt	Nombre del gen	Proveedor
UNC5A	Humano	Q6ZN44	UNC5A	Número de catálogo 6767-UN de R&D Systems o sec. con núm. de ident. interno: 105
UNC5B	Humano	Q8IZJ1	UNC5B	Número de catálogo 8869-UN de R&D Systems o sec. con núm. de ident. interno: 106

UNC5C	Humano	Q95185	UNC5C	Número de catálogo 1005-UN de R&D Systems o sec. con núm. de ident. interno: 107
UNC5D	Humano	Q6UXZ4	UNC5D	Número de catálogo 1429-UN de R&D Systems o sec. con núm. de ident. interno: 108
Neogenina	Humano	Q92859	NEO1	Número de catálogo 8607-NE de R&D Systems
Receptor de netrina DCC	Humano	P43146	DCC	Sistemas R&D Número de catálogo 8637-DC o sec. con núm. de ident. interno: 109
Molécula de adhesión celular DSCAM	Humano	O60469	DSCAM	Sistemas R&D número de catálogo 3666-DS

Tabla 2. Proteínas recombinantes utilizadas para BLI.

Enfoque isoelectrico capilar (cIEF)

El análisis de variantes de carga se realizó

5 preparando una mezcla maestra para diluir muestras de anticuerpos para ejecutarlas en un cartucho cIEF en un instrumento Maurice (Protein Simple). La mezcla maestra tuvo una concentración final de 0,35 % de metilcelulosa (Protein Simple, 101876), 4 % de pharmalyte pH 3-10 (Protein Simple,

10 17-0456-01), 10 mM de arginina (Protein Simple, 042-691), 0,01 % de marcadores de pI 4,05 y 9,99 (Protein Simple, 046-029 y 046-034). Las muestras se diluyeron a 0,15-0,25 mg/ml en la mezcla maestra y se ejecutaron durante 1 minuto a 1500 voltios seguido de 4,5 minutos a 3000 voltios. También se

15 ejecutó un estándar de idoneidad del sistema (Protein Simple, 046-044) al inicio de la ejecución. Los datos de estabilidad generados a las 2 y 4 semanas se superpusieron para comparar el perfil de especies de carga.

El enfoque isoeléctrico capilar (cIEF) para ATL_6187 se realizó en un instrumento Maurice (ProteinSimple). Se añadieron 20 ug de muestra a una mezcla maestra que contenía anfolito portador, marcadores de pI 7 y 10, metilcelulosa y urea y se cargó en un cartucho cIEF (ProteinSimple), la separación se realizó entre el rango de pH pI 7,0 a 10,0 y la detección se realizó a 280 nm.

Cromatografía con exclusión por tamaño (SEC-HPLC)

Las muestras de anticuerpos se diluyeron a 1,2 mg/ml en 20 mM de acetato de histidina, 150 mM de NaCl pH 5,5 para ejecutarse en una columna Zorbax GF-250 SEC-HPLC (Agilent) en un Vanquish Flex (Thermo Scientific). Las muestras se separaron por tamaño en fase móvil de 20 mM de fosfato de sodio, 300 mM de sulfato de sodio y 100 mM de arginina a una velocidad de flujo de 0,75 ml/minuto a +25C durante 25 minutos por muestra. Para integrar los cromatogramas se usó el software Chromeleon (Thermo Scientific).

20

SDS-PAGE

Se prepararon 2 µg de muestras de anticuerpo diluyéndolas en agua y regulador de muestra Laemmli 2x (Bio-Rad). Las muestras se analizaron tanto en condiciones reducidas como no reducidas; las muestras reducidas tenían la adición de 50 mM de DTT (Sigma-Aldrich). Todas las

muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y se cargaron en pocillos de geles de proteína Bolt 4-12 % Bis-Tris Plus Protein (Thermo Scientific), al mismo tiempo que 5 µl de un marcador de peso molecular se cargó en cada gel, 5 estándares de color dual de proteína Precision Plus (Bio-Rad, 1610737) y se ejecutaron en regulador de ejecución Bolt MES SDS (Thermo Scientific). Las muestras se ejecutaron a 200 voltios constantes durante 23 minutos, seguido de una tinción con InstantBlue Coomassie Stain 10 durante un mínimo de 1 hora, los geles se destiñeron con lavados con agua y se tomó una imagen mediante escaneo usando el sistema GelDoc Go Imaging (Bio-Rad).

15 Electroforesis capilar con dodecil sulfato de sodio (CE-SDS)

La CE-SDS se realizó en un instrumento Maurice separando muestras en un cartucho CE-SDS Plus (Protein Simple). Se prepararon muestras de anticuerpos mezclando 5 µl de muestra a 12,6 mg/ml con 55 µl de regulador de 20 muestra 1x (Protein Simple), para obtener una concentración de solución de prueba de 1 mg/ml. Para muestras reducidas se añadieron 2,5 µl de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich ref: M6250) a la mezcla, para muestras no reducidas se añadieron 2,5 µl de yodoacetamida (Sigma- 25 Aldrich), después se agitó completamente y se calentó a 70 °C durante 10 minutos, seguido de 5 minutos en hielo.

Entonces, las muestras se agitaron y centrifugaron brevemente, se transfirieron 50 µl de la mezcla de muestra a una placa de 96 pocillos y se centrifugaron a 1000 xg durante 10 minutos y después se colocaron en el instrumento Maurice. Para reducir las condiciones, las muestras se ejecutaron a 4600 voltios durante 25 segundos para la inyección, seguido de 5750 voltios durante 25 minutos para la separación. Para condiciones no reductoras, las muestras se ejecutaron a 4600 voltios durante 25 segundos para la inyección, seguido de 5750 voltios durante 35 minutos para la separación, los datos se analizaron usando el software Chromeleon (Thermo Scientific).

Condiciones de estabilidad

Los viales de 100 µl de mAb de 12,6 mg/ml (ATL_5262) o 50 mg/ml (ATL_6178) se almacenaron a 40 °C en una incubadora estática, en un refrigerador a 4 °C o en un congelador a -80 °C durante un período de 2 o 4 semanas. Se prepararon viales triplicados para cada condición. Para las condiciones de congelación y descongelación, las muestras de mAb a 12,6 mg/ml se congelaron y descongelaron desde un almacenamiento a -80 °C hasta temperatura ambiente (TA) durante tres ciclos en un período de ocho horas.

Las muestras de 50 mg/ml (ATL_6178) para evaluaciones de congelación y descongelación se sometieron a ciclos de temperatura entre -70 °C y temperatura ambiente,

lo que permitió que la muestra se descongelara completamente cada vez, durante 3 o 5 ciclos. Todas las muestras estresadas se compararon con una muestra de control congelada a -70 °C.

Las muestras que requerían agitación se colocaron en una incubadora con agitación a 25 °C y 300 rpm.

Las muestras que requerían condiciones de pH bajo se ajustaron a pH 3,5 usando ácido clorhídrico y se colocaron a 25 °C durante 6 h o 24 h, después de lo cual se congelaron a -70 °C hasta que se necesitaron para su análisis.

10

Condiciones de solubilidad

Previo a realizar evaluaciones de solubilidad, ATL_6178 purificado se concentró a 50 mg/ml, 100 mg/ml o hasta un máximo de 288,9 mg/ml mediante centrifugación por ultrafiltración. La muestra a 288,9 mg/ml se diluyó a 200 mg/ml para su análisis. Después, las muestras se analizaron antes o después de ser incubadas a 25 °C durante 7 días.

20 Ensayo de desplazamiento térmico

Las mediciones del desplazamiento térmico de proteínas se realizaron en un equipo Uncle (Unchained Labs). Los anticuerpos se diluyeron a 1 mg/ml o 5 mg/ml en 20 mM de acetato de histidina, 150 mM de NaCl, regulador de pH 5,5 y se ejecutaron a través de una rampa de temperatura de 25-95 °C aumentando a una velocidad de 0,5 °C/minuto. Las

muestras se ejecutaron por triplicado, cargando 8,8 µl en 3 pocillos diferentes de un Uni (Unchained Labs). Los ajustes del láser se ejecutaron para lograr una fluorescencia inicial en el rango de 300-350 nm de 10000 - 50000 recuentos. La temperatura de fusión (Tm1/Tm2) y la temperatura de agregación (Tagg/Tonset) se analizaron usando el software Uncle Analysis v6 (Unchained Labs). La medición de Tm se calculó usando la relación 350/330 nm, mientras que la Tonset y Tagg se obtuvieron a partir de la lectura de SLS a 266 nm.

10

UNC5C PK

Para determinar la PK de anticuerpos UNC5C, se realizó un experimento de PK *in vivo* con ATL_0005262. Se trataron ratones machos C57BL/6J de seis a ocho semanas de edad mediante IP con ATL_0005262 a dosis de 1, 10 y 60 mg/kg y se recolectaron muestras de suero a las 1, 4, 8, 24, 72 y 144 horas después de la dosis. Se recolectaron cerebros y líquido cefalorraquídeo (LCR) a las 24, 72 y 144 horas después de la dosis. Se administró ATL_5338 a 10 mg/kg como anticuerpo de control. Los niveles de anticuerpos se evaluaron vía ELISA.

20

Análisis de neuronas dopaminérgicas

Se realizaron experimentos con neuronas dopaminérgicas (Fujifilm iCell DopaNeurons 01279) cultivadas durante siete días *in vitro* de acuerdo con el protocolo del

25

fabricante usando el iCell Neural Base Medium 1, iCell Neural Supplement B e iCell Nervous System Supplement proporcionados por el fabricante. En el quinto día de cultivo, las neuronas fueron expuestas al tratamiento con ATLX-1282 (100 nM),
5 ATL5252 (100 nM), un control de isotipo (100 nM) y Netrina-1 recombinante (1 µg/ml) como un control positivo (obtenido de R&D systems; catálogo núm. 6419N1025CF).

El día 7, las células se lisaron y la proteína se extrajo usando regulador de lisis celular RIPA, que consiste
10 en 50 mM de Tris (pH 8,0), 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 1 % de NP-40, 0,5 % de desoxicolato de sodio y 1 % de SDS, suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Sigma). El impacto de los diversos tratamientos se evaluó mediante Western blot cuantitativo, realizado por
15 RayBioTech, Inc. (Peachtree Corners, GA, USA) usando su servicio de auto-Western Blot. La muestra de proteína extraída a una concentración de 0,1 mg/ml se cargó en la máquina de electroforesis capilar automatizada. Se emplearon los siguientes anticuerpos para la detección de proteínas:
20 UNC5C (ThermoFisher; núm. de catálogo PA5-67780), NeurofilamentL (Cell Signaling; núm. de catálogo 2837), Sinaptofisina (Cell Signaling; núm. de catálogo 36406), PSD95 (Cell Signaling; núm. de catálogo 3450), Sinaptofisina-1 (Cell Signaling; núm. de catálogo 5297),
25 Sinaptotagmina-1 (Cell Signaling; núm. de catálogo 14558). Se usaron anticuerpos secundarios del catálogo del servicio

de auto-Western Blot. de RayBiotech, Inc. Como control de carga se usó el anticuerpo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, por sus siglas en inglés) proporcionado por RayBiotech desde su genoteca de servicios.

5

Ensayo de depleción de netrina-1

Para evaluar el impacto de la privación de Netrina-1 en las neuronas motoras, se realizaron experimentos en neuronas motoras espinales derivadas de iPSC humanas (BX-0100, Brain Xell, EE. UU.) cultivadas durante 7 días *in vitro*. El día 5 del cultivo, estas neuronas fueron sometidas a pretratamiento con ATLX-1282 (100 nM) o ATL5262 (100 nM) durante 1 hora. Después de este pretratamiento, las neuronas fueron expuestas a un tratamiento adicional (como se detalla a continuación) y cuarenta horas más tarde, el día 7, se recolectaron las neuronas para una batería de ensayos para evaluar su respuesta celular y su salud. Estos ensayos incluyeron: (a) ensayo vivo/muerto; (b) análisis de expresión GAP-43; y (c) evaluación del crecimiento de neuritas (usando dispositivos microfluídicos compartimentados XonaChips, de Xona Microfluidics, EE. UU.).

Para los ensayos de viabilidad celular y expresión de GAP-43, después del pretratamiento, las células fueron expuestas a (1) el anticuerpo de control de isotipo ATL5338 solo; (2) ATL5338 y anticuerpo anti-netrina-1 2F5 (10 µg/ml) (AdipoGEN; NC2134483); (3) ATL5262 (100 nM) y anticuerpo

anti-netrina-1 2F5 (10 µg/ml); o (4) ATLX-1282 (100 nM) y anticuerpo anti-netrina-1 2F5 (10 µg/ml). La viabilidad celular se evaluó usando el kit de tinción LIVE/DEAD de Thermo Fisher Scientific. Las neuronas motoras se incubaron con 1 µM de calceína AM y 2 µM de homodímero-1 de etidio (EthD1) en PBS durante 30 minutos. Después del lavado con PBS, se obtuvieron imágenes de las células usando un microscopio fluorescente motorizado (Echo Revolve). El análisis incluyó cuatro fotogramas por chip con un aumento de $\times 10$, con conteo de partículas usando Fiji/ImageJ. La inmunotinción GAP-43 se realizó después de la fijación con paraformaldehído al 4 % y la permeabilización con 1 % de saponinas en PBS. El bloqueo se llevó a cabo durante 30 minutos en suero de burro al 10 % en PBS con 0,1 % de saponina. El anticuerpo primario (GAP-43, ThermoFisher; PIPA579299) se diluyó en suero de burro al 10 % en PBS con 1 % de saponina y se incubó durante la noche a 4 °C. Después de tres lavados con PBS, las células se incubaron con un anticuerpo secundario etiquetado con fluorescencia (Abcam, ab175470) a una dilución 1:300 durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de tinción nuclear DAPI.

Para las evaluaciones del crecimiento de las neuritas, después de que las células del pretratamiento se expusieron a (1) el anticuerpo de control de isotipo ATL5338 solo; (2) ATL5338 y anticuerpo anti-netrina-1 2F5 (10 µg/ml) (AdipoGEN; NC2134483); o (3) ATLX1282 (100 nM) y anticuerpo

anti-netrina-1 2F5 (10 µg/ml). Los cultivos microfluídicos involucraron neuronas motoras espinales BrainXell eGFP (BX-0101) cultivadas en unidades de cultivo XonaChip SF150X4 “X4”, y cada chip contenía entre 40-60k neuronas por unidad.

5 Después de 48 horas de incubación, se obtuvieron imágenes de los compartimentos somáticos y axónicos usando un objetivo 20x, capturando tanto el contraste de interferencia diferencial (DIC) como la fluorescencia de 488 canales. La visualización se realizó después de tres lavados con PBS, y

10 las imágenes se adquirieron usando Echo Revolve. El análisis cuantitativo del compartimento axonal implicó medir la longitud total de neuritas y el número total de neuritas.

Ensayos basados en MEA

15 El control isogénico de iCell Motor Neurons (núm. de catálogo: C1048), iCell Motor Neurons ALS TDP43 Q331K (núm. de catálogo: R1144) e iCell Astrocytes (núm. de catálogo: R1092) fueron todas de FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc. y mantenidas de acuerdo con los protocolos del

20 fabricante. Las superficies de cultivo se prepararon tratándolas inicialmente con una solución de polietilenimina al 0,1 % (Sigma-Aldrich), seguido de una incubación durante la noche. Posteriormente, las superficies tratadas se lavaron completamente tres veces con agua destilada estéril y se

25 dejaron secar al aire durante una hora. Las superficies secas se recubrieron después con 5 µg/ml de laminina (Sigma-

Aldrich), seguido de otra incubación durante la noche. Después de esta incubación, se aspiró la solución de laminina, y se sembraron células inmediatamente a una densidad de 55.000 células por cm^2 , usando el medio proporcionado por el fabricante. Notablemente, el cultivo celular incluyó una relación de 15 % de astrocitos por neuronas (equivalente a 1,5 K astrocitos por 10 K neuronas). Las neuronas motoras cultivadas se alimentaron cada 2-3 días con un reemplazo de medio del 50 % y se analizaron entre los días 15 y 20 de cultivo para todos los experimentos.

Para evaluar la función a nivel poblacional en cultivos de neuronas motoras, usamos placas de matriz multielectrodo (MEA) de 48 pocillos y el sistema Maestro MEA de Axion Biosystems. Durante la adquisición de datos, se aplicaron configuraciones de registro estándar para picos neuronales espontáneos usando el software Axis (versión 2.5). Las células se mantuvieron a una temperatura constante de 37 °C y 5 % de CO_2 a lo largo del periodo de registro de 2 minutos. La configuración estándar incluía una ganancia de 130 $\times$, grabación de 1 a 25.000 Hz, y un filtro digital paso bajo de 2 kHz para reducción de ruido. La detección de picos se configuró a 5 $\times$ la desviación estándar del ruido, y se registró una explosión de red si al menos el 25 % de los electrodos en un mismo pocillo exhibía actividad sincrónica. Los resultados informados en la presente se derivan de promediar todos los electrodos

en cada pocillo y después promediar los datos de seis pocillos. Los tratamientos experimentales consistieron en ATL-5338 (control de isotipo) y AT LX-1282, ambos administrados a concentraciones finales específicas de 100 nM. Estos tratamientos comenzaron el día 15 del experimento y continuaron durante 142 horas (Dosis 1: 0 punto temporal; Dosis 2: 120 h después de la 1.^a dosis). Para evaluar el impacto de estos tratamientos sobre el comportamiento celular, se realizaron registros diarios desde el día 15 hasta el día 20, realizando un registro cada día. Los datos registrados fueron sometidos a procesamiento usando el software de Axion Biosystems para la detección de picos y el análisis de formas de onda. El análisis estadístico se llevó a cabo usando pruebas estadísticas apropiadas para comparar los efectos de diferentes compuestos sobre la actividad de la red neuronal. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con $p < 0,05$.

Ensayos de caspasa

Las células SH-SY5Y (DSMZ) Nuclight Red (núm. de catálogo de Sartorius: 4475) se sembraron a una densidad de 5000/pocillo en una placa de 96 pocillos (núm. de catálogo de Corning: 3606) en DMEM/F12 (núm. de catálogo de Gibco: A4192001) con 10 % de FBS y se dejaron adherir durante la noche (37 °C, 5 % de CO₂). El medio se reemplazó con un pretratamiento en medio completo con colorante verde

Incucyte® caspasa 3/7 (núm. de catálogo de Sartorius: 4440) durante 24 horas. El pretratamiento se seleccionó entre 80 nM ATL5262, 80 nM AT LX-1282, 80 nM de control de isotipo (ATL-5338), 10 nM de Netrina-1, 10 nM de clusterina (proteína de control con un tamaño similar a Netrina 1 (100 kD)), o un control negativo (antifluoresceína ATL_5338, mismo isotipo IgG1) que carecía de un pretratamiento. después de eso, se añadió el péptido β -amiloide 1-42 (rPeptide, núm. de catálogo: A-1170; Abcam, núm. de catálogo: AB120301) diluido en medio completo con colorante verde caspasa 3/7 (concentración final de 20 μ M). Entonces, se leyó la placa usando un sistema de imágenes en vivo Incucyte (Sartorius) durante 72 horas usando un módulo óptico rojo/verde. El análisis se realizó después de eliminar los valores atípicos (Grubbs y ROUT: no se detectaron valores atípicos) con normalización del recuento verde a número de células (recuento rojo). El área bajo la curva en el prisma Graphpad se generó con Anova unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Šídák usada para determinar la significancia entre tratamientos.

Estudio in vivo de haploinsuficiencia de Netrina-1

Los ratones usados fueron ratones machos de 12 semanas de edad haploinsuficientes de Netrina 1 B6.129(Cg)-Ntn1tm1.2Tek/J de Jackson Laboratories (Stock núm. 028070) y crías normales de la misma camada no transgénicas. Los

ratones haploinsuficientes de Netrina 1 fueron tratados con ATLX-1282 dos veces por semana mediante IP, 60 mg/kg. La anfetamina se administró a 4 mg/kg mediante IP a partir del día 8 posterior a ATLX-1282. Se administró cada dos días durante 10 días (5 dosis). Antes del tratamiento con anfetamina, los ratones fueron llevados a la sala experimental durante al menos 1 hora de aclimatación. Se registraron la actividad locomotora, la frecuencia de elevación sobre las patas traseras (rearing) y los conteos estereotipados en intervalos de 5 minutos durante una línea de base de 30 minutos, tras la cual los ratones recibieron anfetamina (4 mg/kg) o solución salina y fueron devueltos a las cámaras OF para una sesión adicional de 60 minutos. Se usó solución salina como control para anfetamina, y se usó ATL5338 como control de isotipo para ATLX-1282.

Estudio 6-OHDA in vivo

Las ratas usadas fueron ratas Sprague-Dawley hembra (Charles River, aproximadamente 290 g al momento de la cirugía). El día 1 de estudio, todos los animales recibieron ya sea 6-OHDA o vehículo (solución salina) administrado unilateralmente, en tres sitios, en el estriado derecho de acuerdo con técnicas estereotáxicas. ATLX-1282 y el control de isotipo (ATL5338) se administraron mediante IP a un volumen de dosis de 5 ml/kg, una vez a la semana (QW) durante 4 semanas. El día 26 del

estudio, las ratas fueron sometidas a una evaluación del comportamiento mediante una prueba del cilindro (evaluación del uso espontáneo de las patas delanteras). La cantidad de veces que cada pata toca la pared del cilindro durante un episodio individual de rearing se determinó a partir de un análisis posterior de video realizado por un observador ciego a los tratamientos administrados y los resultados se grafican como % de toques contralaterales.

10 Ensayo de competencia de Netrina-1

Para determinar si la Netrina-1 podría desplazar a los anticuerpos derivados de fagos, el antígeno humano recombinante UNC5C (R&D Systems; núm. 1005 -UN) se absorbió directamente en placas ELISA y se incubó durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron con PBS. Las placas se bloquearon con 1 % de BSA p/v en solución de bloqueo de PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron a las placas los anticuerpos derivados de fagos (ATL6530-ATL6539) o el anticuerpo de control negativo ATL_0005338 en una curva de dilución que variaba de 1 μ M a 0,1 pM (concentración final; una vez que se añadió la Netrina-1). Las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió Netrina-1 (R&D Systems; núm. 6419-N1) a los pocillos a una concentración final de 75 nM, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. El ensayo se realizó en pocillos replicados para poder detectar tanto

la unión del anticuerpo UNC5C en presencia y ausencia de Netrina-1, además de la unión de Netrina-1 al UNC5C en presencia de anticuerpo. Después, se lavó la placa con PBS/0,1 % de Tween. Se añadió anti-IgG humana con HRP a las
5 placas (Jackson ImmunoResearch;núm. 109-035-097) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente para detectar la unión del anticuerpo al UNC5C. Se añadió anti-His con HRP (Invitrogen núm. MA1-21315-HRP) a los pocillos para detectar la unión de Netrina-1 al UNC5C. Las placas se lavaron con
10 PBS/0,1 % de Tween y solución de TMB (LifeTechnology; núm. 002023) añadida. Las placas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de la solución de parada (0,5 M de ácido sulfúrico). La absorbancia se leyó en un lector de placas Molecular Devices FilterMaxF5 a 450 nm.
15 El análisis se realizó usando un algoritmo de ajuste de curva de ajuste no lineal sobre prisma GraphPad y se calculó EC50.

Inmunohistoquímica

Los cerebros de ratones sin tratamiento previo
20 C57BL/6 se criopreservaron mediante congelación rápida en OCT, se seccionaron usando un criostato en portaobjetos de vidrio y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Los portaobjetos se descongelaron y se secaron al aire antes de la fijación en formalina regulada neutra (10 %) durante 10
25 minutos y se lavaron en PBS-Triton X (0,5 %) durante 30 minutos. Se dibujaron barreras hidrofóbicas alrededor de cada

sección de tejido y se bloquearon con una solución de bloqueo apropiada (1 % de BSA, 10 % de FBS, 5 mM de EDTA, 0,3 M de glicina en 0,5 % de PBS-Tx) con adición de cualquiera de Clusterin (núm. de cat. de R&D Systems 2937-HS-050), Netrina-4 (núm. de cat. de R&D Systems 1254-N4-025/CF) o Netrina-1 (núm. de cat. de R&D Systems 6419-N1-025/CF) [10 nM] durante 1 hora. Se eliminó la solución de bloqueo y se añadieron los anticuerpos primarios en el mismo regulador de bloqueo (ATLX-1282/ATL_5262 [10 ug/ml]) durante la noche a 4 grados. Los portaobjetos se lavaron 3 veces con PBS-TX (0,5 %) 5 minutos cada uno, seguido de la adición de anticuerpo secundario anti-IgG humana DyLight® 594 (núm. de cat. de Abcam ab97005) [2,5 µg/ml] y DAPI [0,1 µg/ml] (núm. de cat. de Thermo Scientific 62248) en el regulador respectivo durante 90 minutos a temperatura ambiente, se lavaron y se montaron con cubreobjetos usando medio de montaje antidecoloración VectaShield (núm. de cat. de Vector Labs H-1200-10). Las imágenes de los portaobjetos se adquirieron usando Molecular Devices PICO y el análisis se realizó usando FIJI para establecer el umbral y medir las imágenes, se realizaron pruebas t de GraphPad para los valores de significación.

Citometría de flujo

Las secuencias de nucleótidos que codifican UNC5C canónico (sec. con núm. de ident.: 99) y la variante UNC5C T835M mutada (sec. con núm. de ident.: 110) se clonaron en

el vector de transferencia lentiviral pCDH-EF1 α -MCS-(PGK-GFP-T2A-Puro) (System Biosciences; núm. CD813A -1) y se confirmaron con secuenciación de Sanger. Las partículas lentivirales se produjeron en la línea celular 293T (ATCC; 5 núm. CRL -3216) usando el reactivo de transfección TransIT-VirusGEN (Mirus; núm. MIR 6700) y kit de empaquetado de lentivector pPACKH1 VIH (System Biosciences; # LV500A-1). Se generaron líneas celulares estables por transducción de la línea celular HEK-293 (ECACC; núm. CRL-1573) con 10 partículas lentivirales y posterior selección de células transducidas exitosamente con puromicina (Gibco™; núm. A1113803) a 1 μ g/ml. Se monitoreó la expresión de GFP en las líneas celulares sobreexpresantes y se cultivaron en presencia de antibiótico de selección.

15 Para la detección de antígenos de superficie, se recolectaron células HEK-293, así como líneas celulares que expresan UNC5C, UNC5C T835M mutado y control de vector vacío (EV, por sus siglas en inglés) usando regulador de disociación no enzimática (CORNING; núm. de cat. 25-056-C1). 20 A continuación, las células se etiquetaron con colorante de viabilidad eF780 (Invitrogen; núm. 65-0865), se lavaron con regulador FACS (DPBS, Gibco; núm. 14190-169, 2 % de FBS, LSG; núm. S-001A-USDA) y se incubaron con los anticuerpos a 100 μ g/ml (0,69 nM), por triplicado, durante 1 h a 4 °C. 25 Después, las células se lavaron dos veces con el regulador FACS y se incubaron con el anticuerpo APC anti-IgG de

detección secundaria (clon IS11-3B2.2.3, Miltenyi; núm. 130-119-772) durante 30 minutos a 4 °C. Entonces, las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en regulador FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo NovoCyte Penteon (Agilent). La compensación se realizó automáticamente usando el software NovoExpress (Agilent) y muestras etiquetadas con fluorocromos individuales. Los parámetros de detección para cada fluorocromo se exponen en la Tabla 3 a continuación. El análisis de datos se realizó usando el software FlowJo (BD).

10

Fluorocromo	Canal de detección	Excitación	Detección
GFP	B525	488	525/45
APC	R667	637	667/30
eF780	R780	637	780/60

Tabla 3. Parámetros de detección de citometría de flujo

Se midió el porcentaje de células positivas para APC (células IgG⁺), así como la intensidad media de fluorescencia (MFI) de IgG-APC en la población seleccionada mediante compuerta para células singulares y viables. La línea celular HEK-293 se usó como control negativo para la compuerta de APC (IgG⁺) y la señal de fondo se restó de los resultados.

20

Análisis Retrogenix

Esto fue realizado por Charles River (Reino Unido) usando su tecnología patentada Retrogenix Cell

Microarray (ver www.criver.com/products-services/discovery-services/screening-and-profiling-assays/retrogenix-cell-microarray-technology).

5 Cristalografía de rayos X

El UNC5C humano recombinante se produjo en ExpiHEK293 mediante transfección transitoria de un constructo correspondiente a los dominios Ig 1 y 2 y se purificó mediante una etiqueta de hexahistidina C-terminal (sec. con núm. de ident.: 111). El fragmento Fab de ATL_5262 se produjo mediante transfección transitoria de ExpiCHO y se purificó mediante el dominio C_H1. Ambos componentes se purificaron mediante SEC, se mezclaron para formar el complejo y se cribaron para su cristalización usando cribas de cristalización comerciales. Los datos de difracción de rayos X se recolectaron de cristales cultivados en 22 % de PEG Smear Broad, 0,1 M de Bicine pH 9,3 (entre muchas otras formulaciones que tenían una composición y un pH similares). Los datos se autoprocesaron con Xia2/Dials y se usaron para el reemplazo molecular con el programa Phaser usando un monómero “receptor de netrina UNC5C” truncado (modelo AlphaFold de UniProt ID D6RE16) y un heterodímero Fab (PDB ID 6CNR) como modelos de búsqueda. Los datos originales del autoprocesamiento se reindexaron a P6522 (grupo espacial del cristal de proteína) y el modelo pasó por varias rondas de reconstrucción de modelo interactivo

con el programa Coot y refinamiento con Refmac, y finalmente construcción de solvente manual y automática con ARP/wARP, para producir el modelo final. Las estadísticas de recopilación y refinamiento de datos se presentan en la

5 **Tabla 4.** El modelo contiene una molécula de cada una de las cadenas pesada y ligera de Fab y una molécula de UNC5C en la unidad asimétrica. La unidad asimétrica es el área dentro de la red cristalina que contiene las moléculas que se repiten a lo largo del cristal. El hallazgo de sólo una

10 copia de cada Fab y antígeno, en combinación con el análisis de cómo las unidades repetidas interactúan entre sí, muestra que no hay otras interacciones biológicamente relevantes, p. ej., la dimerización de la diana.

ATL_5262 Fab – UNC5C Ig1-2	
Longitud de onda (Å)	0,9537
Rango de resolución (Å)	63,51 – 2,27 (2,351 – 2,27)
Grupo espacial	P 65 2 2
Celda unitaria	83,9251 Å, 83,9251 Å, 381,065 Å, 90°, 90°, 120°
Reflexiones totales	1491857 (142455)
Reflexiones únicas	38062 (3670)
Multiplicidad	39,2 (38,8)
Integridad (%)	99,94 (99,67)
Media I/sigma(I)	16,60 (0,37)
Factor B de Wilson	71,71
Fusión R	0,1394 (5,711)
Media R	0,1413 (5,786)
R-pim	0,02248 (0,9228)
CC1/2 1	-0,373
CC* 1	-0,737
Reflexiones usadas en el refinamiento	38042 (3658)

Reflejos usados para Rlibre	1924 (201)
Rtrabajo	0,2694 (0,4369)
R-libre	0,3332 (0,4530)
CC (trabajo)	0,928 (0,288)
CC (libre)	0,909 (0,273)
Número de átomos diferentes a hidrógeno	4821
Macromoléculas	4812
Ligandos	0
Solvente	9
Residuos proteicos	622
RMS (enlaces)	0,008
RMS (ángulos)	1,68
Ramachandran favorecido (%)	87,3
Ramachandran permitido (%)	8,96
Ramachandran atípico (%)	3,75
Rotámeros atípicos (%)	10,36
Clashscore	15,26
Factor B promedio	82,2
Macromoléculas	82,26
Solvente	52,57

Tabla 4. Estadísticas de recolección y refinamiento de datos. Las estadísticas de la capa de mayor resolución se muestran entre paréntesis.

5 Presentación de fagos

Se generó una genoteca de fagos que presentan moléculas scFv en el fago M13, clonando el repertorio de regiones variables de cadena pesada (VH) de los sujetos SU_0000656 y SU_0000697 en una subgenoteca de vectores fagómidos con secuencias de región variable de cadena ligera (VL) de donantes sanos. Se generó una genoteca de presentación de fagos de 1.3e8 clones.

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- Hiperfago (1.5e12 cfu/ml) de Progen, número de catálogo de Alemania RHYPE, K07deltapIII (usado en la presentación de fagos y ELISA de fagos);
- 5 - Fagos ayudantes (1e11 cfu/ml) de Invitrogen, número de catálogo de los EE. UU. 18311-019 (usado en la presentación de fagos y ELISA de fagos);
- 10 - Antígeno UNC5C_HUMAN (sec. con núm. de ident.: 194) producido internamente (número interno UNC5C_HUMAN_008 (Alchemab) res41-380 Lote núm. 004) (usado en la presentación de fagos y ELISA de fagos)
- 15 - UNC5C_human de R&D Systems, número de catálogo de los EE. UU. 1005-UN-050 (usado en la presentación de fagos)

ELISA de fagos en scFv derivado de la presentación de fagos

Los fagos se prepararon mediante cultivo de cada
 20 clon TG1 portador de fagémidos a partir de una reserva de glicerol en 100 µl de 2TYAG (medio 2TY suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 2 % de glucosa) a 37 °C con aireación a densidad óptica OD600=0,6 seguido de rescate con auxiliar o hiperfago añadido a MOI 10 (Invitrogen,
 25 cat.: 18311-019 y Progen, cat.: PRHYPE, K07deltapIII, respectivamente) durante 1 hora y cambio de medio a 2TYAK

(medio 2TY suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 50 mg/ml de kanamicina). Después, los cultivos se incubaron durante la noche a 25 °C con buena aireación y al día siguiente los fagos se separaron de las bacterias mediante centrifugación durante 10 minutos a 3200 rpm. El sobrenadante que contenía fagos se transfirió a una nueva placa y se bloqueó con leche al 3 % p/v en PBS.

El antígeno humano recombinante UNC5C (interno, UNC5C_HUMAN_008 (Alchemab) res41-380 núm. de lote: 004) o el control negativo de lisozima (MP Biomedicals núm. 195303) se absorbieron directamente en la placa ELISA a 3 µg/ml (50 µl por pocillo) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Cada placa recubierta con antígenos se lavó con PBS y se bloqueó con 200 µl/pocillo de solución de bloqueo (3 % de leche p/v en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó la solución de bloqueo y se aplicaron a las placas las muestras de fagos bloqueados que se iban a evaluar. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada placa se lavó con PBS/0,1 % de Tween y se incubó con anti-M13 con HRP (Sino Biological, núm. 11973-MM05T-H) durante 1 hora a temperatura ambiente para detectar la unión del fago. Las placas se lavaron con PBS/0,1 % de Tween y solución TMB (Life Technology; núm. 002023) añadida. Las placas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de la solución de

parada (0,5 M de ácido sulfúrico). La absorbancia se leyó en un lector de placas Molecular Devices FilterMaxF5 a 450 nm.

Cribado de la unión de IgG al UNC5C

5 Para determinar la unión de los anticuerpos IgG al UNC5C, se absorbieron directamente UNC5C_Fc (R&D Systems núm. 1005-UN) o producción interna de células HEK293F con etiqueta His N-terminal o lisozima de control negativo (MP Biomedicals núm. 195303) en una placa ELISA a 1 µg/ml y se incubaron
10 durante la noche a 4 °C. La placa se lavó con PBS. Las placas se bloquearon con 1 % de BSA p/v en solución de bloqueo de PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se retiró la solución de bloqueo y los anticuerpos a evaluar se diluyeron en series de dilución (2 µM a 0,4 pM) en solución
15 de bloqueo (1 % de BSA p/v en PBS) y se aplicaron a la placa. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con PBS/0,1 % de Tween. Se añadió anti-IgG humana con HRP (Jackson ImmunoResearch; núm. 109 - 035-097) a la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura
20 ambiente para detectar la unión del anticuerpo. La placa se lavó con PBS/0,1 % de Tween y solución de TMB (Life Technology; núm. 002023) añadida. Las placas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de la solución de parada (0,5 M de ácido sulfúrico). La
25 absorbancia se leyó en un lector de placas Molecular Devices FilterMaxF5 a 450 nm. El análisis se realizó usando un

algoritmo de ajuste de curva de ajuste no lineal sobre prisma GraphPad y se calculó EC50.

Ejemplo 1 – Análisis de convergencia

5 Los grupos de secuencias convergentes derivados del repertorio de anticuerpos de grupos resilientes de individuos se pueden usar para identificar secuencias de anticuerpos específicas de la enfermedad. Los presentes inventores buscaron identificar anticuerpos protectores
10 candidatos de individuos resilientes a la demencia frontotemporal (FTD) de una cohorte de pacientes con FTD (iniciativa genética de FTD (GENFI, por sus siglas en inglés), www.genfi.org/). La FTD comprende varios tipos de demencia que afectan los lóbulos frontales y temporales
15 del cerebro, y los principales factores de riesgo genético son las mutaciones GRN y C9orf72.

 La resiliencia a la FTD se definió como individuos que no desarrollaron la enfermedad a pesar de estar dentro del 33 % superior de la edad acumulada de
20 aparición de la demencia frontotemporal y la presencia de mutaciones GRN o C9orf72. De la cohorte total de más de 1000 individuos, se seleccionaron los 22 individuos más resilientes. La secuenciación de los repertorios de anticuerpos de estos pacientes resilientes reveló una
25 secuencia variable de cadena pesada (VH) convergente entre tres individuos altamente resilientes (ver la Figura 1

para ver el flujo de trabajo usado para identificar secuencias VH convergentes del conjunto de datos FTD). La probabilidad de que los tres individuos produzcan este anticuerpo por casualidad es extremadamente baja. Es probable que esta secuencia particular haya sido altamente seleccionada y, por lo tanto, ventajosa para el individuo.

Posteriormente, la secuencia VH se emparejó con una VL usando un modelo basado en transformador que comprende un modelo codificador-decodificador entrenado en un corpus de secuencias VH-VL emparejadas. En WO2022/223451 se proporcionan más detalles sobre cómo se puede entrenar y usar un modelo de este tipo. El modelo entrenado toma una secuencia VH como entrada y genera una única secuencia VL complementaria como salida.

El anticuerpo resultante, ATL_5262 (ATL_0005262), se incluyó en una matriz proteómica para la deconvolución de la diana, identificando al receptor de netrina UNC5C como su diana (datos no mostrados). La unión de ATL_5262 al UNC5C se confirmó mediante ELISA (**Figura 2**).

Curiosamente, se identificaron posteriormente anticuerpos UNC5C en repertorios derivados de sujetos resilientes a la neurodegeneración (**Figura 3**). En particular, la secuencia de cadena pesada de ATL_5262 se usó como sonda para buscar secuencias similares en una base de datos de repertorio no publicada derivada de la neurodegeneración. Se encontraron secuencias con alta

homología en un sujeto con enfermedad de Alzheimer resiliente (individuo que muestra una progresión cognitiva lenta); un sujeto con resiliencia para la enfermedad de Parkinson (trastorno de conducta del sueño REM prodrómico (RBD) pero sin diagnóstico de Parkinson); tres sujetos con resiliencia para FTD (portadores de mutaciones de alto riesgo y edad avanzada pero sin progresión a FTD); y centenarios resilientes sin síntomas de neurodegeneración (**Figura 3**). También se encontraron secuencias en controles cognitivamente sanos (predominantemente en individuos mayores de 60 años). Cabe destacar que existe una ausencia de anticuerpos UNC5C en los llamados “progresores” de estas cohortes, con excepción de SU_0001278, quien tiene un diagnóstico de enfermedad de Parkinson y deterioro cognitivo leve. El sujeto con PD SU_0001278 está “Sin clasificar”, ya que inicialmente se lo incluyó en la cohorte como un control sano, pero posteriormente se lo desclasificó debido a que se sospecha que tiene un trastorno de conducta del sueño REM. Al no tener diagnóstico de PD, son “potencialmente resilientes”. Todas las secuencias identificadas, denominadas en la presente “homólogos de ATL_5262”, tienen el mismo gen V y J que ATL5262 VH y como máximo 2 errores de coincidencia AA a lo largo de la región de unión. La **Figura 8** muestra una alineación de secuencia VH de secuencias homólogas

ATL_5262 representativas ATL_6187 y ATL_6191 (sec. con
núm. de ident.: 112-113). Las secuencias VH
representativas de los homólogos ATL_5262 se emparejaron
posteriormente con la VL de ATL_5262 (sec. con núm. de
5 ident.: 9) y se produjeron como anticuerpos IgG1 Fc NULL.
La VH de estos anticuerpos tenía al menos 80 % de secuencia
identificable con la secuencia de la VH de ATL_5262 (en
particular: 6187: 84,87 %, 6191:89,92 % - como referencia,
el anticuerpo 6178 derivado 5262 tiene una identidad de
10 secuencia VH de 94,96 % con la VH de ATL_5262, todo
determinado usando Clustal). Los anticuerpos 6187 y 6191
tenían ambos EC50 para unirse a EC50 por debajo de 10^{-7}
(determinado por ELISA). Estos anticuerpos tienen 0 o 1
mutación en la CDR3 de VH en comparación con ATL_5262 (como
15 máximo 1 mutación en la posición 117 en la numeración IMGT,
Y117S) y hasta 3 mutaciones en cada una de las CDR2 y CDR1
de VH en comparación con ATL_5262. Tanto ATL_6178 como
ATL_6191 tenían una región variable mutada y una región
constante IGHG1, lo que indica que se produjo una
20 recombinación de cambio de clase y una maduración de la
afinidad a través de una hipermutación somática y, por lo
tanto, es muy probable que haya existido una respuesta
inmunitaria inducida por el centro germinal al antígeno
(ver la **Tabla 5**). Es probable que estas secuencias de
25 cambio de clase altamente mutadas provengan de células B

de memoria, que típicamente son más específicas del antígeno que una célula B sin tratamiento previo.

El hecho de que se pudieran encontrar anticuerpos UNC5C en individuos resilientes en estas cohortes resalta la relevancia de UNC5C como diana terapéutica en diversas condiciones neurodegenerativas.

Los homólogos identificados se probaron posteriormente para determinar su unión al UNC5C mediante ELISA y los resultados se muestran en la **Tabla 14**.

10

Anticuerpo ID	Sujeto	Estado de la enfermedad	Sexo (edad)	Funciones de secuencia	Errores de coincidencia de AA (vs. ATL5262 VH completo)
ATL6187 (*)	SU_0000448	Control cognitivamente saludable	Hembra (62)	Altamente mutada y clase IGHG1 conmutada	18
ATL6191 (*)	SU_0001278	PD-sin clasificar	Macho (63)	Mutada y clase IGHG1 conmutada	12

Tabla 5. Características de los homólogos ATL 5262.

Altamente mutada: >20 mutaciones (indicativas de una respuesta a la exposición al antígeno). (*) indican anticuerpos con un perfil de unión a ELISA similar al

15 ATL5262.

Ejemplo 2 - Competencia con Netrina 1

Para determinar si ATL_5262 compite por el mismo sitio de unión que el ligando UNC5C, Netrina 1, se realizó un ensayo de competencia.

Brevemente, las placas ELISA se recubrieron con 45 nM de UNC5C y se preincubaron con 3 μ M de Netrina 1 durante 30 minutos antes de añadir 27 nM de ATL_5262, o un anticuerpo antifuoresceína de control negativo denominado "ATL_5338". La **Figura 4A** muestra que la Netrina 1 podría detectarse en pocillos que contienen UNC5C solo, UNC5C y ATL5262, y UNC5C y ATL_5338, lo que indica que la Netrina 1 inhibe la unión de ATL_5262 al UNC5C. La **Figura 4B** muestra que ATL_5262 solo se pudo detectar en pocillos no preincubados con Netrina 1, lo que confirma que ATL_5262 se une al UNC5C y esta unión es inhibida por Netrina 1. La **Figura 4B** muestra además que el anticuerpo de control ATL_5338 no se une al UNC5C.

Para determinar si la Netrina 1 inhibe la unión de ATL_5262 al UNC5C de manera dependiente de la concentración, se realizó una serie de dilución de 12 puntos de Netrina 1, a partir de 3 μ M, y se evaluó la unión de ATL_5262 al UNC5C usando ELISA (**Figura 5**). La **Figura 5** muestra que Netrina 1 inhibe la unión de ATL_5262 al UNC5C de manera dependiente de la concentración.

Para probar si la Netrina 1 es capaz de competir con ATL_5262 ya unido al UNC5C, las placas ELISA se

recubrieron con 45 nM de UNC5C y se preincubaron con una serie de dilución de 12 puntos de ATL_5262, comenzando a 666 nM durante 30 minutos antes de añadir 75 nM de Netrina 1 (**Figura 6**). La **Figura 6** muestra que la Netrina 1 puede superar la unión de ATL_5262 como lo indica la “curva ATL_0005262 +Netrina 1” que se desplaza hacia la derecha en comparación con “ATL_0005262 sola”, es decir, solo a altas concentraciones de ATL_5262, ATL_5262 puede superar parcialmente a la Netrina 1. Similarmente, sólo a altas concentraciones de ATL_5262 se detectó una pequeña disminución en la señal de Netrina. Como era de esperar, no se observó señal de unión para pocillos incubados con UNC5C y anticuerpo de control ATL_5338.

En conjunto, estos datos muestran que la Netrina 1 inhibe la unión de ATL_5262 al UNC5C de manera dependiente de la concentración, lo que indica que ATL_5262 compite por el mismo sitio de unión en UNC5C que la Netrina 1. Por lo tanto, ATL_5262 podría actuar como un imitador de Netrina 1. Para el mejor conocimiento de los inventores, los anticuerpos descritos en la presente son los primeros anticuerpos que se unen al UNC5C y compiten con la unión de la netrina 1.

Ejemplo 3 – Reactividad cruzada murina

La capacidad de ATL_5262 para unirse tanto al UNC5C recombinante murino como humano se probó usando ELISA (**Figura 7**).

El UNC5C humano y murino tienen 97 % de homología, y ATL_5262 puede unirse tanto a rhUNC5C (**Figura 7A**) como a rmUNC5C (**Figura 7B**). El anticuerpo de control ATL_5338 muestra una unión insignificante a rhUNC5C (**Figura 7A**) y rmUNC5C (**Figura 7B**). ATL_5262 no se une a la proteína lisozima irrelevante (**Figura 7C**), lo que indica que el anticuerpo no exhibe unión inespecífica.

En conclusión, ATL_5262 se une al UNC5C recombinante humano y de ratón.

10 Ejemplo 4 - Unión a otros receptores de netrina y proteínas relacionadas

Posteriormente, los inventores trataron de investigar la selectividad de ATL_5262 para UNC5C. Para identificar otras posibles dianas de unión de anticuerpos, se realizó una búsqueda BLAST de secuencias de proteínas humanas con >50- % de identidad de secuencia usando la secuencia de referencia UNC5C (código de acceso 095185) en la base de datos UniProtKB (www.uniprot.org/). Esto devolvió las proteínas relacionadas UNC5A, UNC5B, UNC5D. Además, para tener en cuenta la posibilidad de mimetismo estructural o funcional de la netrina, se consideraron los receptores de netrina humanos neogenina, DCC y DSCAM como posibles compañeros de unión.

25 La unión de ATL_5262 y ATL_6178 (una variante de ATL_5262, ver el Ejemplo 6) a otros miembros de la familia

de receptores de netrina y proteínas relacionadas se probó usando análisis de interferometría de biocapa (**Figura 28**).

La **Figura 28** muestra que ATL_5262 y ATL6178 se unen al UNC5C pero no a ningún otro receptor de Netrina o proteínas relacionadas en este ensayo (ectodominios UNC5A, B, D, DCC y neogenina-1). No se observó evidencia de unión a ningún antígeno que no fuera UNC5C por parte de ninguno de los anticuerpos a una concentración de hasta 100 nM, lo que indica selectividad de estos ATL_5262 y ATL_6178 para UNC5C.

Para confirmar aún más la selectividad de ATL_6178 se analizó en un ensayo de unión contra células HEK293 fijas que expresan 6105 proteínas individuales de membrana plasmática humana de longitud completa y proteínas humanas secretadas ancladas a la superficie celular, así como otros 400 heterodímeros humanos, seguidos de una serie de cribados confirmatorios, usando la plataforma Retrogenix con los operadores cegados a la diana del anticuerpo. Otros receptores de Netrina-1 que incluyen UNC5A, UNC5B y UNC5D, NEO1, DCC y DSCAM estaban en el panel de cribado y no mostraron unión a ATL_6178. El UNC5C fue la única diana confirmada para ATL_6178.

Estos datos demuestran la especificidad de ATL_5262 y ATL_6178 para UNC5C, mostrando que no se unen a otros receptores de netrina o proteínas relacionadas.

Ejemplo 5 - Estudio de estabilidad

Para asegurar que ATL_5262 sea estable y, por lo tanto, adecuado para una mayor optimización, se llevó a cabo un estudio de estabilidad como se muestra en la **Figura 9**.

ATL_5262 se probó en un ensayo de desplazamiento térmico tanto a 1 como a 5 mg/ml. Los resultados de esto se muestran en la Tabla 6, y en la **Figura 10**. Esto demuestra que T_{m1} y T_{m2} estaban dentro de un rango normal para los anticuerpos monoclonales (mAb) y Tagg ocurrió antes de Tonset, lo que indica que la agregación es inducida por el desplegamiento con mayor fuerza que por la interacción proteína-proteína o proteína-regulador. T_{m1} está después de T_{agg}, lo que indica que la proteína comienza a agregarse en una relación <50 % de proteína desplegada a plegada.

Anticuerpo	Concentración (mg/ml)	T _{inicio} (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	T _{agg} (°C)
ATL_5262	1	56,48	65,583	84,83	62,737
	5	57,7	66,143	88,623	64,343

Tabla 6. T_{inicio}, T_{m1}, T_{m2} y Tagg para ATL 5262 en un ensayo de desplazamiento térmico.

Se usó el enfoque isoeléctrico capilar (cIEF) para analizar la heterogeneidad de carga de ATL_5262 después de 2 semanas (**Figura 11A**) o 4 semanas (**Figure 11B**) en almacenamiento a -80 °C, 4 °C y 40 °C. Mientras que se observó un aumento en las variantes de carga ácida a 40 °C

(49,27 % a las 2 semanas y 53,39 % a las 4 semanas) (Figura 11C, Tabla 4), se observaron cambios mínimos en las especies de carga presentes en todas las demás condiciones (Tabla 7).

Anticuerpo	Punto temporal	Condición	Área pico de especies ácidas (%)	Área pico principal (%)	Área pico de especies básicas (%)
ATL_0005262	2 semanas	- 80 °C	N.A	92,86	7,14
		4 °C	N.A	92,74	7,26
		40 °C	49,27	45,59	5,14
	4 semanas	- 80 °C	N.A	92,53	7,47
		4 °C	N.A	92,26	7,38
		40 °C	53,39	42,22	4,4

5 Tabla 7. Porcentaje calculado de área de especies ácidas; área pico principal; y área de especies básicas.

La agregación de proteínas durante el almacenamiento de anticuerpos debe mantenerse al mínimo, ya que puede provocar reacciones inmunogénicas. Se usó cromatografía con exclusión por tamaño (SEC-HPLC) para evaluar la pureza y la agregación de los anticuerpos en el estudio de estabilidad de 2/4 semanas.

La Figura 12 muestra que no se formaron agregados solubles después de la incubación a -80 °C, 4 °C, 40 °C durante 2 semanas (Figura 12A) o 4 semanas (Figura 12B).

La Tabla 8 respalda aún más la excelente estabilidad de ATL_5262 y muestra niveles bajos de especies de alto peso molecular (HMWS, por sus siglas en inglés) y niveles bajos de especies de bajo peso molecular (LMWS, por sus siglas en inglés), lo que indica que existe una baja

propensión a la agregación y degradación del anticuerpo hasta 40 °C, lo que se ve respaldado además por el alto porcentaje de monómeros en todas las muestras (>95 %).

Anticuerpo	Punto temporal	Condición	% de HMWS	% de monómero	% de LMWS
ATL_5262	Inicial	N/D	1,21	98,79	n.a
	2 semanas	- 80 °C	1,21	98,79	n.a
		4 °C	0,92	99,08	n.a
		40 °C	0,88	99,12	1,19
	4 semanas	- 80 °C	0,44	99,56	n.a
		4 °C	0,46	99,54	n.a
		40 °C	0,49	96,76	2,75

5 Tabla 8. Resultados de SEC-HPLC. HMWS = especie de alto peso molecular; LMWS = especie de bajo peso molecular.

Se usó SDS-PAGE para analizar la pureza de ATL_5262 después del almacenamiento a -80 °C, 4 °C, 40 °C durante dos semanas (**Figura 13A**) o 4 semanas (**Figura 13B**), o después de 3 ciclos FT (**Figura 13B**). Los anticuerpos IgG reducidos típicamente dan lugar a cadenas pesadas glicosiladas de aproximadamente 50 kDa y cadenas ligeras de aproximadamente 25 kDa en SDS-PAGE (como indica “R” en la **Figura 13**) y bandas de 150 kDa para anticuerpos no reducidos (como indica “NR” en la **Figura 13A y B**). Se detectan cambios mínimos en las separaciones del peso molecular de las muestras, tanto para las muestras reducidas como para las no reducidas, siguiendo el transcurso del tiempo de estabilidad de congelación y

descongelación y temperatura. El mAb NIST se usó como control de peso molecular de un mAb IgG1 humano.

Además de ejecutar SDS-PAGE, se usó CE-SDS para analizar el peso molecular y la pureza de las especies siguiendo las muestras de estabilidad del curso de temperatura y tiempo. Las muestras no reducidas muestran una disminución de 3-5 % en especies principales a 40 °C tanto a las 2 semanas (**Figura 14A**) como a las 4 semanas (**Figura 14B**), pero no a otras temperaturas de almacenamiento (**Tabla 9**), en condiciones reductoras se detectaron cambios mínimos mediante el estudio de estabilidad del curso de tiempo de temperatura a las 2 semanas (**Figura 14C**) y a las 4 semanas (**Figura 14D**) (**Tabla 10**).

Anticuerpo	Punto temporal	Condición	% de área pico principal
ATL_5262	2 semanas	- 80 °C	97,55
		4 °C	97,58
		40 °C	94,66
	4 semanas	- 80 °C	97,68
		4 °C	97,68
		40 °C	92,89

15 Tabla 9. Resultados de CE-SDS para ATL 5262 no reducido

Anticuerpo	Punto temporal	Condición	LC	HC	NGHC
ATL_005262	2 semanas	- 80 °C	24,39	74,7	0,74
		4 °C	24,43	74,28	0,93
		40 °C	24,45	71,48	0,92
	4 semanas	- 80 °C	24,54	73,79	0,78
		4 °C	24,26	74,01	1,04
		40 °C	25,34	71,07	0,99

Tabla 10. Resultados de CE-SDS para ATL 5262 reducido

Finalmente, se probó la unión de ATL_5262 a rhUNC5C después de dos semanas (**Figura 15A**) o 4 semanas (**Figura 15B**) a -80 °C, 4 °C, o 40 °C, o después de 3 ciclos de FT (**Figura 15B**) usando ELISA. ATL_5262 mostró una unión consistente al UNC5C bajo todas las condiciones y esto se reflejó en valores de EC50 consistentes (**Tabla 11**), lo que indica que la potencia de unión de ATL_5262 no se ve afectada por los cambios de temperatura o las condiciones de congelación y descongelación.

Anticuerpo	Punto temporal	Condición	EC50 (M)
ATL_5262	2 semanas	- 80 °C	5,06E-08
		4 °C	4,29E-08
		40 °C	4,54E-08
	4 semanas	- 80 °C	1,55E-08
		4 °C	2,1E-08
		40 °C	2,81E-08
	N.A	3xFT	3,35E-08

Tabla 11. Valores EC50 para ATL 5262 dos semanas o 4 semanas después del almacenamiento a las temperaturas indicadas o después de 3 ciclos de FT.

En conclusión, ATL_5262 es estable a -80 °C y 4 °C hasta 4 semanas de prueba, y durante 3 ciclos de congelación y descongelación a -80 °C, y si bien se observaron algunos cambios biofísicos a 40 °C, la prueba ELISA muestra que la

unión al UNC5C no se ve afectada por estos cambios. ATL_5262 es, por lo tanto, estable y adecuado para un mayor desarrollo.

Ejemplo 6 – Variantes de anticuerpos

5 Para identificar anticuerpos de plomo con características óptimas de desarrollo, se generaron variantes de la secuencia VH (sec. con núm. de ident.: 1) y VL (sec. con núm. de ident.: 9) de ATL_5262 y se probó su potencia de unión al UNC5C usando ELISA directo para la
10 unión al UNC5C humano y UNC5C de ratón.

 Para generar variantes de VH, se comparó la secuencia ATL_5262 con la secuencia de la línea germinal de VH y se encontró que tenía cinco sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea
15 germinal. La reversión de las secuencias a la línea germinal generalmente reduce la inmunogenicidad y mejora la expresión y la estabilidad de los anticuerpos. Por lo tanto, una variante de VH probada fue la secuencia marco VH invertida de línea germinal, ATL_6033 (sec. con núm. de
20 ident.: 2). Para identificar si alguna reversión específica a la línea germinal era perjudicial para la expresión de anticuerpos o la actividad de unión, se generaron secuencias del marco VH parcialmente invertidas a la línea germinal con 4 de 5 mutaciones de la línea
25 germinal, es decir, todas las reversiones de la línea germinal menos una posición que permaneció idéntica a la

VH de ATL_5262 (ATL_6034 (sec. con núm. de ident.: 3); ATL_6035 (sec. con núm. de ident.: 4); ATL_6036 (sec. con núm. de ident.: 5); ATL_6037 (sec. con núm. de ident.: 6); ATL_6038 (sec. con núm. de ident.: 7). Además, se generó

5 también una secuencia VH de ATL_5262 con la mutación T82K para eliminar una vulnerabilidad estructural (usando la numeración IMGT) (ATL_6039) (sec. con núm. de ident.: 8), (ver la **Tabla 12**). Todos los anticuerpos se expresaron usando la cadena VL ATL_5262 (sec. con núm. de ident.: 9).

10 Todos los anticuerpos probados fueron variantes de IgG1 L234A/L235A (LALA), es decir, variantes de IgG1 que comprenden sustituciones L234A/L235A que reducen la unión a los receptores Fc de IgG FcγRi, FcγRII y FcγRIII, así como para complementar el componente Clq, reduciendo

15 la toxicidad mediada por Fc (Lund J, et al. 1991).

Anticuerpos (numeración de sec. AA)	EC50 (M)	Numeración IMGT
ATL_0006033 (línea germinal completa)	4,77E-08	
ATL_0006034 (línea germinal - T35)	9,81E-08	línea germinal - T40
ATL_0006035 (línea germinal - R44)	9,74E-08	línea germinal - R49
ATL_0006036 (línea germinal - Q59)	5,38E-09	línea germinal - Q67
ATL_0006037 (línea germinal - I71)	5,51E-08	línea germinal - I80
ATL_0006038 (línea germinal - H77)	4,82E-08	línea germinal - H86
ATL_0006039 (T73K)	1,09E-09	T82K
ATL_0005262	3,48E-09	

Tabla 12. Valores de EC50 para anticuerpos variantes VH probados en ELISA.

Invertir toda la secuencia VH de ATL_5262 a la línea germinal aumenta la EC50 y, por lo tanto, reduce la potencia, más de 10 veces en comparación con ATL_5262 (**Tabla 12 y Figura 16**). Todas las variantes con reversión de la línea germinal Q67Y (IMGT) (ATL_6033; 6034; 6035; 6037; y 6038) muestran una actividad de unión reducida en ELISA (**Figura 16**), reflejada en un valor de EC50 aumentado. Por lo tanto, es deseable mantener la glutamina (Q) en la posición 67 de IMGT para mantener el grado de unión al UNC5C observado para ATL_5262. Los inventores observaron además que la mutación de la posición 82 de IMGT de la VH a una lisina (K) para reducir el riesgo de isomerización de aspartato (T), potencia la unión del anticuerpo resultante (ATL_6039) al UNC5C aproximadamente 3 veces en comparación con ATL_5262 (**Figura 16**). Por lo tanto, estos datos indican que los residuos 67 y 82 de IMGT son importantes para la unión al UNC5C. Estas mutaciones se combinaron posteriormente en las VH de ATL_6177 (sec. con núm. de ident.: 91) y ATL_6178 (sec. con núm. de ident.: 93), y ambas mutaron la posición 82 de IMGT (T82K) y conservaron Q67. Además, ATL_6178 (sec. con núm. de ident.: 93) también elimina una posible característica en la secuencia adicional al mutar la asparagina (N) en la posición 58 IMGT, que es parte de un sitio de desamidación de asparagina previsto en CDR2 (motivo NS), a tirosina (Y) (N58Y). Al combinar mutaciones beneficiosas, se espera que ATL_6177 y ATL_6178

tengan estabilidad y potencia de unión mejoradas en comparación con otras variantes de ATL_5262.

Las variantes de VH probadas muestran perfiles de unión similares para humanos (**Figura 17A**) y murinos UN5C (**Figura 17B**), mientras que muestran una unión mínima a la lisozima a la concentración más alta de anticuerpo usado (**Figura 17C**).

El UN5C existe en forma monomérica en ausencia de su ligando netrina 1, y en forma dimérica cuando se une a la netrina-1. Para probar si ATL_5262 se une tanto al UN5C monomérico como al dimérico, se realizó una ELISA usando rhUN5C dimérico etiquetado con Fc y rhUN5C monomérico etiquetado con His. Se observaron perfiles de unión similares para la unión al rhUN5 dimérico etiquetado con Fc (**Figura 18A**) y rhUN5C monomérico etiquetado con his (**Figura 18B**), y esto se reflejó en valores EC50 similares (**Tabla 13**) indicando que ATL_5262 es capaz de unirse tanto al UN5C monomérico como dimérico.

EC50 (M)	Numeración IGMT	rhUN5C_Fc (n=2)	rhUN5C_His (n=1)
ATL_0006033 (línea germinal completa)		1,90E-07	2,65E-07
ATL_0006034 (línea germinal - T35)	línea germinal - T40	2,10E-07	5,08E-07
ATL_0006035 (línea germinal - R44)	línea germinal - R49	1,28E-07	2,12E-07
ATL_0006036 (línea germinal - Q59)	línea germinal - Q67	1,16E-08	3,70E-08
ATL_0006037 (línea germinal - I71)	línea germinal - I80	8,71E-08	1,48E-07
ATL_0006038 (línea germinal - H77)	línea germinal - H86	1,04E-07	3,02E-07

ATL_0006039 (T73K)	T82K	1,90E-09	9,78E-09
ATL_0005262 parental		5,84E-09	1,40E-08
ATL_0006002-001 (variante VL)		8,178E-09	2,126E-08

Tabla 13. Valores de EC50 para anticuerpos variantes VH probados en ELISA usando UNC5C etiquetado con FC o etiquetado con His.

5 También se generaron y probaron variantes de anticuerpos de ATL_5262 con diferentes cadenas ligeras.

Se obtuvieron otras VL candidatas mediante un proceso de dos etapas. En primer lugar, se sintetizaron computacionalmente 600 VL diferentes para la VH de ATL_5262
10 usando una versión modificada del modelo descrito en W02022/223451, donde los modelos de codificador y decodificador se reemplazaron con un modelo AntiBERTa preentrenado como se describe en Leem et al., 2022. Como segunda etapa, se priorizaron los 600 pares VH-VL
15 diferentes usando un modelo AntiBERTa separado, descrito en GB 2215218.5 presentado el 14 de octubre de 2022. En resumen, el modelo de GB2215218.5 toma un par VH-VL como entrada (natural o sintético) y calcula la probabilidad de que las dos cadenas formen un emparejamiento.

20 Se seleccionaron 10 VL para síntesis basadas en la probabilidad prevista del modelo (seleccionando VL candidatas con alta probabilidad de emparejamiento prevista con la VH de ATL_5262), bajo contenido de característica

de secuencia y diversidad de secuencia. Las variantes de VL probadas incluyeron la VL de ATL_5996 (sec. con núm. de ident.: 10); ATL_5997 (sec. con núm. de ident.: 11); ATL_5998 (sec. con núm. de ident.: 12); ATL_5999 (sec. con
5 núm. de ident.: 13); ATL_6000 (sec. con núm. de ident.: 14); ATL_6001 (sec. con núm. de ident.: 15); ATL_6002 (sec. con núm. de ident.: 16); ATL_6003 (sec. con núm. de ident.: 17); ATL_6004 (sec. con núm. de ident.: 18); ATL_6005 (sec. con núm. de ident.: 19). Todos los anticuerpos de variantes
10 VL anteriores incluyen la VH de ATL_5262.

Las diferentes variantes de cadena ligera se cribaron para su unión a rhUNC5C y rmUNC5C mediante ELISA y se compararon con ATL_5262. Los resultados muestran que ATL_6002 (misma VH que ATL_0005262 pero diferente VL) se
15 une a rhUNC5C de una manera muy similar a ATL_0005252 (**Figura 19A**). También se observaron resultados similares para la unión a rmUNC5C (**Figura 19B**). La variante ATL_6003 demostró una unión reducida (aproximadamente 10 veces) tanto a rhUNC5C como a rmUNC5C.

20 Estos datos demuestran que son posibles otros emparejamientos de VL, por ejemplo usando la VL de ATL_6002, que mantienen la funcionalidad de la VH descrita en la presente. Los datos demuestran además que el emparejamiento VH-VL inicial obtenido (que dio como
25 resultado ATL_5262) ya era muy bueno.

Para medir la potencia de unión de los anticuerpos a la proteína UNC5C, se evaluaron los anticuerpos en un formato ELISA directo para la unión al UNC5C humana. Además, también se analizó una selección de
5 estos anticuerpos para determinar su unión al UNC5C de ratón, cyno y rata en un formato ELISA directo. La lisozima se ejecutó como antígeno de control y no mostró unión discernible a ninguno de los anticuerpos evaluados a una concentración inferior a 1 μ M. El anticuerpo
10 antifluoresceína ATL-5338 se usó como control de isotipo negativo y no mostró unión a ninguno de los antígenos UNC5C evaluados en concentraciones de anticuerpos <1 μ M. Además, algunos de los anticuerpos se evaluaron en un ensayo adicional para evaluar su capacidad de competir con Netrina
15 1 por la unión al UNC5C. Los resultados de estas pruebas se muestran en la **Tabla 14**.

	Anticuerpo	EC50 de UNC5C humano (M) UNC5C (R&D Systems; núm. 1005-UN)	UNC5C de ratón con EC50 (M) (Antígeno interior)	Cyno UNC5C EC50 (M) (Antígeno interior)	ELISA de UNC5C de rata con EC50 (Antígeno interior)	Cambio inducido por netrina 1 en la curva de unión
Cadena ligera alternativa	ATL_0005996	>0,000001	>0,000001	n/d	n/d	n/d
	ATL_0005997	>0,000001	>0,000001	n/d	n/d	n/d
	ATL_0005998	Unión a 0,00000107 pero no se alcanza la parte superior de la curva	Unión a 0,00000107 pero no se alcanza la parte superior de la curva	n/d	n/d	n/d
	ATL_0005999	>0,000001	>0,000001	n/d	n/d	n/d
	ATL_0006000	>0,000001	>0,000001	n/d	n/d	n/d
	ATL_0006001	Unión a 0,00000107 pero no se alcanza la parte superior de la curva	Unión a 0,00000107 pero no se alcanza la parte superior de la curva	n/d	n/d	n/d
	ATL_0006002	2,45E-08	6,537E-08	n/d	n/d	Sí
	ATL_0006003	9,5e-8	3,072E-07	n/d	n/d	n/d
	ATL_0006004	>0,000001	>0,000001	n/d	n/d	n/d
	ATL_0006005	>0,000001	>0,000001	n/d	n/d	n/d
Línea germinal y desarrollo	ATL_0006033	4,77E-08	1,26E-07	n/d	n/d	n/d
	ATL_0006034	9,81E-08	1,94E-07	n/d	n/d	n/d
	ATL_0006035	9,74E-08	1,24E-07	n/d	n/d	n/d
	ATL_0006036	5,38E-09	1,74E-08	n/d	n/d	Sí
	ATL_0006037	5,51E-08	7,99E-08	n/d	n/d	n/d
	ATL_0006038	4,82E-08	1,17E-07	n/d	n/d	n/d
	ATL_0006039	1,09E-09	2,55E-09	Unión a 0,00000000411523 pero no se ha alcanzado la parte inferior de la curva	Unión a 0,00000000411523 pero no se ha alcanzado la parte inferior de la curva	Sí
Combo	ATL_0006177	1,36E-08		n/d		Sí
	ATL_0006178	9,62E-09	5,956E-09	1,578E-08	7,218E-09	Sí
5262 homólogos	ATL_0006187	2,24E-08	n/d	n/d	n/d	n/d
	ATL_0006191	4,52E-09	Unión a 0,00000000411523 pero no se ha alcanzado la parte inferior de la curva	Unión a 0,00000000411523 pero no se ha alcanzado la parte inferior de la curva	Unión a 0,00000000411523 pero no se ha alcanzado la parte inferior de la curva	n/d

Tabla 14. La potencia de unión de los anticuerpos
enumerados al UNC5C humano, de ratón y de cyno y
capacidad para competir con netrina-1.

5 ATL_0005262, ATL_0005998, ATL_0006001,
ATL_0006002, ATL_0006003, ATL_0006033, ATL_0006034,
ATL_0006035, ATL_0006036, ATL_0006037, ATL_0006038,
ATL_0006039, ATL_0006177, ATL_0006178, ATL_0006187,
ATL_0006191 todos demostraron unión al UNC5C humano con
10 diversas potencias (ver la **Tabla 14**). Para ATL_0006001 y
ATL_6039, se observó una señal al menos 3 veces superior
al control lisosomal, pero no se pudo obtener una curva
completa de respuesta a dosis, por lo que no se puede
reportar un EC50. En ambos casos los datos muestran, por
15 lo tanto, que los anticuerpos sí se unen a la diana. En el
caso de ATL_6039 no se pudo obtener un EC50 debido a que
el anticuerpo era muy potente y se necesitaría probar un
rango de concentración más bajo para obtener un EC50. Estos
datos significan que el anticuerpo ciertamente se une,
20 pero no se puede informar el número de potencia.

 ATL_0005262, ATL_0005998, ATL_0006001,
ATL_0006002, ATL_0006003, ATL_0006178, ATL_0006191 mostraron
unión al UNC5C de ratón. Se demostró la unión de ATL_0005262,
ATL_0006178 y ATL_0006191 al UNC5C de cyno. Se probaron
25 ATL_0005262, ATL_0006178 y ATL_0006191 y se demostró su unión
al UNC5C de rata. Además, la Netrina 1 compitió con

ATL_0005262, ATL_0006002, ATL_0006036, ATL_0006039,
ATL_0006177 y ATL_0006178 por la unión al UNC5C humana.

Estos datos demuestran que al menos ATL_0006178
exhibe unión al UNC5C humano, de ratón, de rata y de cyno,
5 y es capaz de competir con netrin-1 por la unión al UNC5C.

Ejemplo 7 - Análisis PK

Se realizó un estudio farmacocinético *in vivo* en
ratones para evaluar los niveles circulantes de ATL_5262
10 y su capacidad de penetración en el SNC en comparación con
el anticuerpo de control, ATL_5338. Los niveles de
anticuerpos se evaluaron mediante ELISA de muestras de
suero recolectadas a las 1, 4, 8, 24, 72 y 144 horas y de
muestras de LCR recolectadas a las 4, 24 y 144 horas
15 después de la administración intraperitoneal. ATL_5262
exhibe una PK lineal en suero (**Figura 20A**) y LCR (**Figura
20B**) con un perfil de aclaramiento que es comparable al
control IgG1 no vinculante, ATL_5338. De manera
importante, el ATL_5262 muestra evidencia de penetración
20 del SNC con una relación de suero:LCR de ~0,1-0,2 %.

Ejemplo 8 - Apoptosis de UNC5C

Se ha demostrado que el tratamiento con amiloide
de SHSY5Y, derivadas de una línea celular de neuroblastoma,
25 induce la muerte celular. Se ha reportado que Netrina 1
reduce esto. Para determinar si ATL6178 (también

denominado en la presente ATLX-1282) y ATL5262 pueden replicar este efecto, se realizó un experimento de rescate, añadiendo los anticuerpos a las células SHSY5Y tratadas con amiloide, seguido de la medición de la producción de caspasa 3/7 como medida de toxicidad amiloide. **La Figura 22** muestra los resultados de este ensayo. ATLX1282 (ATL_6178), ATL5262 y Netrina 1 todos demostraron una capacidad para reducir la señal de caspasa3/7 en respuesta a la citotoxicidad inducida por beta amiloide 1-42.

Se espera que los anticuerpos descritos en la presente sean capaces de mejorar la salud sináptica (tal como, p. ej., plasticidad) actuando como un imitador de netrina-1. Esto se puede probar mediante ensayos *in vitro* que evalúan directamente las medidas de la salud sináptica, que pueden incluir, pero sin limitarse a, parámetros tales como la cantidad de procesos por célula, la longitud del crecimiento de las neuritas y la ramificación (usando, por ejemplo, los métodos proporcionados en Spijkers et al., Sci Rep, 2021), como se esperaría de su perfil de unión.

En conjunto, estos datos muestran que es probable que los anticuerpos UNC5C descritos en la presente muestren efectos terapéuticos en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas como la FTD y la AD, y proporcionan anticuerpos que pueden lograrlo uniéndose al mismo sitio de unión que la Netrina 1.

Ejemplo 12 – Plasticidad sináptica en neuronas dopaminérgicas iPSC humanas

Para investigar el impacto de ATLX-1282 y ATL5262
5 en las proteínas sinápticas, se realizó una serie de experimentos en neuronas dopaminérgicas derivadas de iPSC humanas. Como se muestra en la **Figura 23**, el tratamiento de neuronas dopaminérgicas con ATL6178 produce un aumento notable en la expresión de proteínas sinápticas
10 (específicamente PSD95, sinaptofisina, sinapsina-1, sinaptotagmina-1 y neurofilamento-L), similar a los efectos observados con la Netrina-1.

Estos hallazgos demuestran que ATL6178 potencia la salud sináptica al actuar como un imitador de netrina-1
15 usando ensayos *in vitro* que evalúan directamente medidas de salud sináptica que pueden incluir, pero sin limitarse a, parámetros tales como el número de procesos por célula, la longitud del crecimiento de las neuritas y la ramificación (usando por ejemplo los métodos proporcionados en Spijkers
20 et al., 2021), como se esperaría de su perfil de unión.

Ejemplo 13 – Ensayos de depleción de Netrina-1

Se investigaron los efectos de la depleción de la Netrina-1 en neuronas motoras derivadas de iPSC humanas
25 usando un anticuerpo anti-Netrina-1 para inducir la depleción de Netrina-1. Se descubrió que esto conducía a

niveles reducidos de la proteína del cono de crecimiento axonal GAP-43 (**Figura 24A**), aumento de la muerte de células neuronales (**Figura 24B**) y daño axonal (**Figura 24C**). Las cifras muestran que ATLX-1282 y ATL-5262 contrarrestan efectivamente estos efectos (**Figuras 24A-C**).

Estos hallazgos indican que ATLX-1282 y ATL5262 potencian la salud sináptica al actuar como un imitador de netrina-1.

Ejemplo 14 - Impacto de anticuerpos anti-UNC5C en la función neuronal

La TDP-43 es una proteína ribonuclear altamente conservada que se acumula como inclusiones ubiquitinadas tanto en pacientes con ELA como con DFT. Se ha informado que las neuronas motoras derivadas de iPSC que portan la mutación TDP43 Q331K relevante para ELA muestran disfunción sináptica cuando se evalúan mediante una matriz de electrodos múltiples (Smith, Alec S T et al., 2021). El cocultivo de tales neuronas con iCell Astrocytes proporciona un modelo de cocultivo sofisticado que permite una comprensión más completa del comportamiento de la red neuronal y su respuesta a diversos compuestos. Para examinar esto, el sistema de cocultivo de neuronas motoras y astrocitos derivados de iPSC se trató con ATLX-1282 o un control de isotipo (ATL-5338) durante hasta 142 horas y se evaluó la actividad mediante un ensayo multielectrodo (MEA),

que mide el potencial de campo extracelular producido por las neuronas. Las neuronas motoras iCell TDP43 Q331K de ELA manifiestan deficiencias pronunciadas en la actividad general, la viabilidad y la dinámica de disparo en ráfagas en comparación con sus contrapartes de control isogénico, las neuronas motoras iCell. Estas neuronas motoras iCell TDP43 Q331K de ELA también exhiben alteraciones discernibles en la conectividad y la frecuencia media de disparo en comparación con las neuronas motoras iCell isogénicas.

ATLX-1282 atenúa la pérdida de actividad dependiente temporal observada en las neuronas motoras TDP43 Q331K y promueve un incremento en la actividad de disparo en ráfagas (**Figura 25A-B**). La viabilidad es relativamente estable a lo largo del tiempo dentro de las respectivas líneas celulares (**Figura 25C**), lo que sugiere que cualquier cambio en la actividad no es simplemente un resultado de la muerte celular sino un cambio putativo en, y promoción de, la salud neuronal. Cabe destacar que ATLX-1282 desempeña un papel fundamental en la mejora de las conexiones sinápticas, fomentando una mayor sincronía entre las neuronas motoras TDP43 Q331K de ELA, como lo ilustra un mayor índice de sincronía y una mayor frecuencia de disparo de las células TDP43 tratadas con ATLX-1282 en comparación con los controles de isotipo (**Figura 25D**). Estos hallazgos representan una justificación convincente de la eficacia del tratamiento con ATLX-1282 en las neuronas motoras.

Ejemplo 15 - Estudio in vivo con ratones

La haploinsuficiencia de UNC5C o Netrina-1 conduce a una inervación alterada por neuronas dopaminérgicas a la corteza prefrontal medial, y a un contenido alterado de dopamina en la corteza prefrontal medial (mPFC, por sus siglas en inglés). Esto se manifiesta como una respuesta reducida a la anfetamina estimulante (Pokinko et al; 2015). Para determinar si ATLX-1282 podría actuar como un ligando mimético para Netrina 1, se trataron ratones haploinsuficientes de Netrina 1 con ATLX-1282 y se evaluó la respuesta a la anfetamina. Para encontrar la ventana óptima en la que se pudiera observar cualquier respuesta alterada a la anfetamina, se administró anfetamina en diversos días, comenzando el día 8 después del primer tratamiento con ATXL-1282. Como se reporta en la literatura, se observó una respuesta reducida a la anfetamina en ratones haploinsuficientes de Netrina 1 con relación a sus hermanos de camada no transgénicos (silvestres). Esto fue estadísticamente significativo para el día 10 del estudio (segundo tratamiento con anfetamina). Por lo tanto, en este punto de tiempo se probó la capacidad de ATLX-1282 para rescatar el fenotipo haploinsuficiente de Netrina 1.

El día 10, el tratamiento con ATLX-1282 resultó en un aumento estadísticamente significativo de la respuesta a la anfetamina en ratones haploinsuficientes de

Netrina 1, con relación al control de isotipo (ver la **Figura 26**). Estos datos sugieren que ATLX-1282 puede interactuar efectivamente con UNC5C en su entorno natural del SNC y puede reducir el déficit inducido por la haploinsuficiencia de Netrina 1 y que ATLX-1282 puede actuar como un ligando mimético para Netrina 1.

Ejemplo 16 - Estudio in vivo de ratas

La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) es una neurotoxina que se ha demostrado que causa degeneración de neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio. Se ha demostrado que la netrina 1 mediante inyección intracerebroventricular (ICV, por sus siglas en inglés) tiene un efecto neuroprotector contra la degeneración mediada por 6-OHDA (Jasmin et al., 2021).

ATLX-1282 y control de isotipo ATL-5338 se probaron en un estudio de eficacia en ratas tratadas con 6-OHDA para ver si podían replicar este efecto (si ATLX-1282 tiene efectos neuroprotectores similares a la netrina-1 en este modelo). Se usó una prueba de cilindro de pata contralateral para evaluar esto y determinar el grado de pérdida de células dopaminérgicas en las ratas tratadas. Las ratas tratadas con 6-OHDA exhibieron una disminución promedio en el uso de la pata contralateral con relación a los controles tratados con solución salina, lo que indica éxito del tratamiento con 6-OHDA (es decir, demostrando neurodegeneración mediada por 6-

OHDA). Los toques contralaterales medios de las ratas tratadas con ATLX1282 y 6-OHDA tendieron a una mejora frente al control de isotipo y las ratas tratadas con 6-OHDA (ver la **Figura 27**), lo que indica que ATLX-1282 puede tener un efecto neuroprotector en la PD, similar a la Netrina-1.

En conjunto, estos datos muestran que los anticuerpos UNC5C como se describen en la presente muestran efectos terapéuticos en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas tales como PD, FTD y AD y proporcionan anticuerpos que pueden lograr esto al unirse al mismo sitio de unión que la Netrina 1.

Ejemplo 17 - Solubilidad y estabilidad de ATL 6178 (ATLX 1282)

La capacidad de fabricación de ATL_6178 (también referido en la presente como ATXL_1282) se probó después de la exposición a diferentes condiciones de estrés. Tales condiciones incluyeron ciclos de congelación y descongelación, agitación, estabilidad térmica y pH bajo. Se evaluaron muestras estresadas para determinar su apariencia, pureza, agregación, tamaño y cambio en variantes de carga usando MFI, SEC-HPLC, CE-SDS, cIEF y DLS. Las muestras también se concentraron a altas densidades (50 mg/ml, 100 mg/ml y 200 mg/ml) y se analizaron en el tiempo 0 y después de 7 días de incubación a temperatura ambiente. Las

muestras de solubilidad se analizaron para determinar su apariencia, viscosidad y pureza usando SEC-HPLC.

ATL_6178 se expresó a partir de una transfección de grupo estable CHO-K1, después de un lote alimentado de 14 días, el cultivo se cosechó y el anticuerpo monoclonal se purificó usando captura de proteína A y una etapa de cromatografía de intercambio de cationes de segunda etapa seguido de centrifugación usando un corte de 30 kDa e intercambio de regulador en regulador de formulación de 20 mM de histidina HCl, 8 % de sacarosa, 0,04 % de Tween 80, pH 6,0 seguido de filtración estéril.

La solubilidad ATLX-1282 se probó a 50 mg/ml, 100 mg/ml y 200 mg/ml. Las muestras se evaluaron en el tiempo 0 y después de 7 días a 25 °C. Los resultados se muestran en la **Tabla 15** y la **Tabla 16**. La evaluación visual mostró que la proteína está libre de partículas y no existe cambio en apariencia (**Tabla 15**), mientras que el análisis SEC-HPLC no demuestra cambio sustancial en la forma monomérica, pequeños cambios en especies de bajo peso molecular (LMWS) y especies de alto peso molecular (HMWS) presentes después de la concentración e incubación a 25 °C durante 7 días (**Tabla 16**). Esto indica que la molécula es estable a altas concentraciones. La viscosidad alcanza un máximo de 24 cP a 200 mg/ml indicando que la molécula es fabricable.

25

Anticuerpo	Concentración de proteína	Puntos de muestreo	Apariencia	Conc. de proteína	Viscosidad (cP, 20 °C)
				(mg/mL)	
ATL_6178	50 mg/ml	T0	SY, SO, FP	54,2	1,9
		25-7D	SY, SO, FP	57	NT
	100 mg/ml	T0	SY, SO, FP	106,6	3,6
		25-7D	SY, SO, FP	104,6	NT
	200 mg/ml	T0	SY, SO, FP	205,1	24
		25-7D	SY, SO, FP	192,9	NT

Tabla 15. Resultados del análisis de solubilidad para

ATL 6178. D; día, SY; ligeramente amarillo; SO: Líquido

ligeramente opalescente; FP: libre de partículas

visibles; cP: centipoise.

5

Anticuerpo	Concentración de proteína	Puntos de muestreo	Conc. de proteína (mg/mL)	SEC-HPLC		
				Monómeros (%)	HMW (%)	LMW (%)
ATL_6178	50 mg/ml	T0	54,2	98,9	1,1	0
		25-7D	57	98,8	1,1	0
	100 mg/ml	T0	106,6	98,9	1,1	0
		25-7D	104,6	98,4	1,5	0,1
	200 mg/ml	T0	205,1	98,6	1,4	0
		25-7D	192,9	97,6	2,3	0,1

Tabla 16. Resultados de SEC-HPLC para estudio de

solubilidad ATL 6178. HMW: Alto peso molecular; LMW: Bajo

peso molecular.

10 Para evaluar adicionalmente la estabilidad de
ATL_6178, el anticuerpo se sometió a un panel de diferentes
condiciones de estrés, que incluyen temperatura, ciclos de
congelación y descongelación, agitación y pH bajo. El
análisis visual de las muestras antes y después de las
15 condiciones de estrés mostró que las muestras fueron

ligeramente amarillas, ligeramente opalescentes y libres de partículas visibles, sin cambio en apariencia siguiendo condiciones evaluadas con la excepción del estrés térmico a 40 °C durante 4 semanas mostrando un bajo nivel de partículas visibles. En la **Tabla 17** se muestran los resultados de estos estudios de estrés.

Puntos de muestreo		Apariencia	Conc. de proteína	Recuentos de partículas subvisibles (recuentos/ml)		
			(mg/mL)	≥ 2 µm	≥ 10 µm	≥ 25 µm
Tiempo 0		SY, SO, FP	50	985	12	2
Térmico (40 °C)	2 W	SY, SO, FP	51,1	1687	17	0
(40 °C)	4 W	SY, SO, NEFP	49,6	4965	97	14
Congelación y descongelación (-70 °C a TA)	3 C	SY, SO, FP	51,7	1828	14	5
(-70 °C a TA)	5 C	SY, SO, FP	50,4	2858	61	15
Agitación (25 °C, 300 rpm)	1 D	SY, SO, FP	50,3	1347	16	2
(25 °C, 300 rpm)	3 D	SY, SO, FP	50,7	1532	33	2
Bajo pH (25 °C, ~pH 3,5)	6 h	SY, SO, FP	49,1	No evaluado		
(25 °C, ~pH 3,5)	24 h	SY, SO, FP	49,2			

Tabla 17. Análisis visual y recuento de partículas

subvisibles de estudios de estrés ATL 6178. SY:

10 ligeramente amarillo; SO: Líquido ligeramente opalescente; FP: libre de partículas visibles; NEFP: No esencialmente libre de partículas visibles (se observaron más de 3 partículas visibles); W: Semana(s); C: Ciclo(s); D: Día(s); h: hora(s).

15

El análisis de imágenes de microflujo (MFI, por sus siglas en inglés) muestra un aumento en la detección de partículas subvisibles >2-25 μm para la condición de estrés de 40 °C. El tamaño y la distribución de las partículas se analizaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS). El promedio Z no mostró cambios significativos en ninguna muestra en comparación con la muestra no estresada almacenada a -70 °C. El índice de polidispersidad (PDI, por sus siglas en inglés) indica que las muestras estaban monodispersas (**Tabla 18**).

Puntos de muestreo		Apariencia	Conc. de proteína (mg/mL)	DLS (tamaño)	
				Promedio Z (d.nm)	PDI
Tiempo 0		SY, SO, FP	50	6,2	0,15
Térmico (40 °C)	2 W	SY, SO, FP	51,1	6,3	0,14
(40 °C)	4 W	SY, SO, NEFP	49,6	6,6	0,15
Congelación y descongelación (-70 °C a TA)	3 C	SY, SO, FP	51,7	6,3	0,15
(-70 °C a TA)	5 C	SY, SO, FP	50,4	6,3	0,15
Agitación (25 °C, 300 rpm)	1 D	SY, SO, FP	50,3	6,2	0,15
(25 °C, 300 rpm)	3 D	SY, SO, FP	50,7	6,2	0,14
Bajo pH (25 °C, ~pH 3,5)	6 h	SY, SO, FP	49,1	No evaluado	
(25 °C, ~pH 3,5)	24 h	SY, SO, FP	49,2		

Tabla 18. Resultados de DLS de estudios de estrés

ATL 1678. W: Semana(s); C: Ciclo(s); D: Día(s); h:

hora(s); SY: ligeramente amarillo; SO: Líquido ligeramente

15 opalescente; FP: Libre de partículas visibles.

El análisis SEC-HPLC no muestra cambios después de 3 o 5 ciclos de congelación y descongelación o agitación durante 1 o 3 días. Se detectó una pequeña disminución en el pico principal de monómero después de la incubación a 40 °C durante 4 semanas con un aumento en HMWS y LMWS presentes, 0,7 % y 0,5 %, respectivamente. La baja retención de pH a 25 °C a pH3,4 resultó en un aumento de 1,3 % en HMWS (**Tabla 19**).

Puntos de muestreo		SEC-HPLC		
		Monómeros (%)	HMW (%)	LMW (%)
T0		99	1	0
Térmico	2 W	98,3	1,4	0,3
(40 °C)	4 W	97,8	1,7	0,5
Congelación y descongelación	3 C	99	1	0
(-70 °C a TA)	5 C	99	1	0
Agitación	1 D	99	1	0
(25 °C, 300 rpm)	3 D	98,8	1,2	0,1
Bajo pH	6 h	97,7	2,3	0
(25 °C, ~pH 3,5)	24 h	97,9	2	0

10 Tabla 19. Resultados de SEC-HPLC de estudios de estrés

ATLX-1282. HMW: alto peso molecular, LMW; Bajo peso molecular, W: Semana(s), C: Ciclo(s), D: Día(s), h: hora(s).

15 Se analizó la heterogeneidad de carga de ATL_1678 usando cIEF. Se observó una disminución en las principales variantes de carga a 40 °C (-22,6pp a las 2 semanas y 34,3pp a las 4 semanas) con un aumento tanto en especies ácidas como básicas, sin embargo se observaron cambios

mínimos en las especies de carga presentes en todas las demás condiciones (**Tabla 20**).

Puntos de muestreo		iCIEF		
		MP (%)	AP (%)	BP (%)
T0		65,4	32,6	2
Térmico (40 °C)	2 W	42,8	41,8	15,4
	4 W	31,1	54,6	14,3
Congelación y descongelación (-70 °C a TA)	3 C	64,1	34	1,9
	5 C	64,2	33,7	2,1
Agitación (25 °C, 300 rpm)	1 D	64	33,9	2,1
	3 D	63,5	34,7	1,8
Bajo pH (25 °C, ~pH 3,5)	6 h	63,4	33,9	2,7
	24 h	64,6	33,1	2,4

Tabla 20. Resultados de iCIEF de estudios de estrés

- 5 ATL 1678. MP: pico principal; AP: Pico ácido; BP: Pico básico; W: Semana(s); C: Ciclo(s); D: Día(s); h: hora(s).

Se analizaron el peso molecular y la pureza de las especies después de la exposición de las muestras a condiciones de estrés usando CE-SDS. Las muestras incubadas a 40 °C durante 4 semanas demostraron una disminución en la pureza de 3,5pp para las muestras no reducidas y 1pp para las muestras reducidas. Se observaron cambios mínimos para las muestras que experimentaron otras condiciones de estrés (**Tabla 21**).

Puntos de muestreo		Calibrador SDS-NR	Calibrador SDS-R
		Pureza (%)	Pureza (%)
T0		96,5	98,4
Térmico	2 W	94,4	97,9

(40 °C)	4 W	93	97,4
Congelación y descongelación (-70 °C a TA)	3 C	96,6	98,5
	5 C	96,5	98,4
Agitación (25 °C, 300 rpm)	1 D	96,4	98,5
	3 D	96,4	98,5
Bajo pH (25 °C, ~pH 3,5)	6 h	96,4	98,6
	24 h	95,9	98,3

Tabla 21. Resultados de iCIEF de estudios de estrés

ATL 6178. W: Semana(s), C: Ciclo(s), D: Día(s), h: hora(s).

Los datos anteriores muestran que ATL_6178 es altamente estable bajo diversas condiciones de estrés.

Ejemplo 18 - Unión al UNC5C celular

Para evaluar la capacidad de ATL_6178 (también denominado en la presente ATLX-1282) y ATL5262 para unirse al UNC5C en su contexto natural del sistema nervioso central (SNC), se evaluó la unión de anticuerpos a secciones de cerebro de ratón congeladas.

ATLX-1282 (ATL_6178) y ATL_5262 demostraron un patrón de unión similar, y este fue bloqueado por 10 nM de Netrina-1, pero no por proteínas de tamaño similar como clusterina y Netrina-4 (que no se unen al UNC5C), como se muestra en las **Figuras 29A-D**. Esto concuerda con los datos *in vitro* descritos anteriormente que muestran la capacidad de ATLX-1282 y ATL_5262 para unirse al UNC5C selectivamente.

Para verificar la unión de los anticuerpos al UNC5C expresados en la superficie celular, se evaluaron los

anticuerpos en un ensayo de citometría de flujo. La isoforma UNC5C humana canónica (O95185) y la variante UNC5C T835M ligada a AD (VAR_081368) se sobreexpresaron constitutivamente en una línea celular HEK-293 usando un sistema lentiviral.

5 Después, se probó la unión de los anticuerpos mediante citometría de flujo. La línea celular transducida con el vector vacío (EV) y un anticuerpo específico para una diana no relacionada expresada en formato IgG relevante (control ATL) se usaron como controles negativos.

10 ATL5262 y ATLX-1282 mostraron una mayor unión a las células HEK-293 que sobreexpresan UNC5C y a las células HEK-293 que sobreexpresan UNC5C T835M con relación a las células transfectadas con un control de vector vacío (**Figuras 30A y B**).

15 Estos datos demuestran que ATL5262 y ATLX-1282 pueden unirse al UNC5C y la variante UNC5C T835M unirse a AD (VAR_081368) cuando están en un contexto de membrana celular natural. Estos datos muestran que los anticuerpos se unen a la forma asociada a la enfermedad de Alzheimer
20 del UNC5C. Se demostró que los anticuerpos descritos en la presente se unen a la región extracelular del UNC5C y esta mutación afecta a la región intracelular. Por lo tanto, se espera que todos los anticuerpos descritos se unan a la forma relevante para la AD del UNC5C.

Ejemplo 19 - Determinación de la estructura cristalina del fragmento Fab ATL 5262 unido a dominios de Ig UNC5C humanos

Para comprender mejor la unión de ATL_5262 al UNC5C, se obtuvo una estructura cristalina de rayos X para un complejo que contenía un fragmento Fab de ATL_5262 unido a los dominios de inmunoglobulina (Ig) del UNC5C humano. Una vista en boceto del complejo Fab-UNC5C completo se muestra en la **Figura 31A**, y vistas en primer plano de las interacciones específicas entre las proteínas en las **Figuras 31B-E**. En la **Tabla 22** a continuación se expone un sumario de los contactos entre cadenas, con detalles de las interacciones específicas de aminoácidos en la **Tabla 23**.

Interacción entre cadenas	Área de superficie enterrada, Å ²	Enlaces H	Puentes de sal
VH:UNC5C	397,9	5	2
VL:UNC5C	238,5	4	0
VH:VL	1816,9	17	2

15 Tabla 22. ATL 5262 Fab: Sumario de contactos entre cadenas UNC5C

VH	UNC5C	VL
Thr64	Thr89	
Gly63	Gln90	
Thr65	Gln102	
Ser74	Lys103	
Asn66	Val107	Thr114
	Asp108	Thr114
Tyr55, Asn66, Arg108, Met110	Glu109	Ser109, T114

	Arg110	Tyr108, Ser109
	Val111	Tyr38, Ser107, Tyr108
Arg108, Met110	Ile118	
Tyr55, Thr64, Thr65	Arg120	

Tabla 23. Sumario de interacciones entre cadenas dentro de 4,0 Å, que incluye contactos polares e interacciones hidrofóbicas.

5 La **Figura 30F** muestra una alineación de proteínas de los miembros B, A y D de la familia de UNC5 humano con la región del dominio 1 similar a Ig UNC5C humano que interactúa con ATL_5262. Secuencias idénticas resaltadas en rojo. Los aminoácidos de UNC5C implicados en la

10 interacción con ATL_5262 y resumidas en la **Tabla 23** se indican mediante flechas. Estos datos indican que la especificidad de ATL_5262 al UNC5C sobre los otros miembros de la familia UNC5 puede estar impulsada por aminoácidos que son diferentes entre UNC5C y las otras proteínas UNC5.

15 Ejemplo 20 - Anticuerpos adicionales

Se realizaron selecciones de presentación de fagos para descubrir anticuerpos derivados de pacientes adicionales, funcionales y resistentes para UNC5C. Las

20 genotecas de presentación de fagos se generaron a partir de repertorios VH de pacientes que portaban el anticuerpo original ATL_0005262, y un repertorio VL de donantes sanos. Las selecciones de presentación de fagos se realizaron

mediante selección de dos antígenos UNC5C. Se cribaron un subconjunto de anticuerpos enriquecidos mediante ELISA de fagos en el antígeno UNC5C y se eligieron 10 anticuerpos para la conversión de IgG.

- 5 Se cribaron diez IgG derivadas de fagos (ATL_6530 a ATL_6539) para la unión al UNC5C mediante ELISA y los valores de EC50 estimados a partir de las curvas de unión al UNC5C se enumeran en la **Tabla 24** a continuación. Todos los anticuerpos mostraron unión al UNC5C con alta afinidad.
- 10 ATL_6178 también se incluyó como referencia. **La Figura 32** muestra una alineación de las secuencias VH y VL de estos anticuerpos.

Lote de anticuerpos	Antígeno	Tipo de ensayo	Orientación del ensayo	EC50 (M)
Y_0001389-001 (ATL_6530)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005-UN)	ELISA	Antígeno bajado	3,90E-11
Y_0001390-001 (ATL_6531)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005-UN)	ELISA	Antígeno bajado	1,30E-11
Y_0001391-001 (ATL_6532)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005-UN)	ELISA	Antígeno bajado	2,80E-12
Y_0001392-001 (ATL_6533)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005-UN)	ELISA	Antígeno bajado	9,20E-12
Y_0001393-001 (ATL_6534)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005-UN)	ELISA	Antígeno bajado	1,00E-11
Y_0001394-001 (ATL_6535)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005-UN)	ELISA	Antígeno bajado	2,40E-08
Y_0001395-001 (ATL_6536)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005-UN)	ELISA	Antígeno bajado	1,10E-09
Y_0001396-001 (ATL_6537)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005-UN)	ELISA	Antígeno bajado	7,10E-10

Y_0001397-001 (ATL_6538)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005-UN)	ELISA	Antígeno bajado	5,50E-10
Y_0001398-001 (ATL_6539)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005-UN)	ELISA	Antígeno bajado	1,10E-08
Y_0001282-003 (ATL_6178)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005-UN)	ELISA	Antígeno bajado	8,00E-09

Tabla 24. Valores de EC50 de curvas de unión al UNC5C.

A continuación, estos anticuerpos fueron cribados para determinar si eran capaces de competir por la unión al UNC5C con Netrina 1 recombinante. El UNC5C se recubrió en placas ELISA y se preincubó una titulación de cada anticuerpo individualmente con la proteína UNC5C antes de añadir netrina 1 a una concentración establecida. En cada caso se determinó la unión de cada anticuerpo y netrina 1 usando anticuerpos de detección secundarios específicos para cada reactivo. Si la presencia de netrina 1 fue capaz de desplazar la curva de unión del anticuerpo hacia la derecha (es decir, requerir una mayor concentración de anticuerpo para ver un nivel similar de señal para la unión al UNC5C), esto se observó como competencia en el ensayo. Además, si la presencia del anticuerpo fue capaz de reducir la señal de unión a Netrina1 detectada en el ensayo, esto también se observó como competencia (ver la **Tabla 25**). Todos los anticuerpos mostraron competencia con Netrina-1.

	Anticuerpo (Unión al antígeno)	Antígeno diana	Competidor (Antígeno)	Concentración superior Ab (M)	Concent. inferior Ab (M)	Concent. de competidores (M)
1	Y_0001389-001 (ATL_6530)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005- UN)	Netrina 1 (R&D Systems; núm. 6419-N1)	1e-6	1e-13	7,5e-8
2	Y_0001390-001 (ATL_6531)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005- UN)	Netrina 1 (R&D Systems; núm. 6419-N1)	1e-6	1e-13	7,5e-8
3	Y_0001391-001 (ATL_6532)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005- UN)	Netrina 1 (R&D Systems; núm. 6419-N1)	1e-6	1e-13	7,5e-8
4	Y_0001392-001 (ATL_6533)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005- UN)	Netrina 1 (R&D Systems; núm. 6419-N1)	1e-6	1e-13	7,5e-8
5	Y_0001393-001 (ATL_6534)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005- UN)	Netrina 1 (R&D Systems; núm. 6419-N1)	1e-6	1e-13	7,5e-8
6	Y_0001394-001 (ATL_6535)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005- UN)	Netrina 1 (R&D Systems; núm. 6419-N1)	1e-6	1e-13	7,5e-8
7	Y_0001395-001 (ATL_6536)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005- UN)	Netrina 1 (R&D Systems; núm. 6419-N1)	1e-6	1e-13	7,5e-8
8	Y_0001396-001 (ATL_6537)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005- UN)	Netrina 1 (R&D Systems; núm. 6419-N1)	1e-6	1e-13	7,5e-8
9	Y_0001397-001 (ATL_6538)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005- UN)	Netrina 1 (R&D Systems; núm. 6419-N1)	1e-6	1e-13	7,5e-8
10	Y_0001398-001 (ATL_6539)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005- UN)	Netrina 1 (R&D Systems; núm. 6419-N1)	1e-6	1e-13	7,5e-8
11	Y_0001282-003 (ATL_6178)	UNC5C (R&D Systems; núm. 1005- UN)	Netrina 1 (R&D Systems; núm. 6419-N1)	1e-6	1e-13	7,5e-8

Tabla 25. Competencia de anticuerpos con unión a Netrina

1. Ab = anticuerpo, Conc = concentración.

	Anticuerpo (Unión al antígeno)	Hit (competición observada)	Notas
1	Y_0001389-001 (ATL_6530)	Sí	Cambio en el perfil de la curva de unión vs. lo que se observa en ausencia de Netrina 1
2	Y_0001390-001 (ATL_6531)	Sí	Cambio en el perfil de la curva de unión vs. lo que se observa en ausencia de Netrina 1
3	Y_0001391-001 (ATL_6532)	Sí	No hay cambio en el perfil de la curva de unión vs. lo que se observa en ausencia de Netrina 1; La señal de unión a la netrina 1 se reduce, lo que sugiere que ATL6532 es particularmente potente y supera a Netrina 1 para la unión en esta configuración de ensayo.
4	Y_0001392-001 (ATL_6533)	Sí	Cambio en el perfil de la curva de unión vs. lo que se observa en ausencia de Netrina 1
5	Y_0001393-001 (ATL_6534)	Sí	Cambio en el perfil de la curva de unión vs. lo que se observa en ausencia de Netrina 1
6	Y_0001394-001 (ATL_6535)	Sí	Cambio en el perfil de la curva de unión vs. lo que se observa en ausencia de Netrina 1
7	Y_0001395-001 (ATL_6536)	Sí	Cambio en el perfil de la curva de unión vs. lo que se observa en ausencia de Netrina 1
8	Y_0001396-001 (ATL_6537)	Sí	Cambio en el perfil de la curva de unión vs. lo que se observa en ausencia de Netrina 1
9	Y_0001397-001 (ATL_6538)	Sí	Cambio en el perfil de la curva de unión vs. lo que se observa en ausencia de Netrina 1
10	Y_0001398-001 (ATL_6539)	Sí	Cambio en el perfil de la curva de unión vs. lo que se observa en ausencia de Netrina 1
11	Y_0001282-003 (ATL_6178)	Sí	Cambio en el perfil de la curva de unión vs. lo que se observa en ausencia de Netrina 1

Tabla 25 (continuación) Competencia de anticuerpos con unión a Netrina 1.

Este ejemplo identifica, por lo tanto, 5 anticuerpos adicionales que se unen al UNC5C con alta afinidad y son capaces de competir con Netrina-1 por la unión al UNC5C y, por lo tanto, se espera que tengan

propiedades similares a ATL_5262 y AT LX-1282, que incluyen la reducción de la apoptosis mediada por UNC5C, la reducción de la toxicidad beta-amiloide, el aumento de la actividad neuronal, la viabilidad y la frecuencia de ráfagas, y la mejora de la salud sináptica *in vitro* e *in vivo*.

Los datos anteriores muestran que todos estos anticuerpos se unen a un área de UNC5C que se comparte para la unión a Netrina (como es el caso de los otros anticuerpos de unión al UNC5C descritos en la presente, que incluyen ATL_5262 y AT LX-1282). El sitio de unión de Netrina en UNC5C no se conocía previamente con precisión, pero se creía que estaba en algún lugar de los dos primeros dominios de inmunoglobulina de UNC5C. Estos datos proporcionan la información más reciente que sugiere que el sitio de unión está dentro del primer dominio de inmunoglobulina de UNC5C y es probable que se superponga al menos parcialmente con el lugar donde los anticuerpos descritos en la presente se unen al UNC5C.

Juntos, los datos descritos en la presente muestran que los anticuerpos UNC5C como se describen en la presente muestran efectos terapéuticos en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas tales como PD, FTD, AD y ELA y proporciona anticuerpos que pueden lograr esto al unirse al mismo sitio de unión que Netrina 1.

25

Referencias

Todos los documentos citados en la presente se incorporan como referencia en su totalidad.

Ackerman, S L, and B B Knowles. "Cloning and
5 mapping of the UNC5C gene to human chromosome 4q21-q23." Genomics vol. 52,2 (1998): 205-8. doi:10.1006/geno.1998.5425

Bang, Jee et al. "Frontotemporal dementia." Lancet (London, England) vol. 386,10004 (2015): 1672-82. doi:10.1016/S0140-6736(15)00461-4

10 Bang, Jee et al. "Frontotemporal dementia." Lancet (London, England) vol. 386,10004 (2015): 1672-82. doi:10.1016/S0140-6736(15)00461-4

Boyer, Nicholas P, and Stephanie L Gupton. "Revisiting Netrin-1: One Who Guides (Axons)." Frontiers in
15 cellular neuroscience vol. 12 221. 31 Jul. 2018, doi:10.3389/fncel.2018.00221

Burrell, James R et al. "Motor neuron dysfunction in frontotemporal dementia." Brain: a journal of neurology vol. 134,Pt 9 (2011): 2582-94. doi:10.1093/brain/awr195

20 Chen, Guiqin et al. "Netrin-1 receptor UNC5C cleavage by active δ -secretase enhances neurodegeneration, promoting Alzheimer's disease pathologies." Science advances vol. 7,16 eabe4499. 16 Apr. 2021, doi:10.1126/sciadv.abe4499

Chen, Guiqin et al. "UNC5C Receptor Proteolytic
25 Cleavage by Active AEP Promotes Dopaminergic Neuronal

Degeneration in Parkinson's Disease.” Advanced science
(Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany) vol. 9,7 (2022):
e2103396. doi:10.1002/advs.202103396

Cunningham, B C, and J A Wells. “High-resolution
5 epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-
scanning mutagenesis.” Science (New York, N.Y.) vol.
244,4908 (1989): 1081-5. doi:10.1126/science.2471267

Dun, Xin-Peng, and David B Parkinson. “Role of
Netrin-1 Signaling in Nerve Regeneration.” International
10 journal of molecular sciences vol. 18,3 491. 24 Feb. 2017,
doi:10.3390/ijms18030491

Glasgow, Stephen D y col. “Guiding synaptic
plasticity: Novel roles for netrin-1 in synaptic plasticity
and memory formation in the adult brain.” The Journal of
15 physiology vol. 599,2 (2021): 493-505. doi:10.1113/JP278704

Golde, Todd E. “Disease-Modifying Therapies for
Alzheimer's Disease: More Questions than Answers.”
Neurotherapeutics: the journal of the American Society for
Experimental NeuroTherapeutics vol. 19,1 (2022): 209-227.
20 doi:10.1007/s13311-022-01201-2

Hashimoto, Yuichi et al. “An Alzheimer Disease-
linked Rare Mutation Potentiates Netrin Receptor
Uncoordinated-5C-induced Signaling That Merges with Amyloid
 β Precursor Protein Signaling.” The Journal of biological

chemistry vol. 291,23 (2016): 12282-93.
doi:10.1074/jbc.M115.698092

Hardiman, Orla et al. "Amyotrophic lateral sclerosis." Nature reviews. Disease primers vol. 3 17071.
5 5 Oct. 2017, doi:10.1038/nrdp.2017.71

Jasmin, Mélissa et al. "Netrin-1 and its receptor DCC modulate survival and death of dopamine neurons and Parkinson's disease features." The EMBO journal vol. 40,3 (2021): e105537. doi:10.15252/emboj.2020105537

10 Ju, Ting et al. "Decreased Netrin-1 in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Patients." Frontiers in aging neuroscience vol. 13 762649. 16 Feb. 2022, doi:10.3389/fnagi.2021.762649

Knopman, David S y col. "Alzheimer disease." 15 Nature reviews. Disease primers vol. 7,1 33. 13 de mayo. 2021, doi:10.1038/s41572-021-00269-y

Llambi, F et al. "Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC." The EMBO journal vol. 20,11 (2001): 2715-22. doi:10.1093/emboj/20.11.2715

20 Leem, Jinwoo et al. "Deciphering the language of antibodies using self-supervised learning." Patterns (New York, N.Y.) vol. 3,7 100513. 18 de mayo. 2022, doi:10.1016/j.patter.2022.100513

- Leonardo, E D et al. "Vertebrate homologues of C. elegans UNC-5 are candidate netrin receptors." *Nature* vol. 386,6627 (1997): 833-8. doi:10.1038/386833a0
- Lund, J et al. "Human Fc gamma RI and Fc gamma RII interact with distinct but overlapping sites on human IgG." *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* vol. 147,8 (1991): 2657-62
- Li, Quan et al. "The role of UNC5C in Alzheimer's disease." *Annals of translational medicine* vol. 6,10 (2018): 178. doi:10.21037/atm.2018.04.43
- Obien, Marie Engelene J et al. "Revealing neuronal function through microelectrode array recordings." *Frontiers in neuroscience* vol. 8 423. 6 Jan. 2015, doi:10.3389/fnins.2014.00423
- Panza, Francesco et al. "Development of disease-modifying drugs for frontotemporal dementia spectrum disorders." *Nature reviews. Neurology* vol. 16,4 (2020): 213-228. doi:10.1038/s41582-020-0330-x
- Phukan, Julie et al. "Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis." *The Lancet. Neurology* vol. 6,11 (2007): 994-1003. doi:10.1016/S1474-4422(07)70265-X
- Poliak, Sebastian et al. "Synergistic integration of Netrin and ephrin axon guidance signals by spinal motor neurons." *eLife* vol. 4 e10841. 3 Dec. 2015, doi:10.7554/eLife.10841

- Pokinko, Matthew et al. "Resilience to amphetamine in mouse models of netrin-1 haploinsufficiency: role of mesocortical dopamine." *Psychopharmacology* vol. 232,20 (2015): 3719-29. doi:10.1007/s00213-015-4032-9
- 5 Prince, M et al (2014) Dementia UK: Update Second Edition report produced by King's College London and the London School of Economics for the Alzheimer's Society.
- Rajasekharan, Sathyanath, and Timothy E Kennedy. "The netrin protein family." *Genome biology* vol. 10,9
10 (2009): 239. doi:10.1186/gb-2009-10-9-239
- Renaud, Jean-Paul y col. "Cryo-EM in drug discovery: achievements, limitations and prospects." *Nature reviews. Drug discovery* vol. 17,7 (2018): 471-492. doi:10.1038/nrd.2018.77
- 15 Rosso, Sonia M et al. "Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study." *Brain: a journal of neurology* vol. 126,Pt 9 (2003): 2016-22. doi:10.1093/brain/awg204
- 20 Smith, Alec S T et al. "Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived TDP-43 Mutant Neurons Exhibit Consistent Functional Phenotypes Across Multiple Gene Edited Lines Despite Transcriptomic and Splicing Discrepancies." *Frontiers in cell and developmental biology* vol. 9 728707.
25 29 Sep. 2021, doi:10.3389/fcell.2021.728707

Spijkers, Xandor M et al. "A directional 3D neurite outgrowth model for studying motor axon biology and disease." Scientific reports vol. 11,1 2080. 22 Jan. 2021, doi:10.1038/s41598-021-81335-z

- 5 Zamani, Elham et al. "Netrin-1 protects the SH-SY5Y cells against amyloid beta neurotoxicity through NF- κ B/Nrf2 dependent mechanism." Molecular biology reports vol. 47,12 (2020): 9271-9277. doi:10.1007/s11033-020-05996-1