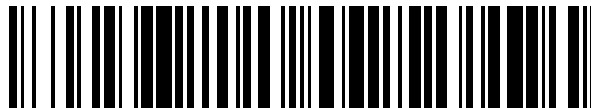


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 804**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010 E 10728555 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015 EP 2445528**

54 Título: **Método para tratar el cáncer con antagonista de DII4 y agente quimioterapéutico**

30 Prioridad:

25.06.2009 US 220465 P
05.02.2010 US 301881 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.01.2016

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

NOGUERA-TROISE, IRENE;
THURSTON, GAVIN y
THIBAUT, ALAIN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 556 804 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para tratar el cáncer con antagonista de Dll4 y agente quimioterapéutico

5 Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 Esta invención se refiere a métodos para tratar cánceres o tumores un antagonista del ligando 4 tipo delta (Dll4), en particular, anticuerpos humanos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a Dll4 humano, en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos, y composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista de Dll4 y un agente quimioterapéutico.

15 Descripción de la técnica relacionada

15 Dll4 es un miembro de la familia Delta de ligandos Notch que muestra expresión altamente selectiva por endotelio vascular (Shutter et al., 2000, Genes Develop. 14:1313-1318). Dll4 es un ligando para receptores Notch, incluyendo Notch 1 y Notch 4. Los antagonistas de Dll4 son útiles para inhibir el crecimiento tumoral en diversos cánceres. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos para Dll4 humano (hDll4) se muestran en las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Se describen anticuerpos específicos para Dll4 humano y tratamiento contra cáncer/tumor usando anticuerpos contra Dll4 en las publicaciones de solicitud de patente internacional WO 2007/143689, WO 2008/042236, y WO 2007/070671.

20 Los agentes quimioterapéuticos se usan ampliamente para el tratamiento de cáncer tanto solos como en combinación con cirugía y/o radioterapia. Las terapias de combinación usando un antagonista de Dll4 y agentes quimioterapéuticos se describen en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos US 2008/0014196 y US 2008/0107648.

30 Breve resumen de la invención

30 En un primer aspecto, la invención presenta un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto un antagonista de Dll4 en combinación con un agente quimioterapéutico, en el que se trata el cáncer. El sujeto a tratar por el método de la invención puede incluir cualquier especie de mamífero, pero preferiblemente seres humanos que padecen cáncer.

35 Las terapias de combinación de la presente invención son particularmente útiles en afecciones o enfermedades asociadas por Dll4 o mediadas por Dll4, que se ven afectadas directa o indirectamente por la modulación de la actividad Dll4. Más específicamente, como ahora se ha demostrado que Dll4 está implicado en el crecimiento y desarrollo de vasos sanguíneos, inhibir o reducir el crecimiento de vasos sanguíneos mediado por Dll4 o la maduración usando antagonistas de Dll4, es un tratamiento eficaz para cáncer/tumor que requiere suficiente suministro sanguíneo para su crecimiento y supervivencia. Además, la combinación de antagonistas de Dll4 con agentes quimioterapéuticos, incluyendo agentes inhibidores del crecimiento y otros agentes citotóxicos, potencia de forma sinérgica sus efectos antineoplásicos/antitumorales. Los cánceres/tumores tratables por los métodos de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, diversas neoplasias sólidas, incluyendo cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer pulmonar, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de hueso, cáncer cutáneo, incluyendo melanoma, sarcoma maligno de tejido blando, incluyendo, aunque sin limitación, sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma, sarcoma adipocítico, sarcoma sinovial, histiocitoma fibroso maligno, hemangioendotelio epitelioide, angiosarcoma, fibrosarcoma, y sarcomas no clasificados, y similares.

40 45 50 En una realización, el antagonista de Dll4 es un anticuerpo contra Dll4 o fragmento del mismo ("Ab Dll4") que se une específicamente a Dll4 con alta afinidad y bloquea la unión de Dll4 a los receptores Notch y/o neutraliza las actividades Dll4. El anticuerpo puede ser policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado, o un anticuerpo completamente humano. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completamente humano o fragmento de anticuerpo monoclonal. El fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo de cadena sencilla, un Fab, o un (Fab')₂.

55 60 65 En otra realización, el Ab Dll4 se une a un epítipo dentro del dominio N-terminal (S27-R172), o el dominio DSL V173-C217), o el dominio DSL-N-terminal (S27-C217), de Dll4 (SEQ ID NO: 2). El Ab Dll4 a usarse en los métodos de la invención es capaz de unirse a Dll4 humano con alta afinidad y su constante de disociación (K_D) es aproximadamente 500 pM o menos, incluyendo aproximadamente 300 pM o menos, e incluyendo aproximadamente 200 pM o menos, medida por resonancia de plasmón superficial. Por ejemplo, el AbDll4 tiene una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende tres CDR de cadena pesada (H-CDR) y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende tres CDR de cadena ligera (L-CDR), donde las tres CDR de cadena pesada comprenden CDR1, CDR2 y CDR3 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y las tres CDR de cadena ligera comprenden CDR1, CDR2 y CDR3 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28. En otra realización,

la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada del Ab DII4 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 22, 24 y 26, respectivamente. En otra realización, la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de Ab DII4 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 30, 32 y 34, respectivamente. En otra realización más, el Ab DII4 comprende secuencias CDR1, CDR" y CDR3 de cadena pesada que comprenden las SEQ ID NO: 22, 24 y 26, respectivamente, y secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que comprenden las SEQ ID NO: 30, 32 y 34, respectivamente. En otra realización más, el Ab DII4 comprende un HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 o 116, o una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 o 118. En otra realización más, el Ab DII4 comprende una combinación HCVR/LCVR de la SEQ ID NO: 20/28 (REGN281) o 116/118 (REGN421).

En otro aspecto, el Ab DII4 comprende una combinación CDR1/CDR2/CDR3 de cadena pesada y una combinación CDR1/CDR2/CDR3 de cadena ligera seleccionadas entre: SEQ ID NO: 6/8/10 y SEQ ID NO: 14/16/18, respectivamente; SEQ ID NO: 38/40/42 y SEQ ID NO: 46/48/50, respectivamente; SEQ ID NO: 54/56/58 y SEQ ID NO: 62/64/66, respectivamente; SEQ ID NO: 70/72/74 y SEQ ID NO: 78/80/82, respectivamente; SEQ ID NO: 86/88/90 y SEQ ID NO: 94/96/98, respectivamente; y SEQ ID NO: 102/104/106 y SEQ ID NO: 110/112/114, respectivamente. En otro aspecto, el Ab DII4 comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, 36, 52, 68, 84, o 100, o una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, 44, 60, 76, 92, o 108. En otro aspecto más, el Ab DII4 comprende una combinación de HCVR/LCVR seleccionada entre: SEQ ID NO: 4/12 (REGN279); SEQ ID NO: 36/44 (REGN290); SEQ ID NO: 52/60 (REGN306); SEQ ID NO: 68/76 (REGN309); SEQ ID NO: 84/92 (REGN310); y SEQ ID NO: 100/108 (REGN289).

Las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116 y 118, se muestran como las SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115 y 117, respectivamente.

En una realización, el agente quimioterapéutico es un agente antimetabólico, tal como docetaxel, paclitaxel, y similares; un compuesto quimioterapéutico basado en platino, tal como cisplatino, carboplatino, iproplatino, oxaliplatino, y similares; u otro agente citotóxico convencional, tal como 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, irinotecano, leucovorina, gemcitabina; inhibidores de receptores tirosina quinasa y/o de la angiogénesis, tales como inhibidores de ErbB, inhibidores de RTK clase III, inhibidores de VEGFR, y similares, y el antagonista de DII4 es un anticuerpo contra DII4 o fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente.

En un segundo aspecto, la invención presenta un método para disminuir, reducir, o detener el crecimiento tumoral en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto un antagonista de DII4 en combinación con un agente quimioterapéutico, donde el crecimiento tumoral se disminuye, reduce, o detiene.

En un tercer aspecto, la invención presenta un método para reducir la cantidad de un agente quimioterapéutico o un antagonista de DII4 necesaria para conseguir un efecto terapéutico deseado, en comparación con la administración de cada agente en solitario, que comprende administrar el agente quimioterapéutico con un antagonista de DII4. En un aspecto, la cantidad de un agente quimioterapéutico para conseguir un efecto terapéutico deseado tal como, por ejemplo, detención o reducción del crecimiento tumoral, es al menos un 10% menor, al menos un 20% menor, al menos un 30% menor, al menos un 40% menor, o al menos un 50% menor, en presencia de antagonista de DII4 co-administrado, o viceversa. En general, es deseable que la cantidad de un agente quimioterapéutico o el antagonista de DII4 pueda reducirse en aproximadamente de un 30% a aproximadamente un 50%. Por tanto, los métodos de la invención son particularmente beneficiosos para pacientes con cáncer que tienen baja tolerancia a los efectos secundarios causados por altas dosificaciones necesarias para el tratamiento mediante cualquier agente en solitario, mediante la capacidad de reducir las dosificaciones eficaces.

En un cuarto aspecto, la invención presenta una composición farmacéutica que comprende un antagonista de DII4, un agente quimioterapéutico, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, el antagonista de DII4 es un Ab DII4 o fragmento del mismo que se une específicamente a DII4 con alta afinidad y neutraliza las actividades de DII4, y el agente quimioterapéutico es cualquiera de los descritos en este documento.

En un quinto aspecto, la invención presenta un kit que comprende un recipiente que comprende la composición farmacéutica de la presente invención, y un prospecto con instrucciones para su uso. En una realización, un kit puede comprender un recipiente que comprende en el mismo un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a hDII4, uno o más recipientes adicionales que comprenden en los mismos al menos un agente quimioterapéutico seleccionado entre cualquiera de los descritos en este documento, y un prospecto con instrucciones para su uso.

Otros objetos y ventajas llegarán a ser evidentes a partir de la revisión de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra los efectos de Ab DII4 en combinación con cisplatino sobre el crecimiento de tumores VMcub1 humanos (carcinoma de vejiga) implantados en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) que expresan proteína DII4 humanizada (ratones SCID DII4 humanizados) (Ejemplo 1). Control de Fc humano (♦ con línea sólida); REGN421 (Ab DII4) 2 mg/kg/inyección (♦ con línea discontinua); cisplatino 0,5 mg/kg/inyección (□); cisplatino 2 mg/kg/inyección (■); REGN421 2 mg/kg/inyección + cisplatino 0,5 mg/kg/inyección (O); y REGN421 2 mg/kg/inyección + cisplatino 2 mg/kg/inyección (●).

La Fig. 2 muestra los efectos de Ab DII4 en combinación con cisplatino sobre el crecimiento de tumores A549 humanos (cáncer pulmonar no microcítico) implantados en ratones SCID DII4 humanizados (Ejemplo 2). Control de Fc (●); REGN421 6 mg/kg de dosis total (O); cisplatino 5 mg/kg de dosis total (Δ); cisplatino 9 mg/kg de dosis total (A); REGN421 6 mg/kg + cisplatino 5 mg/kg de dosis totales (◇); y REGN421 6 mg/kg + cisplatino 9 mg/kg de dosis totales (◆).

La Fig. 3 muestra los efectos de Ab DII4 en combinación con 5-FU sobre el crecimiento de HCT116 humano (carcinoma colorrectal) implantados en ratones SCID DII4 humanizados (Ejemplo 5). Control de Fc humano (●); REGN421 6 mg/kg de dosis total (O); 5-FU 45 mg/kg de dosis total (Δ); 5-FU 75 mg/kg de dosis total (A); REGN421 6 mg/kg + 5-FU 45 mg/kg de dosis totales (◇); y REGN421 6 mg/kg + 5-FU 75 mg/kg de dosis totales (◆).

La Fig. 4 muestra los efectos de Ab DII4 en combinación con Irinotecano sobre el crecimiento de tumores HCT116 humanos implantados en ratones SCID DII4 humanizados (Ejemplo 6). Control de Fc humano (●); REGN421 6 mg/kg de dosis total (O); irinotecano 22,5 mg/kg de dosis total (Δ); irinotecano 75 mg/kg de dosis total (A); REGN421 6 mg/kg + irinotecano 22,5 mg/kg de dosis totales (◇); y REGN421 6 mg/kg + irinotecano 75 mg/kg de dosis totales (◆).

La Fig. 5 muestra los cambios factoriales promedio (4 ratones/grupo) de la expresión génica Hey1 en células de tumor colorrectal humano Colo205 implantadas en ratones SCID DII4 humanizados, con una dosis única de REGN421 a 0,5, 5 o 15 mg/kg, en comparación con el hFc a 15 mg/kg, medida a las 5, 10, 24 y 72 horas y 7 días post-dosis.

Descripción detallada

Antes de describir los presentes métodos, debe entenderse que esta invención no está limitada a métodos particulares, y condiciones experimentales descritas, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También puede entenderse que la terminología usada en este documento es con el fin de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará únicamente limitado por las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno", "una", y "el", "la" incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "un método" incluye uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en este documento y/o que llegarán a ser evidentes para los expertos en la materia tras leer esta descripción.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el habitualmente entendido por un experto en la materia a la cual pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

Definiciones

"Ligando 4 tipo Delta", "DII4", "hDII4" se usan de forma intercambiable para hacer referencia a la proteína codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 y la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Los antagonistas de DII4 incluyen anticuerpos contra DII4 y fragmentos de los mismos capaces de bloquear la unión de DII4 a un receptor Notch (tal como Notch 1 y Notch 4), proteínas de fusión que comprenden el dominio extracelular de DII4 fusionado a un componente de multimerización, o fragmentos del mismo (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2006/0134121 y 2008/0107648), y péptidos y peptidocuerpos (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2003/0229023).

Salvo que se indique específicamente de otro modo, el término "anticuerpo" como se usa en este documento, debe entenderse como abarcando moléculas de anticuerpo que comprenden dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina (es decir, "moléculas completas de anticuerpo") así como fragmentos de unión a antígeno de las mismas. Las expresiones "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, y similares, como se usan en este documento, incluyen cualquier péptido o glucopéptido de origen natural, obtenible de forma enzimática, sintético o modificado por ingeniería genética que se une específicamente a un antígeno para formar a un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden derivarse, por ejemplo, de moléculas completas de anticuerpo usando cualquier técnica convencional

adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica dominios variables y opcionalmente constantes de anticuerpo. Dicho ADN es conocido y/o está fácilmente disponible en, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, por ejemplo, bibliotecas de anticuerpo en fagos), o puede sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o usando técnicas de biología molecular, por ejemplo, para ordenar uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codines, crear restos de cisteína, modificar, añadir o deleccionar aminoácidos, etc.

Ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades mínimas de reconocimiento que consisten en los restos de aminoácido que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad aislada (CDR)). Otras moléculas modificadas por ingeniería, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos, también están incluidos dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno", como se usa en este documento.

Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo típicamente comprenderá al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR que está adyacente a o en fase con una o más secuencias flanqueantes. En fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L, los dominios V_H y V_L pueden situarse uno respecto al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimerica y contener dímeros V_H-V_H, V_H-V_L o V_L-V_L. Como alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio monomérico V_H o V_L.

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

Como con moléculas completas de anticuerpo, los fragmentos de unión a antígeno pueden ser mono-específicas o multiespecíficas (por ejemplo, biespecíficas). Un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de un anticuerpo típicamente comprenderá al menos dos dominios variables diferentes, donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno diferente o a un epítipo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluyendo los formatos de anticuerpo biespecífico ejemplares descritos en este documento, puede adaptarse para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención usando técnicas rutinarias disponibles en la técnica.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los mAb humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, no pretende incluir mAb en que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero (por ejemplo, ratón), se han injertado en secuencias FR humanas.

Los anticuerpos anti-DII4 completamente humanos descritos en este documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácido en las regiones flanqueante y/o CDR de los dominios variable de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de línea germinal correspondientes. Dichas mutaciones pueden averiguarse fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos descritas en este documento con secuencias de línea germinal disponibles en, por ejemplo, bases de datos públicas de secuencias de anticuerpo. La presente invención incluye anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se obtienen de cualquiera de las secuencias de aminoácido descritas en este documento, donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones flanqueantes y/o CDR están retro-mutados al resto o restos de línea germinal correspondientes o a una sustitución conservativa de aminoácido (natural o no natural) del resto o restos de línea germinal correspondientes (dichos cambios de secuencia se mencionan en este documento "retro-mutaciones de línea germinal"). Un experto en la materia, partiendo de las secuencias de región variable de cadena

pesada y ligera descritas en este documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una o más retro-mutaciones de línea germinal individuales o combinaciones de las mismas. En ciertas realizaciones, todos los restos flanqueantes y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L se retro-mutan a la secuencia de línea germinal. En otras realizaciones, solamente ciertos restos se retro-mutan a la secuencia de línea germinal, por ejemplo, solamente los restos mutados encontrados dentro de los primeros 8 aminoácidos de la FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de la FR4, o solamente los restos mutados encontrados en CDR1, CDR2 o CDR3. Además, los anticuerpos de la presente invención pueden contener cualquier combinación de dos o más retro-mutaciones de línea germinal dentro de las regiones flanqueante y/o CDR, es decir, donde ciertos restos individuales están retro-mutados a la secuencia de línea germinal mientras que otros ciertos restos que difieren de las secuencias de línea germinal se mantienen. Una vez obtenidos, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más retro-mutaciones de línea germinal pueden ensayarse fácilmente para una o más propiedades deseadas tales como, especificidad de unión mejorada, afinidad de unión aumentada, propiedades biológicas antagonistas o antagonistas mejoradas o potenciadas (como pueda ser el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno obtenidos de este modo general están incluidos dentro de la presente invención.

La presente invención también describe anticuerpos anti-DII4 que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en este documento que tienen una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, la presente invención describe anticuerpos anti-DII4 que tienen secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR, y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, 2 o 1, sustituciones conservativas de aminoácido respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en este documento. En un aspecto, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116 con 10 o menos sustituciones conservativas de aminoácido en la misma. En otro aspecto, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116 con 8 o menos sustituciones conservativas de aminoácido en la misma. En otra realización, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116 con 6 o menos sustituciones conservativas de aminoácido en la misma. En otro aspecto, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116 con 4 o menos sustituciones conservativas de aminoácido en la misma. En otro aspecto más, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116 con 2 o 1 sustitución conservativa de aminoácido en la misma. En un aspecto, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118 con 10 o menos sustituciones conservativas de aminoácido en la misma. En otro aspecto, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118 con 8 o menos sustituciones conservativas de aminoácido en la misma. En otro aspecto, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118 con 6 o menos sustituciones conservativas de aminoácido en la misma. En otro aspecto, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118 con 4 o menos sustituciones conservativas de aminoácido en la misma. En otro aspecto más, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118 con 2 o 1 sustitución conservativa de aminoácido en la misma.

Un anticuerpo "neutralizante" o "de bloqueo", pretende hacer referencia a un anticuerpo cuya unión a DII4 provoca la inhibición de la actividad biológica de DII4. Esta inhibición de la actividad biológica de DII4 puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de actividad biológica de DII4. Estos indicadores de actividad biológica de DII4 pueden evaluarse por uno o más de varios ensayos convencionales *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica. Por ejemplo, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de neutralizar la actividad DII4 por inhibición de la unión de DII4 a un receptor Notch.

La expresión "se une específicamente", o similares, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una constante de disociación en equilibrio de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M o menos (por ejemplo, una K_D más pequeña indica una unión más fuerte). Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis en equilibrio, resonancia de plasmón superficial, y similares. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hDII4 puede, sin embargo, mostrar reactividad cruzada con otros antígenos tales como moléculas DII4 de otras especies. Además, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) que se unen a DII4 y uno o más antígenos adicionales se consideran, no obstante, anticuerpos que "se unen específicamente" a hDII4, como se usa en este documento.

El término " K_D ", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

La expresión anticuerpo "de alta afinidad" se refiere a aquellos anticuerpos que se unen a DII4 con una K_D de menos de aproximadamente 500 pM, de menos de aproximadamente 400 pM, de menos de aproximadamente 300 pM, o de menos de aproximadamente 200 pM, medida por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™ o ELISA de afinidad en solución usando, por ejemplo, DII4 monomérico; o una K_D of de menos de aproximadamente 100 pM, de menos de aproximadamente 50 pM, o de menos de aproximadamente 20 pM, medida por resonancia de plasmón superficial, usando DII4 dimérico.

La expresión "resonancia de plasmón superficial", como se usa en este documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas a tiempo real mediante la detección de alteraciones en las

concentraciones de proteína dentro de una matriz biodetectora, por ejemplo usando el sistema BIOCORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.).

El término "epítipo" es una región de un antígeno que se une por un anticuerpo. Los epítipos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítipos funcionales son generalmente un subconjunto de los epítipos estructurales y tienen aquellos restos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítipos también pueden ser conformacionales, es decir, compuestos por aminoácidos no lineales. En ciertas realizaciones, los epítipos pueden incluir determinantes que son agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo, o grupos sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas.

Los agente quimioterapéuticos son compuestos químicos útiles en el tratamiento del cáncer e incluyen agentes inhibidores del crecimiento u otros agentes citotóxicos. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos que pueden usarse en los presentes métodos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosfaoramida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinias, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, calicheamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-díazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcellomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-FU; análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostanol, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; miembros de la familia de taxoide o taxano, tales como paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), docetaxel (TAXOTERE®, Aventis Antony, Francia) y análogos de los mismos; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; inhibidores de receptores tirosina quinasa y/o de la angiogénesis, incluyendo sorafenib (NEXAVAR® por Bayer Pharmaceuticals Corp.), sunitinib (SUTENT® por Pfizer), pazopanib (VOTRIENT™ por GlaxoSmithKline), toceranib (PALLADIA™ por Pfizer), vandetanib (ZACTIMA™ por AstraZeneca), cediranib (RECENTIN® por AstraZeneca), regorafenib (BAY 73-4506 por Bayer), axitinib (AG013736 por Pfizer), lestaurtinib (CEP-701 por Cephalon), erlotinib (TARCEVA® por Genentech), gefitinib (IRESSA™ por AstraZeneca), BIBW 2992 (TOVOK™ por Boehringer Ingelheim), lapatinib (TYKERB® por GlaxoSmithKline), neratinib (HKI-272 por Wyeth/Pfizer), y similares, y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre tumores tales como anti-estrógenos incluyendo, por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromataza, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona, y toremifeno (FARESTON®); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Otros compuestos químicos citotóxicos convencionales como los descritos en Wiemann et al., 1985, en Medical Oncology (Calabresi et al., eds.), Capítulo 10, McMillan Publishing, también son aplicables a los métodos de la presente invención.

La expresión "agentes inhibidores del crecimiento" se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa *in vitro* o *in vivo*. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el progreso del ciclo celular (en un sitio diferente a la fase S), tales como agentes que inducen detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueantes clásicos en fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), miembros de la familia de taxano incluyendo, aunque sin limitación, paclitaxel (TAXOL®), docetaxel (TAXOTERE®), y análogos de los mismos (por ejemplo, XRP9881 y XRP6258; véase Ojima et al., Curr Opin Investig Drugs 4:737, 2003), e inhibidores de topoisomerasa, tales como irinotecano, topotecano, camptotecina, lamellarina D, doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido, y bleomicina. Aquellos agentes que detienen en G1 también extienden sus efectos en la detección en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-FU, y ara-C.

Descripción general

La presente invención se basa en los hallazgos de que la co-administración de un antagonista de DII4, por ejemplo, un anticuerpos contra DII4 o fragmento del mismo que se une específicamente a DII4 y bloquea las actividades de DII4, con un agente quimioterapéutico, por ejemplo, cisplatino o docetaxel, provoca mayor inhibición del crecimiento tumoral que cualquier agente individual. Para una descripción del Ab DII4 completamente humano, incluyendo Ab DII4 humano recombinante, véase la publicación de solicitud de patente internacional N° WO 2008/076379.

Métodos para preparar Ab DII4

Los métodos para preparar anticuerpos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497; Harlow y Lane (1988) *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY). Los anticuerpos que se aíslan de organismos diferentes de los seres humanos, tales como ratones, ratas, conejos, vacas, pueden hacerse de tipo más humano a través de quimerización o humanización.

Las formas "humanizadas" o quiméricas de anticuerpos no humano (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas necesarias para la unión al antígeno derivadas de inmunoglobulina no humana. Tienen la misma o similar especificidad y afinidad de unión que un anticuerpo ratón u otro anticuerpo no humano que proporciona el material de partida para la construcción de un anticuerpo quimérico o humanizado. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes (C) humanos, tales como IgG1 e IgG4. Un anticuerpo quimérico típico es por tanto una proteína híbrida que consiste en el dominio V o de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio C o efector de un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados tienen restos flanqueantes de región variable sustancialmente de un anticuerpo humano (llamado anticuerpo aceptor) y regiones determinantes de complementariedad (regiones CDR) sustancialmente de un anticuerpo de ratón (mencionado como inmunoglobulina donante). Véase, Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989) y la publicación de solicitud de patente internacional N° WO 90/07861 y las patentes de Estados Unidos 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089, 5.530.101 y 5.225.539. La región o regiones constantes, si están presentes, también son sustancial o completamente de una inmunoglobulina humana. Los dominios variables humanos se eligen habitualmente entre anticuerpos humanos cuyas secuencias flanqueantes muestran un alto grado de identidad de secuencia con los dominios de región variable murina de los que se derivan las CDR. Los restos flanqueantes de la región variable de cadena pesada y ligera pueden derivarse de las mismas o diferentes secuencias de anticuerpo humano. Las secuencias de anticuerpo humano pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos de origen natural o pueden ser secuencias consenso de varios anticuerpos humanos. Véase la publicación de solicitud de patente internacional N° WO 92/22653. Ciertos aminoácidos de los restos flanqueantes de la región variable humana se seleccionan para sustitución en base a su posible influencia sobre la conformación de las CDR y/o unión a antígeno. La investigación de dichas posibles influencias puede realizarse por modelado, examen de las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, u observación empírica de los efectos de sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares. Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un resto flanqueante de la región variable murina y un resto flanqueante de la región variable humana seleccionada, el aminoácido flanqueante humano debe habitualmente sustituirse por el aminoácido flanqueante equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido: (1) se una de forma no covalente al antígeno directamente; (2) esté adyacente a una región CDR; (3) interaccione de otro modo con una región CDR (por ejemplo, está dentro de los aproximadamente 6 Å de una región CDR), o (4) participe en la interfaz V_L-V_H. Otros candidatos para sustitución son aminoácidos flanqueantes humanos aceptores que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la misma posición equivalente del anticuerpo donante de ratón o de las posiciones equivalente de inmunoglobulinas humanas más típicas. Otros candidatos para sustitución son aminoácidos flanqueantes humanos aceptores que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Las secuencias flanqueantes de la región variable de inmunoglobulinas humanizadas habitualmente muestran al menos un 85% de identidad de secuencia con una secuencia flanqueante de la región variable humana o consenso de dichas secuencias.

Los métodos para generar anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo, VELOCIMMUNE™ (Regeneron Pharmaceuticals), tecnología XENOMOUSE™ (Abgenix), el enfoque de "minilocus", y la presentación en fagos. La tecnología VELOCIMMUNE™ (patente de Estados Unidos 6.596.541) abarca un método para generar un anticuerpo completamente humano de alta especificidad contra un antígeno seleccionado. Esta tecnología implica la generación de un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera humanas unidas de forma funcional a los loci de región constante de ratón endógenos de modo que el ratón produzca un anticuerpo que comprenda una región variable humana y una región constante de ratón en respuesta a estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se aíslan y unen de forma funcional al ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada y ligera humanas. El ADN después se expresa en una célula capaz de expresar el anticuerpo completamente humano. En una realización, la célula es una célula CHO.

La tecnología XENOMOUSE™ (Green et al., 1994, Nature Genetics 7:13-21) genera un ratón que tiene regiones tanto variables como constantes humanas de loci tanto de cadena pesada como de cadena ligera kappa. En un enfoque alternativo, otros han utilizado un enfoque de "minilocus" en que se imita un locus Ig exógeno a través de la inclusión de genes individuales del locus Ig (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.545.807). El ADN que codifica las regiones variables puede aislarse con o sin unirse de forma funcional al ADN que codifica la región constante de cadena pesada y ligera humana.

Como alternativa, pueden usarse las tecnologías de presentación en fagos o presentación relacionada para identificar anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, tales como dominios variables, y fragmentos Fab heteroméricos que se unen específicamente a Dll4, (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2003/0229023).

La exploración y selección de inmunoglobulinas preferidas (anticuerpos) puede realizarse mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. La exploración inicial para la presencia de anticuerpos monoclonales específicos para Dll4 puede realizarse a través del uso de métodos basados en ELISA o presentación en fagos, por ejemplo. Se realiza preferiblemente una segunda exploración para identificar y seleccionar un anticuerpo monoclonal deseado. La exploración secundaria puede realizarse con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Un método preferido, llamado "perfilado asistido por modificación con biodetector" ("BiaMAP") se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2004/101920. BiaMAP permite la rápida identificación de clones de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales con características deseadas. Más específicamente, los anticuerpos monoclonales se clasifican en distintos grupos relacionados con epítipo en base a la evaluación de interacciones anticuerpo:antígeno. Como alternativa, pueden usarse ensayos de competición basados en ELISA, basados en perlas, o basados en BIACORE® para identificar parejas de unión que se unan a diferentes epítopos de Dll4 y por tanto tengan probabilidad de cooperar en la unión del ligando con alta afinidad.

Métodos de administración

La presente invención proporciona métodos de tratamiento que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un antagonista de Dll4, tal como un Ab Dll4, y un agente quimioterapéutico, tal como agentes anti-mitóticos, por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, y similares (taxanos); compuestos quimioterapéuticos basados en platino, tales como cisplatino, carboplatino, iproplatino, oxaliplatino, y similares; análogo de pirimidina, tal como 5-Fu, capecitabina (XELODA®, Roche), y similares; inhibidores de topoisomerasa, tales como irinotecano, topotecano, camptotecina, lamellarina D, y similares; y/o adyuvantes, tales como leucovorina (ácido folínico), y similares (para detalles, véase la sección anterior de definiciones).

El antagonista de Dll4 y el agente quimioterapéutico pueden co-administrarse juntos o por separado. Cuando se usan formulaciones de dosificación separadas, el antagonista de Dll4 y el agente quimioterapéutico pueden administrarse de forma concurrente, o por separado en momentos escalonados, es decir, secuencialmente.

Se conocen diversos sistemas de suministro y pueden usarse para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429 4432). Los métodos de introducción incluyen, aunque sin limitación, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, intraocular, epidural, y oral. La composición puede administrarse por cualquier vía, por ejemplo por infusión o inyección en embolada, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. La administración puede ser aguda o crónica (por ejemplo, diariamente, semanalmente, mensualmente, etc.) o en combinación con otros agentes. También puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de formación de aerosol.

Con respecto a suministro subcutáneo, un dispositivo de suministro tipo pluma fácilmente tiene aplicaciones en el suministro de una composición farmacéutica de la presente invención. Dicho dispositivo de suministro tipo pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de suministro de tipo pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez se ha administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede desecharse fácilmente y reemplazarse con un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo de suministro tipo pluma entonces puede reutilizarse. En un dispositivo de suministro tipo pluma desechable, no existe cartucho reemplazable. En su lugar, el dispositivo de suministro tipo pluma desechable viene precargado con la composición farmacéutica mantenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez vaciado el depósito de la composición farmacéutica, se desecha el dispositivo completo.

Numerosos dispositivos de suministro tipo pluma reutilizables tienen aplicaciones en el suministro subcutáneo de una composición farmacéutica de la presente invención. Ejemplos incluyen, aunque definitivamente sin limitación, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, RU), pluma DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co.,

Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar solamente unos pocos. Ejemplos de dispositivos de suministro tipo pluma desechables que tienen aplicaciones en suministro subcutáneo de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, aunque definitivamente sin limitación, la pluma SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), el FLEXPEN™ (Novo Nordisk), y el KWIKPEN™ (Eli Lilly).

En otra realización, el agente activo puede suministrarse en una vesícula, o un liposoma (véase Langer (1990) Science 249:1527-1533). En otra realización más, el agente activo puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (véase Langer (1990) supra). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71:105). En otra realización donde el agente activo de la invención es un ácido nucleico que codifica una proteína, el ácido nucleico puede administrarse in vivo para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que llegue a estar intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 4.980.286), o por inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo en unión a un péptido tipo homeobox que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Como alternativa, un ácido nucleico puede introducirse de forma intracelular e incorporarse dentro del ADN de la célula hospedadora para su expresión, por recombinación homóloga.

En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención de forma local al área que necesita tratamiento; esto puede conseguirse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, por inyección, mediante un catéter, o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, fibras, o sustitutos comerciales de piel.

La cantidad del agente activo de la invención que será eficaz en el tratamiento del cáncer/tumor puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales basadas en la presente descripción. Además, pueden emplearse ensayos *in vitro* opcionalmente para ayudar a identificar intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la afección, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada sujeto. Sin embargo, los intervalos adecuados de dosificación para administración intravenosa son generalmente de aproximadamente 0,2 a 30 mg de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los intervalos adecuados de dosificación para administración intranasal son generalmente de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis eficaces pueden extrapolarse de las curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o en modelo animal.

Para administración sistémica, puede estimarse inicialmente una dosis terapéuticamente eficaz a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en circulación que incluye la CI_{50} determinada en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa dosis útiles en seres humanos. Las dosificaciones iniciales también pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que son bien conocidas en la técnica. Un experto en la materia podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos en base a los datos en animales.

La dosis puede variar dependiendo de la edad y el tamaño (por ejemplo, pero corporal o área superficial corporal) de un sujeto al que administrársela, la enfermedad diana, las circunstancias, la vía de administración, y similares. Para administración sistémica de antagonistas de Dll4, en particular, para anticuerpos contra Dll4, los intervalos típicos de dosificación para administración intravenosa son a una dosis diaria de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg, o de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 10 mg/kg. Para administración subcutánea, los anticuerpos pueden administrarse de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 400 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 200 mg, a la concentración de anticuerpo de, al menos, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 125 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, o aproximadamente 250 mg/ml, al menos, 1 a 5 veces al día, 1 a 5 veces por semana, o 1 a 5 veces por mes. Como alternativa, los anticuerpos pueden administrarse inicialmente mediante inyección intravenosa, seguida de administración subcutánea secuencial.

En general, los agentes quimioterapéuticos se usan de forma intravenosa u oral a un intervalo de dosis entre 50 mg/m² y 5000 mg/m² por semana, pero los intervalos de dosificación varían dependiendo de diversos factores, incluyendo el sujeto que se está tratando, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la afección, el modo de administración, el tipo de agente quimioterapéutico que se esté usando, el juicio del médico que otorga la prescripción, y similares. La terapia puede repetirse de forma intermitente mientras los síntomas sean detectables o incluso cuando no son detectables. La duración del tratamiento también puede variar dependiendo de la gravedad de las afecciones tratadas así como los niveles de tolerancia de los sujetos para posibles efectos adversos, si los

hay, y puede durar tanto como sea necesario o siempre que el beneficio supere cualquier efecto adverso.

La dosificación de cada agente puede ajustarse adicionalmente en la terapia de combinación, donde la cantidad de cada agente necesaria para conseguir un efecto terapéutico deseado está reducida (es decir, mostrando un efecto sinérgico), en comparación con la administración de cualquier agente en solitario (véanse los Ejemplos 1 y 2, *infra*).

Los agentes quimioterapéuticos que pueden usarse en las terapias de combinación de la invención también incluyen aquellos que se emplean en regímenes quimioterapéuticos bien conocidos. Por ejemplo, FOLFOX es un régimen quimioterapéutico para tratar el cáncer colorrectal (CRC) y es una combinación de 5-FU, ácido folínico y oxaliplatino. FOLFIRI es otro régimen quimioterapéutico para CRC y es una combinación de 5-FU, ácido folínico e irinotecano. XELOX es un régimen quimioterapéutico de segunda línea para CRC y es una combinación de capecitabina y oxaliplatino.

Además, la terapia con la combinación de un agente quimioterapéutico y un antagonista de DII4 puede proporcionarse sola o en combinación con fármacos adicionales, tales como otros agentes anti-angiogénicos, por ejemplo, antagonistas de VEGF, incluyendo anticuerpos anti-VEGF (por ejemplo, AVASTIN® por Genentech), proteína de fusión que se unen a VEGF (por ejemplo, aflibercept por Regeneron Pharmaceuticals), y similares, y otros agentes terapéuticos, tales como analgésicos, agentes anti-inflamatorios, incluyendo fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID), tales como inhibidores de Cox-2, y similares, para mejorar y/o reducir los síntomas que acompañan al cáncer/tumor subyacente.

Quimioterapias metronómicas

La quimioterapia metronómica está surgiendo como un modo mejorado de administrar quimioterapia. La quimioterapia tradicional se ha administrado en dosis individuales o cortos cursos de terapia como la dosis más alta posible sin causar niveles potencialmente mortales de toxicidad, por ejemplo, a la dosis tolerada máxima (MTD). La terapia MTD requiere interrupciones prolongadas de 2-3 semanas entre ciclos sucesivos de terapia. A pesar de la cantidad de estos agentes quimioterapéuticos y la gran cantidad de ensayos clínicos emprendidos para ensayarlos, el progreso ha sido moderado en términos de cura o prolongación significativa de las vidas de los pacientes con cáncer (Kerbel et al., 2004, Nature Reviews Cancer 4:423-436).

Quimioterapia metronómica se refiere a la administración frecuente, incluso diaria, de agentes quimioterapéuticos a dosis significativamente por debajo de la MTD, sin interrupciones prolongadas sin fármaco. Además de la toxicidad aguda reducida, la eficacia de la quimioterapia metronómica puede aumentar cuando se administra en combinación con fármacos anti-angiogénicos específicos, tales como inhibidores de VEGF (Kerbel *et al.*, 2004, *supra*).

Por consiguiente, la presente invención presenta una quimioterapia metronómica para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto un antagonista de DII4 en combinación con un agente quimioterapéutico, en la que se trata el cáncer. En una realización específica, el antagonista de DII4 y un agente quimioterapéutico pueden administrarse juntos o secuencialmente durante un periodo de tiempo relativamente corto, por ejemplo, 1-12 semanas, seguido de administración metronómica del agente quimioterapéutico sobre un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo, 6-24 meses.

Composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista de DII4, un agente quimioterapéutico, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o medio con que se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse en forma de supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin.

En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios en forma de una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa para seres humanos. Cuando sea necesario, la

composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Cuando la composición tiene que administrarse por infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua para inyección o solución salina estéril de modo que los ingredientes puedan mezclarse antes de su administración.

Los agente activos de la invención pueden formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formas con grupos amino libres tales como los derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con grupos carboxilo libres tales como los derivados de hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

Una composición útil en la práctica de los métodos de la invención puede ser un líquido que comprende un agente de la invención en solución, en suspensión, o ambas. El término "solución/suspensión" se refiere a una composición líquida donde una primera parte del agente activo está presente en solución y una segunda parte del agente activo está presente en forma particulada, en suspensión en una matriz líquida. La composición líquida puede ser acuosa y también incluye formas de gel y de pomada.

Una suspensión acuosa o solución/suspensión útil para la práctica de los métodos de la invención puede contener uno o más polímeros como agentes de suspensión. Los polímeros útiles incluyen polímeros solubles en agua tales como polímeros que contienen carboxilo reticulado. Una suspensión acuosa o solución/suspensión de la presente invención es preferiblemente viscosa o mucoadhesiva, o incluso más preferiblemente, tanto viscosa como mucoadhesiva.

Kits

La invención describe adicionalmente un artículo de fabricación o kit, que comprende un material de envasado, recipiente y un agente farmacéutico contenido dentro del recipiente, donde el agente farmacéutico comprende al menos un antagonista de Dll4, tal como anticuerpo contra Dll4, y al menos un agente quimioterapéutico, y donde el material de envasado comprende una etiqueta o prospecto que indica que el antagonista de Dll4 y el agente quimioterapéutico pueden usarse para tratar el cáncer o reducir o detener el crecimiento tumoral. En un aspecto, el antagonista de Dll4 y el agente quimioterapéutico pueden estar contenidos en recipientes diferentes; por tanto, la invención describe un kit que comprende un recipiente que comprende en el mismo un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a hDll4, y uno o más recipientes adicionales que comprenden en los mismos al menos un agente quimioterapéutico.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación completa y descripción del modo para preparar y usar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se ha hecho esfuerzos por asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben justificarse algunos errores experimentales y desviaciones. Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, la temperatura es en grados centígrados, la presión es a o cerca de la atmosférica, y las barras de error de las figuras = media \pm ETM.

Ejemplo 1: Efecto del anticuerpo anti-hDll4 en combinación con cisplatino

Se evaluó el efecto del anticuerpo anti-Dll4 (REGN421) en combinación con cisplatino (platino, cis-diaminadichloroplatino) sobre el crecimiento tumoral en tumores implantados en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) que expresan una proteína Dll4 humanizada (ratones SCID Dll4 humanizados). El ratón SCID Dll4 humanizado se creó reemplazando el dominio extracelular completo del gen Dll4 de ratón con la correspondiente región extracelular del gen Dll4 humano (7 kb) en células madre embrionarias (ES). Los ratones hDll4 homocigóticos se generaron y criaron en un fondo SCID.

A cada mouse se le implantó de forma subcutánea (sc) 1×10^6 células tumorales humanas VM-Cub1 (células de carcinoma de vejiga) más MATRIGEL™ (BD Biosciences, nº 354234). Después de que se establecieron los tumores en los ratones (tamaño del tumor de 150-200 mm³, aproximadamente 14 días después del implante), se midieron los tumores, se asignaron aleatoriamente y se trataron con hFc, REGN421, cisplatino, o combinación de REGN421 y cisplatino. Se dividió un total de 45 ratones en nueve grupos (n=5 por cohorte). El primer grupo se trató de forma subcutánea (sc) con hFc a 2 mg/kg; el segundo y tercer grupos se trataron sc con REGN421 a 0,5 y 2 mg/kg, respectivamente; el cuarto y quinto grupos se trataron de forma intraperitoneal (ip) con cisplatino a 0,5 y 2 mg/kg, respectivamente; el sexto grupo se trató sc con REGN421 a 0,5 mg/kg e ip con cisplatino a 0,5 mg/kg; el séptimo grupo se trató sc con REGN421 a 0,5 mg/kg e ip con cisplatino a 2 mg/kg; el octavo grupo se trató sc con REGN421 a 2 mg/kg e ip con cisplatino a 0,5 mg/kg; y el noveno grupo se trató sc con REGN421 a 2 mg/kg e ip con cisplatino a 2 mg/kg. REGN421 se administró cada 3-4 días empezando en el día 14 y los ratones recibieron tres dosis en total. El cisplatino se administró cada 24 horas empezando el día 14; los ratones recibieron cuatro dosis en total.

Para evaluar los efectos de REGN421 y cisplatino como agentes individuales o en tratamientos de combinación, se registraron los cambios en el tamaño del tumor. El crecimiento tumoral se midió tres días antes del tratamiento inicial con REGN421, en el día de cada tratamiento con REGN421 (días 14, 17 y 21) y después de ello cada 3-4 días hasta que los tumores alcanzaron ~600 mm³ de tamaño. Se calculó el tamaño del tumor *in vivo* usando la fórmula (longitud x anchura²)/2 (Fig. 1 y Tabla 1).

Tabla 1

TRATAMIENTO (mg/kg/dosis)	TGI (%)	TGD (días)	Eutanasia (día)
hFc	-	-	32
REGN421 (0,5)	-13,7	0	32
REGN421 (2)	83,1	12	44
Cisplatino (0,5)	60,7	13	45
Cisplatino (2)	53,8	9	41
REGN421 (0,5) + cisplatino (0,5)	4,4	2	34
REGN421 (0,5) + cisplatino (2)	-0,8	0	28
REGN421 (2) + cisplatino (0,5)	104,8	49	>81
REGN421 (2) + cisplatino (2)	57,9	7	39

La **Inhibición del crecimiento tumoral, TGI**, se determinó calculando la diferencia en el tamaño del tumor para tumor tratado (T) frente a control de vehículo (C) en el día que se sacrificó a la cohorte de control (es decir, en el día 32); $TGI = [1 - (T_{final} - T_{inicial}) / (C_{final} - C_{inicial})] \times 100$.

El **retardo en el crecimiento tumoral, TGD**, se evaluó como la diferencia en días entre tumores tratados (T) frente a control (C) cuando cada cohorte alcanzó un tamaño de tumor especificado. El tamaño de tumor predeterminado para este experimento fue 600 mm³.

Los resultados muestran que el tratamiento con REGN421 en solitario causaba una reducción del 54% en el crecimiento tumoral. El tratamiento con cisplatino en solitario provocó un crecimiento tumoral reducido (reducción del 61% para la dosis de 0,5 mg/kg/inyección; y reducción del 54% para la dosis de 2 mg/kg/inyección). Los tratamientos de combinación produjeron reducciones mayores en el crecimiento tumoral que cualquier tratamiento de agente individual (reducción del 104% para 0,5 mg/kg/inyección de cisplatino más 2 mg/kg/inyección de REGN421; y reducción para 2 mg/kg/inyección de cisplatino más 2 mg/kg/inyección de REGN421).

Estos resultados mostraron que el tratamiento de tumores con una combinación de bloqueante de Dll4 junto con cisplatino, a 2 mg/kg/inyección de bloqueante de Dll4 y 0,5 mg/kg/inyección de cisplatino, puede provocar mayor inhibición del crecimiento tumoral que cualquier agente individual.

Ejemplo 2: Efecto del anticuerpo anti-hDll4 en combinación con cisplatino

Se evaluó el efecto de REGN421 en combinación con cisplatino sobre el crecimiento tumoral en tumores implantados en ratones SCID Dll4 humanizados, como se ha descrito anteriormente. A cada ratón se le implantó de forma subcutánea (sc) 5x10⁶ células tumorales humanas A549 (cáncer pulmonar no microcítico o "NSCLC"). Después de que se establecieron los tumores en los ratones (tamaño del tumor de 100-150 mm³, aproximadamente 29 días después del implante), se midieron los tumores, se asignaron aleatoriamente y se trataron con hFc, REGN421, cisplatino o combinación de REGN421 y cisplatino. Se dividió un total de 36 ratones en 6 grupos (n=6 por cohorte). El primer grupo se trató sc con hFc a 2 mg/kg; el segundo grupo se trató sc con REGN421 a 2 mg/kg; el tercer y cuarto grupos se trataron ip con cisplatino a 2,5 y 4,5 mg/kg, respectivamente; el quinto grupo se trató sc con REGN421 a 2 mg/kg e ip con cisplatino a 2,5 mg/kg; y el sexto grupo se trató sc con REGN421 a 2 mg/kg e ip con cisplatino a 4,5 mg/kg. REGN421 se administró cada 3-4 días empezando en el día 29 y los ratones recibieron tres dosis en total. El cisplatino se administró cada 24 horas empezando en el día 29 y los ratones recibieron dos dosis en total.

Para evaluar los efectos de REGN421 y cisplatino como agentes individuales o en combinación se midió el tamaño del tumor (volumen), empezando tres días antes del tratamiento inicial con REGN421, en el día de cada tratamiento con agente (días 29, 30, 33, 36) y después de ello cada 3-4 días hasta que los tumores alcanzaron ~600mm³ de tamaño. El tamaño del tumor *in vivo* tumor se calculó usando la fórmula (longitud x anchura²)/2. Los efectos sobre el crecimiento tumoral se indican en la Figura 2 y la Tabla 2.

Tabla 2

TRATAMIENTO (mg/kg de dosis total)	TGI (%) en el día 57	TGD (días)
hFc	-	-
REGN421 2 mg/kg (6)	54	8
Cisplatino 2,5 mg/kg (5)	35	4
Cisplatino 4,5 mg/kg (9)	22	11
REGN421 2 mg/kg (6) + Cisplatino 2,5 mg/kg (5)	69	21
REGN421 2 mg/kg (6) + Cisplatino 4,5 mg/kg (9)	80	26

Los resultados muestran que el tratamiento con REGN421 en solitario causó una reducción del 54% en el crecimiento tumoral. El tratamiento con cisplatino en solitario provocó un crecimiento tumoral reducido (reducción del 35% para la dosis de 2,5 mg/kg/inyección; y reducción del 22% para la dosis de 4,5 mg/kg/inyección). Los tratamientos de combinación produjeron reducciones mayores en el crecimiento tumoral que cualquier tratamiento con agente individual (reducción del 69% para 2,5 mg/kg/inyección de cisplatino más 2 mg/kg/inyección de REGN421; y reducción del 80% para 4,5 mg/kg/inyección de cisplatino más 2 mg/kg/inyección de REGN421). Los tratamientos de combinación retardaron el crecimiento tumoral significativamente (21 días para 2,5 mg/kg/inyección de cisplatino más 2 mg/kg/inyección de REGN421; y 26 días para 4,5 mg/kg/inyección de cisplatino más 2 mg/kg/inyección de REGN421), en comparación con el control y cualquier agente individual ($p < 0,01$).

Estos resultados muestran que el tratamiento de tumores con una combinación de bloqueante de Dll4 junto con cisplatino, a 2 mg/kg/inyección de bloqueante de Dll4 y 2,5-4,5 mg/kg/inyección de cisplatino, puede provocar una mayor inhibición del crecimiento tumoral que cualquier agente individual.

Ejemplo 3: Efecto del anticuerpo anti-hDll4 en combinación con docetaxel

Se evaluó el efecto del anticuerpo anti-Dll4 en combinación con docetaxel (TAXOTERE®) sobre el crecimiento tumoral en tumores implantados en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID). A cada ratón se le implantó de forma subcutánea (sc) 1×10^6 células tumorales de rata C6 (células de glioblastoma). Después de que se establecieron los tumores (tamaño del tumor de $\sim 100-150 \text{ mm}^3$, aproximadamente 13 días después del implante), los ratones se trataron con hFc, docetaxel, anticuerpo contra Dll4, o una combinación de docetaxel más anticuerpo contra Dll4. Como estos ratones expresaban Dll4 de ratón, el Ab Dll4 usado en este experimento se preparó en el propio laboratorio, en base a la secuencia publicada (publicación de solicitud de patente internacional WO 2007/143689), y denominado como REGN 577. REGN 577 se une a Dll4 humano y de ratón, pero no se une de forma detectable a Dll1 humano y JAG1. Un total de 30 ratones macho que albergaban tumor se asignaron aleatoriamente en seis grupos (N=5). El primer grupo se trató de forma subcutánea con hFc (a 25 mg/kg) y de forma intravenosa (iv) con vehículo; el segundo grupo se trató con REGN577 sc a 5 mg/kg; el tercer grupo se trató con docetaxel iv a 4,5 mg/kg; el cuarto grupo se trató con docetaxel iv a 6 mg/kg; el quinto grupo se trató con docetaxel iv a 4,5 mg/kg más REGN577 sc a 5 mg/kg; el sexto grupo se trató con docetaxel iv a 6 mg/kg más REGN577 sc a 5 mg/kg. El docetaxel y/o el anticuerpo contra Dll4 se administraron en el mismo día. Los animales se trataron 2 veces por semana y recibieron un total de 3 dosis. Empezando desde el día de tratamiento inicial, se midió el peso corporal y los tumores dos veces a la semana hasta que los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron $\sim 600 \text{ mm}^3$ de tamaño. El tamaño del tumor se calculó usando la fórmula $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$.

Los tumores de control alcanzaron el tamaño de $\sim 600 \text{ mm}^3$ y se recogieron en el día 25. En el día 25, los resultados muestran que el tratamiento con anticuerpo contra Dll4 en solitario causaba una moderada reducción en el crecimiento tumoral (en aproximadamente el 44%). El tratamiento con docetaxel en solitario provocó un crecimiento tumoral reducido (reducción del 62% para la dosis de 4,5 mg/kg; y reducción del 70% para la dosis de 6 mg/kg). Los tratamientos de combinación produjeron reducciones mayores en el crecimiento tumoral (reducción del 75% para 4,5 mg/kg de docetaxel más Ab Dll4; y reducción del 81% para 6 mg/kg docetaxel más Ab Dll4) que el control y cualquier tratamiento con agente individual. Se determinaron la TGI y TGD (Tabla 3).

Tabla 3

TRATAMIENTO (mg/kg de dosis total)	TGI (%) en el día 25	TGD (días)
REGN577 5 mg/kg (15)	44	3
Docetaxel 4,5 mg/kg (13,5)	62	6
Docetaxel 6 mg/kg (18)	70	7
REGN577 5 mg/kg (15) + Docetaxel 4,5 mg/kg (13,5)	75	10
REGN577 5 mg/kg (15) + Docetaxel 6 mg/kg (18)	81	13

Estos resultados muestran que el tratamiento de tumores con una combinación de bloqueante de Dll4 junto con diversas dosis de docetaxel, puede retardar el crecimiento tumoral casi dos veces en extensión que y provocar mayor inhibición del crecimiento tumoral que cualquier agente individual.

5 Ejemplo 4: Efecto del anticuerpo anti-hDll4 en combinación con docetaxel

Se evaluó el efecto del anticuerpo anti-Dll4 en combinación con docetaxel (TAXOTERE®, sanofi-aventis) sobre el crecimiento tumoral en tumores implantados en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID). A cada mouse se le implantó de forma 'pseudo-ortotópica' (de forma subcutánea en la glándula mamaria nº 3) 5×10^6 células de tumor de mama humano MDA-MB-231 con MATRIGEL™ (BD Biosciences lote nº 84540). Después de que se establecieran los tumores en los ratones (tamaño del tumor de ~ 150-200 mm³, aproximadamente 45 días después del implante), los ratones se trataron con hFc, docetaxel, anticuerpo contra Dll4, o una combinación de docetaxel más anticuerpo contra Dll4. Un total de 25 ratones macho que albergaban tumor se asignaron aleatoriamente en cinco grupos (N=5 ratones por grupo). El primer grupo se trató de forma subcutánea con hFc (a 25 mg/kg) y de forma intravenosa (iv) con vehículo; el segundo grupo se trató con anticuerpo contra Dll4 REGN577 sc a 5 mg/kg; el tercer grupo se trató con docetaxel iv a 4,5 mg/kg; el cuarto grupo se trató con docetaxel iv a 6 mg/kg; el quinto grupo se trató con docetaxel iv a 6 mg/kg más REGN577 sc a 5 mg/kg. El docetaxel y/o el anticuerpo contra Dll4 se administraron en el mismo día. Los animales se trataron 2 veces por semana y recibieron un total de 3 dosis. Empezando desde el día de tratamiento inicial, se midió el peso corporal y los tumores dos veces a la semana hasta que los ratones se sacrificaron. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron ~600 mm³ de tamaño. El tamaño del tumor se calculó usando la fórmula (longitud x anchura²)/2.

Los tumores de control alcanzaron ~600 mm³ y se recogieron en el día 63. En el día 63, los resultados muestran que el tratamiento con docetaxel en solitario produjo una moderada reducción del crecimiento tumoral (reducción del 37% para la dosis de 4,5 mg/kg; y reducción del 52% para la dosis de 6 mg/kg). El tratamiento con anticuerpo contra Dll4 en solitario causó una significativa reducción en el crecimiento tumoral (reducción de aproximadamente el 85%); en cambio el tratamiento de combinación provocó regresión tumoral (reducción del 105% para 6 mg/kg de docetaxel más Ab Dll4). Se determinaron la TGI y TGD (Tabla 4).

Tabla 4

TRATAMIENTO (mg/kg de dosis total)	TGI (%) en el día 25	TGD (días)
REGN577 5 mg/kg (15)	85	21
Docetaxel 4,5 mg/kg (13,5)	37	4
Docetaxel 6 mg/kg (18)	52	4
REGN577 5 mg/kg (15) + Docetaxel 6 mg/kg (18)	105	28

El tratamiento con docetaxel en solitario provocó un retardo mínimo en el crecimiento tumoral (4 días para la dosis de 4,5 mg/kg; y 4 días para la dosis de 6 mg/kg). Los tumores tratados con anticuerpo contra Dll4 en solitario retardaron el crecimiento tumoral en 21 días. Los tratamientos de combinación retardaron el crecimiento tumoral aún más, en comparación con el control y cualquier tratamiento con agente individual (28 días para 6 mg/kg de docetaxel más Ab Dll4; p<0,5).

Estos resultados muestran que los tumores MDA-MB-231 son moderadamente sensibles a tratamiento con docetaxel en solitario pero son muy sensibles al tratamiento con anticuerpo anti-Dll4. La combinación de bloqueante de Dll4 junto con docetaxel puede retardar adicionalmente el crecimiento tumoral y mejorar ligeramente la inhibición del crecimiento tumoral (regresión tumoral) en comparación con cualquier agente individual.

Ejemplo 5: Efecto del anticuerpo anti-hDll4 en combinación con 5-FU

Se evaluó el efecto del anti-anticuerpo contra Dll4 (REGN421) en combinación con 5-FU sobre el crecimiento tumoral en tumores implantados en ratones SCID Dll4 humanizados. A cada ratón se le implantó de forma subcutánea (sc) 5×10^6 células tumorales humanas HCT116 (CRC). Después de que se establecieran los tumores en los ratones (tamaño del tumor de ~150 mm³, 22 días después del implante), se midieron los tumores y se asignaron aleatoriamente. Los ratones después se trataron con hFc, REGN421, 5-FU o combinación de REGN421 y 5-FU. Un total de 30 ratones se dividieron en 6 grupos (n=5 por cohorte). El primer grupo se trató sc con hFc a 2 mg/kg; el segundo grupo se trató sc con REGN421 a 2 mg/kg; el tercer y cuarto grupos se trataron ip con 5-FU a 15 y 25 mg/kg, respectivamente; el quinto grupo se trató sc con REGN421 a 2 mg/kg e ip con 5-FU a 15 mg/kg; y el sexto grupo se trató sc con REGN421 a 2 mg/kg e ip con 5-FU a 25 mg/kg. REGN421 se administró cada 3-4 días empezando en el día 22 y los ratones recibieron tres dosis en total. 5-FU se administró cada 3-4 días empezando en el día 22 y los ratones recibieron tres dosis en total.

Para evaluar los efectos de REGN421 y 5-FU como agentes individuales o en combinación, se midieron los cambios en el tamaño del tumor (volumen), empezando tres días antes del tratamiento inicial con REGN421, y después en el

día de cada tratamiento con agente (días 22, 26, 29) y después de ello cada 3-4 días hasta que los tumores alcanzaron ~600 mm³ de tamaño. El tamaño del tumor *in vivo* se calculó usando la fórmula (longitud x anchura²)/2 (Fig. 3 y Tabla 5).

Tabla 5

TRATAMIENTO (mg/kg de dosis total)	TGI(%) en el día 39	TGD (días)
REGN421 2 mg/kg (6)	36,3	6
5-FU 15 mg/kg (45)	5,6	4
5-FU 25 mg/kg (75)	0	2
REGN421 2 mg/kg (6) + 5-FU 15 mg/kg 15 mg/kg (45)	66,8	7
REGN421 2 mg/kg (6) + 5-FU 25 mg/kg (75)	63,3	7

5 El tratamiento con 5-FU en solitario provocó un retardo mínimo en el crecimiento tumoral (4 días para la dosis total de 45 mg/kg; y 2 días para la dosis total de 75 mg/kg). Los tumores tratados con anticuerpo contra Dll4 en solitario retardaron el crecimiento tumoral en 6 días. Los tratamientos de combinación retardaron crecimiento tumoral aún más, en comparación con el control ($p < 0,043$).

10

Ejemplo 6: Efecto del anticuerpo anti-hDll4 en combinación con irinotecano

Se evaluó el efecto del anti-anticuerpo contra Dll4 (REGN421) en combinación con irinotecano (clorhidrato de irinotecano) sobre el crecimiento tumoral en tumores implantados en ratones SCID Dll4 humanizados.

15

A cada ratón se le implantó de forma subcutánea (sc) 5×10^6 células tumorales humana HCT116. Después de que se establecieron los tumores en los ratones (tamaño del tumor de ~150 mm³, 15 días después del implante), se midieron los tumores y se asignaron aleatoriamente. Los ratones después se trataron con hFc, REGN421, irinotecano o combinación de REGN421 e irinotecano. Un total de 30 ratones se dividieron en 6 grupos (n=5 por cohorte). El primer grupo se trató sc con hFc a 2 mg/kg; el segundo grupo se trató sc con REGN421 a 2 mg/kg; el tercer y cuarto grupos se trataron ip con irinotecano a 7,5 y 25 mg/kg, respectivamente; el quinto grupo se trató sc con REGN421 a 2 mg/kg e ip con irinotecano a 7,5 mg/kg; y el sexto grupo se trató sc con REGN421 a 2 mg/kg e ip con irinotecano a 25 mg/kg. REGN421 se administró cada 3-4 días empezando en el día 15 y los ratones recibieron tres dosis en total. El irinotecano se administró cada 3-4 días empezando en el día 15 y los ratones recibieron tres dosis en total.

25

Para evaluar los efectos de REGN421 e irinotecano como agentes individuales o en tratamientos de combinación, se midieron los cambios en el tamaño del tumor (volumen), empezando tres días antes del tratamiento inicial con REGN421, y después en el día de cada tratamiento con agente (días 15, 19, 22) y después de ello cada 3-4 días hasta que los tumores alcanzaron ~600 mm³ de tamaño. El tamaño del tumor *in vivo* se calculó usando la fórmula (longitud x anchura²)/2. Los resultados se muestran en la Fig. 4 y la Tabla 6.

30

Tabla 6

TRATAMIENTO (mg/kg de dosis total)	TGI (%) en el día 39	TGD (días)
REGN421 2 mg/kg (6)	81,3	9
Irinotecano 7,5 mg/kg (22,5)	71,2	8
Irinotecano 25 mg/kg (75)	100,5	16
REGN421 2 mg/kg (6) + Irinotecano 7,5 mg/kg (22,5)	91,5	10
REGN421 2 mg/kg (6) + Irinotecano 25 mg/kg (75)	119,6	19

35 El tratamiento con irinotecano en solitario provocó un retardo en el crecimiento tumoral (8 días para la dosis total de 22,5 mg/kg; y 16 días para la dosis total de 75 mg/kg). Los tumores tratados con anticuerpo contra Dll4 en solitario retardaron el crecimiento tumoral en 9 días. Los tratamientos de combinación mejoraron significativamente la eficacia anti-tumor y retardaron el crecimiento tumoral aún más, en comparación con cualquier tratamiento con agente individual (19 días para 75 mg/kg de irinotecano más Ab Dll4; $p < 0,0001$).

40

Ejemplo 7: Efecto del anticuerpo anti-hDll4 sobre la expresión génica de Hey1 en tumor Colo205

Se estudió el efecto del anticuerpo anti-hDll4 sobre la expresión génica diferencial en tumores en ratones SCID Dll4 humanizados con células de tumor colorrectal humano Colo205 implantadas. En resumen, se le implantó a ratones SCID Dll4 humanizados macho y hembra de forma subcutánea 2×10^6 células Colo205 por ratón. Cuando los tumores alcanzaron ~150mm³, los ratones (4 animales por grupo) se trataron con una única dosis de REGN421 a 0,5, 5 o 15 mg/kg, o de hFc de control a 15 mg/kg. Los tumores se escindieron a las 5 h, 10 h, 24 h, 72 h y 7 días después del tratamiento y se almacenaron en reactivo de estabilización tardía de ARN (Qiagen). El ARN tumoral se

45

purificó usando el kit RNEASY® Midi (Qiagen). El tejido se homogeneizó en tampón de lisis que contenía β -mercaptoetanol en un molino de mezcla, se cargó en las columnas y se aclararon los contaminantes no unidos. Se realizó digestión con DNasa I en la columna y se eluyó el ARN en agua sin RNasa. Se incorporó cianina 3 (Cy3)-CTP en el ARNc amplificado a partir de 500 ng de ARN total usando el kit de amplificación de ARN QUICK AMP™ (Agilent Technologies). El ARNc marcado con Cy3 de cada muestra entonces se hibridó en una serie personalizada que cubría el transcriptoma tanto de ratón como humano. La hibridación y el lavado de las series se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante y las series se exploraron en un escáner Agilent Microarray. Los datos se extrajeron de las imágenes escaneadas de las series usando el Software Agilent Feature Extraction 9.5.

Para identificar los genes expresados de forma diferencial entre los grupos de control y de tratamiento, se aplica el centrado en el medio por chip al perfil genómico completo de cada muestra. Los valores de expresión génica después se comparan entre dos grupos usando un ensayo t de modelo de varianza aleatoria (Simon, R.A. et al., 2007, "Analysis of Gene Expression Data Using BRB-Array Tools", Cancer Inform 3:11-7). Aquellos genes con una diferencia media mayor de 1,5 veces y valor $p < 0,05$ entre los dos grupos se seleccionan y clasifican en cambio factorial descendente. También se realiza un ensayo global en que los marcadores de muestra individuales se permutan hasta 1000 veces y se repite el proceso de selección génica. Esto determina si el número de genes identificado como expresado de forma diferencial entre los dos grupos es más de lo que se esperaría por casualidad solamente.

Hey1 es un miembro de la familia Hey que se ha identificado como dianas corriente abajo inmediatas de la activación de Notch y se ha demostrado que la inhibición de la señalización por la ruta Dll4-Notch en tumores *in vivo* en estudios en ratones provoca la reducción de los niveles de ARN de Hey-1 (Noguera-Troise, I et al., 2006, Nature 444(7122):1032-7). Como se muestra en la Fig. 5, el análisis de los niveles de ARNm de Hey1 en el presente estudio usando microseries reveló que los niveles de ARNm de Hey1 estaban disminuidos en los ratones tratados con REGN421 en comparación con ratones de control tratados con hFc empezando a las 10 horas post-tratamiento, pero estaban más significativamente disminuidos a las 72 horas y 7 días post-tratamiento. No se observó disminución significativa a 0,5 mg/kg, es decir, la dosis más baja de REGN421. Estos resultados indicaron que REGN421 bloqueaba de forma eficaz la ruta de señalización de Notch y que Hey1 podría ser un marcador farmacodinámico útil para la inhibición de la señalización de Notch por un anticuerpo contra Dll4.

Ejemplo 8: Estudio farmacocinético preliminar en fase I

REGN421 está actualmente siendo estudiado en un primer ensayo en humanos. El objetivo principal del estudio es determinar la dosis recomendada de REGN421 para futuros ensayos de eficacia. Los objetivos secundarios son caracterizar el perfil de seguridad del fármaco, su farmacocinética, inmunogenicidad, y farmacodinámica, así como evidencias preliminares de eficacia. En este estudio, se administra anticuerpo anti-hDll4 REGN 421 de forma intravenosa cada 3 semanas a pacientes cuyo cáncer ha progresado en terapia convencional. El diseño del estudio sigue la metodología convencional para la escala de dosis y la definición de toxicidad limitante de dosis. Hasta la fecha, se ha tratado a 7 pacientes a 0,25 mg/kg/dosis cada tres semanas, y se ha tratado a 6 pacientes a 0,50 mg/kg/dosis cada tres semanas. Para el estudio farmacocinético, se toman muestras de sangre en pre-dosis, 0 horas, y post-dosis 1, 2, 4 y 8 horas en el día 1, seguido de días 2, 3, 4, 8 y 15 del ciclo 1; y pre-dosis, 0 horas en el día 1 de ciclos ≥ 2 , y post-tratamiento de seguimiento en los días 15, 30 y 60. Se miden los niveles en plasma/suero de REGN421 en las muestras por ELISA con un límite superior de cuantificación de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ y un límite inferior de cuantificación de 0,039 $\mu\text{g/ml}$ en la muestra de suero sin diluir. El estudio está en curso con la intención de administrar dosis más altas, definidas en el protocolo como 1, 2, 4, y 7 mg/kg/dosis.

Los datos actualmente disponibles que muestran parámetros farmacocinéticos en plasma después de una única infusión IV de 30-min de REGN421 a 0,25 mg/kg (7 pacientes) y 0,5 mg/kg (2 pacientes), se muestran en la Tabla 7. $C_{\text{máx}}$: concentración máxima en suero del fármaco; $T_{\text{últ}}$: tiempo hasta la última concentración cuantificable del fármaco; $C_{\text{últ}}$: última concentración cuantificable del fármaco; $\text{AUC}_{\text{últ}}$: área bajo la curva hasta la última concentración del fármaco; AUC: área total bajo la curva (es decir, exposición a fármaco); $t_{1/2Z}$: semi-vida terminal; V_{ss} : volumen de distribución en estado estacionario; CL: tasa de eliminación del fármaco. Los valores son: media, (CV%), y [intervalo] (a: mediana [intervalo]).

Tabla 7

Dosis (mg/kg)	C _{máx} (µg/ml)	T _{úit} ^a (h)	C _{úit} (µg/ml)	AUC _{úit} (µg*h/ml)	AUC (µg*h/ml)	T _{1/2z} (h)	V _{ss} (L)	CL (Uh)
0,25 (n=7)	6,27 (30,5)	170 [72-240]	0,51 (57,7)	452 (56,7)	489 (55,9)	47,1 (33,5)	2,85 (27,3)	0,0473 (39,5)
0,5 (n=2)	9,88 [9,25-10,5]	203 [73-333]	2,24 [0,976-3,51]	759 [479-1040]	963 [684-1240]	92,3 [40,6-144]	3,64 [2,65-4,63]	0,0355 [0,0273-0,0436]

Como se muestra en la Tabla 7, las concentraciones máximas en suero de REGN421 son valores promedio de 6,27 $\mu\text{g/ml}$ al nivel de dosis de 0,25 mg/kg, y 9,88 $\mu\text{g/ml}$ al nivel de dosis de 0,50 mg/kg. Estos valores están en el intervalo de concentraciones de REGN421 asociadas con actividad anti-tumoral en modelos animales de xenoinjerto.

5 El efecto farmacodinámico de REGN421 sobre la ruta de señalización de DII4-notch se ha analizado usando tecnología de microserie en las muestras de suero del paciente recogidas antes de así como 24 horas después de la administración de REGN421. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Paciente	Dosis (mg/kg)	Proporción de transcrito de Hey-1 post-tratamiento frente a pre-tratamiento
1	0,25	0,52
2	0,25	0,85
3	0,25	0,77
4	0,25	0,51
5	0,25	0,61
6	0,25	0,55
7	0,25	0,75
8	0,5	0,68
9	0,5	0,82

10 Como se muestra en la Tabla 8, la expresión del gen Hey-1 tras la administración de REGN421 se redujo en comparación con muestras pre-tratamiento, en todas las muestras. Como se observa en el modelo de tumor de xenoinjerto en ratones SCID DII4 humanizados (véase el Ejemplo 7 anterior), los hallazgos sugieren que REGN421 está de hecho inhibiendo la actividad biológica de DII4 en seres humanos.

15 **Ejemplo 9: Ab DII4 en combinación con gemcitabina a paciente en fase I**

El estudio se realizará en pacientes adultos con cáncer avanzado o metastásico que es refractario a terapia convencional o no tiene opciones de tratamiento aprobadas. Los pacientes que están diagnosticados con neoplasias sólidas avanzadas de acuerdo con el examen patológico, físico y radiológico, con un valor de estado de rendimiento ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) de 0-2 (escala 0-5) y parámetros clínicos renales, hepáticos y hematológicos adecuados son elegibles para su participación en el estudio. Se permite que los pacientes reciban cuidados de apoyo concurrentes, tales como transfusiones de sangre y analgésicos, durante el estudio. Los pacientes pueden haber recibido previa quimioterapia o terapia biológica para enfermedad metastásica. Los pacientes se asignan en cohortes de dosificación secuencial en un diseño 3+3. Tres pacientes se incluirán en un nivel de dosis y, si no aparecen toxicidades limitantes de la dosis (DLT), sucederá un aumento de dosis al siguiente nivel de dosis. Si 1 de los 3 primeros pacientes experimenta una DLT, entonces pueden incluirse 3 pacientes adicionales a ese nivel de dosis. Si 2 de los 3 primeros pacientes experimenta una DLT, entonces se considerará que ese nivel de dosis tiene excesiva toxicidad, y se incluirán 3 pacientes adicionales en el nivel de dosis previo. Los pacientes recibirán en el día 1: anti-anticuerpo contra DII4 (por ejemplo, REGN421 o REGN281) a 0,25 a 10 mg/kg IV durante 30 minutos más gemcitabina a 1250 mg/m² por infusión IV durante 30 minutos y día 8: gemcitabina a 1250 mg/m² por infusión IV durante 30 minutos. El régimen de combinación se repite cada 3 semanas hasta la progresión del cáncer o se desarrolle toxicidad intolerable.

35 El criterio de valoración principal es evaluar la seguridad, tolerabilidad, y toxicidades limitantes de la dosis del anti-anticuerpo contra DII4 en combinación con gemcitabina e identificar la dosis tolerada máxima (MTD) del anti-anticuerpo contra DII4 en combinación con gemcitabina en pacientes con neoplasias sólidas avanzadas. Los criterios de valoración secundarios incluyen una descripción de la actividad antitumoral de acuerdo con los criterios RECIST (por Eisenhauer et al., 2009, Eur J Cancer 45:228-247), evaluación del perfil farmacocinético (PK) del anticuerpo anti-DII4 cuando se da en combinación con gemcitabina y determinación de la inmunogenicidad al anticuerpo anti-DII4. Se evalúa la remisión de la enfermedad usando examen físico, métodos radiológicos (rayos X, tomografía computada, o imágenes de resonancia magnética). Los eventos adversos se evalúan usando los criterios de terminología común para eventos adversos del National Cancer Institute (CTCAE v 4.0, disponibles en el Cancer Therapy Evaluation Program o CTEP en el sitio web del National Cancer Institute). Se toman muestras de suero de los pacientes para medir las concentraciones del anticuerpo anti-DII4 así como la presencia de posibles anticuerpos contra el anticuerpo anti-DII4.

50 **Ejemplo 10: Administración de Ab DII4 y FOLFOX a pacientes con CRC**

En resumen, pacientes adultos que están diagnosticados con cáncer colorrectal localmente avanzado o metastásico de acuerdo con el examen patológico, físico y radiológico, con un valor del estado de rendimiento ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) de 0-2 (escala 0-5) y parámetros clínicos renales, hepáticos y hematológicos

adecuados son elegibles para su participación en el estudio. Se permite que los pacientes reciban cuidados de apoyo concurrentes, tales como transfusiones de sangre y analgésicos, durante el estudio. Los pacientes pueden no haber recibido quimioterapia previa (o terapia anti-angiogénica, o anti-EGFR) para enfermedad metastásica; está permitida terapia previa para el tratamiento adyuvante de su enfermedad, y deben haber completado al menos 12 meses antes de incluirse en este estudio. Los pacientes se asignan aleatoriamente en una proporción 1:1 para recibir quimioterapia intravenosa FOLFOX (día 1: Oxaliplatino 85 mg/m² infusión IV y leucovorina (ácido folínico) 200 mg/m² infusión IV, seguida de 5-FU 400 mg/m² bolo IV dando en 2-4 minutos, seguido de 5-FU 600 mg/m² IV como una infusión continua de 22 horas. Día 2: Leucovorina 200 mg/m² infusión IV, seguida de 5-FU 400 mg/m² bolo IV dado en 2-4 minutos, seguido de 5-FU 600 mg/m² infusión IV como una infusión continua de 22 horas) con bevacizumab (AVASTIN®: Ab monoclonal humanizado contra factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), Genentech) (día 1: 10 mg/kg IV) cada 2 semanas, o un anticuerpo anti-DII4 (REGN421) a 0,25 a 10 mg/kg IV en el día 1, en combinación con el tratamiento previamente mencionado. El tratamiento se repite cada 2 semanas hasta la progresión del cáncer o se desarrolle toxicidad intolerable.

El criterio de valoración principal es la proporción de pacientes que han conseguido al menos una remisión parcial (una disminución del 30% o mayor en la suma de diámetros de lesiones cancerosas identificadas, de acuerdo con los criterios RECIST (por Eisenhauer *et al.*, 2009, *supra*) y los criterios de valoración secundarios incluyen tiempo hasta la progresión del tumor, y supervivencia global. La remisión de la enfermedad se evalúa usando examen físico, métodos radiológicos (rayos X, tomografía computada, o imágenes de resonancia magnética), y el nivel de antígeno carcino-embriionario (CEA) medido en suero. También se evalúan otros parámetros clínicos, tales como eventos adversos, usando los criterios de terminología común para eventos adversos del National Cancer Institute (CTCAE v 4.0, *supra*). Las muestras de suero de los pacientes se toman para medir las concentraciones en suero del anticuerpo anti-DII4 así como la presencia de posibles anticuerpos contra el anticuerpo anti-DII4.

Ejemplo 11: Fase II de Ab DII4 en combinación con docetaxel

El estudio se realizará en pacientes adultos cáncer de mama avanzado inoperable o metastásico. Pueden haber fracasado en terapia adyuvante previa. Los pacientes que están diagnosticados con cáncer de mama de acuerdo con examen patológico, físico y radiológico, con un valor del estado de rendimiento ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) de 0-2 (en escala 0-5) y parámetros clínicos renales, hepáticos y hematológicos adecuados son elegibles para su participación en el estudio. Se permite que los pacientes reciban cuidados de apoyo concurrentes, tales como transfusiones de sangre y analgésicos, durante el estudio. Los pacientes pueden no haber recibido quimioterapia previa o terapia biológica para enfermedad metastásica. Se tratará una cohorte secuencia de hasta 100 pacientes después de pasar de forma satisfactoria los procedimientos de selección para determinar la elegibilidad del paciente. Los pacientes recibirán en el día 1: anticuerpo anti-DII4 (REGN421) a 0,25 a 10 mg/kg IV durante 30 minutos más docetaxel 75 mg/m² infusión IV durante 30 minutos. El régimen de combinación se repite cada 3 semanas hasta la progresión del cáncer o se desarrolle toxicidad intolerable.

El criterio de valoración principal es evaluar la eficacia del tratamiento en base a la tasa de respuesta tumoral de acuerdo con los criterios RECIST (por Eisenhauer *et al.*, 2009, *Eur J Cancer* 45:228-247), y el tiempo hasta la progresión de la enfermedad. Los criterios de valoración secundarios incluirán una descripción de la seguridad y del perfil farmacocinético (PK) del anticuerpo anti-DII4 cuando se da en combinación con docetaxel así como la determinación de la inmunogenicidad al anticuerpo anti-DII4. La remisión de la enfermedad se evalúa usando examen físico, métodos radiológicos (rayos X, tomografía computada, o imágenes de resonancia magnética). Los eventos adversos se evalúan usando los criterios de terminología común para eventos adversos del National Cancer Institute (CTCAE v 4.0, disponible en el Cancer Therapy Evaluation Program o CTEP en el sitio web del National Cancer Institute). Se toman muestras de sangre de los pacientes para medir las concentraciones del anticuerpo anti-DII4 así como la presencia de posibles anticuerpos contra el anticuerpo anti-DII4.

Ejemplo 12: Un estudio en fase II de Ab DII4 con cisplatino/gemcitabina

El estudio se realizará en pacientes adultos con cáncer de vejiga avanzado inoperable o metastásico. Los pacientes que están diagnosticados con cáncer de vejiga invasivo de acuerdo con el examen patológico, físico y radiológico, con un valor del estado de rendimiento ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) de 0-2 (en escala 0-5) y parámetros clínicos renales, hepáticos y hematológicos adecuados son elegibles para su participación en el estudio. Se permite que los pacientes reciban cuidados de apoyo concurrentes, tales como transfusiones de sangre y analgésicos, durante el estudio. Los pacientes pueden no haber recibido quimioterapia previa o terapia biológica para enfermedad metastásica. Se tratará una cohorte secuencia de hasta 100 pacientes después de pasar de forma satisfactoria los procedimientos de selección para determinar la elegibilidad del paciente. Los pacientes recibirán anticuerpo anti-DII4 (REGN421) a 0,25 a 10 mg/kg IV durante 30 minutos en el día 1 más gemcitabina 1.000 mg/m² durante 30 a 60 minutos en los días 1, 8, y 15, más cisplatino 70 mg/m² en el día 2. El régimen de combinación se repite cada 4 semanas hasta la progresión del cáncer o se desarrolle toxicidad intolerable.

El criterio de valoración principal es evaluar la eficacia del tratamiento en base a la tasa de respuesta tumoral de acuerdo con los criterios RECIST (por Eisenhauer *et al.*, 2009, *Eur J Cancer* 45:228-247), y el tiempo hasta la progresión de la enfermedad. Los criterios de valoración secundarios incluirán perfil de seguridad y una descripción

5 del perfil farmacocinético (PK) del anticuerpo anti-Dll4 cuando se da en combinación con docetaxel y la determinación de la inmunogenicidad al anticuerpo anti-Dll4. La remisión de la enfermedad se evalúa usando examen físico, métodos radiológicos (rayos X, tomografía computada, o imágenes de resonancia magnética). Los eventos adversos se evalúan usando los criterios de terminología común para eventos adversos del National Cancer Institute (CTCAE v 4.0, disponible en el Cancer Therapy Evaluation Program o CTEP en el sitio web del National Cancer Institute). Se toman muestras de sangre de los pacientes para medir las concentraciones del anticuerpo anti-Dll4 así como la presencia de posibles anticuerpos contra el anticuerpo anti-Dll4.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- <120> Método para tratar el cáncer con antagonista de DLL4 y agente quimioterapéutico
- 15 <130> 6043A-WO
- <140> A asignar
- <141> Presentada junto con este documento
- 20 <150> 61/301.881
- <151> 05-02-2010
- <150> 61/220.465
- <151> 25-06-2009
- 25 <160> 118
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 30 <210> 1
- <211> 2058
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- 35 <400> 1

ES 2 556 804 T3

```

atggcggcag cgtcccggag cgcctctggc tgggcgctac tgctgctggt ggcactttgg 60
cagcagcgcg cggccggctc cggcgtcttc cagctgcagc tgcaggagt catcaacgag 120
cgcggcgctac tggccagtgg gcggccttgc gagcccggct gccggacttt cttccgcgtc 180
tgcttaagc acttccagge ggtcgtctcg cccggaccct gcacctegg gaccgtctcc 240
acgccggtat tgggcaccaa ctcttctcgt gtccgggacg acagtagcgg cggggggcgc 300
aacctctcc aactgccctt caatttcacc tggccgggta ccttctcgt catcatcgaa 360
gcttggcacg cgcaggaga cgacctgcgg ccagaggcct tgccaccaga tgcactcatc 420
agcaagatcg ccatccaggg ctccctagct gtgggtcaga actggttatt ggatgagcaa 480
accagcacc tcacaaggct gcgctactct taccgggtca tctgcagtga caactactat 540
ggagacaact gctcccgcct gtgcaagaag cgcaatgacc acttcggcca ctatgtgtgc 600
cagccagatg gcaacttgtc ctgcctgccc ggttggactg ggaatattg ccaacagcct 660
atctgtcttt cgggctgtca tgaacagaat ggctactgca gcaagccagc agagtgcctc 720
tgccgccag gctggcaggg ccggctgtgt aacgaatgca tccccacaa tggctgtcgc 780
cacggcacct gcagcactcc ctggcaatgt acttgtgatg agggctgggg aggcctgttt 840
tgtgaccaag atctcaacta ctgcaaccac cactccccat gcaagaatgg ggcaacgtgc 900
tccaacagtg ggcagcgaag ctacacctgc acctgtcgc caggctacac tgggtgtggac 960
tgtgagctgg agctcagcga gtgtgacagc aacctgtc gcaatggagg cagctgtaag 1020
gaccaggagg atggctacca ctgectgtgt cctccgggct actatggcct gcattgtgaa 1080
cacagcacct tgagctgcgc cgaactcccc tgcttcaatg ggggtcctc cggggagcgc 1140
aaccaggggg ccaactatgc ttgtgaatgt ccccccaact tcaccggctc caactgcgag 1200
aagaaagtgg acaggtgcac cagcaacccc tgtgccaacg ggggacagt cctgaaccga 1260
ggtccaagcc gcatgtgccg ctgocgtcct ggattcacgg gcacctact tgaactccac 1320
gtcagcgact gtgccgtaa cccttgcgcc cacgggtgca cttgccatga cctggagaat 1380
gggtcatgt gcacctgcc tgccggcttc tctggccgac gctgtgaggt ggggacatcc 1440
atcgatgcct gtgcctcgag tccctgcttc aacagggcca cctgctacac cgacctctcc 1500
acagacacct ttgtgtgcaa ctgcecttat ggctttgtgg gcagccgctg cgagttcccc 1560
gtgggcttgc cgcaccgctt cccctgggtg gccgtctcgc tgggtgtggg gctggcagtg 1620
ctgctggtac tgctgggat ggtggcagtg gctgtgcggc agctgcccgt tcgacggccg 1680
gacgacggca gcaggaagc catgaacaac ttgtcggact tccagaagga caacctgatt 1740
cctgccgccc agcttaaaaa cacaaaccag aagaaggagc tggaaagtga ctgtggcctg 1800
gacaagtcca actgtggcaa acagcaaac cacacattgg actataatct ggccccaggg 1860

ccccggggc gggggaccat gccaggaaag tttccccaca gtgacaagag cttaggagag 1920
aaggcgccac tgcggttaca cagtgaaaag ccagagtgtc ggatatcagc gatatgctcc 1980
cccagggact ccatgtacca gtctgtgtgt ttgatatcag aggagaggaa tgaatgtgtc 2040
attgccacgg aggtataa

```

- <210> 2
- <211> 685
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

- <400> 2

ES 2 556 804 T3

Met	Ala	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Ala	Ser	Gly	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
Val	Ala	Leu	Trp	Gln	Gln	Arg	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Val	Phe	Gln	Leu
			20					25					30		
Gln	Leu	Gln	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu	Arg	Gly	Val	Leu	Ala	Ser	Gly	Arg
		35					40					45			
Pro	Cys	Glu	Pro	Gly	Cys	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Val	Cys	Leu	Lys	His
	50					55					60				
Phe	Gln	Ala	Val	Val	Ser	Pro	Gly	Pro	Cys	Thr	Phe	Gly	Thr	Val	Ser
65					70					75					80
Thr	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Asn	Ser	Phe	Ala	Val	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser
				85					90					95	
Gly	Gly	Gly	Arg	Asn	Pro	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Thr	Trp	Pro
			100					105					110		
Gly	Thr	Phe	Ser	Leu	Ile	Ile	Glu	Ala	Trp	His	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp
		115					120					125			
Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	Leu	Ile	Ser	Lys	Ile	Ala
	130					135					140				
Ile	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Gly	Gln	Asn	Trp	Leu	Leu	Asp	Glu	Gln
145					150					155					160
Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Val	Ile	Cys	Ser
				165					170					175	
Asp	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Asn	Cys	Ser	Arg	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg	Asn
		180						185					190		
Asp	His	Phe	Gly	His	Tyr	Val	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly	Asn	Leu	Ser	Cys
		195					200					205			
Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Cys	Gln	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu	Ser
	210					215					220				
Gly	Cys	His	Glu	Gln	Asn	Gly	Tyr	Cys	Ser	Lys	Pro	Ala	Glu	Cys	Leu
225					230					235					240
Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Gln	Gly	Arg	Leu	Cys	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro	His
				245					250					255	
Asn	Gly	Cys	Arg	His	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr	Pro	Trp	Gln	Cys	Thr	Cys
			260					265					270		
Asp	Glu	Gly	Trp	Gly	Gly	Leu	Phe	Cys	Asp	Gln	Asp	Leu	Asn	Tyr	Cys
		275					280					285			
Thr	His	His	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ala	Thr	Cys	Ser	Asn	Ser	Gly
	290					295					300				
Gln	Arg	Ser	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Val	Asp
305					310					315					320
Cys	Glu	Leu	Glu	Leu	Ser	Glu	Cys	Asp	Ser	Asn	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly
				325					330					335	
Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Glu	Asp	Gly	Tyr	His	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro
			340					345					350		
Gly	Tyr	Tyr	Gly	Leu	His	Cys	Glu	His	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Ala	Asp
		355					360					365			
Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Glu	Arg	Asn	Gln	Gly	Ala
	370					375					380				
Asn	Tyr	Ala	Cys	Glu	Cys	Pro	Pro	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys	Glu
385					390					395					400

ES 2 556 804 T3

Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln
 405 410 415
 Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys Arg Cys Arg Pro Gly Phe
 420 425 430
 Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser Asp Cys Ala Arg Asn Pro
 435 440 445
 Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Leu Met Cys
 450 455 460
 Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg Thr Ser
 465 470 475 480
 Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe Asn Arg Ala Thr Cys Tyr
 485 490 495
 Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly Phe
 500 505 510
 Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe Pro
 515 520 525
 Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu Ala Val Leu Leu Val Leu
 530 535 540
 Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg Pro
 545 550 555 560
 Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln Lys
 565 570 575
 Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys Lys
 580 585 590
 Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys Gln
 595 600 605
 Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Arg
 610 615 620
 Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly Glu
 625 630 635 640
 Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile Ser
 645 650 655
 Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu Ile
 660 665 670
 Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
 675 680 685

5 <210> 3
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 3

caggtgcagc tgggtgcagtc aggtccagga ctgggtgaagc cctcgcagaa cctctcactc 60
 acctgtgccca tctccggaga cagtgtctct agtgateagtg ctgcttgga cttggatcagg 120
 cagtcceccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggat 180
 aatgattatg cagtatctgt gaaaagtcga ataaccttca acccagatac atccaagaac 240
 cacatctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctatcta ttactgtgca 300
 agagagggggg ataattggaa ttacggctgg ctcgaccct ggggccaggg aaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

15 <210> 4
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 556 804 T3

<220>
<223> Sintética

<400> 4

5

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Ser	Asp
			20					25					30		
Ser	Ala	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Lys	Trp	Tyr	Asn	Asp	Tyr	Ala
	50					55					60				
Val	Ser	Val	Lys	Ser	Arg	Ile	Thr	Phe	Asn	Pro	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn
65					70					75					80
His	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile
				85					90					95	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Asp	Asn	Trp	Asn	Tyr	Gly	Trp	Leu	Asp
			100					105					110		
Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115						120							

<210> 5
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintética

15

<400> 5
ggagacagtg tctctagtag tagtgctgct 30

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Sintética

25

<400> 6

Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Ser	Asp	Ser	Ala	Ala
1				5					10

30

<210> 7
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Sintética

<400> 7
acatactaca ggtccaagtg gtataat 27

40

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>

ES 2 556 804 T3

<223> Sintética

<400> 8

Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn
1 5

5

<210> 9

<211> 42

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

15

<400> 9

gcaagagagg gggataattg gaattacggc tggctcgacc cc 42

<210> 10

<211> 14

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

25

<400> 10

Ala Arg Glu Gly Asp Asn Trp Asn Tyr Gly Trp Leu Asp Pro
1 5 10

30

<210> 11

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Sintética

<400> 11

```

gacatccagt tgacccagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtc gagcctcctt cttagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacaa ctctgatct atttggtttc tagtcggggcc 180
tccggggtec ctgacaggtt cagtggcagt ggatccggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga ttttgggaatt tattattgta tgcaagctct acaaactccg 300
tacacttttg gccgggggac caaggtggaa atcaaa 336
    
```

40

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

50

<400> 12

ES 2 556 804 T3

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser
          20           25           30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro
          50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
          85           90           95
Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105           110

```

5 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 13
 cagagcctcc ttctagtaa tggatacaac tat 33

15 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 14

```

Gln Ser Leu Leu Leu Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
 1           5           10

```

25 <210> 15
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 15
 ttggttct 9

40 <210> 16
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

45 <400> 16

ES 2 556 804 T3

Leu Val Ser
1

5
<210> 17
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Sintética

<400> 17
atgcaagctc tacaaactcc gtacact 27

15
<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Sintética

<400> 18

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Tyr Thr
1 5

25
<210> 19
<211> 369
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Sintética

35
<400> 19

```

gagggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgtcattt ttatggtatg atggaactaa taaaaactat 180
gtagagtccg tgaagggccg attcaccatc tcaagagaca attccaagaa tatgctgtat 240
ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcac 300
gatttttagga gtggttatga ggggtggttc gaccctctggg gccagggaac cctgggtcacc 360
gtctctctca
    
```

40
<210> 20
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<223> Sintética

<400> 20

ES 2 556 804 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Phe	Leu	Trp	Tyr	Asp	Gly	Thr	Asn	Lys	Asn	Tyr	Val	Glu	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Met	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Glu	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90						95
Ala	Arg	Asp	His	Asp	Phe	Arg	Ser	Gly	Tyr	Glu	Gly	Trp	Phe	Asp	Pro
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120								

5 <210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 21
 ggattcacct tcagtagtta tggc 24

15 <210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 22

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

25 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 23
 ttatggtatg atggaactaa taaa 24

40 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

45 <400> 24

ES 2 556 804 T3

Leu Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Lys
 1 5

5 <210> 25
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 25
 gcgagagatc acgattttag gagtggttat gaggggtggt tcgacccc 48

15 <210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 26

Ala Arg Asp His Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Glu Gly Trp Phe Asp Pro
 1 5 10 15

25 <210> 27
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 27

```

gaaatagtga tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catoccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagatdddg cagtttatta ctgtcaaac cgtagcaact ggctcccac tttcgggcga 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321
  
```

40 <210> 28
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética

<400> 28

ES 2 556 804 T3

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Pro
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

5 <210> 29
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 29
 cagagtgtta gcagctac 18

15 <210> 30
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 30

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5

25 <210> 31
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 31
 gatgcatcc 9

40 <210> 32
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

45 <400> 32
 Asp Ala Ser

1

ES 2 556 804 T3

5
 <210> 33
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10
 <400> 33
 caacaccgta gcaactggcc tcccact 27

15
 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

20
 <400> 34

Gln His Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr
 1 5

25
 <210> 35
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Sintética

<400> 35

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgatgg ctccatcaac agtgttgaat cctactggac ctggatccgc 120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt ggatacatca aatacactgg gggcatccac 180
tataaccogt ccctcaagag tcgacttgcc atatcagtg acacgtcaaa gaaccagttc 240
tcctgaaaa tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagca 300
cgtggaagtc atacttttga tgtctggggc caggggacaa tggtcaccgt ctcttca 357
  
```

35
 <210> 36
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Sintética

<400> 36

45

ES 2 556 804 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Asp	Gly	Ser	Ile	Asn	Ser	Val
			20					25					30		
Glu	Ser	Tyr	Trp	Thr	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Lys	Tyr	Thr	Gly	Gly	Ile	His	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50					55					60				
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Ala	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
65					70					75					80
Ser	Leu	Lys	Met	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Cys	Ala	Arg	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Thr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

5 <210> 37
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 37
 gatggctcca tcaacagtgt tgaatcctac 30

15 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 38

Asp	Gly	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser	Tyr
1				5					10

25 <210> 39
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 39
 atcaaataca ctgggggcat c 21

40 <210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

45 <400> 40

ES 2 556 804 T3

Ile Lys Tyr Thr Gly Gly Ile
 1 5

5 <210> 41
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 41
 gcgagagcac gtggaagtca tactttgat gtc 33

15 <210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 42

Ala Arg Ala Arg Gly Ser His Thr Phe Asp Val
 1 5 10

25 <210> 43
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 43

```

gaaattgtgc tgactcagtc tccaggcacc ctgtcttggc ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agtaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccagact cctcatttat ggtgcatcca gcagggtcac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcactgta ttattgtcag cagtatagta ggtcaccgat caccttcggc 300
caagggacca aagtggatat caaa 324
  
```

40 <210> 44
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética

<400> 44

ES 2 556 804 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Trp Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Val Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Ser Pro
 85 90 95
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

5 <210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 45
 cagagtatta gcagtaacta c 21

15 <210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 46

Gln Ser Ile Ser Ser Asn Tyr
 1 5

25 <210> 47
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 47
 ggtgcatcc 9

40 <210> 48
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

45 <400> 48

Gly Ala Ser
 1

ES 2 556 804 T3

<210> 49
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 49
 10 cagcagtata gtaggtcacc gatcacc 27
 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 20 <400> 50
 Gln Gln Tyr Ser Arg Ser Pro Ile Thr
 1 5
 <210> 51
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Sintética
 30 <400> 51
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcaac agtgttactt actactggac ctggatccgc 120
 cagcaccagc ggaggggctt agagtggatt gggtagatca aattcagtgg gagcacctac 180
 tacaaccogt ccctcaaggc tcgagtcacc atatcagtgg acacgtctaa gaaccaattc 240
 tcccttaaaa ttaactctgt gactgccgcg gacacggcgc tgttttactg tgcgagagct 300
 tctggaagtc atacttttga tatctggggc caagggacaa tggtcaccgt ctccctca 357
 35
 <210> 52
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 52
 45

ES 2 556 804 T3

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Val
 20           25           30
Thr Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Arg Gly Leu Glu
 35           40           45
Trp Ile Gly Tyr Ile Lys Phe Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50           55           60
Leu Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65           70           75
Ser Leu Lys Ile Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Phe Tyr
 85           90           95
Cys Ala Arg Ala Ser Gly Ser His Thr Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100          105          110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

```

5 <210> 53
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 53
 ggtggctcca tcaacagtgt tacttactac 30

15 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 54

```

Gly Gly Ser Ile Asn Ser Val Thr Tyr Tyr
 1           5           10

```

25 <210> 55
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 55
 atcaaattca gtgggagcac c 21

40 <210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

45 <400> 56

ES 2 556 804 T3

Ile Lys Phe Ser Gly Ser Thr
 1 5

5
 <210> 57
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Sintética

<400> 57
 gcgagagctt ctggaagtca tactttgat atc 33

15
 <210> 58
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Sintética

<400> 58

Ala Arg Ala Ser Gly Ser His Thr Phe Asp Ile
 1 5 10

25
 <210> 59
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Sintética

35
 <400> 59

```

gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc aacagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctct ggtgctcca gcagggtcac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttggaatgta ttactgtcag cagtatagta ggtcaccgat caccttcggc 300
caagggacca agctggagat caaa 324
  
```

40
 <210> 60
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Sintética

<400> 60

ES 2 556 804 T3

```

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser
 20           25           30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35           40           45
Ile Ser Gly Ala Ser Ser Arg Val Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50           55           60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65           70           75           80
Pro Glu Asp Phe Gly Met Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Ser Pro
 85           90           95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100           105

```

5 <210> 61
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 61
 cagagtgtta gcaacagcta c 21

15 <210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 62

```

Gln Ser Val Ser Asn Ser Tyr
 1           5

```

25 <210> 63
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 63
 ggtgcgtcc 9

40 <210> 64
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

45 <400> 64

```

Gly Ala Ser
 1

```

ES 2 556 804 T3

<210> 65
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 65
 10 cagcagtata gtaggtcacc gatcacc 27
 <210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 20 <400> 66
 Gln Gln Tyr Ser Arg Ser Pro Ile Thr
 1 5
 <210> 67
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Sintética
 30 <400> 67
 gaagtgcagc tgggtgcagtc tgggggagcc ttggtacaac ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttaac aactttgcca tgacctgggt ccgccagget 120
 ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaact attagtggta gtggcggtga cacatactgc 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgttc gaaagatggc 300
 gccttctata gtggctacga aactactctg gccagggaa ccacggtcac cgtctctctca 360
 35
 <210> 68
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 68
 45

ES 2 556 804 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Asn	Phe
			20					25					30		
Ala	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Thr	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Val	Asp	Thr	Tyr	Cys	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ser	Lys	Asp	Gly	Ala	Phe	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Glu	His	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

5 <210> 69
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 69
 ggattcacct ttaacaactt tgcc 24

15 <210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 70

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Phe Ala
 1 5

25 <210> 71
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 71
 attagtggta gtggcgttga caca 24

40 <210> 72
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

45 <400> 72

ES 2 556 804 T3

Ile Ser Gly Ser Gly Val Asp Thr
 1 5

5
 <210> 73
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Sintética

<400> 73
 tcgaaagatg ggccttcta tagtggctac gaacactac 39

15
 <210> 74
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Sintética

<400> 74

Ser Lys Asp Gly Ala Phe Tyr Ser Gly Tyr Glu His Tyr
 1 5 10

25
 <210> 75
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Sintética

35
 <400> 75

```

gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca acagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
tctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacctcg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggagat caaa 324
  
```

40
 <210> 76
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Sintética

<400> 76

ES 2 556 804 T3

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 77
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 77
 cagagtgtta gcagcagcta c 21

15 <210> 78
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 78

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

25 <210> 79
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30

<220>
 <223> Sintética

35 <400> 79
 ggtacatcc 9

40 <210> 80
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

45 <400> 80

Gly Thr Ser
 1

ES 2 556 804 T3

5 <210> 81
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10 <400> 81
 cagcagtatg gtagctcacc tcggacg 27

15 <210> 82
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

20 <400> 82

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr
 1 5

25 <210> 83
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

<400> 83

35 gaagtgcagc tgggtgcagtc tggacctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc tactatggta tcagttggat acgacagacc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acgatggtaa cacagactat 180
 gcacagaagt tccaagacag aatcaccatg accacagaca catcctcgac cacagcctac 240
 atggaactga ggagcctgag atctgacgac acggccgtct attactgtgc gaggtatagt 300
 tggacaagaagc actgggttcga ccctggggc caggaacca tggtcaccgt ctcttca 357

40 <210> 84
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

45 <400> 84

ES 2 556 804 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Tyr	Tyr
			20					25					30		
Gly	Ile	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Asp	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55				60					
Gln	Asp	Arg	Ile	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Tyr	Ser	Trp	Asn	Lys	His	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 85
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 85
ggttacacct ttacctacta tggg 24

15 <210> 86
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

<400> 86

Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr Gly
1 5

25 <210> 87
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

35 <400> 87
atcagcgctt acgatggtaa caca 24

40 <210> 88
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

45 <400> 88

ES 2 556 804 T3

Ile Ser Ala Tyr Asp Gly Asn Thr
 1 5

5 <210> 89
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 89
 gcgaggata gttgaacaa gactggtc gacccc 36

15 <210> 90
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 90

Ala Arg Tyr Ser Trp Asn Lys His Trp Phe Asp Pro
 1 5 10

25 <210> 91
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 91

```

gaaattgtga tgacacagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga cagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttacc ggcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcatcca acagggccac tggcatcca 180
gacaggttca ctggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta tttctgtcaa cagtctgctt tctcacogtg gacgttcggc 300
caggggacca aggtggaaat caaa 324
  
```

40 <210> 92
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética

<400> 92

ES 2 556 804 T3

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Thr	Gly	Ser
			20					25					30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Ala	Phe	Ser	Pro
				85					90					95	
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

5 <210> 93
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 93
 cagagtgtta ccggcagcta c 21

15 <210> 94
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 94

Gln Ser Val Thr Gly Ser Tyr
 1 5

25 <210> 95
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 95
 ggtgcatcc 9

40 <210> 96
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

45 <400> 96

Gly Ala Ser
 1

ES 2 556 804 T3

<210> 97
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 97
 10 caacagtctg ctttctcacc gtggacg 27
 <210> 98
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 20 <400> 98
 Gln Gln Ser Ala Phe Ser Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 99
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Sintética
 30 <400> 99
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctgggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ttggatccgc 120
 cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatcc attatagtgg gaacaccac 180
 tacaatccga cctcaagag tcgaattacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tcccttgagg tgaactctgt gactgccgcg gacacggcgg tatactactg tgcgaggaat 300
 atgggttcggg gagttcactg gttcgacccc tggggccagg gaaccaaggc caccgtctcc 360
 tca 363
 35
 <210> 100
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 100
 45

ES 2 556 804 T3

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
      20           25           30
Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35           40           45
Trp Ile Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr His Tyr Asn Pro Thr
      50           55           60
Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65           70           75           80
Ser Leu Glu Val Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85           90           95
Cys Ala Arg Asn Met Val Arg Gly Val His Trp Phe Asp Pro Trp Gly
      100          105          110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115          120

```

5 <210> 101
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 101
 ggtggctcca tcagcagtggtggttactac 30

15 <210> 102
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 102

```

          Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr
          1           5           10

```

25 <210> 103
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 103
 atccattata gtggaacac c 21

40 <210> 104
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

45 <400> 104

ES 2 556 804 T3

Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr
 1 5

5
 <210> 105
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Sintética

<400> 105
 gcgaggaata tggctcgggg agttcactgg ttcgacccc 39

15
 <210> 106
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Sintética

<400> 106

Ala Arg Asn Met Val Arg Gly Val His Trp Phe Asp Pro
 1 5 10

25
 <210> 107
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Sintética

35
 <400> 107

```

gaaatagtgt tgacacagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga gagagccacc 60
ctcttctggt gggccagtcg gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctct ggtgcatcca gcagggccac tggcatocca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtata tttctgtcaa cagtatagta gttcaccgct cactttcggc 300
ggagggacca agctggagat caaaa 324
  
```

40
 <210> 108
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Sintética

<400> 108

ES 2 556 804 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Phe Cys Trp Ala Ser Arg Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Ser Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 109
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 109
 cggagtgtta gcagcagcta c 21

15 <210> 110
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 110

Arg Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

25 <210> 111
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 111
 ggtgcatcc 9

40 <210> 112
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

45 <400> 112

Gly Ala Ser
 1

ES 2 556 804 T3

5
 <210> 113
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10
 <400> 113
 caacagtata gtagttcacc gctcact 27

15
 <210> 114
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

20
 <400> 114

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro Leu Thr
 1 5

25
 <210> 115
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Sintética

<400> 115

```

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgtcattt ttatgggatg atggaactaa taaaaactat 180
gtagagtccg tgaagggccg attcaccatc tcaagagaca attccaagaa tatgctgtat 240
ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcac 300
gatttttagga gtggttatga ggggtggttc gaccctctggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcctca
  
```

35
 <210> 116
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

40
 <400> 116

45

ES 2 556 804 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Phe Leu Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Asn Tyr Val Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp His Asp Phe Arg Ser Gly Tyr Glu Gly Trp Phe Asp Pro
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 117
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 117

gaaatagtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagatattg cagtttatta ctgtcaacac cgtagcaact ggcctcccac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 118
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 118

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a ligando 4 tipo delta humano (hDII4) para su uso en el tratamiento del cáncer o la reducción o detención del crecimiento tumoral en un sujeto mediante la administración en combinación con un agente quimioterapéutico, donde el anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 de secuencias SEQ ID NO: 22, 24 y 26, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende las cadenas ligeras CDR1, CDR2 y CDR3 de secuencias SEQ ID NO: 30, 32 y 34, respectivamente, el agente quimioterapéutico es un agente quimioterapéutico basado en platino o un análogo de pirimidina, y el cáncer o tumor es una neoplasia sólida.
2. El anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno para el uso de la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia HCVR de SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 116, o una secuencia LCVR de SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 118.
3. El anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno para el uso de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una combinación HCVR/LCVR de SEQ ID NO: 20/28 o 116/118.
4. El anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde:
- (a) el agente quimioterapéutico basado en platino es cisplatino, carboplatino, iproplatino, u oxaliplatino; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos;
 - (b) el análogo de pirimidina es gemcitabina, 5-FU, o capecitabina; o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.
5. El anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno para el uso de la reivindicación 4, donde el agente quimioterapéutico es cisplatino o 5-FU.
6. Uso de un anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 de secuencias SEQ ID NO: 22, 24 y 26, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende las cadenas ligeras CDR1, CDR2 y CDR3 de secuencias SEQ ID NO: 30, 32 y 34, respectivamente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer o la reducción o detención del crecimiento tumoral en un sujeto mediante la administración en combinación con un agente quimioterapéutico, donde el agente quimioterapéutico es un agente quimioterapéutico basado en platino o un análogo de pirimidina, y el cáncer o tumor es una neoplasia sólida.
7. El anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el uso de la reivindicación 6, donde el cáncer se selecciona entre cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer pulmonar, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de hueso, cáncer cutáneo, y sarcoma maligno de tejido blando.
8. El anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno para el uso o el uso de la reivindicación 7, donde el cáncer se selecciona entre cáncer pulmonar, cáncer colorrectal o cáncer de vejiga.
9. El anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 7 a 8, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y el agente quimioterapéutico son para su administración de forma concurrente o secuencial.
10. El anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 7 a 8, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde dicho anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno se administra a un sujeto humano en combinación con dicho agente quimioterapéutico.
11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 de secuencias SEQ ID NO: 22, 24 y 26, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende las cadenas ligeras CDR1, CDR2 y CDR3 de secuencias SEQ ID NO: 30, 32 y 34, respectivamente, un agente quimioterapéutico seleccionado entre un agente quimioterapéutico basado en platino o un análogo de pirimidina, opcionalmente donde el agente quimioterapéutico es cisplatino o 5-FU, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Un kit que comprende un recipiente que comprende en el mismo un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 de secuencias SEQ ID NO: 22, 24 y 26, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende las cadenas ligeras CDR1, CDR2 y CDR3 de secuencias SEQ ID NO: 30, 32 y 34, respectivamente, y uno o más recipientes adicionales que comprenden en los mismos al menos un agente

quimioterápico seleccionado entre un agente quimioterápico basado en platino o un análogo de pirimidina, opcionalmente donde el agente quimioterápico es cisplatino o 5-FU.

5 13. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso en un método terapéutico para reducir la cantidad de un agente quimioterápico necesaria para conseguir un efecto terapéutico deseado en un sujeto que tiene un cáncer o tumor, que comprende administrar dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno al sujeto en combinación con el agente quimioterápico;

10 donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 de secuencias SEQ ID NO: 22, 24 y 26, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende las cadenas ligeras CDR1, CDR2 y CDR3 de secuencias SEQ ID NO: 30, 32 y 34, respectivamente

15 donde el agente quimioterápico es un agente quimioterápico basado en platino o un análogo de pirimidina, opcionalmente donde el agente quimioterápico es cisplatino o 5-FU;

y donde la cantidad del agente quimioterápico está reducida en comparación con la cantidad necesaria para el mismo efecto terapéutico en ausencia del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

20 14. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para el uso de la reivindicación 13, donde la cantidad de un agente quimioterápico necesaria para conseguir el efecto terapéutico deseado está reducida en al menos el 20%, o 30% a 50%.

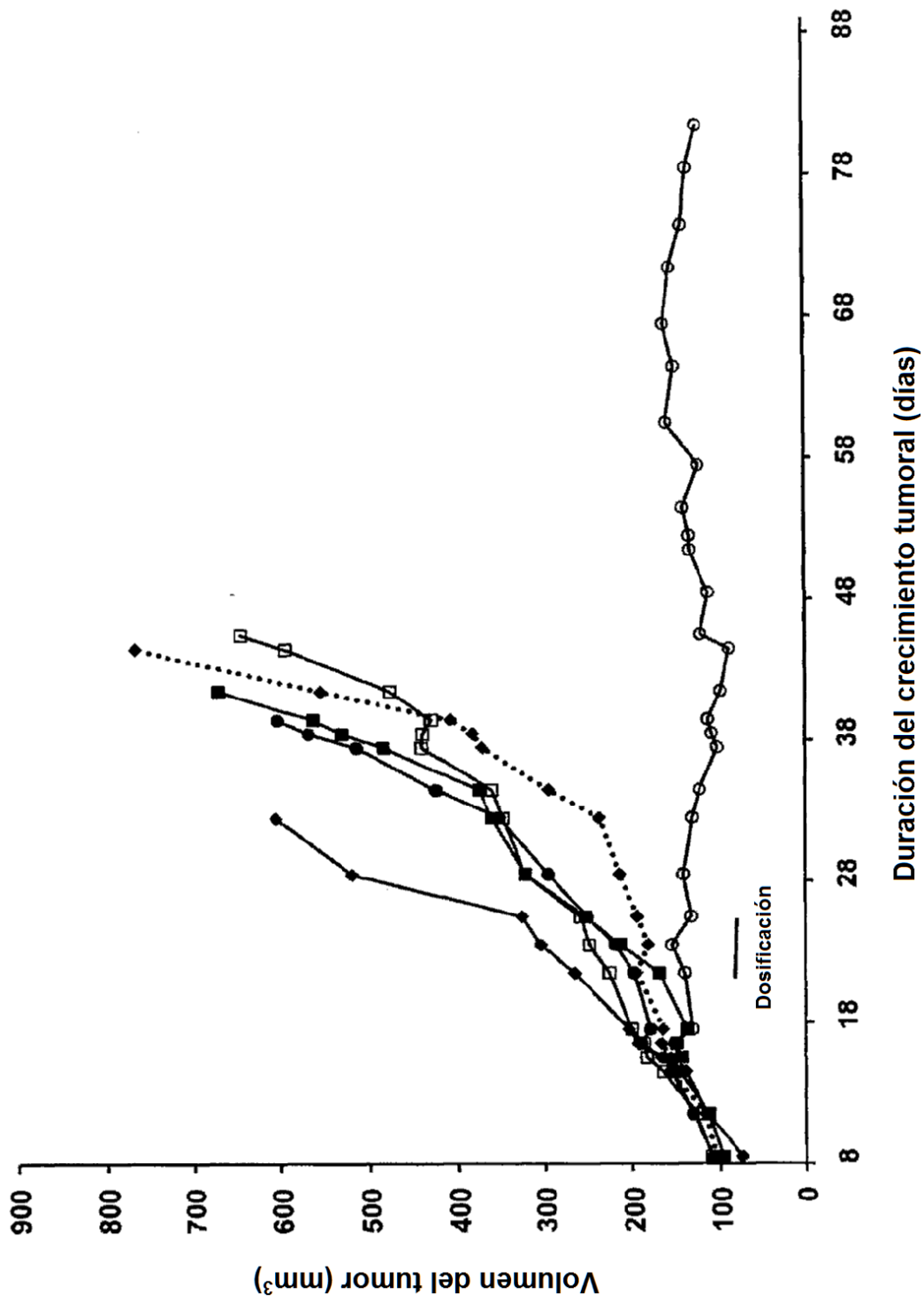


Fig. 1

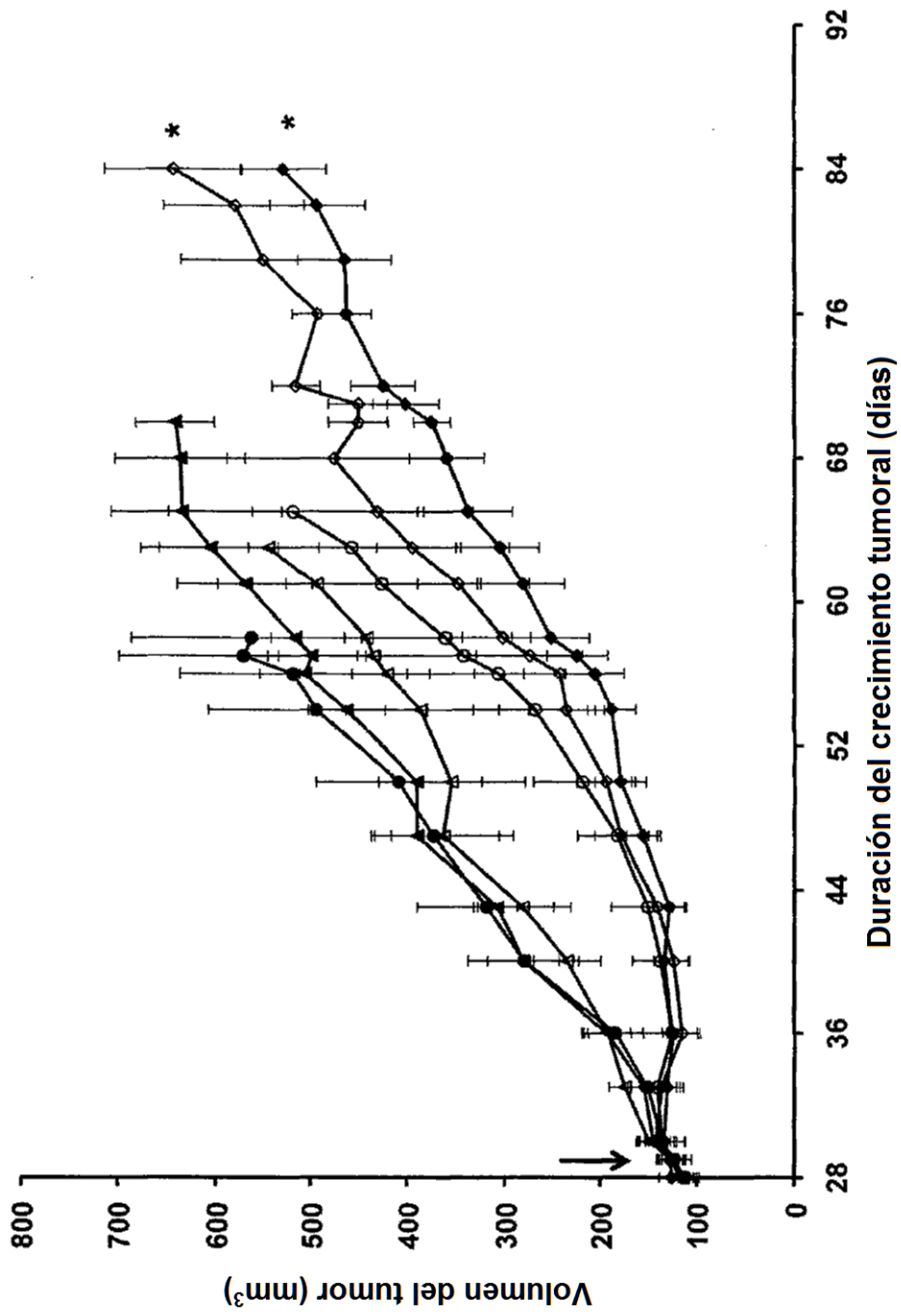


Fig. 2

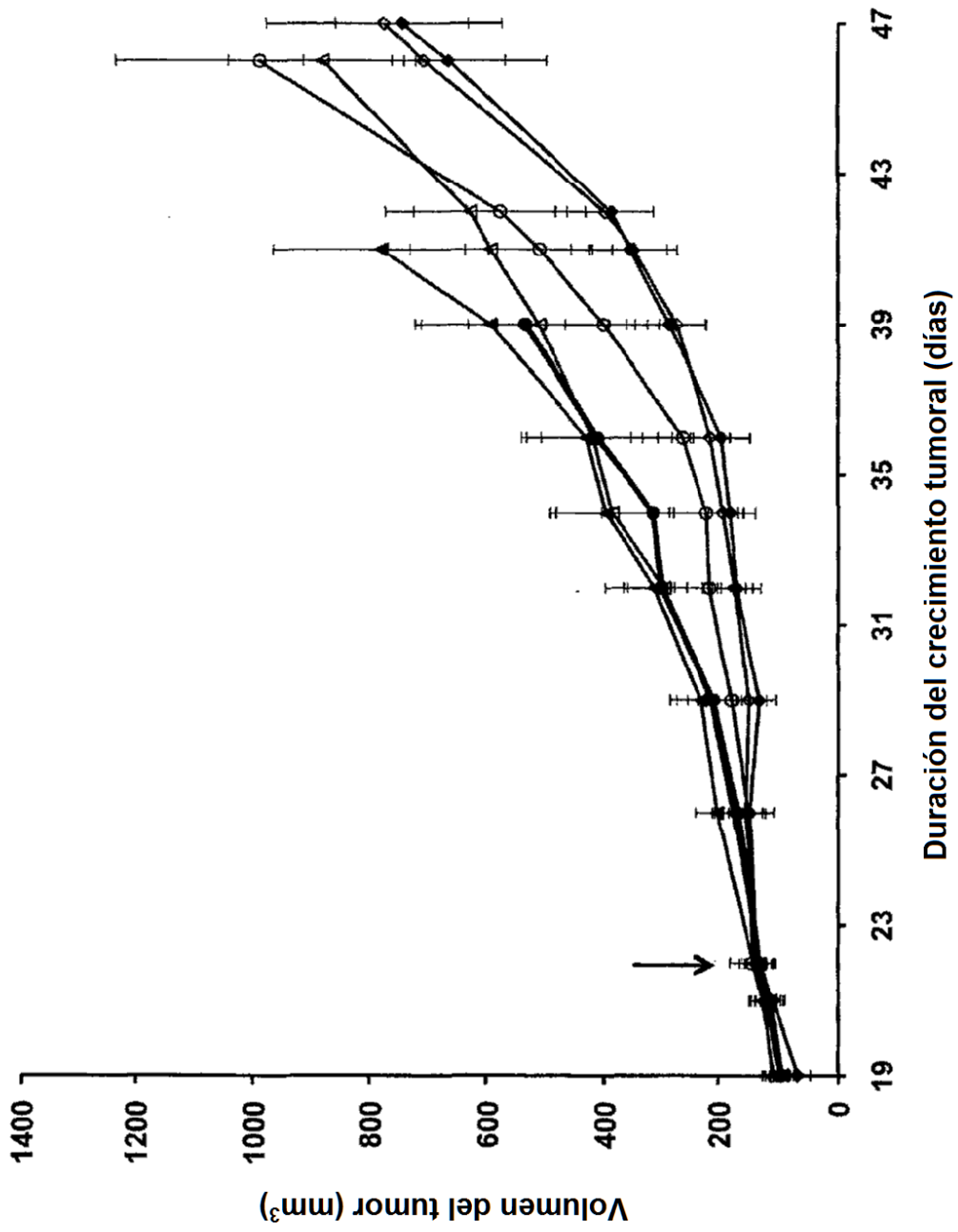


Fig. 3

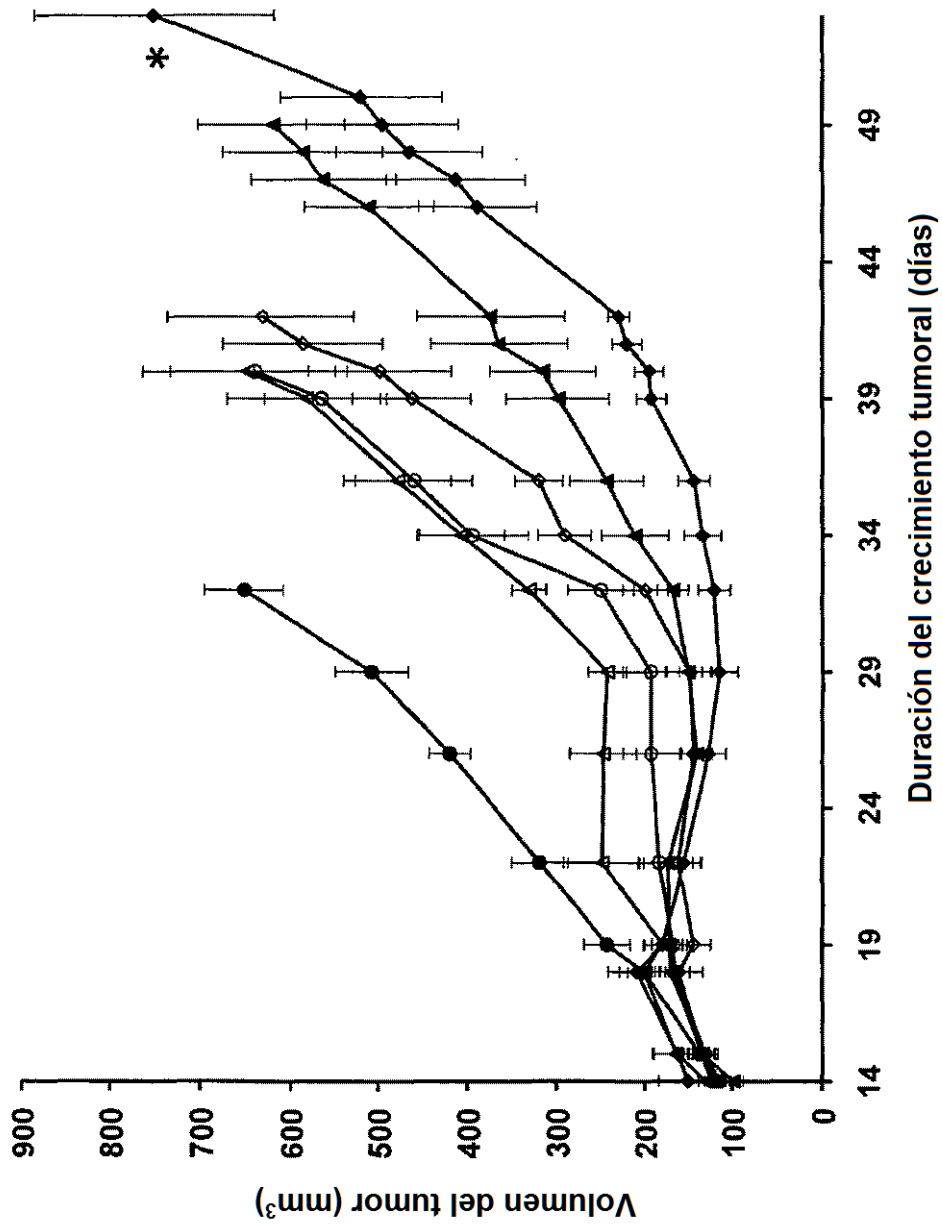


Fig. 4

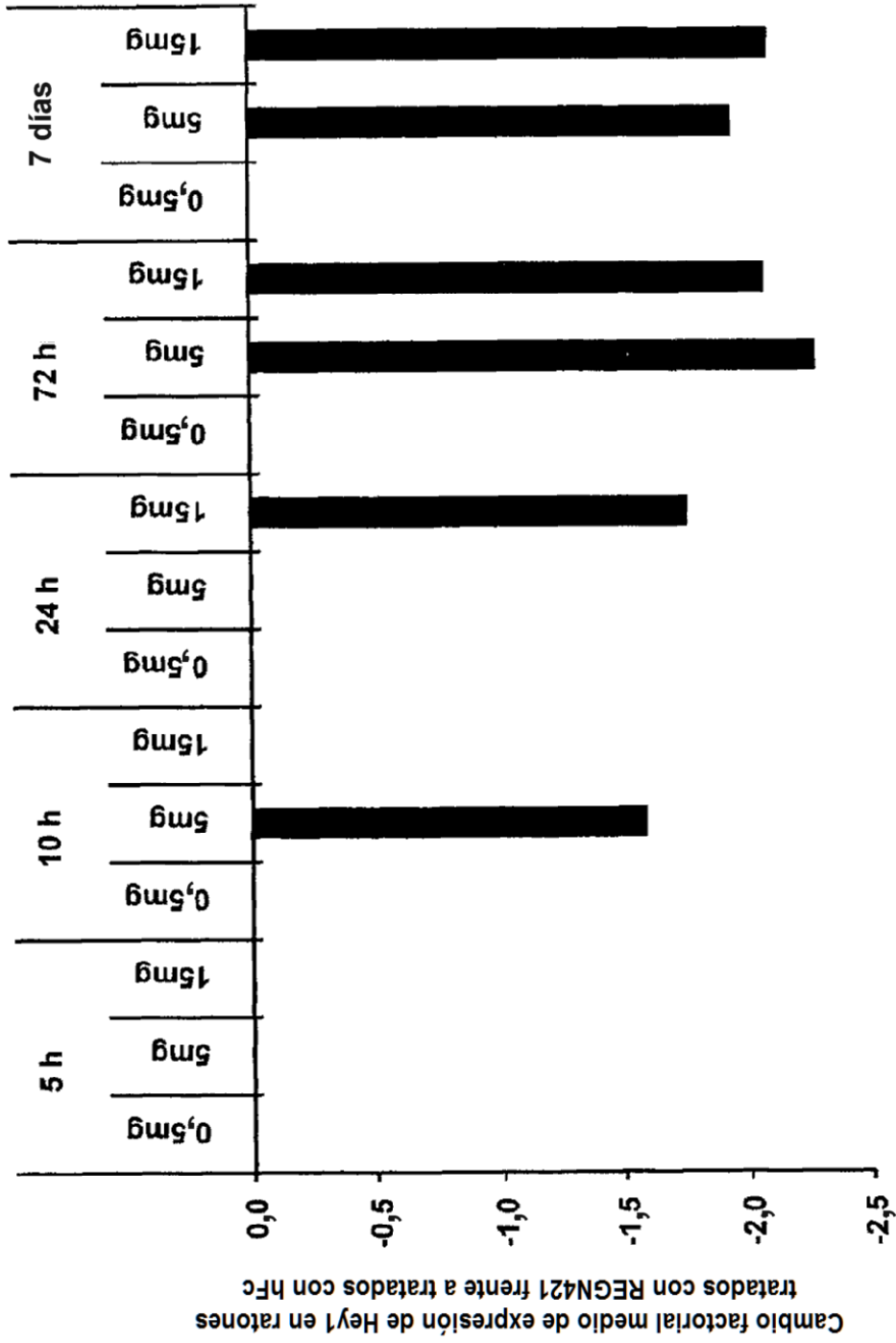


Fig. 5