

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 430**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2011 PCT/US2011/022817**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011 WO11094467**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2011 E 11701735 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2528945**

54 Título: **Métodos para tratar la diabetes con antagonistas de DLL4**

30 Prioridad:

**29.01.2010 US 299801 P**  
**06.07.2010 US 361687 P**  
**01.10.2010 US 388697 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.03.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SKOKOS, DIMITRIS**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 605 430 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

Métodos para tratar la diabetes con antagonistas de DLL4

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

10 Esta invención se refiere a antagonistas del ligando de tipo delta 4 (DII4) para su uso en métodos de tratamiento de la diabetes mellitus de tipo 1. Los métodos pueden prevenir, tratar o mejorar la diabetes al bloquear la unión de DII4 a un receptor Notch con antagonistas de DII4, aumentando de esta manera la cantidad de Treg. Además, la invención se refiere a antagonistas de DII4 para su uso en métodos para reducir los niveles de glucosa en sangre.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

Las interacciones entre los receptores Notch y sus ligandos representan una ruta conservada a lo largo de la evolución, importante no solo para decidir el destino de las células, sino también en la regulación de las decisiones de linaje en la hematopoyesis y en el timo en desarrollo (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999, *Science* 284: 770-776; Skokos *et al.*, 2007, *J Exp Med* 204: 1525-1531; y Amsen *et al.*, 2004, *Cell* 117: 515-526). Recientemente se ha demostrado que la inhibición de DII4-Notch1 conduce a un bloqueo completo del desarrollo de células T acompañado por la aparición ectópica de células B y una expansión de células dendríticas (DC) que pueden surgir por la conversión de destino de células Pro-T en DC dentro del timo (Hozumi *et al.*, 2008, *J Exp Med* 205(11): 2507-2513; Koch *et al.*, 2008, *J Exp Med* 205(11): 2515-2523; y Feyerabend *et al.*, 2009, *Immunity* 30: 1-13). De esta manera, cada vez hay más pruebas de que la señalización Notch es crítica para la determinación de la decisión del destino de las células a partir de células progenitoras hematopoyéticas. Además, se ha mostrado un control de retroalimentación de la homeostasis de células T reguladoras (Treg) por DC *in vivo* (Darrasse-Jéze *et al.*, 2009, *J Exp Med* 206(9): 1853-1862). Sin embargo, aún se desconoce el papel de la señalización Notch en el control del origen y el desarrollo de DC y, por consiguiente, la homeostasis de Treg. Esta es una cuestión clínicamente importante porque la identificación de nuevos métodos para inducir la expansión de Treg podría usarse como tratamiento para enfermedades y trastornos autoinmunitarios.

Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos del DII4 humano (hDII4) se muestran en las SEQ ID NOS: 1 y 2, respectivamente. Los antagonistas de DII4 y sus usos se desvelan en los documentos WO 2007/143689, WO 2007/070671, WO 2008/076379, WO 2008/042236, y WO/2008/019144.

35 **Breve resumen de la invención**

La presente invención está basada, en parte, en la observación por el presente inventor de que un anticuerpo que se une específicamente a DII4 y bloquea la unión de DII4 a receptores Notch, puede prevenir completamente la progresión de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en ratones, un modelo animal de esclerosis múltiple humana, mientras que un anticuerpo de control no previene la EAE. Además, el presente inventor ha descubierto que este efecto del anticuerpo anti-DII4 está asociado con un mayor número de células Treg. Además, también se ha observado que un anticuerpo anti-DII4 previene el aumento del nivel de glucosa en sangre y conserva el número y la morfología de los islotes pancreáticos en ratones NOD/ShiLtJ, un modelo animal de diabetes de tipo 1, y dichos efectos están mediados, al menos en parte, por la expansión de células Treg.

De esta manera, en un primer aspecto, la invención se refiere a un antagonista del ligando de tipo delta 4 (DII4) para su uso en la prevención, tratamiento o mejoría de la diabetes mellitus de tipo 1 en un sujeto, donde el antagonista bloquea la interacción entre DII4 y el receptor Notch y se previene, se trata o se mejora la diabetes, y donde el antagonista de DII4 es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a hDII4 y bloquea las rutas de señalización DII4-Notch, o una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de DII4 que está fusionado al dominio Fc de una IgG humana.

En un segundo aspecto, la invención se refiere al uso de un antagonista del ligando de tipo delta 4 (DII4) en la fabricación de un medicamento para prevenir, tratar o mejorar la diabetes mellitus de tipo 1 en un sujeto, donde el antagonista de DII4 es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a hDII4 y bloquea las rutas de señalización DII4-Notch, o una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de DII4 que está fusionado al dominio Fc de una IgG humana.

60 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un antagonista del ligando de tipo delta 4 (DII4) para su uso en la reducción del nivel de glucosa en sangre asociado con la diabetes mellitus de tipo 1 en un sujeto que lo necesita, donde el antagonista bloquea la interacción entre DII4 y el receptor Notch y se reduce el nivel de glucosa en sangre, y donde el antagonista de DII4 es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a hDII4 y bloquea las rutas de señalización DII4-Notch, o una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de DII4 que está fusionado al dominio Fc de una IgG humana.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere al uso de un antagonista del ligando de tipo delta 4 (DII4) en la fabricación de un medicamento para reducir el nivel de glucosa en sangre asociado con la diabetes mellitus de tipo 1 en un sujeto, donde el antagonista de DII4 es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a hDII4 y bloquea las rutas de señalización DII4-Notch, o una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de DII4 que está fusionado al dominio Fc de una IgG humana.

En una realización, el antagonista de DII4 para dicho uso descrito anteriormente en un anticuerpo para DII4 o fragmento del mismo ("Ac anti-DII4" o "Ac DII4") que se une específicamente a DII4 con alta afinidad y bloquea la unión de DII4 a los receptores Notch y/o bloquea las rutas de señalización DII4-Notch. El anticuerpo puede ser policlonal, monoclonal (mAc), quimérico, humanizado o un anticuerpo completamente humano o fragmento del mismo. El fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo monocatenario, un Fab o un (Fab')<sub>2</sub>.

En una realización, el Ac DII4 o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítipo dentro del dominio N-terminal (restos S27-R172), o el dominio Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) (restos V173-C217), o el dominio N-terminal-DSL (restos S27-C217), de hDII4 (SEQ ID NO: 2). En otra realización, el Ac DII4 o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítipo dentro de uno de los dominios de EGF, es decir, aproximadamente en los restos de aminoácido Q218-N251 (dominio 1), E252-D282 (dominio 2), D284-E322 (dominio 3), E324-E360 (dominio 4), S362-E400 (dominio 5), K402-E438 (dominio 6), H440-E476 (dominio 7), o S480-E518 (dominio 8), de hDII4 (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede unirse a un epítipo conformacional que implica más de uno de los epítopos enumerados anteriormente. El Ac DII4 o fragmento del mismo puede ser capaz de unirse a DII4 humano con alta afinidad y tiene una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de aproximadamente 1 nM o menor, aproximadamente 500 pM o menor, aproximadamente 300 pM o menor, aproximadamente 200 pM o menor, aproximadamente 100 pM o menor, o aproximadamente 50 pM o menor, medida por resonancia de plasmón superficial.

En una realización, el Ac DII4 o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 22, 24 y 26, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 30, 32 y 34, respectivamente. En otra realización, el Ac DII4 o fragmento del mismo comprende las secuencias de CDR de cadena pesada y ligera que comprenden una combinación de secuencias de CDR de las SEQ ID NOS: 22, 24, 26, 30, 32 y 34. En otra realización, el Ac DII4 comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 20 o 116, o una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 28 o 118. En otra realización, el Ac DII4 comprende una combinación de HCVR/LCVR de las SEQ ID NO: 20/28 (REGN281) o 116/118 (REGN421).

En ciertas realizaciones, el Ac DII4 comprende una combinación de CDR1/CDR2/CDR3 de cadena pesada y una combinación de 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 otra realización, el Ac DII4 comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 36, 52, 68, 84, o 100, o una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 12, 44, 60, 76, 92, o 108. En otra realización, el Ac 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 NOS: 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 SEQ ID NOS: 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 ciertas realizaciones, el antagonista de DII4 de la invención es una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de DII4 fusionado a un dominio Fc de una IgG humana.

En algunas realizaciones, la invención se refiere al antagonista de DII4 como se ha descrito anteriormente para su uso en cualquiera de los métodos descritos anteriormente, donde el antagonista de DII4 se coadministra conjunta o secuencialmente con al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente reductor de la glucosa en sangre (por ejemplo, insulina, análogos de insulina y similares), un agente inmunosupresor o inmunoinhibidor, agente antiinflamatorio, agente analgésico y similares, de los que muchos pueden tener efectos terapéuticos parcialmente coincidentes entre sí. Los inmunosupresores adecuados a usar en combinación con el antagonista de DII4 incluyen, pero sin limitación, glucocorticoides, ciclosporina, metotrexato, interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), tacrolimus, sirolimus, azatioprina, mercaptopurina, opiáceos, micofenolato, proteínas de unión a TNF, tales como infliximab,

eterncept, adalimumab y similares, antibióticos citotóxicos, tales como dactinomicina, antraciclinas, mitomicina C, bleomicina, mitramicina y similares, anticuerpos que se dirigen a células inmunitarias, tales como anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-CD3 y similares. Los agentes antiinflamatorios y/o analgésicos adecuados para las terapias de combinación con antagonistas anti-DII4 incluyen corticosteroides, antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como aspirina, ibuprofeno, naproxeno y similares, antagonistas de TNF- $\alpha$ , antagonistas de IL-1, antagonistas de IL-6, acetaminofeno, morfonomiméticos y similares.

En el presente documento también se describe una composición farmacéutica que comprende un antagonista de DII4, al menos un agente terapéutico adicional y un vehículo farmacológicamente aceptable. En una realización, el antagonista de DII4 es un Ac de DII4 o fragmento del mismo que se une específicamente a DII4 con alta afinidad y neutraliza las actividades de DII4, y al menos un agente terapéutico adicional es cualquiera de los agentes reductores de glucosa, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, analgésicos y similares, descritos anteriormente.

También se describe en el presente documento un kit que comprende un recipiente que comprende la composición farmacéutica de la presente invención, y un prospecto con instrucciones de uso. El kit puede comprender un recipiente que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a hDII4, comprendiendo otro recipiente al menos un agente terapéutico adicional descrito anteriormente.

Otros objetos y ventajas serán evidentes tras una revisión de la descripción detallada que se proporciona a continuación.

#### Breve descripción de las figuras

Las **Fig. 1A-1B** muestran los efectos del bloqueo de DII4 sobre el desarrollo de células T y células B. Se inyectaron en ratones anticuerpo anti-DII4 (REGN577) o fragmento Fc humano de control (hFc). Catorce días después, se recogieron los timos y se evaluaron las subseries de células T y células B por citometría de flujo. **Fig. 1A:** los gráficos de puntos muestran el número de células T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (precursores tímicos dobles negativos o "DN"), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (precursores tímicos dobles positivos o "DP"), CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (precursores tímicos simples positivos o "SP") y DN/CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (precursores tímicos en la fase DN1). Los números en los gráficos de puntos representan porcentajes (media  $\pm$  ETM) de subpoblaciones de células T entre las células tímicas totales. **Fig. 1B:** los histogramas muestran el porcentaje (media  $\pm$  DT) de células B (B220<sup>+</sup>) entre células DN1 (es decir, seleccionadas sobre CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>).

Las **Fig. 2A-2B** muestran los efectos del bloqueo de DII4 sobre las fases del desarrollo de células B en la médula ósea (**Fig. 2A**) y sobre la homeostasis de células B en el bazo (**Fig. 2B**). Los números en los gráficos de puntos representan porcentajes (media  $\pm$  ETM) de subseries de células B entre las células totales en médula ósea o en bazo. GC: células B del centro germinal; T1 y T2: subseries de células B; M: células B marginales; y Fo: células B foliculares.

Las **Fig. 3A-3D** muestran los efectos del bloqueo de DII4 sobre el desarrollo de células dendríticas (DC). **Fig. 3A:** los gráficos de puntos muestran la expansión de DC convencionales ("cDC"; B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) y DC plasmacitoides ("pDC"; PDCA1<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) en el timo tras el tratamiento con Ac anti-DII4. Los números en los gráficos de puntos representan porcentajes medios (media  $\pm$  ETM) de DC entre células totales en el día 14. **Fig. 3B:** los gráficos de barras muestran las cinéticas de la expansión de cDC y pDC en el timo de ratones tratados con Ac DII4 (■) y ratones tratados con control de hFc (□). **Fig. 3C:** los gráficos de puntos muestran los efectos del Ac DII4 sobre pre-DC (MHCN<sup>lo</sup>CD11c<sup>int</sup>CD135<sup>+</sup>Sirp- $\alpha$ <sup>int</sup>) y pre-DC tardías (MHCII<sup>lo</sup>CD11c<sup>int</sup>) en el timo. Los números en los gráficos de puntos representan los porcentajes medios (media  $\pm$  ETM) de pre-DC entre células totales el día 14. **Fig. 3D:** los gráficos de puntos muestran la presencia de DC MHCII<sup>lo</sup>CD11c<sup>int</sup> en la población de células pro-T DN1 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) en el timo de ratones tratados con Ac DII4, pero no en el timo de ratones tratados con Ac de control de hFc. Los números en los gráficos de puntos representan el número medio (media  $\pm$  ETM) de DC MHCII<sup>lo</sup>CD11c<sup>int</sup> entre la población de células pro-T DN1 el día 3.

La **Fig. 4** muestra el efecto del bloqueo de DII4 sobre el desarrollo del linaje de DC intratímico alternativo en DC inmaduras (imDC) procedentes de un progenitor común T/DC DN1. Células clasificadas como DN1 CD45.1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> se transfirieron por vía intratímica a ratones hospedadores CD45.2<sup>+</sup> tratados con Ac DII4 (■) o Ac de control de hFc (□).

La **Fig. 5** muestra el efecto del bloqueo de DII4 sobre los niveles en suero de CSF-1 (M-CSF), una citocina clave implicada en el desarrollo de DC. Se midieron los niveles de CSF-1 en suero de ratones no tratados (▩), o tratados con Ac de control de isotipo (□), o Ac DII4 (■) por ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La **Fig. 6** muestra los efectos de la delección genética de DII4, tras el tratamiento con tamoxifeno, sobre la homeostasis de células B y DC en ratones DLL4COIN que contienen una construcción de recombinasa Cre inducible por tamoxifeno, CreERT2. Los números en los gráficos de puntos representan los porcentajes medios (media  $\pm$  ETM) de las células B y tanto pDC como cDC entre las células totales en el timo.

Las **Fig. 7A-7C** muestran los efectos del bloqueo/delección de DII4 sobre la homeostasis de Treg. **Fig. 7A:** los gráficos de puntos muestran una expansión de Tregs dentro del timo de ratones tratados con Ac DII4 durante dos semanas, en comparación con ratones tratados con Ac de control de hFc. Los números en los gráficos de puntos representan los porcentajes medios (media  $\pm$  ETM) de Tregs entre células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en el timo. **Fig.**

**7B:** los gráficos de barras muestran la cinética del desarrollo de Treg en el timo (panel superior) y bazo (panel inferior), respectivamente, de los ratones tratados con Ac DII4 (■) y Ac de control de hFc (□). **Fig. 7C:** los gráficos de puntos muestran una expansión de células Treg dentro del timo de ratones DLL4COIN tratados con tamoxifeno (TAM), en comparación con ratones DLL4COIN de control tratados con control de aceite de maíz. Los números en los gráficos de puntos representan porcentajes medios (media ± ETM) de células Treg entre células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en el timo.

Las **Fig. 8A-8B** muestran los efectos del bloqueo de DII4 sobre la homeostasis de DC (**Fig. 8A**) y de Treg (**Fig. 8B**) en el timo de ratones que expresan DII4 humano (hDII4) observada 7 y 14 días después del tratamiento con Ac DII4 (REGN421) (1 mg/kg o 5 mg/kg) o el tratamiento con hFc (5 mg/kg), dos veces por semana durante 2 semanas, y el día 28 después del cese del tratamiento. Los números de los gráficos de puntos representan los porcentajes medios (media ± ETM) de pDC y cDC (**Fig. 8A**) o células Treg (**Fig. 8B**) entre las células totales en el timo.

Las **Fig. 9A-9B** muestran los efectos del bloqueo de DII4 en el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) de ratón. **Fig. 9A:** el gráfico muestra las tasas (%) de incidencia de la enfermedad EAE por grupo de tratamiento. **Fig. 9B:** el gráfico muestra el desarrollo de EAE basándose en las puntuaciones medias de la enfermedad. El tratamiento se realizó con Ac anti-DII4 (REGN577) antes de la inducción (▼); antes de la inducción con Ac de control de isotipo (◆); después de la inducción con REGN577 (▲); o antes de la inducción con Ac anti-VLA-4 (PS/2) (■).

La **Fig. 10** muestra los efectos del bloqueo de DII4 sobre la producción de IL-17 e IFN-γ en los ganglios linfáticos de ratones EAE. Se midieron los niveles de IL-17 (panel izquierdo) e IFN-γ (panel derecho) en los ganglios linfáticos de ratones EAE tratados con Ac DII4 (■) o Ac de control de hFc (□) los días 12 y 18 por ELISA.

Las **Fig. 11A-11 E** muestran los efectos del Ac DII4 en un modelo diabético de ratón NOD. La **Fig. 11A** muestra el % de incidencia de diabetes (dos lecturas consecutivas del nivel de glucosa en sangre mayores de 250 mg/dl) entre los ratones que recibieron Ac de control de hFc (●) o Ac anti-DII4 (REGN577) (■) a las 9 semanas de edad. También se muestra el % de incidencia de diabetes de cinco ratones que se habían tratado con el Ac DII4 y posteriormente se inyectaron con Ac de PC61 a las 20 semanas (◆). Ac de PC61 es un anticuerpo anti-CD25 y reduce la cantidad de células Treg. La **Fig. 11 B** muestra la medición por ELISA de las producciones de autoanticuerpo anti-insulina (□) y autoanticuerpo anti-ácido glutámico descarboxilasa 65 (GAD65) (■) en ratones NOD tratados con Ac DII4 o control de hFc, en comparación con ratones de tipo silvestre sin tratar (WT). La **Fig. 11 C** muestra secciones pancreáticas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) de ratones NOD tratados con Ac DII4 (panel izquierdo) o control de hFc (panel derecho). Las flechas negras indican islotes pancreáticos individuales y las flechas blancas indican células infiltrantes dentro del islote (panel derecho).

La **Fig. 11 D** muestra el número de islotes pancreáticos (panel izquierdo) o el % de islotes pancreáticos infiltrados (panel derecho) en el páncreas de ratones tratados con control de hFc (□) o tratados con Ac DII4 (■).

La **Fig. 11E** muestra los cambios en el nivel de glucosa en sangre en ratones tratados, al principio de la enfermedad, con Ac DII4 (●) o control de hFc (□), durante 42 días después del tratamiento.

### Descripción detallada

Antes de describir los presentes métodos, debe entenderse que la presente invención no se limita a los métodos particulares y condiciones experimentales descritas, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene fines de describir únicamente realizaciones particulares, y no debe considerarse limitada, ya que el alcance de la presente invención se limita solo por las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. De esta manera, por ejemplo, una referencia a "un método" incluye uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que serán evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de esta divulgación.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen los métodos y materiales preferidos.

### Definiciones

La expresión "antagonistas de DII4", como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos contra DII4 y fragmentos de los mismos capaces de bloquear la unión de DII4 a un receptor Notch (tal como Notch1 y Notch4) y/o bloquear las rutas de señalización DII4-Notch (véase, por ejemplo, el documento WO 2008/076379), 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 patente de Estados Unidos n.º 2006/0134121 y 2008/0107648), péptidos y peptidocuerpos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.138.370), y similares, que bloquean la interacción entre DII4 y un receptor Notch. La expresión también incluye antagonistas, tales como moléculas pequeñas, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y similares, que se

unen específicamente a receptores Notch (por ejemplo, anticuerpos anti-Notch1, anticuerpos anti-Notch4, etc.) y bloquean las rutas de señalización DII4-Notch.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a moléculas de inmunoglobulina compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas con enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o  $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada ( $C_H$ ). La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o  $V_L$ ) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

En la técnica se conocen métodos y técnicas para identificar CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y LCVR y pueden aplicarse para identificar CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y/o LCVR especificadas desveladas en el presente documento. Las convenciones que pueden usarse para identificar los límites de las CDR incluyen la definición de Kabat, la definición de Chothia y la definición de AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de la secuencia, la definición de Chothia se basa en la localización de las regiones de bucles estructurales y la definición de AbM es un compromiso entre los enfoques de Kabat y Chothia. Véase, por ejemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, J. Mol. Biol. 273: 927-948 (1997); y Martin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9268-9272 (1989). También se dispone de bases de datos públicas para identificar secuencias de CDR dentro de un anticuerpo.

También es posible la sustitución de uno o más restos de CDR o la omisión de una o más CDR. En la bibliografía científica se han descrito anticuerpos en los que puede prescindirse de una o dos CDR para la unión. Padlan *et al.* (1995 FASEB J. 9: 133-139) analizaron las regiones de contacto entre anticuerpos y sus antígenos, basándose en las estructuras cristalinas publicadas, y concluyeron que realmente solo contactan con el antígeno aproximadamente de un quinto a un tercio de los restos de CDR. Padlan también encontró muchos anticuerpos en los que una o dos CDR no tenían aminoácidos en contacto con un antígeno (véase también, Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320: 415-428).

Basándose en estudios previos pueden identificarse restos de CDR que no contactan con el antígeno (por ejemplo, con frecuencia no se requieren los restos H60-H65 de CDRH2), de regiones de CDR de Kabat que caen fuera de las CDR de Chothia, por creación de modelos moleculares y/o empíricamente. Si se omite una CDR o uno o más restos de la misma, normalmente se sustituye por un aminoácido que ocupa la posición correspondiente en otra secuencia de anticuerpo humano o un consenso de dichas secuencias. También pueden seleccionarse empíricamente posiciones para la sustitución dentro de CDR y aminoácidos para sustituir. Las sustituciones empíricas pueden ser sustituciones conservativas o no conservativas.

El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos que tienen un patrón de glicosilación modificado. En algunas aplicaciones, puede ser útil la modificación para retirar sitios de glicosilación indeseables o, por ejemplo, la retirada de un resto de fucosa para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (véase Shield *et al.* (2002) JBC 277: 26733). En otras aplicaciones, la retirada del sitio de N-glicosilación puede reducir reacciones inmunitarias indeseables contra los anticuerpos terapéuticos, o aumentar las afinidades de los anticuerpos. En otras aplicaciones adicionales, puede realizarse una modificación de la galactosilación para modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

La expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "fragmento de anticuerpo"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a hDII4, o cualquier otra proteína diana deseada. Un fragmento de anticuerpo puede incluir un fragmento Fab, un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento Fd, un fragmento Fv, una molécula de Fv monocatenaria (scFv), un fragmento de dAc, unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los restos de aminoácido que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, un fragmento que contiene una CDR, o una CDR aislada). Dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno", como se usa en el presente documento, también se incluyen otras moléculas obtenidas por ingeniería genética, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo de la invención pueden conjugarse con un resto terapéutico ("inmunoconjugado"), tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, un inmunosupresor o un radioisótopo.

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 o en fase con una o más secuencias marco conservadas. 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 estar situados

entre sí en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dímera 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  $V_H$  o  $V_L$  monomérico.

- 5 En ciertas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Las 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 indicadas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden unirse directamente entre sí o pueden unirse por una región de bisagra o enlazadora completa o parcial. Una región de bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que dan como resultado un enlace flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una sola 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 indicadas anteriormente, en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios  $V_H$  o  $V_L$  monoméricos (por ejemplo, por uno o más enlaces disulfuro).
- 10
- 15
- 20 Como ocurre con las moléculas de anticuerpo completas, los fragmentos de unión a antígeno pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). 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 separado o a un epítipo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico 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 este campo.
- 25

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

30

35

Los anticuerpos anti-DII4 completamente humanos desvelados en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones marco conservada y/o CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias correspondientes de la línea germinal. Dichas mutaciones pueden averiguarse fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento con secuencias de la línea germinal disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. La presente invención incluye anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que proceden de cualquiera de las secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento, donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco conservadas y/o CDR están mutados al resto o restos correspondientes de la secuencia de la línea germinal de la que procede el anticuerpo, o al resto o restos correspondientes de otra secuencia de línea germinal humana, o a una sustitución de aminoácido conservativa del resto o restos de la línea germinal correspondiente (dichos cambios de secuencia se denominan en el presente documento colectivamente "mutaciones de línea germinal"). Un experto en la materia, partiendo de las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera desveladas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una o más retromutaciones de la línea germinal individuales o combinaciones de las mismas. En ciertas realizaciones, todos los restos marco conservados y/o de CDR dentro de los dominios  $V_H$  y/o  $V_L$  están retromutados a los restos encontrados en la secuencia original de la línea germinal a partir de la cual se produjo el anticuerpo. En otras realizaciones, solo ciertos restos están retromutados a la secuencia original de la línea germinal, por ejemplo, solo los restos mutados encontrados dentro de los 8 primeros aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o solo los restos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras realizaciones, uno o más de los restos marco conservados y/o de CDR están mutados al resto o restos correspondientes de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal a partir de la cual se produjo originalmente el anticuerpo). Además, los anticuerpos de la presente invención pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal dentro de las regiones marco conservada y/o de CDR, por ejemplo, donde ciertos restos individuales están mutados a los restos correspondientes de una secuencia de línea germinal particular mientras que otros ciertos restos que difieren de la secuencia de línea germinal original se mantienen o están mutados al resto correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de línea germinal pueden ensayarse fácilmente con respecto a una o más propiedades deseadas tales como mejor especificidad de unión, mayor afinidad de unión, propiedades biológicas antagonistas o agonistas mejoradas o potenciadas (según sea el caso), menor inmunogenicidad, etc. Dentro de la presente invención se incluyen anticuerpos y fragmentos de

40

45

50

55

60

65

unión a antígeno obtenidos de esta forma general.

La presente invención también incluye anticuerpos anti-Dll4 que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR desveladas en el presente documento, que tienen una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-Dll4 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 sustitución de aminoácidos conservativa con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR desveladas en el presente documento. En una realización, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 con 10 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas. En otra realización, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 con 8 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas. En otra realización, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 con 6 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas. En otra realización, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 con 4 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas. En otra realización, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 con 2 o 1 sustitución de aminoácidos conservativa. En una realización, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118 con 10 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas. En otra realización, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118 con 8 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas. En otra realización, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118 con 6 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas. En otra realización, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118 con 4 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas. En otra realización, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118 con 2 o 1 sustitución de aminoácidos conservativa.

Un anticuerpo "neutralizador" o "bloqueante" pretende hacer referencia a un anticuerpo cuya unión a Dll4 da como resultado la inhibición de la actividad biológica de Dll4. Esta inhibición de la actividad biológica de Dll4 puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de Dll4. Estos indicadores de la actividad biológica de Dll4 pueden evaluarse por uno o más de varios ensayos convencionales *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica. Por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo de neutralizar la actividad de Dll4 se evalúa por inhibición de la unión de Dll4 a un receptor Notch. De forma similar, el término también es aplicable a anticuerpos contra otras dianas, tales como Notch1 y Notch4; dichos anticuerpos inhiben las actividades biológicas de las dianas, inhibiendo de esta manera las rutas de señalización o interacciones Dll4-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 de equilibrio de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  M o menor (por ejemplo, una  $K_D$  menor 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 de equilibrio, resonancia de plasmón superficial y similares. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hDll4, sin embargo, puede presentar reactividad cruzada con otros antígenos tales como moléculas de Dll4 de otras especies. Por otra parte, sin embargo, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) que se unen a hDll4 y a uno o más antígenos adicionales se consideran anticuerpos que "se unen específicamente" a hDll4, como se usa en el presente documento.

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

La expresión anticuerpo de "alta afinidad" se refiere a los anticuerpos que se unen a Dll4 con una  $K_D$  de aproximadamente 1 nM o menor, de aproximadamente 500 pM o menor, de aproximadamente 400 pM o menor, de aproximadamente 300 pM o menor, de aproximadamente 200 pM o menor, o de aproximadamente 100 pM o menor, o de aproximadamente 50 pM o menor, medida por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™ o ELISA de afinidad en disolución.

La expresión "resonancia de plasmón superficial", como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones biespecíficas en tiempo real por detección de alteraciones en concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensores, por ejemplo, usando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia and Piscataway, N.J.).

El término "epítipo" es la región del antígeno que se une al anticuerpo. Los epítipos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítipos funcionales generalmente son una subserie de los epítipos estructurales y tienen los restos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítipos también pueden ser conformacionales, es decir, estar compuestos de aminoácidos no lineales. En ciertas realizaciones, los epítipos pueden incluir determinantes que son agrupamientos de moléculas de superficie químicamente activos 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. Un epítipo típicamente incluye al menos 3 y, más normalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una sola conformación espacial.

El término "tratamiento" o "tratar", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a procedimientos tanto profilácticos (o preventivos) como terapéuticos, a menos que se indique otra cosa. Los sujetos que necesitan tratamiento incluyen no solo los que han desarrollado una afección, trastorno o enfermedad particular, sino también los que están predispuestos o son susceptibles a desarrollar dicha afección, trastorno o enfermedad y se benefician por procedimientos profilácticos de forma que la aparición o recurrencia, o la progresión, si se produce, de dicha afección, trastorno o enfermedad se haya reducido en comparación con los que no tienen el tratamiento.

Por la frase "cantidad terapéuticamente eficaz", "cantidad profilácticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se entiende una cantidad que produce el efecto deseado para el que se administra. La cantidad exacta dependerá del objetivo del tratamiento, la edad y el tamaño del sujeto tratado, la vía de administración y similares, y podrá determinarse por un experto en la materia usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

### Descripción general

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que el bloqueo de Dll4 por un anticuerpo específico de Dll4 da como resultado una mayor cantidad de células Treg lo cual, a su vez, impide, reduce o retrasa la progresión de EAE o la diabetes en ratones. Como descripción de un Ac Dll4 completamente humano, incluyendo un Ac Dll4 humano recombinante, véase la publicación de patente internacional n.º WO 2008/076379.

### Administración y formulaciones terapéuticas

La presente invención proporciona un antagonista del ligando de tipo delta 4 (Dll4) como se define en las reivindicaciones para su uso en métodos de prevención, tratamiento o mejoría de la diabetes mellitus de tipo 1, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende el antagonista de Dll4. La composición farmacéutica que comprende un antagonista de Dll4 puede comprender además uno o más agentes terapéuticos adicionales tales como agentes inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, agentes analgésicos, agentes para reducir la glucosa en sangre y similares (véase la sección siguiente). Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan en las formulaciones para mejorar la mejor transferencia, liberación, tolerancia y similares. Puede encontrarse una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidra, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones de carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Véase también Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52: 238-311.

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

La dosis puede variar dependiendo de la edad y del tamaño (por ejemplo, peso corporal o área de superficie corporal) del sujeto que va a recibir la administración, la enfermedad diana, las condiciones, la vía de administración y similares. Para la administración sistémica de antagonistas de Dll4, en particular, para anticuerpos contra Dll4, los intervalos de dosificación típicos para administración intravenosa están en 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 la administración subcutánea, los anticuerpos pueden administrarse en una cantidad de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 800 mg, 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 una 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, de 1 a 5 veces al día, de 1 a 5 veces por semana o de 1 a 5 veces al mes. Como alternativa, los anticuerpos pueden administrarse inicialmente por inyección intravenosa, seguido de administración subcutánea secuencial.

Se conocen diversos sistemas de liberación y pueden usarse para administrar la composición farmacéutica, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu *et al.* (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, pero sin limitación, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición puede administrarse por

cualquier vía conveniente, 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.

5 La composición farmacéutica también puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer (1990) *Science* 249: 1527-1533; Treat *et al.* (1989) en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pág. 353-365; Lopez-Berestein, *ibid.*, pág. 317-327; véase en general *ibid.*).

10 En ciertas situaciones, la composición farmacéutica puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (véase Langer, *supra*; Sefton (1987) *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 201). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos; véase, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974). En otra realización adicional, un sistema de liberación controlada puede ponerse cerca de la diana de la composición, requiriéndose de esta manera solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release, supra*, vol. 2, pág. 115-138, 1984).

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones de goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse por métodos conocidos públicamente. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse, por ejemplo, por disolución, suspensión o emulsión del anticuerpo o su sal descrita anteriormente en un medio acuoso estéril o un medio oleoso usado convencionalmente para inyecciones. Como medio acuoso para inyecciones existen, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que puede usarse en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)] etc. Como medio oleoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencilico, etc. La inyección preparada de esta manera preferentemente se introduce en una ampolla apropiada. La composición farmacéutica puede administrarse por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y una jeringa convencional. Además, con respecto a la liberación subcutánea, un dispositivo de liberación de tipo pluma fácilmente tiene aplicaciones para suministrar una composición farmacéutica. Dicho dispositivo de liberación de tipo pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de liberación de tipo pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede desecharse fácilmente y reemplazarse por un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo de liberación de tipo pluma después puede reutilizarse. En un dispositivo de liberación de tipo pluma desechable, no hay cartucho reemplazable. En su lugar, el dispositivo de liberación de tipo pluma desechable se rellena con la composición farmacéutica mantenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez vaciado el depósito de la composición farmacéutica, se desecha el dispositivo entero.

40 Numerosos dispositivos de liberación de tipo pluma y autoinyectores reutilizables tienen aplicaciones en la liberación subcutánea de una composición farmacéutica. Los ejemplos incluyen, pero sin duda alguna sin limitación, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Reino Unido), 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, Copenhage, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhage, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar solo algunos. Los ejemplos de dispositivos de liberación de tipo pluma desechables que tienen aplicaciones en la liberación subcutánea de una composición farmacéutica incluyen, pero sin duda alguna no se limitan a la pluma SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), la FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y la KWIKPEN™ (Eli Lilly).

Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los principios activos. Dichas formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, capsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del antagonista de DII4, tal como un anticuerpo DII4, contenida generalmente es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 800 mg por forma de dosificación en una dosis unitaria; especialmente en la forma de inyección, se prefiere que el anticuerpo esté contenido en una cantidad de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg, y para las otras formas de dosificación, de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg.

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

65

### Terapias de combinación

El antagonista de DII4 de la invención puede proporcionarse solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes inmunosupresores o inmunoinhibidores, agentes antiinflamatorios, agentes analgésicos, agentes reductores de la glucosa en sangre directos o indirectos, y similares. Los inmunosupresores adecuados incluyen, pero sin limitación, glucocorticoides, ciclosporina, metotrexato, interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), tacrolimus, sirolimus, azatioprina, mercaptopurina, opiáceos, micofenolato, proteínas de unión a TNF, tales como infliximab, etanercept, adalimumab y similares, antibióticos citotóxicos, tales como dactinomicina, antraciclinas, mitomicinas C, bleomicina, mitramicina y similares, anticuerpos que se dirigen a células inmunitarias, tales como anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-CD3, y similares. Los agentes antiinflamatorios y/o analgésicos adecuados para terapias de combinación con los antagonistas anti-DII4 incluyen corticosteroides, antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como aspirina, ibuprofeno, naproxeno y similares, antagonistas de TNF- $\alpha$ , (por ejemplo, Infliximab o REMICADE® de Centocor Inc.; golimumab de Centocor Inc.; etanercept o ENBREL® de Amgen/Wyeth; adalimumab o HUMIRA® de Abbott Laboratories, y similares), antagonistas de IL-1 (por ejemplo, proteínas de fusión de unión a IL-1, por ejemplo, ARCALYST® de Regeneron Pharmaceuticals, Inc., véase la patente de Estados Unidos n.º 6.927.044; KINERET® de Amgen, y similares), antagonistas de IL-6 (por ejemplo, anticuerpos anti-receptor de IL-6 como se desvelan en la patente de Estados Unidos n.º 7.582.298 y ACTEMRA® de Roche), acetaminofeno, morfínomiméticos, y similares. Los agentes reductores de glucosa adecuados incluyen, pero sin limitación, insulina y análogos de la misma, biguanidas, sulfonamidas y derivados de urea de la misma, inhibidores de alfa-glucosidasa, tiazolidinadiona y derivados de la misma, inhibidores de dipeptidilpeptidasa-4, goma guar, repaglinida, nateglinida, exenatida, pramlintida, benfluorex, liraglutida, mitiglinida, inhibidores de la aldosa reductasa y similares.

El antagonista de DII4, tal como Ac hDII4 o fragmento del mismo, y el agente o agentes terapéuticos adicionales descritos anteriormente pueden administrarse conjuntamente o por separado. Cuando se usan formulaciones de dosificación separadas, el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención y los agentes adicionales pueden administrarse conjuntamente, o por separado a tiempos escalonados, es decir, secuencialmente en el orden apropiado.

### Kits

También se describe en el presente documento 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 DII4, tal como un anticuerpo contra DII4, y al menos un agente terapéutico adicional, y donde el material de envasado comprende una etiqueta o prospecto que muestra indicaciones e instrucciones de uso. El antagonista de DII4 y el agente terapéutico adicional pueden estar contenidos en recipientes separados.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de cómo fabricar y usar las composiciones de la invención, y no pretende limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, la temperatura está en grados centígrados, la presión es la presión atmosférica o está próxima a esta, y las barras de error de las figuras = media  $\pm$  ETM.

En los ejemplos proporcionados a continuación, se usaron los siguientes anticuerpos en PBS de Dulbecco (GIBCO® INVITROGEN™) 1X suplementado con FCS al 3 %, para teñir las células para citometría de flujo: para las DC, anticuerpos contra la proteína  $\alpha$  reguladora de señales (Sirp- $\alpha$ ; n.º cat. P84; BD Biosciences), B220 (n.º cat. RA3-6B2), PDCA-1 (n.º cat. eBio927), CD8 (n.º cat. 53-6.7), CD11b (n.º cat. M1/70), MHCII (n.º cat. M5/114.15.2), CD11c (n.º cat. N418), y CD135 (n.º cat. A2F10), respectivamente; para las células T, B y NK, anticuerpos contra CD4 (n.º cat. GK1.5 o L3T4), CD3 (n.º cat. 145-2C11), CD25 (n.º cat. PC61 o 7D4), CD44 (n.º cat. IM7), FoxP3 (n.º cat. FJK16s); y F4/80 (n.º cat. BM8), NK1.1 (n.º cat. PK136), IgM (n.º cat. II/41), IgD (n.º cat. 26-11c), CD43 (n.º cat. S7), CD21 (n.º cat. eBio4E3), HSA (n.º cat. M1/69) y CD23 (n.º cat. B3B4), respectivamente, (todos de eBioscience).

#### Ejemplo 1: Efecto del bloqueo de DII4 sobre el desarrollo de células B, células dendríticas y células T

Se ha demostrado que la inhibición de DII4-Notch1 conduce a un bloqueo completo en el desarrollo de células T acompañado de la aparición ectópica de células B y una expansión de células dendríticas (DC) que pueden proceder de la conversión de destino de células Pro-T en DC dentro del timo (Hozumi *et al.*, 2008, J Exp Med 205(11): 2507-2513; Koch *et al.*, 2008, J Exp Med 205(11): 2515-2523; y Feyerabend *et al.*, 2009, Immunity 30: 1-13). Sin embargo, aún se desconoce qué fase de desarrollo de DC específica se ve afectada directamente por el bloqueo de DII4.

Para responder a esta cuestión, en ratones C57B1/6 de 6 semanas de edad (Jackson Labs) se inyectaron por vía subcutánea 5 o 25 mg/kg de Ac anti-DII4 (REGN577) (n= 5) o fragmento Fc humano (control) (n= 5), dos veces por semana durante dos semanas. Se preparó REGN577 localmente basándose en la secuencia publicada (documento WO 2007/143689). REGN 577 se une a DII4 humano y de ratón, pero no se une de forma detectable a JAG1 y DII1 humano. Catorce (14) días después de la inyección, se recogieron los timos y los bazos y se digirieron a 37 °C durante 30 min en medio RPMI 1640 completo (Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal (FCS) al 10 % y que contiene colagenasa D (Sigma Aldrich). Para detener la reacción, se añadió EDTA 2 mM y la suspensión de órganos se pasó a través de un tamiz de células de 70 mm. Se recogió la médula ósea (BM) de cada ratón lavando abundantemente los fémures y las tibias en medio RPMI 1640 completo suplementado con FCS al 10 % y las células se resuspendieron en medio RPMI. Las subseries de células T, células B y DC se evaluaron por citometría de flujo después de teñir las células con los anticuerpos contra marcadores específicos descritos anteriormente. Las células teñidas se procesaron en un citómetro de flujo BD™ LSR II (BD Biosciences) y los datos se analizaron usando el software FlowJo (versión 8.8.6; Tree Star Inc.).

Las Fig. 1A y 1B muestran las poblaciones de células T y B en el timo. Como se muestra en la Fig. 1A, el bloqueo de DII4 indujo un aumento significativo en el número de células T doble negativas ("DN"; CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) y una reducción en el número de células T doble positivas ("DP"; CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) dentro del timo. Además, el mismo tratamiento indujo una aparición ectópica de células B dentro del timo, que procedían de células Pro-T (es decir, células CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> en la fase DN1) (véase la Fig. 1 B). Por el contrario, el bloqueo de DII4 no tuvo ningún efecto sobre el desarrollo de células B en la médula ósea (Fig. 2A) o en las subpoblaciones de células B esplénicas periféricas (Fig. 2B). Además, el bloqueo de DII4 indujo la expansión de DC convencionales ("cDC"; B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) y DC plasmacitoides ("pDC"; PDCA1<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) en el timo (Fig. 3A), con una expansión significativa que empezaba el día 7 (p< 0,001) hasta el día 14 (p< 0,001) y continuaba hasta el día 21 (p< 0,01) (Fig. 3B) después de la inyección inicial de Ac DII4. Los números en gráficos de puntos de la Fig. 3A representan porcentajes medios de DC entre células totales en el día 14. Además, las DC se expandieron en la periferia de ratones tratados con Ac DII4 (REGN577). El aumento en veces en porcentaje y el número absoluto de DC en el bazo tras el tratamiento con Ac DII4, en comparación con ratones de control (tratados con hFc), se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Días después de la inyección inicial	Aumento en veces en porcentaje	Aumento en veces en número absoluto
3	1,0	1,0
7	1,1	1,1
14	1,6	2,0
21	1,3	1,7

Se sabe que los monocitos, pDC y cDC de tejido linfóide comparten un progenitor común denominado "precursor de macrófagos y DC" o "MDP", que puede identificarse por su fenotipo de superficie "Lin<sup>-</sup>cKit<sup>hi</sup>CD115<sup>+</sup>FLT3<sup>+</sup>", mientras que un progenitor distinto denominado "precursor común de DC" o "CDP" con "Lin<sup>-</sup>cKit<sup>lo</sup>CD115<sup>+</sup>FLT3<sup>+</sup>" está restringido a producir cDC y pDC. Aunque los monocitos pueden desarrollar muchas de las características fenotípicas de las DC en condiciones inflamatorias, los linajes cDC, pDC y de monocitos se distinguen por el tiempo que tardan en alcanzar los tejidos, y ni los monocitos ni las pDC se transforman en cDC en condiciones en estado estacionario. A diferencia de los monocitos y las pDC, se cree que las cDC de tejido linfóide se producen a partir de la médula ósea como células inmaduras que deben diferenciarse y dividirse en órganos linfoides. Las pre-DC (MHCII<sup>lo</sup>CD11c<sup>int</sup>CD135<sup>+</sup>Sirp- $\alpha$ <sup>int</sup>) y las pre-DC tardías (MHCII<sup>lo</sup>CD11c<sup>int</sup>) son precursores principalmente de cDC que se producen en la médula ósea (Liu *et al.*, 2009, Science 324: 392-397).

Para identificar cualquier efecto de Ac DII4 sobre la homeostasis de progenitores de DC, se evaluaron los niveles de MDP y CDP en el timo, la médula ósea y el bazo por citometría de flujo. MDP y CDP solo se detectaron en la médula ósea, pero no se detectaron ni en el timo ni en el bazo (datos no mostrados). Además, el bloqueo de DII4 no indujo la expansión de progenitores tempranos en la médula ósea en comparación con los ratones tratados con el control. De esta manera, el resultado sugirió que el Ac DII4 pudo actuar en una fase posterior, es decir, en una fase pre-DC, de desarrollo de DC en comparación con MDP y CDP.

Por consiguiente, se investigaron células pre-DC y pre-DC tardías en el timo y la médula ósea usando citometría de flujo. Como se muestra en la Fig. 3C, las DC MHCII<sup>lo</sup>CD11c<sup>int</sup>, que normalmente están presentes en la médula ósea, solo se expandieron en el timo 14 días después del tratamiento con Ac DII4 (p<0,001), mientras que no se detectó expansión de DC MHCII<sup>lo</sup>CD11c<sup>int</sup> en la BM de los mismos ratones (datos no mostrados). De esta manera, la expansión de DC procedente de la fase pre-DC estaba restringida al timo. Para evaluar el origen de DC MHCII<sup>lo</sup>CD11c<sup>int</sup> en el timo, se realizó citometría de flujo para identificar DC MHCII<sup>lo</sup>CD11c<sup>int</sup> en la población de células pro-T DN1 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>). Como se muestra en la Fig. 3D, se detectaron DC MHCII<sup>lo</sup>CD11c<sup>int</sup> dentro de la población de células pro-T DN1 tras el bloqueo de DII4 en el día 3. No se detectaron DC MHCII<sup>lo</sup>CD11c<sup>int</sup> en ausencia de tratamiento con Ac DII4, así como dentro de las poblaciones de células T DN2, DN3 y DN4 tras el tratamiento con Ac DII4 (datos no mostrados). No se observó cambio en la homeostasis de DC periféricas tras el tratamiento con Ac DII4 (datos no mostrados). De esta manera, el bloqueo de DII4 indujo una

expansión significativa de DC MHCII<sup>lo</sup>CD11c<sup>int</sup> dentro de la población de células pro-T DN1 en el timo en el día 3 (p<0,01) (Fig. 3D) con un pico de expansión el día 14 (p<0,001) (datos no mostrados). Mientras tanto, las subseries de DC maduras se expandieron el día 7 (p<0,001) hasta el día 21 (p<0,01) en el timo, como se ha analizado anteriormente (véase la Fig. 3B).

5 Para examinar si la expansión de DC podría proceder de precursores de células T no comprometidos, se transfirieron intratímicamente células clasificadas como DN1 CD45.1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> a ratones hospedadores CD45.2<sup>+</sup> tratados con Ac anti-DII4. Se descubrió que se acumulaban células CD45.1<sup>+</sup> en la fase DN1 (datos no mostrados) y se detectaron DC inmaduras (imDC) y se expandieron en el timo (Fig. 4) (p<0,01). No se detectaron células en los  
10 ratones tratados con Ac de control, posiblemente porque la mayoría de las células transferidas a DN1 se eliminaron por selección negativa de células T. Se concluyó que el bloqueo de DII4 promueve el desarrollo del linaje de DC alternativo intratímico procedente de un progenitor DN1 T/DC común.

15 El ligando de tirosina quinasa 3 de tipo Fms (Flt3-L) es suficiente y esencial para la diferenciación de progenitores de médula ósea en DC y el desarrollo de DC periféricas. Los niveles en suero de Flt3-L no cambiaron en animales WT tratados con Ac anti-DII4 (datos no mostrados). Además, como se muestra en las Tablas 2 y 3 presentadas a continuación, los porcentajes de DC en el timo se expandieron en ratones de tipo silvestre (WT) (Tablas 2 y 3),  
20 ratones knock-out para FLt3-L (Flt3-L<sup>-/-</sup>) (p<0,05) (Tabla 2), y ratones knock-out para Flt3-R (Flt3-R<sup>-/-</sup>) (p<0,001) (Tabla 3), todos tratados con Ac DII4, en comparación con los tratados con Ac de control. De esta manera, el bloqueo de DII4 induce una expansión de DC independiente de Flt3 en el timo.

**Tabla 2**

Ratones	% DC en el timo en ratones tratados con:	
	Ac de control	Ac DII4
WT	0,04 ± 0,005	0,58 ± 0,13
Flt3-L <sup>-/-</sup>	0,04 ± 0,006	0,45 ± 0,13

**Tabla 3**

Ratones	% DC en el timo en ratones tratados con:	
	Ac de control	Ac DII4
WT	0,03 ± 0,003	0,37 ± 0,03
Flt3-R <sup>-/-</sup>	0,06 ± 0,01	0,44 ± 0,02

25 Se ha observado la capacidad de progenitores de células T tempranas de redirigirse hacia un fenotipo de célula no T (James P. Di Santo, 2010, Science 329: 44-45). Se realizaron análisis de matrices de genes en timocitos y en células pro-T para determinar el efecto del tratamiento con Ab anti-DII4 en genes implicados en la especificación de linaje de células T frente a B y DC. Se observó que los genes esenciales para el compromiso de células T (por ejemplo, *Tcf7*, *Gata3* y *Ets1*) estaban regulados negativamente, mientras que los genes (*Lyl1*, *Sfp1*) que pueden  
30 bloquear el desarrollo de células T, estaban regulados positivamente (datos no mostrados; véase Di Santo, 2010, *supra*). Es muy curioso que los genes que controlan el desarrollo de células DC (*PU.1* y *Spi-B*) y células B también estaban regulados positivamente (datos no mostrados; véase M. Merad *et al.*, 2009, Blood 113: 3418-3427). Además, la expresión de *RelB* y *Id2*, así como de los factores reguladores de interferón (*IRF*) 2, 4 y 8 - factores de transcripción clave implicados en el desarrollo de subseries de DC, estaba aumentada (datos no mostrados; véase  
35 Merad *et al.*, 2009, *supra*). Finalmente, se observó que la expresión génica de CSF-1 (M-CSF), una citocina clave implicada en el desarrollo de DC, estaba regulada positivamente tras el tratamiento con Ab anti-DII4 (p<0,05; datos no mostrados). Además, los niveles en suero de CSF-1 estaban aumentados tras el tratamiento con Ac anti-DII4 (Fig. 5; p<0,05) (véase B. Francke, *et al.*, 2008, Blood 111: 150-159). De esta manera, puede concluirse que el  
40 bloqueo de la señalización DII4-Notch regula negativamente factores de transcripción específicos para el compromiso del linaje de células T mientras que regula positivamente otros cruciales en el desarrollo de DC.

**Ejemplo 2: efecto de la delección de DII4 sobre el desarrollo de células T**

45 Para evaluar si el efecto de DII4 sobre el desarrollo de DC observado en el Ejemplo 1 anterior era intrínseco a DII4, se prepararon ratones DLL4COIN, en los que DII4 está condicionalmente inactivado. Los alelos "condicional por inversión (COIN)" son alelos condicionales que se basan en un elemento invertible ("elemento COIN") para proporcionar mutaciones condicionales mediadas por recombinasa. Los ratones DLL4COIN contienen una construcción de recombinasa Cre inducible por tamoxifeno, CreERT2, que codifica una recombinasa Cre fusionada a un dominio de unión a ligando de estrógenos (ERT2) mutante. CreERT2 es esencialmente inactivo en ausencia de  
50

tamoxifeno y tampoco se activa por estrógenos endógenos. El tratamiento con tamoxifeno de los ratones activará CreERT2 y causará la inversión del elemento COIN, lo cual anula la transcripción de todos los exones cadena abajo del punto de inserción de COIN, induciéndose de esta manera la desactivación de Dll4. Véanse los detalles del sistema recombinasa CreERT2 en Feil *et al.*, 1997, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237: 752-757.

En ratones DLL4COIN (n=6) se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) tamoxifeno (TAM) (n.º cat. T-5648, Sigma) a 3 mg/150 µl de aceite de maíz por ratón, tres (3) veces por semana durante 2 semanas. Los ratones de control DLL4COIN (n=6) recibieron aceite de maíz sin tamoxifeno. Análogamente, se trataron ratones C5B1/6 de tipo silvestre con tamoxifeno (n=6) o aceite de maíz únicamente (n=6). En los ratones se supervisaron los signos de malestar (por ejemplo, aspecto del pelo, baja actividad, etc.), infecciones y pérdida excesiva de peso corporal. Los ratones se pesaron aproximadamente 3 veces por semana. Todo ratón que perdió más del 20 % de peso corporal se retiró del experimento. Después de 2 semanas del tratamiento, se recogieron los timos y las células de timo se analizaron por citometría de flujo.

Como se muestra en la Fig. 6, en ausencia de Dll4 (es decir, en ratones tratados con tamoxifeno), se expandieron las células B y tanto las pDC como las cDC en el timo, en comparación con los ratones tratados con aceite de maíz, indicando que los efectos de Dll4 sobre el desarrollo de DC y la homeostasis observada en el Ejemplo 1 efectivamente eran intrínsecos a Dll4. De esta manera, la señalización Dll4-Notch parece sostener el compromiso de las células T al suprimir el potencial del linaje que no es de células T dentro de la población de células pro-T.

### Ejemplo 3: efecto del bloqueo de Dll4 o la delección de Dll4 sobre la homeostasis de células Treg

Recientemente se ha demostrado que las Treg son esenciales para el mantenimiento de un número normal de DC. Tras la reducción de Treg hay un aumento compensador dependiente de la tirosina quinasa 3 de tipo Fms (Flt3) de DC (Liu *et al.*, 2009, *supra*). Además, dos grupos independientes mostraron un control de retroalimentación de la homeostasis de células T reguladoras por DC *in vivo*; es decir, el aumento de número de DC conduce a un aumento de la división y acumulación de Treg, que podría prevenir el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias (Darrasse-Jeze G. *et al.*, 2009, *J Exp. Med.* 206(9): 1853-1862; y Swee LK *et al.*, 2009, *Blood* 113(25): 6277-6287).

Para determinar si el bloqueo de Dll4 podría afectar a la homeostasis de Treg, se midieron por citometría de flujo las cantidades de Treg en los timos de los ratones tratados con el Ac Dll4 o Fc humano (control) en el Ejemplo 1. Como se muestra en la Fig. 7A, el bloqueo de Dll4 dio como resultado una sólida expansión de Treg dentro del timo el día 14 después de la inyección inicial. La expansión de Treg comenzó el día 7 (p<0,001) y alcanzó un efecto máximo el día 14 en el timo (p<0,001) después de la inyección inicial (véase la Fig. 7B), mientras que en la periferia (es decir, el bazo), las Treg empezaron a aparecer únicamente entre los días 14 y 21 (p<0,05) (Fig. 7B y Tabla 4). En la Tabla 4, se muestran los aumentos en veces en el porcentaje y el número absoluto de Treg en el bazo tras el tratamiento con Ac Dll4, en comparación con los ratones de control (tratados con hFc).

Tabla 4

Días después de la inyección inicial	Aumento en veces en porcentaje	Aumento en veces en número absoluto
3	1,0	1,0
7	1,0	1,2
14	1,1	1,7
21	1,1	1,2

Para evaluar si la expansión de Treg observada era intrínseca a la molécula de Dll4, también se midieron por citometría de flujo las cantidades de Treg en los timos de ratones DLL4COIN del Ejemplo 2. Como se observa con el bloqueo de Dll4 por Ac Dll4, la inactivación condicional de Dll4 por tratamiento con tamoxifeno también dio como resultado la expansión de Treg en el timo, en comparación con los ratones tratados con aceite de maíz (véase la Fig. 7C) así como los ratones de tipo silvestre tratados con tamoxifeno (datos no mostrados). De esta manera, la señalización Dll4-Notch sostiene a las DC y, por consiguiente, la homeostasis de Treg y el compromiso de las células T.

Se realizó un experimento similar en ratones que expresaban Dll4 humano ("ratones Dll4 humanizados") usando Ac anti-Dll4 (REGN421 que tiene secuencias de HCVR y LCVR de SEQ ID NO: 116 y 118, respectivamente) que, como se sabe, se une al dominio N-terminal-DSL del Dll4 humano. El ratón Dll4 humanizado se preparó reemplazando el dominio extracelular entero del gen Dll4 de ratón con la región extracelular correspondiente del gen Dll4 humano (7 kb) en células madre embrionarias (ES) de F1 C57BL/6 /129. Se generaron ratones hDll4 homocigotos y se criaron en un fondo C57BL/6. Se trataron ratones Dll4 humanizados con 5 mg/kg de hFc (control; n=6), o 1 mg/kg (n=6) o 5 mg/kg (n=6) de Ac REGN421 dos veces por semana durante dos semanas. Se sacrificaron dos ratones de cada grupo de tratamiento el día 7 y se sacrificaron 2 ratones más por grupo el día 14. Se recogieron los timos y las

células se tiñeron y se examinaron por citometría de flujo. Los ratones restantes se dejaron recuperar durante 4 semanas más sin ningún tratamiento y, el día 28 después de finalizar el tratamiento, se sacrificaron y se analizaron las células del timo usando citometría de flujo. Después de dos semanas de tratamiento, se observó un aumento de cDC y pDC (Fig. 8A) así como un aumento significativo en la población de Treg (Fig. 8B) en el timo de los ratones tratados con Ac anti-Dll4 ( $p < 0,01$ ). En los timos de los ratones que recibieron Ac Dll4 durante 2 semanas, seguido de 4 semanas de ausencia de tratamiento, tanto las cantidades de DC como las de Treg volvieron al nivel normal al final del periodo (Fig. 8A y 8B). Mientras tanto, también se observó una expansión de DC y Treg en la periferia de los ratones tratados con Ac Dll4, en comparación con los ratones tratados con hFc (datos no mostrados).

10 Ejemplo 4: efecto del bloqueo de receptor Notch sobre Treg

Se ha demostrado que la expansión de DC conduce a una expansión de Treg (Darrasse-Jeze G. *et al.*, 2009). Como se ha analizado anteriormente, se observó que tras el bloqueo de Dll4 se expandían tanto las células DC como las células Treg en el timo (Fig. 3A y Fig. 7A). Además, también se encontró una expansión de los dos porcentajes y números absolutos de DC y Treg en la periferia de ratones tratados con Ac Dll4 (Tablas 1 y 4). Para determinar si el bloqueo de receptores Notch conduciría al mismo fenotipo que la delección de Dll4, se estudiaron ratones knockout (KO) para Nicastrina ( $Nic^{-/-}$ ). La nicastrina es una molécula implicada en la ruta de señalización de Notch y la inhibición genética de nicastrina en ratones deficientes en nicastrina da como resultado un bloqueo de la transducción de señales corriente debajo de los receptores Notch 1, 2, 3 y 4 (Aifantis *et al.*, datos no publicados). Se demostró que los ratones KO para nicastrina presentaban un fenotipo similar al de los ratones en los que se había delecionado/bloqueado el Dll4 con un mayor número de células Treg, tanto en porcentaje como en cantidad absoluta, tanto en el timo como en el bazo (véase la Tabla 5).

Tabla 5

Treg	Timo		Bazo	
	Ratones de control	Ratones KO para nicastrina	Ratones de control	Ratones KO para nicastrina
Treg (%) en células $CD3^+CD4^+$	$3,3 \pm 0,2$	$15,2 \pm 2,0$ ( $p < 0,1$ )	$16,0 \pm 1,3$	$33,9 \pm 2,1$ ( $p < 0,0001$ )
Relación de cantidades absolutas (Treg/Teff)	$0,04 \pm 0,002$	$0,2 \pm 0,03$ ( $p < 0,01$ )	$0,2 \pm 0,01$	$0,6 \pm 0,06$ ( $p < 0,0001$ )

Finalmente, cuando se transfirieron células de médula ósea (BM) de ratones  $Nic^{-/-}$  a ratones WT irradiados letalmente, se observó la expansión de células Treg tímicas en quimeras  $Nic^{-/-} \rightarrow WT$ , lo que sugiere que dicha expansión era un efecto autónomo de las células; y el bloqueo de Dll4 de los ratones receptores con Ac anti-Dll4 no tuvo ningún efecto aditivo (véase la Tabla 6)

Tabla 6

Donantes de BM	% Treg en células $CD3^+CD4^+$ en ratones WT receptores tratados con:	
	Ac de control	Ac Anti-Dll4
WT	$3,6 \pm 0,4$	$35 \pm 4$
$Nic^{-/-}$	$37 \pm 2$	$41 \pm 2$

Estos resultados sugieren que la interrupción de la señalización Dll4-Notch por el bloqueo de Dll4 o los receptores Notch conduce a fenotipos similares con respecto a la expansión de células Treg.

Para determinar si la expansión de Treg tras el bloqueo de Dll4 se correlaciona con las cantidades de DC (Darrasse-Jeze G. *et al.*, 2009, *supra*), se prepararon ratones que carecían de DC y se ensayaron con el Ac Dll4 como en el Ejemplo 1. En ratones transgénicos que expresan el receptor de la toxina diftérica de primates (DTR), se confiere sensibilidad a la toxina diftérica (DT) a células que, de otra manera, serían insensibles a DT. La DT entra en las células mediante la interacción de su subunidad B con el DTR celular y, tras la endocitosis, la subunidad A de DT se libera y cataliza la ADP-ribosilación del factor de alargamiento 2, dando como resultado la inhibición de la síntesis de proteínas seguida de una rápida apoptosis tanto en células mitóticas como en células diferenciadas terminalmente. La especificidad y el momento de ablación celular pueden determinarse por elementos promotores/potenciadores restringidos a tipos celulares y por el régimen de la administración de la toxina, respectivamente. Para dirigir la sensibilidad a DT hacia DC, Jung *et al.* (2002, *Immunity* 17: 211-220) han generado ratones (ratones CD11cre-DTR) que llevan un transgén que codifica una proteína de fusión DTR de simio-GFP (proteína fluorescente verde) bajo el control del promotor CD11c murino. Como CD11c codifica todas las DC, todas las subseries de DC murinas que expresan CD11c se delecionan tras la administración de DT.

Los ratones transgénicos preparados de esta manera que carecen de DC se trataron con Ac Dll4 o control de hFc de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Catorce (14) días después del tratamiento, se recogieron los timos y los bazos y se prepararon para el análisis. El nivel de expresión de Dll4 sobre las superficies de subseries

específicas de células DC o T se evaluó por citometría de flujo para determinar a qué subserie específica se unía el Ac Dll4. Los resultados mostraron que las DC y las células T no expresaban niveles detectables de Dll4 en su superficie (datos no mostrados). Esta observación se corrobora por el informe de que Dll4 se expresa en la superficie de células epiteliales tímicas (TEC) (Koch *et al.* 2008, *supra*). Sin embargo, es aún más importante el hecho de que se observara que el tratamiento con Ac Dll4 de ratones que carecían de DC no podía inducir la expansión de Treg, mientras que en los ratones de tipo silvestre (es decir, ratones en los que no se habían eliminado las DC) tratados con Ac Dll4 aumentaba significativamente la proporción de Treg entre células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ( $p < 0,001$ ), lo que sugiere que la expansión de Treg tras el tratamiento con Ac Dll4 estaba mediada al menos en parte por la expansión de DC.

#### Ejemplo 5: efecto del bloqueo de Dll4 sobre la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE)

Las células T reguladoras naturales CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (es decir, Treg) juegan un papel importante en el mantenimiento de la autotolerancia y reprimen las enfermedades autoinmunitarias, tales como diabetes de tipo 1, encefalomiелitis autoinmunitaria, GVHD y enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (Darrasse-Jeze G. *et al.*, 2009, *supra*; Swee LK *et al.*, 2009, *supra*; y McGreathy *et al.*, 2005, 175(5): 3025-3032).

Para ver si el mayor número de células Treg debido al bloqueo de Dll4 prevendría enfermedades autoinmunitarias, se estudió el impacto del bloqueo de Dll4 sobre una EAE en un modelo de ratón. El modelo de ratón de EAE se estableció inyectando en la almohadilla plantar de ratones C57B1/6 el péptido de glicoproteína mielínica oligodendrocitaria (MOG) emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA) seguido (24 horas después) de la inyección de toxina Pertussis (PTX) para inducir la enfermedad. La puntuación de la enfermedad se determinó basándose en los siguientes síntomas: (0) sin síntomas; (1) arrastre de la cola; (2) arrastre de la cola con debilidad en patas traseras; (3) parálisis parcial en patas traseras; (4) parálisis completa en patas traseras; (5) parálisis de todas las extremidades; y (6) moribundo. De doce a veinticuatro horas antes de la inmunización, los ratones en un grupo previo a la inducción ( $n=10$ ) también recibieron una inyección subcutánea de 25 mg/kg de Ac anti-Dll4 (REGN577) o Ac de control de isotipo (anticuerpo humano específico para CD20, preparado localmente de acuerdo con la divulgación del documento US 2008/0260641), o PS/2 (IgG2b de rata/ratón contra molécula de adhesión celular de tipo integrina murina VLA-4; ATCC n.º CRL-1911), mientras que los ratones en un grupo posterior a la inducción ( $n=10$ ) recibieron lo mismo el día en el que aparecieron los síntomas. Se sabe que el Ac PS/2 exacerba las recaídas de la enfermedad y aumenta la acumulación de células T CD4<sup>+</sup> en el sistema nervioso central en un modelo de ratón de encefalomiелitis autoinmune experimental recurrente (R-EAE) (Theien BE *et al.*, 2001, J Clin Invest 107(8): 995-1006). Las inyecciones de anticuerpo se realizaron dos veces por semana, durante dos semanas. Al final del experimento, se retiraron cuidadosamente las medulas espinales de los ratones, se trituraron y después se incubaron en un medio RPMI 1640 que contenía colagenasa D (Sigma Aldrich). Se añadió EDTA a una concentración 2 mM para detener la reacción y la mezcla se pasó a través de un tamiz de células de 70  $\mu$ m y el contenido celular se analizó por citometría de flujo.

Como se muestra en las Fig. 9A y 9B, los ratones tratados con Ac de control de isotipo desarrollaron síntomas (es decir, tenían puntuaciones de enfermedad mayores de "0") empezando aproximadamente a los 10-14 días y alcanzando un máximo entre los 15 y 21 días, después de las inyecciones de MOG. Por el contrario, en los ratones tratados con Ac Dll4 se prevenía completamente la progresión de la enfermedad en comparación con los ratones tratados con Ac de control. La Tabla 7 muestra los aumentos en veces en el porcentaje y en la cantidad absoluta de Treg en el timo y bazo de los ratones tratados con Ac Dll4, en comparación con los ratones tratados con Ac de control.

Tabla 7

Días después de la inyección de MOG	Treg en timo		Treg en bazo	
	Aumento en veces en porcentaje	Aumento en veces en número absoluto	Aumento en veces en porcentaje	Aumento en veces en número absoluto
12	2,46	0,77	1,08	1,46
18	4,88	2,67	1,23	1,89
21	1,41	1,01	1,85	4,77

Las células Treg parecían expandirse principalmente dentro del timo aproximadamente en el día 18 y se observó una expansión significativa en la periferia (es decir, el bazo) solo después del día 21.

En estas condiciones experimentales particulares, el tratamiento con Ac Dll4 en la fase posterior a la inducción no mostró una mejoría significativa en la progresión de la enfermedad. Las dosificaciones y/o frecuencia de administraciones de Ac Dll4 pueden ajustarse adicionalmente dentro del conocimiento de un experto en la materia. Sin embargo, es importante indicar que los ratones que habían recibido Ac Dll4 antes de la inducción presentaron una reducción significativa en la infiltración celular en la médula espinal el día 18, en comparación con los que habían recibido Ac de control (véase la Tabla 8 mostrada a continuación). La infiltración celular observada en la médula espinal de los ratones tratados con Ac de control podría ser un factor contribuyente importante para el proceso de enfermedad en esos ratones.

Como se muestra en la Tabla 8, hubo una reducción de 8 veces ( $p < 0,0001$ ) en los macrófagos ( $F4/80^+$ ), una reducción de 2,7 veces ( $p < 0,0001$ ) en las células NK, una reducción de 1,7 veces ( $p < 0,001$ ) en las células CD11b y una reducción de 2,5 veces ( $p < 0,001$ ) en células B en la médula espinal de ratones tratados con Ac DII4, en comparación con la médula espinal de los ratones tratados con Ac de control el día 21.

5

Tabla 8

Días después de la inyección de MOG	Número absoluto de células infiltrantes en la médula espinal ( $\times 10^6$ )							
	Macrófagos		Células NK		Células B		Células mieloides CD11b <sup>+</sup>	
	Control	Ac DII4	Control	Ac DII4	Control	Ac DII4	Control	Ac DII4
12	0,4 ± 0,05	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,03	0,1 ± 0,004	0,3 ± 0,005	0,2 ± 0,006	0,9 ± 0,09	0,6 ± 0,02
18	1,7 ± 0,5	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,06	0,1 ± 0,005	1,8 ± 0,2	1,0 ± 0,08	4,7 ± 0,7	1,8 ± 0,1
21	1,6 ± 0,1	0,2 ± 0,01	0,8 ± 0,07	0,3 ± 0,03	1,5 ± 0,1	0,6 ± 0,02	4,8 ± 0,1	2,9 ± 0,2

Además, la producción de IL-17 e IFN- $\gamma$  en ganglios linfáticos en los ratones tratados con Ac DII4 se redujo significativamente ( $p < 0,001$ ) (Fig. 10). De esta manera, DII4 podría estar implicado en la patogénesis de EAE al mediar el desarrollo de Th1 y el tratamiento con Ac DII4 puede prevenir la inducción de la enfermedad al bloquear la secreción de citocinas Th1 y Th17.

10

#### Ejemplo 6. Efecto del bloqueo de DII4 sobre la diabetes

15

También se ensayó el efecto del bloqueo de DII4 sobre la diabetes en ratones NOD/ShiLtJ ("ratones NOD"), un modelo poligénico para la diabetes de tipo 1 (Makino S *et al.*, 1980, Jikken Dobutsu 29 (1): 1-13; Serreze DV *et al.*, 1997, J Immunol 158 (8): 3978-86). La diabetes en los ratones NOD/ShiLtJ se caracteriza por insulinitis e infiltración leucocitaria de los islotes pancreáticos. Se producen notables reducciones del contenido de insulina pancreático de forma espontánea en hembras a aproximadamente 12 semanas de edad y varias semanas después en machos. Por consiguiente, los niveles de glucosa en plasma aumentan a más de 250 mg/dl. En ratones NOD se comprobaron dos veces por semana los niveles de glucosa en sangre, usando ONETOUGH® mini (LifeScan, Inc.). Los ratones se consideraron diabéticos después de dos lecturas consecutivas por encima de 250 mg/dl de glucosa en sangre. El inicio de la diabetes se fechó desde la primera de las mediciones diabéticas secuenciales. En los ratones, se inyectaron hFc ( $n=5$ ) o Ac anti-DII4 (Regn577) ( $n=10$ ) a 25 mg/kg dos veces por semana durante 7 semanas, empezando a las 9 semanas de edad. Los niveles de glucosa en sangre se supervisaron una vez por semana con muestras de sangre extraídas de la cola.

20

25

Como se muestra en la Fig. 11A, los ratones tratados con hFc empezaron a desarrollar una diabetes espontánea con niveles de glucosa en sangre mayores de 250 mg/dl después de 13 semanas de edad (●). Por el contrario, los ratones tratados con Ac anti-DII4 (REGN577) no mostraron ningún signo de aumento en el nivel de glucosa hasta las 25 semanas de edad (■) y las mediciones se continuaron durante 10 semanas más. El tratamiento con Ac DII4 antes del inicio de la diabetes previno el desarrollo de diabetes y los animales tratados no parecían desarrollar diabetes. De manera interesante, cuando 5 de 10 ratones tratados con Ac DII4 se inyectaron con mAc anti-CD25 (PC61) a las 20 semanas de edad para reducir la cantidad de Treg (◆), sus niveles de glucosa en sangre empezaron a aumentar 1-2 semanas después y los ratones se volvieron diabéticos. Esto indicó que el efecto preventivo del Ac DII4 sobre la diabetes de tipo I estaba mediado, al menos en parte, por Treg (Fig. 11A).

30

35

La insulina y GAD65 son dos autoanticuerpos convencionales que se encuentran en los sueros de ratones NOD diabéticos, así como de individuos diabéticos. Por consiguiente, los niveles en suero de autoanticuerpos en los ratones tratados con control de hFc o Ac DII4 se midieron por ELISA. Como se muestra en la Fig. 11B, el tratamiento con Ac DII4 bloqueó la producción de autoanticuerpos anti-insulina (□) y anti-GAD65 (■) a niveles similares a los de C57Bl/6 WT sin tratar (es decir, ratones no NOD; animales de control negativos). Por el contrario, los ratones NOD (diabéticos) que recibieron el control de hFc, tuvieron altos niveles de autoanticuerpos de sus sueros. Además, cuando las secciones pancreáticas de ratones de 23 semanas de edad, que se habían tratado con Ac DII4 y que no mostraban síntomas diabéticos, se tiñeron con H&E (hematoxilina y eosina), se conservaron cantidades normales de islotes pancreáticos (las células que producen insulina o glucagón y su destrucción está directamente correlacionada con la incidencia de diabetes) que conservaban la morfología (Fig. 11C, panel izquierdo y Fig. 11D, panel izquierdo). Además, no se observó infiltración celular dentro de los islotes con los ratones tratados con Ac DII4 (Fig. 11C, panel izquierdo, y Fig. 11D, panel derecho). Por el contrario, los animales diabéticos, que se habían tratado con control de hFc, tuvieron cantidades significativamente menores de islotes pancreáticos (Fig. 11C, panel derecho, y Fig. 11D, panel izquierdo) en sus páncreas que los ratones tratados con Ac DII4 y los pocos islotes restantes contenían altos niveles de infiltración celular (Fig. 11C, panel derecho, y Fig. 11D, panel derecho). De esta manera, Ac DII4 pudo prevenir la diabetes completamente durante un periodo prolongado y su efecto parecía estar, al menos en parte, mediado por la expansión de Treg; sin embargo, es posible que en el efecto protector de Ac DII4 sobre los islotes pancreáticos y/o la insulina pueda estar implicado uno o más mecanismos adicionales.

40

45

50

55

Se determinaron los niveles reales de glucosa en sangre de los ratones diabéticos tratados con Ac Dll4 y se compararon con los de los ratones tratados con control de hFc. Los ratones diabéticos se trataron con 25 mg/kg de Ac Dll4 (n=3) o hFc de control (n=4) al principio de la enfermedad (día 0). Tras el tratamiento con Ac Dll4, los ratones diabéticos redujeron significativamente el nivel de glucosa desde aproximadamente 350 mg/dl a un nivel normal (aproximadamente 120-130 mg/dl) (Fig. 11E). Este efecto duró una media de 4 a 5 semanas. En general, además se observó que, cuando los ratones diabéticos que tenían menos de 350 mg/dl de glucosa en sangre se trataron con Ac Dll4, sus niveles de glucosa se redujeron al nivel normal y este efecto duró más que en los que tenían más de 350 mg/dl de glucosa en sangre en el momento del tratamiento. Esto indica que hay una cierta ventana de oportunidad durante un tratamiento prolongado y eficaz para controlar los niveles de glucosa en sangre con Ac Dll4. De esta manera, sin limitarse por ningún mecanismo específico descrito en el presente documento, estas observaciones sugieren que los anticuerpos Dll4 tienen un gran potencial terapéutico para la diabetes de tipo I.

Los resultados de los experimentos anteriores han revelado la existencia de un bucle regulador previamente desconocido que controla la cantidad de células Treg y DC *in vivo*. Este circuito regulador probablemente es esencial para el equilibrio entre inmunidad y tolerancia, pero lo que es más importante, aporta, por primera vez, la asociación entre tres componentes importantes del sistema inmunitario, es decir, Dll4-DC-Treg. De esta manera, una terapia con antagonistas de Dll4 presenta una metodología eficaz para controlar las cantidades de Treg *in vivo* y, por consiguiente, controlar la progresión de enfermedades autoinmunitarias y afecciones relacionadas.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- <120> Métodos para tratar la diabetes con antagonistas de DLL4
- <130> 6050A1-WO
- <140> A asignar
- <141> Presentado en la presente memoria descriptiva
- <150> 61/299.801
- <151> 29-01-2010
- <150> 61/361.687
- <151> 06-07-2010
- <150> 61/388.697
- <151> 01-10-2010
- <160> 118
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 2058
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 605 430 T3

```

atggcggcag cgtcccggag cgcctctggc tgggcgctac tgctgctggt ggcactttgg 60
cagcagcgcg cggccggctc cggcgtcttc cagctgcagc tgcaggagt catcaacgag 120
cgcgcgctac tggccagtgg cgggccttgc gagcccggct gccggacttt cttccgogtc 180
tgccttaagc acttccaggc ggtcgtctcg cccggaccct gcaccttogg gaccgtctcc 240
acgocggtat tgggcaocaa ctccctcgct gtocgggacg acagtagcgg cggggggcgc 300
aacctctccc aactgcocct caatttcacc tggccgggta ccttctcgct catcatogaa 360
gcttggcacg cgccaggaga cgacctgogg ccagaggcct tgccaccaga tgcactcatc 420
agcaagatcg ccatccaggg ctccctagct gtgggtcaga actggttatt ggatgagcaa 480
accagcacc cacaaggct gcgctactct taccgggtca tctgcagtga caactactat 540
ggagacaact gctcccgcct gtgcaagaag cgcaatgacc acttcggcca ctatgtgtgc 600
cagccagatg gcaacttgtc ctgacctgcc ggttggactg ggaatatg ccaacagcct 660
atctgtcttt cgggctgtca tgaacagaat ggctactgca gcaagccagc agagtgcctc 720
tgccgccag gctggcagg ccggctgtgt aacgaatgca tccccacaa tggctgtcgc 780
cacggcacct gcagcactcc ctggcaatgt acttgtgatg agggctgggg aggctgttt 840
tgtgaccaag atctcaacta ctgcacccac cactccocat gcaagaatgg ggcaacgtgc 900
tccaacagtg ggcagcgaag ctacacctgc acctgtcgcc caggctacac tgggtgggac 960
tgtgagctgg agctcagcga gtgtgacagc aaccocctgtc gcaatggagg cagctgtaa 1020
gaccaggagg atggctacca ctgocctgtgt cctccgggct actatggcct gcattgtgaa 1080
cacagcacct tgagctgccc cgactcccc tgcctcaatg ggggctcctg cgggagcgc 1140
aaccaggggg ccaactatgc ttgtgaatgt ccccccaact tcaccggctc caactgcgag 1200
aagaaagtgg acaggtgcac cagcaacccc tgtgccaacg ggggacagt cctgaaccga 1260
ggtccaagcc gcatgtgccg ctgcccgtct ggattcacgg gcacctactg tgaactccac 1320
gtcagcgact gtgcccgtaa cccttgccc caccggtggca cttgccatga cctggagaat 1380
gggctcatgt gcacctgccc tgccggcttc tctggccgac gctgtgaggt gcgacatcc 1440
atcgatgcct gtgctcgag tcctgtcttc aacagggcca cctgctacac cgacctctcc 1500
acagacacct ttgtgtgcaa ctgcccctat ggctttgtgg gcagccgctg cgagttcccc 1560
gtgggcttgc cgccagctt ccctgggtg gccgtctcgc tgggtgtggg gctggcagtg 1620
ctgctggtac tgctgggcat ggtggcagtg gctgtgcggc agctgoggct tcgacggccg 1680
gacgacggca gcagggaaac catgaacaac ttgtcgact tcagaagga caacctgatt 1740
cotgcccgcc agcttaaaaa cacaaaccag aagaaggagc tggagtggga ctgtggcctg 1800
gacaagtcca actgtggcaa acagcaaac cacacattgg actataatct ggcccaggg 1860
cccctggggc gggggacct gccaggaag tttcccaca gtgacaagag cttaggagag 1920
aaggcgccac tgcggttaca cagtgaaaag ccagagtgtc ggatatcagc gatatgctcc 1980
cccagggact ccatgtacca gtctgtgtgt ttgatatcag aggagaggaa tgaatgtgtc 2040

```

attgccacgg aggtataa

2058

- <210> 2
- <211> 685
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 2

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
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

ES 2 605 430 T3

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 ctggtgaagc cctcgcagaa cctctcactc 60
acctgtgccca tctccggaga cagtgtctct agtgatagtg ctgcttgga ctggatcagg 120
cagtcceccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtgggat 180
aatgattatg cagtatctgt gaaaagtcga ataaccttca acccagatac atccaagaac 240
cacatctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctatcta ttactgtgca 300
agagagggggg ataattggaa ttacggctgg ctogaccocct ggggccaggg aaccacggtc 360
accgtctcct ca 372
  
```

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

20 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 4

ES 2 605 430 T3

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								

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

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 5  
 ggagacagtg tcctagtga tagtgctgct 30

15 <210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 6

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

25 <210> 7  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Sintética

35 <400> 7  
 acatactaca ggtccaagtg gtataat 27

40 <210> 8  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

45 <400> 8

**Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn**  
**1 5**

5 <210> 9  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 9  
 gcaagagagg gggataattg gaattacggc tggctcgacc cc 42

15 <210> 10  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<400> 10

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

25 <210> 11  
 <211> 336  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

35 <400> 11

```

gacatccagt tgaccagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctt cttagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacaa ctctgatct atttggtttc tagtcggggc 180
tccggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatccggca cagatcttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga ttttggattt tattattgta tgcaagctct acaaactccg 300
tacacttttg gccgggggac caaggtggaa atcaaa 336
  
```

40 <210> 12  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Sintética

<400> 12

ES 2 605 430 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	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 ttcttagtaa 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

Leu Val Ser  
 1

ES 2 605 430 T3

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

<220>  
 <223> Sintética

10  
 <400> 17  
 atgcaagctc tacaaactcc gtacact 27

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

<220>  
 <223> Sintética

20  
 <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

<400> 19

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tgggggagggc 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 aaggctgtgt attactgtgc gagagatcac 300
gatttttagga gtggttatga ggggtgggtc gaccocctggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcctca 369
  
```

35  
 <210> 20  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

40  
 <400> 20

45

ES 2 605 430 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 tcagtagta 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

25 1 5

<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 2 605 430 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 acgatttag gagtgggtat gaggggtgtg 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 gggccagtca gagtggtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120  
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240  
 gaagatthtg cagtttatta ctgtcaacac cgtagcaact ggcctccac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

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

45 <220>  
 <223> Sintética

<400> 28

ES 2 605 430 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 2 605 430 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 ctgggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgatgg ctccatcaac agtgttgaat cctactggac ctggatccgc 120
cagcaccag ggaagggcct ggagtgatt ggatacatca aatacaactgg gggcatccac 180
tataaccogt cctcaagag tgcacttggc atatcagtgg acacgtcaaa gaaccagttc 240
tcctgaaaa tgagctctgt gactgcogcg gacacggcog tgtattactg tgcgagagca 300
cgtggaagtc atacttttga tgtctggggc caggggacaa tggtcaccgt ctcttca 357
  
```

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

<220>  
 <223> Sintética

40  
 <400> 36

45

ES 2 605 430 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 2 605 430 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 gcaggggtcac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgactgta 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 2 605 430 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 2 605 430 T3

5  
 <210> 49  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

10  
 <400> 49  
 cagcagtata gtaggtcacc gatcacc 27

15  
 <210> 50  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

20  
 <400> 50

Gln Gln Tyr Ser Arg Ser Pro Ile Thr  
 1 5

25  
 <210> 51  
 <211> 357  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> Sintética

<400> 51

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtcocctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctocatcaac agtgttactt actactggac ctggatccgc 120
cagcaccccag ggaggggcct agagtggatt gggtacatca aattcagtgg gagcacctac 180
tacaaccccgt cctcaaggg tcgagtacc atatcagtgg acacgtotaa gaaccaattc 240
tccttaaaa ttaactctgt gactgccgcg gacacggccg tgttttactg tgogagagct 300
tctggaagtc atacttttga tatctggggc caagggaaa tggtcaccgt ctcctca 357
  
```

35  
 <210> 52  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

40  
 <400> 52

45

ES 2 605 430 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 80  
 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 2 605 430 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 gagtgttagc aacagctact tagcctggta ccagcagaaa 120  
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctct ggtgcgtcca gcagggtcac tggcatccca 180  
 gacaggttca gtggcagtgg gtotgggaca 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 2 605 430 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 2 605 430 T3

5  
 <210> 65  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

10  
 <400> 65  
 cagcagtata gtaggtcacc gatcacc 27

15  
 <210> 66  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

20  
 <400> 66

Gln Gln Tyr Ser Arg Ser Pro Ile Thr  
 1 5

25  
 <210> 67  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> Sintética

<400> 67

```

gaagtgcagc tgggtgcagtc tgggggagcc ttggtacaac ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttaac aactttgcca tgacctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaact attagtggta gtggcggtga cacatactgc 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgttc gaaagatggc 300
gccttctata gtggctacga aactactctg ggccagggaa ccacggtcac cgtctcctca 360
  
```

35  
 <210> 68  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

40  
 <400> 68

45

ES 2 605 430 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

<400> 72

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

25 <400> 74

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

30 <210> 75  
<211> 324  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Sintética

<400> 75

```

gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc 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 2 605 430 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 2 605 430 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

```

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
tggaacaagc actggttcga ccctgggggc caggaacca tggtcaccgt ctcttca 357
  
```

35  
 <210> 84  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

40  
 <400> 84

45

ES 2 605 430 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 tgggt 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 2 605 430 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  
 gcgaggtata gttggaacaa gcactgggtc 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 tccagggcacc ctgtctttgt ctccagggga cagagccacc 60**  
**ctctcctgca gggccagtca gagtgttacc ggcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120**

**cctggccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcatcca acagggccac tggcatocca 180**  
**gacaggttca ctggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240**  
**cctgaagatt ttgcagtgta tttctgtcaa cagtctgctt tctcaccgtg gaogttoggc 300**  
**caggggacca aggtggaat caaa 324**

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

45 <220>  
 <223> Sintética

<400> 92

ES 2 605 430 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

<400> 96

**Gly Ala Ser**  
**1**

ES 2 605 430 T3

5  
 <210> 97  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

10  
 <400> 97  
 caacagtctg ctttctcacc gtggacg 27

15  
 <210> 98  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

20  
 <400> 98

Gln Gln Ser Ala Phe Ser Pro Trp Thr  
 1 5

25  
 <210> 99  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> Sintética

<400> 99

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtggt actactggag ttggatccgc 120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtgatt gggtagatcc attatagtgg gaacacccac 180
tacaatccga ccctcaagag tccaattacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tcccttgagg tgaactctgt gactgccgcg gacacggcgg tatactactg tgcgaggaat 300
atggttcggg gagttcactg gttcgacccc tggggccagg gaaccacggt cacogtctcc 360
tca 363
  
```

35  
 <210> 100  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Sintética

40  
 <400> 100  
 45



ES 2 605 430 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 tagoctggta 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 caaa 324
    
```

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

45  
<220>  
<223> Sintética

<400> 108

ES 2 605 430 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 2 605 430 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

```

cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt cggccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgtcattt ttatggtatg atggaactaa taaaaactat 180
gtagagtccg tgaagggccg attcaccatc tcaagagaca attccaagaa tatgctgtat 240
ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcac 300
gattttagga gtggttatga ggggtggttc gaccctctggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcctca
  
```

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

<220>  
 <223> Sintética

40  
 <400> 116

45

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1          5          10
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> 117  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintética

<400> 117

```

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

```

15 <210> 118  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <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

```

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un antagonista del ligando de tipo delta 4 (DII4) para su uso en la prevención, tratamiento o mejoría de la diabetes mellitus de tipo 1 en un sujeto, donde el antagonista bloquea la interacción entre DII4 y el receptor Notch y se previene, trata o mejora la diabetes, y donde el antagonista de DII4 es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a hDII4 y bloquea las rutas de señalización DII4-Notch, o una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de DII4 que está fusionado al dominio Fc de una IgG humana.
2. Un antagonista del ligando de tipo delta 4 (DII4) para su uso en la reducción del nivel de glucosa en sangre asociado con la diabetes mellitus de tipo 1 en un sujeto que lo necesita, donde el antagonista bloquea la interacción entre DII4 y el receptor Notch y se reduce el nivel de glucosa en sangre, y donde el antagonista de DII4 es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a hDII4 y bloquea las rutas de señalización DII4-Notch, o una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de DII4 que está fusionado al dominio Fc de una IgG humana.
3. El antagonista de DII4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 22, 24 y 26, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 30, 32 y 34, respectivamente.
4. El antagonista de DII4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende (a) una secuencia de HCVR de SEQ ID NO: 20 o 116 y una secuencia de LCVR de SEQ ID NO: 28 o 118, o (b) una combinación de HCVR/LCVR de SEQ ID NO: 20/28 o 116/118.
5. El antagonista de DII4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en combinación con al menos un agente terapéutico adicional seleccionado entre un agente reductor de la glucosa en sangre, un inmunosupresor, un agente antiinflamatorio y un agente analgésico, opcionalmente, donde:
- (i) el agente terapéutico adicional es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en insulina o análogos de la misma, glucocorticoides, ciclosporina, metotrexato, antiinflamatorios no esteroideos (AINE), antagonistas de TNF- $\alpha$ , antagonistas de IL-1, antagonistas de IL-6 y opiáceos; y/o
  - (ii) el antagonista de DII4 y dicho al menos un agente terapéutico adicional son para la administración conjunta o secuencial.
6. Uso de un antagonista del ligando de tipo delta 4 (DII4) en la fabricación de un medicamento para prevenir, tratar o mejorar la diabetes mellitus de tipo 1 en un sujeto, donde el antagonista bloquea una interacción entre DII4 y el receptor Notch, y
- donde el antagonista de DII4 es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a hDII4 y bloquea las rutas de señalización DII4-Notch, o una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de DII4 que está fusionado al dominio Fc de una IgG humana.
7. Uso de un antagonista del ligando de tipo delta 4 (DII4) en la fabricación de un medicamento para reducir el nivel de glucosa en sangre asociado con la diabetes mellitus de tipo 1 en un sujeto, donde el antagonista bloquea la interacción entre DII4 y el receptor Notch, y
- donde el antagonista de DII4 es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a hDII4 y bloquea las rutas de señalización DII4-Notch, o una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de DII4 que está fusionado al dominio Fc de una IgG humana.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de las SEQ ID NO: 22, 24 y 26, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 30, 32 y 34, respectivamente.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende (a) una secuencia de HCVR de SEQ ID NO: 20 o 116, y una secuencia de LCVR de SEQ ID NO: 28 o 118, o (b) una combinación de HCVR/LCVR de SEQ ID NO: 20/28 o 116/118.

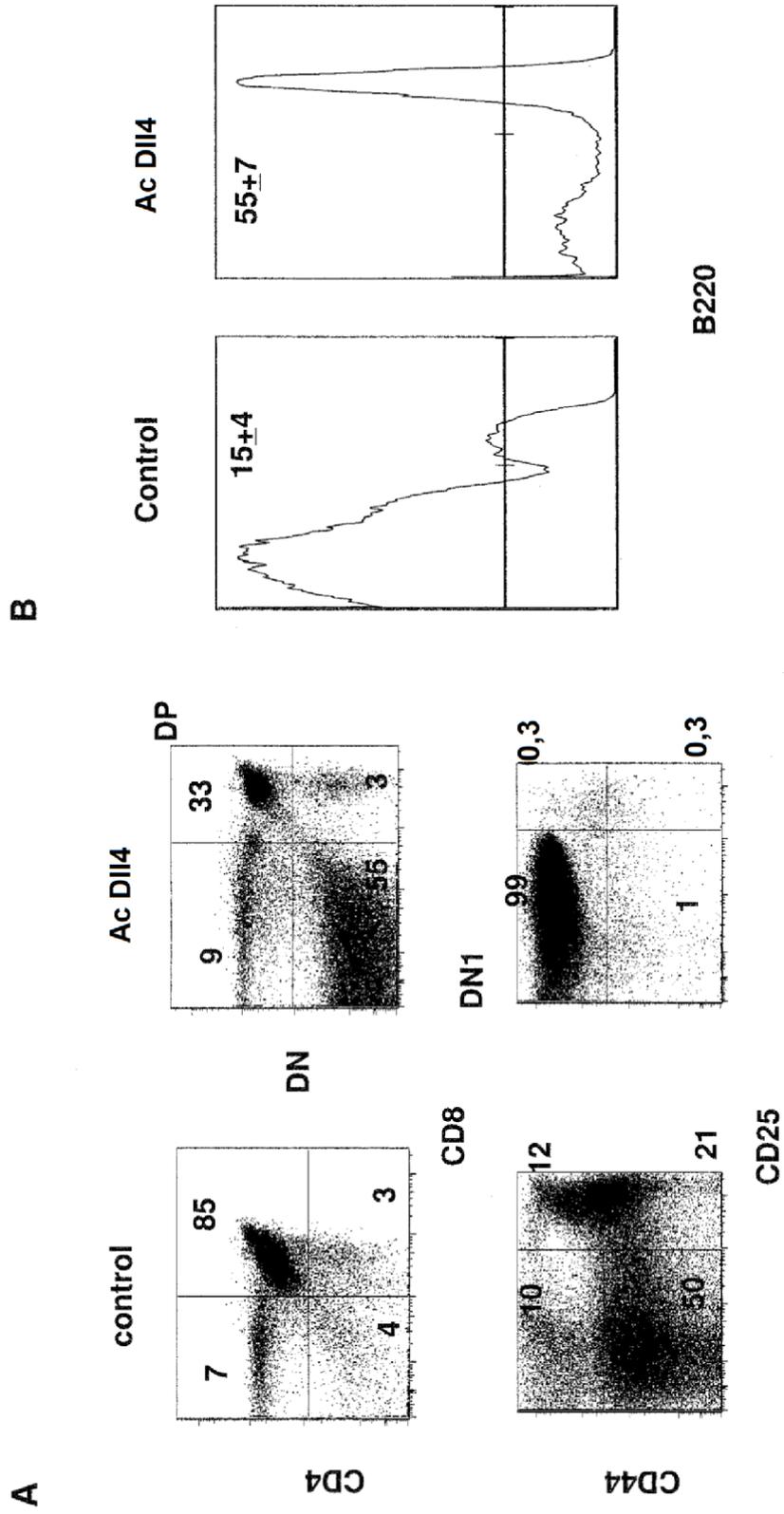


Fig. 1A-B

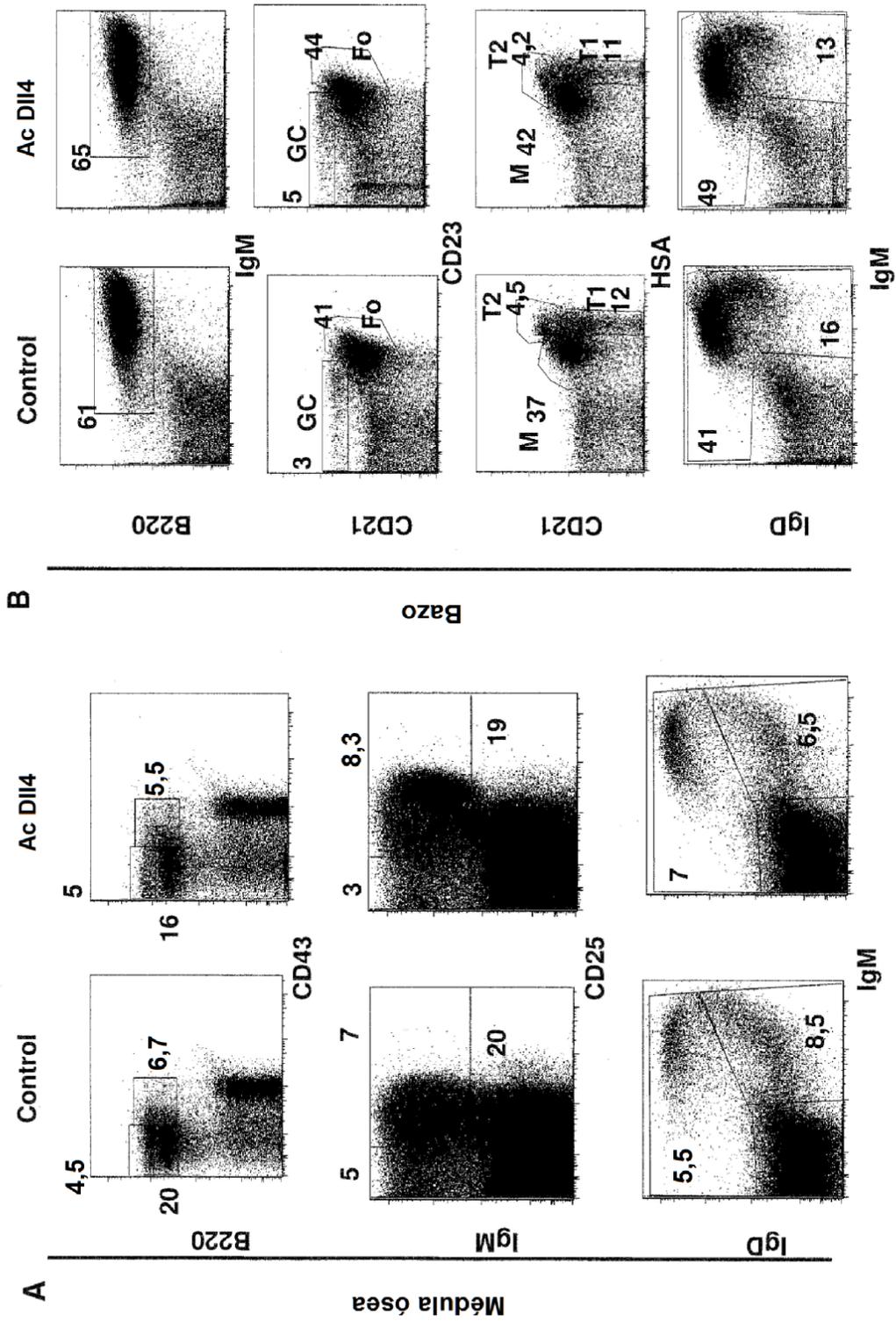


Fig. 2A-B

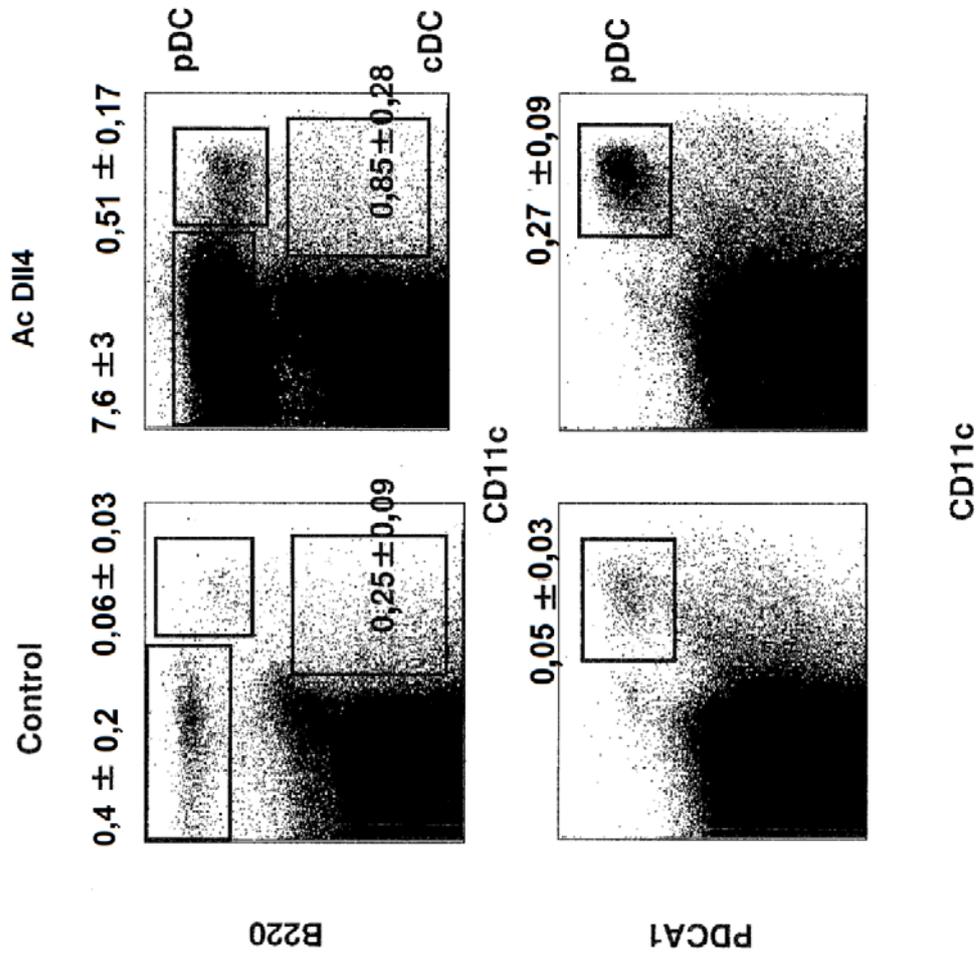


Fig. 3A

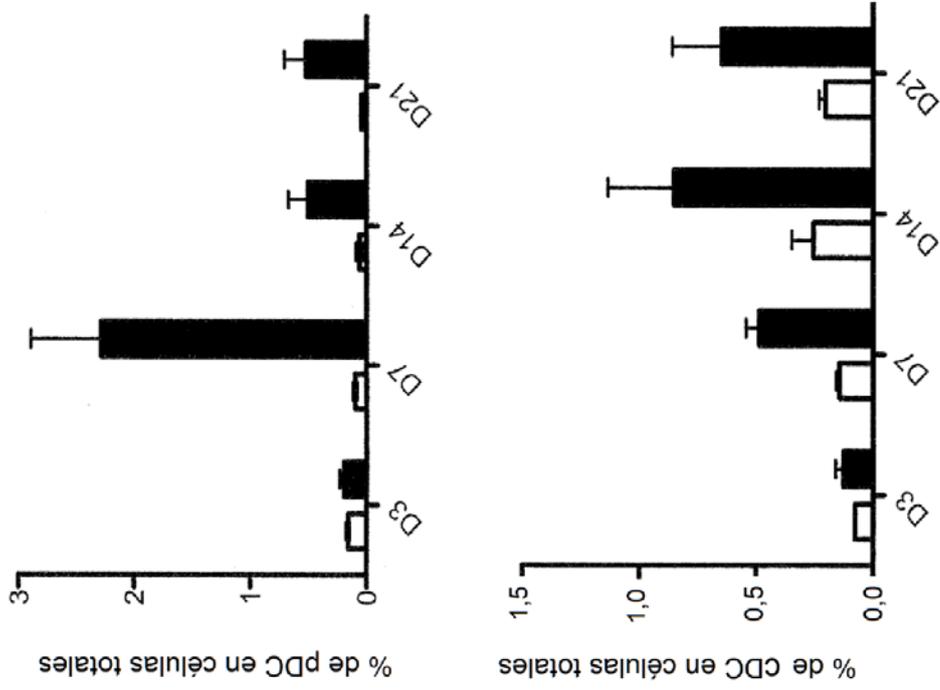


Fig. 3B

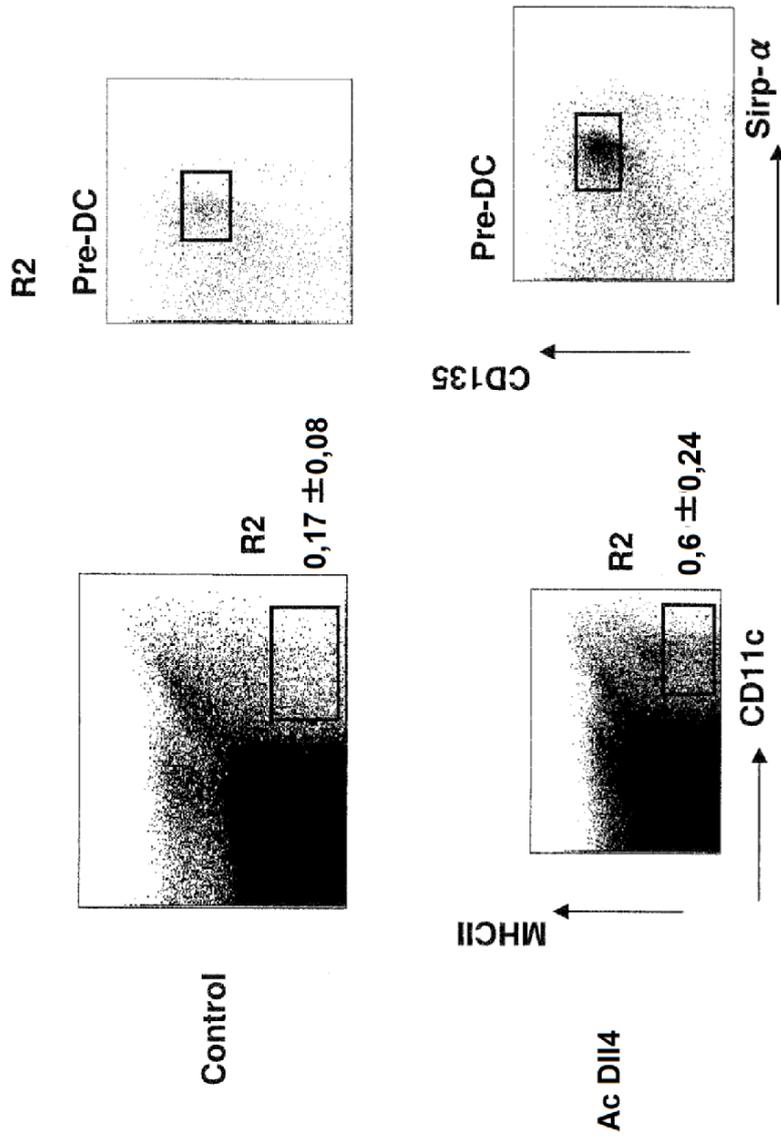


Fig. 3C

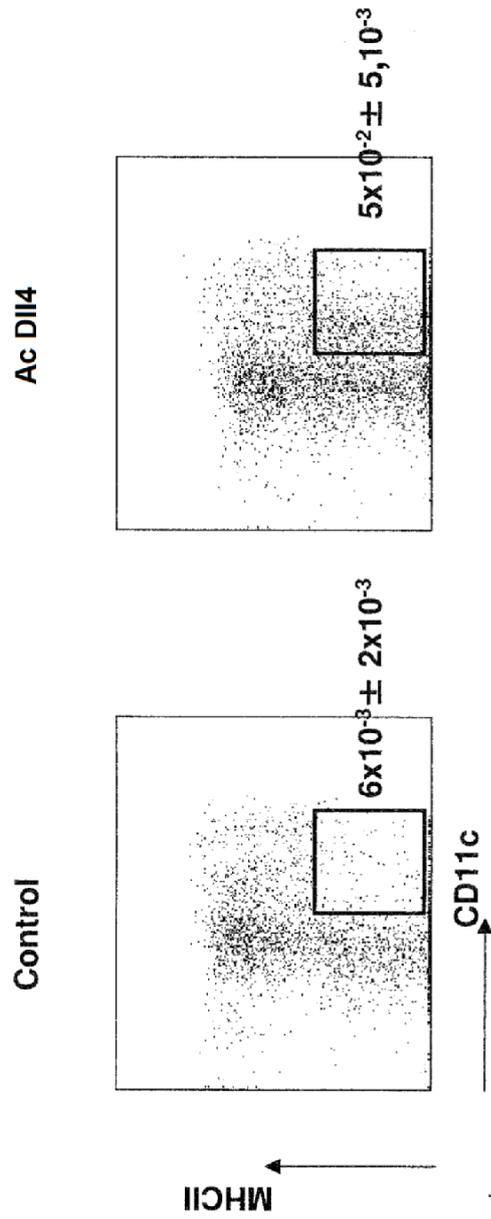


Fig. 3D

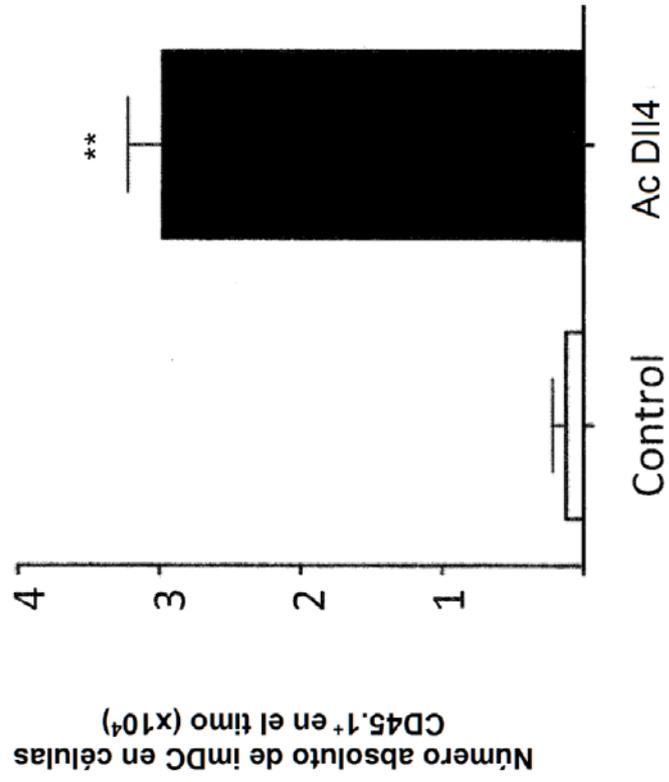


Fig. 4

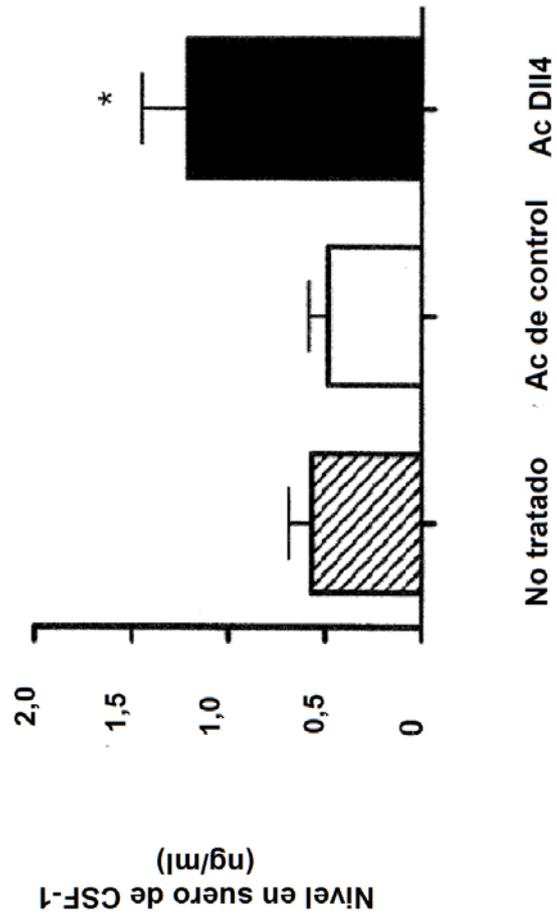


Fig. 5

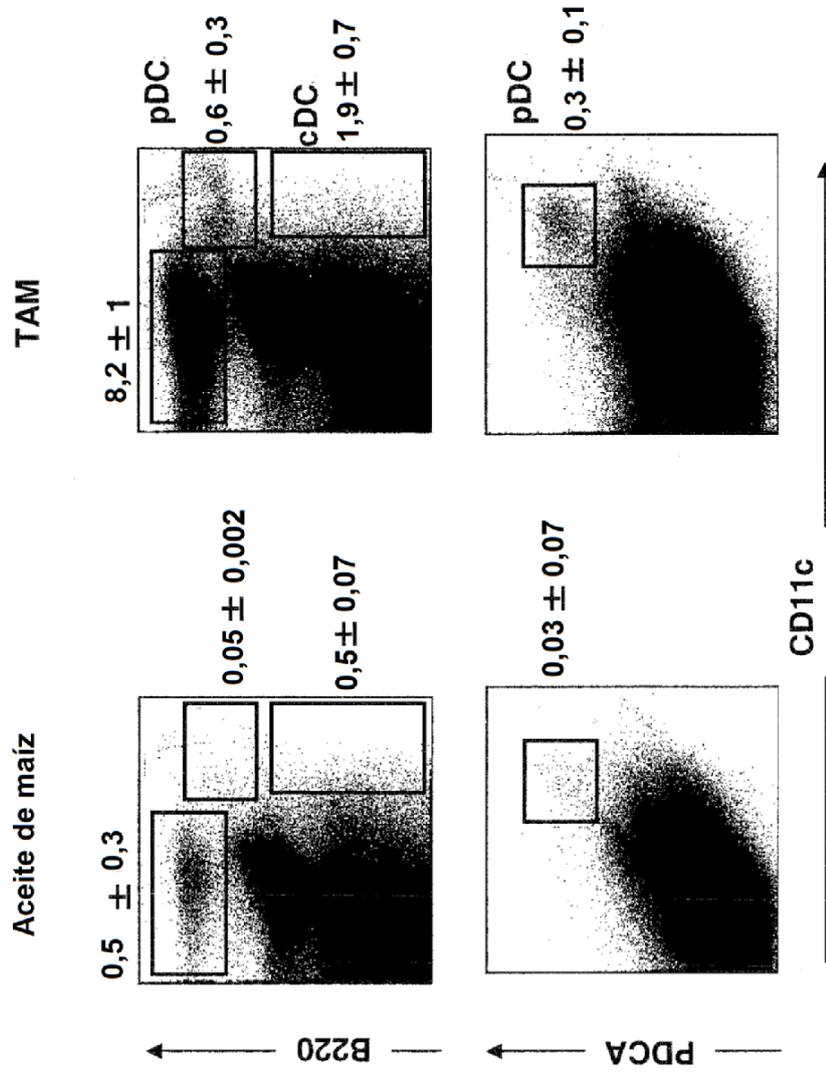


Fig. 6

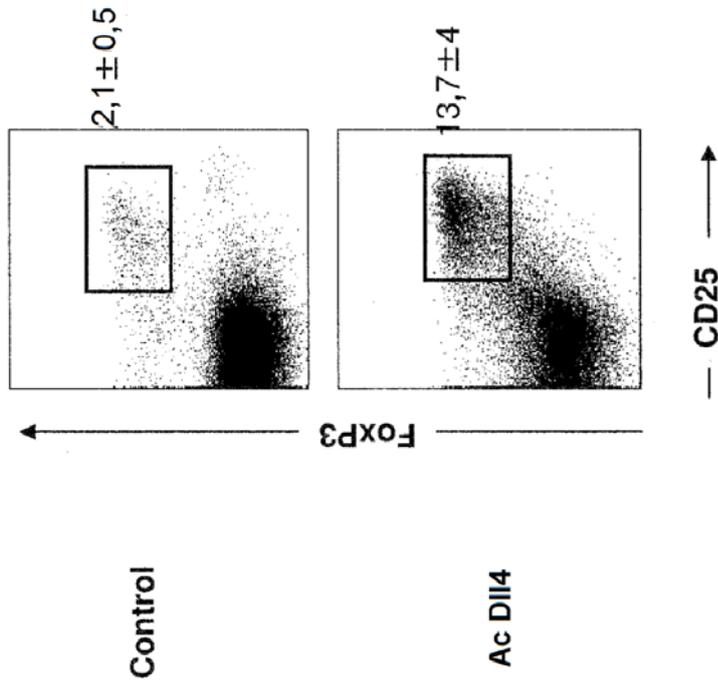


Fig. 7A

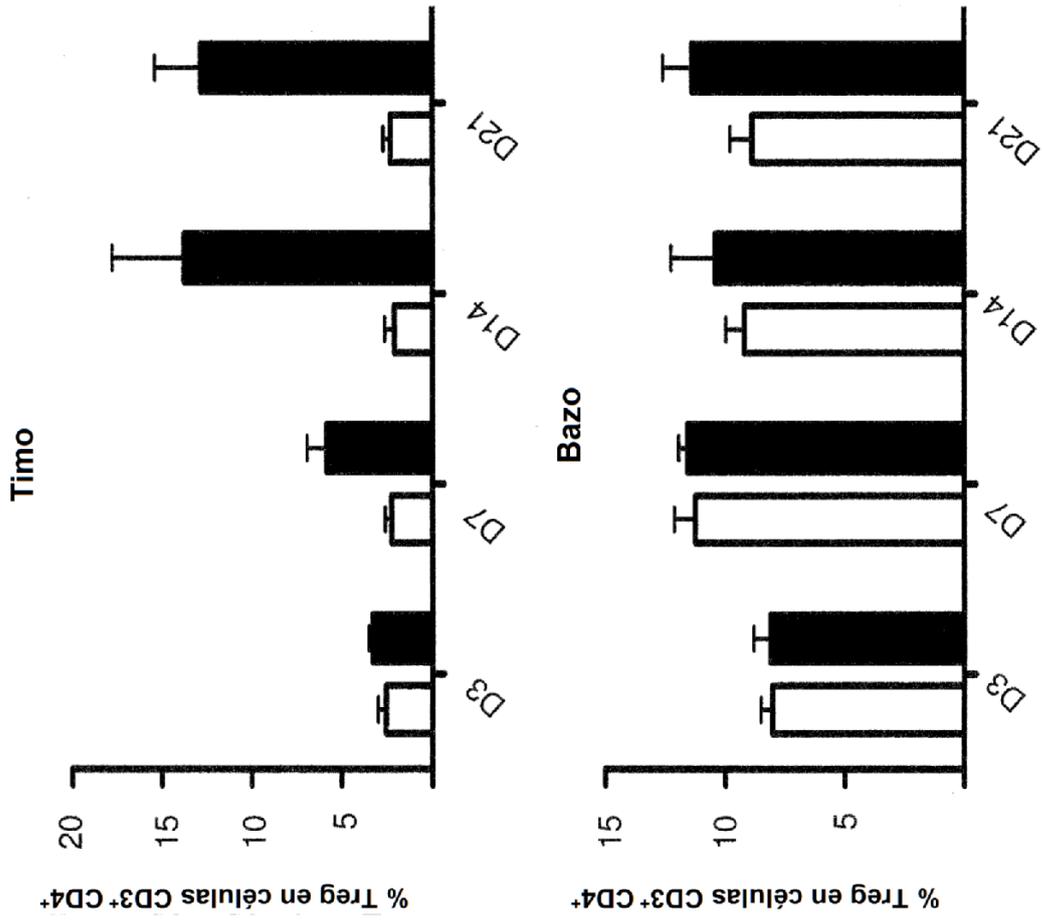


Fig. 7B

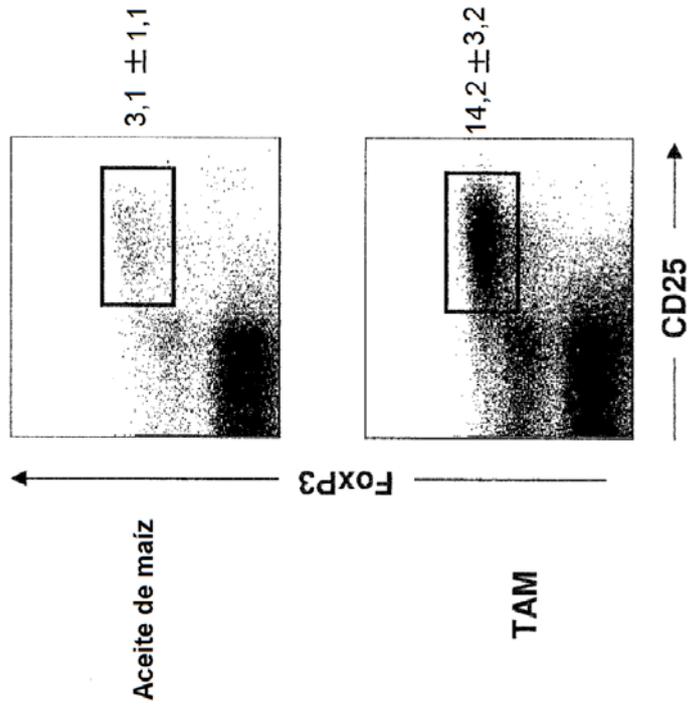


Fig. 7C

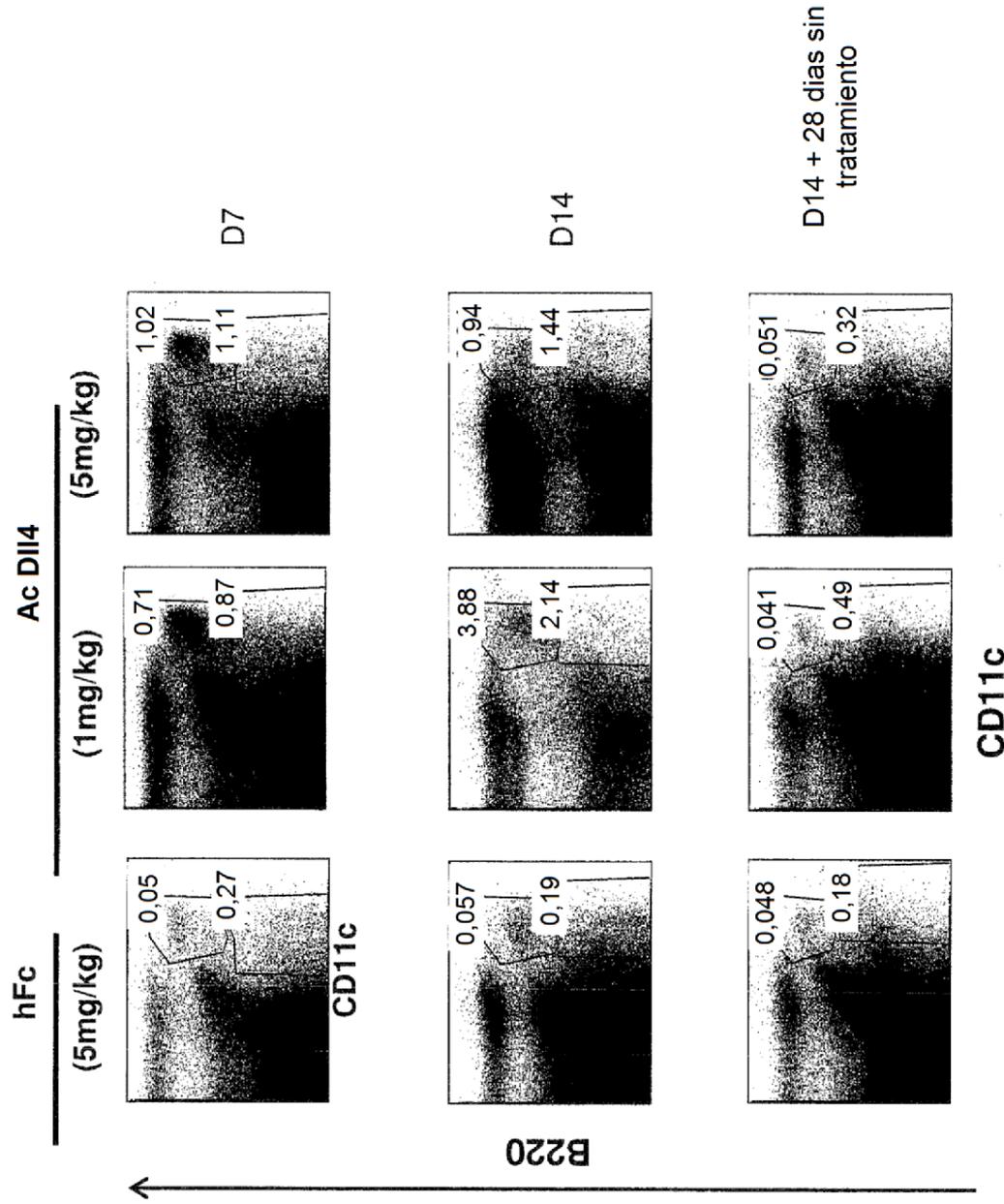


Fig. 8A

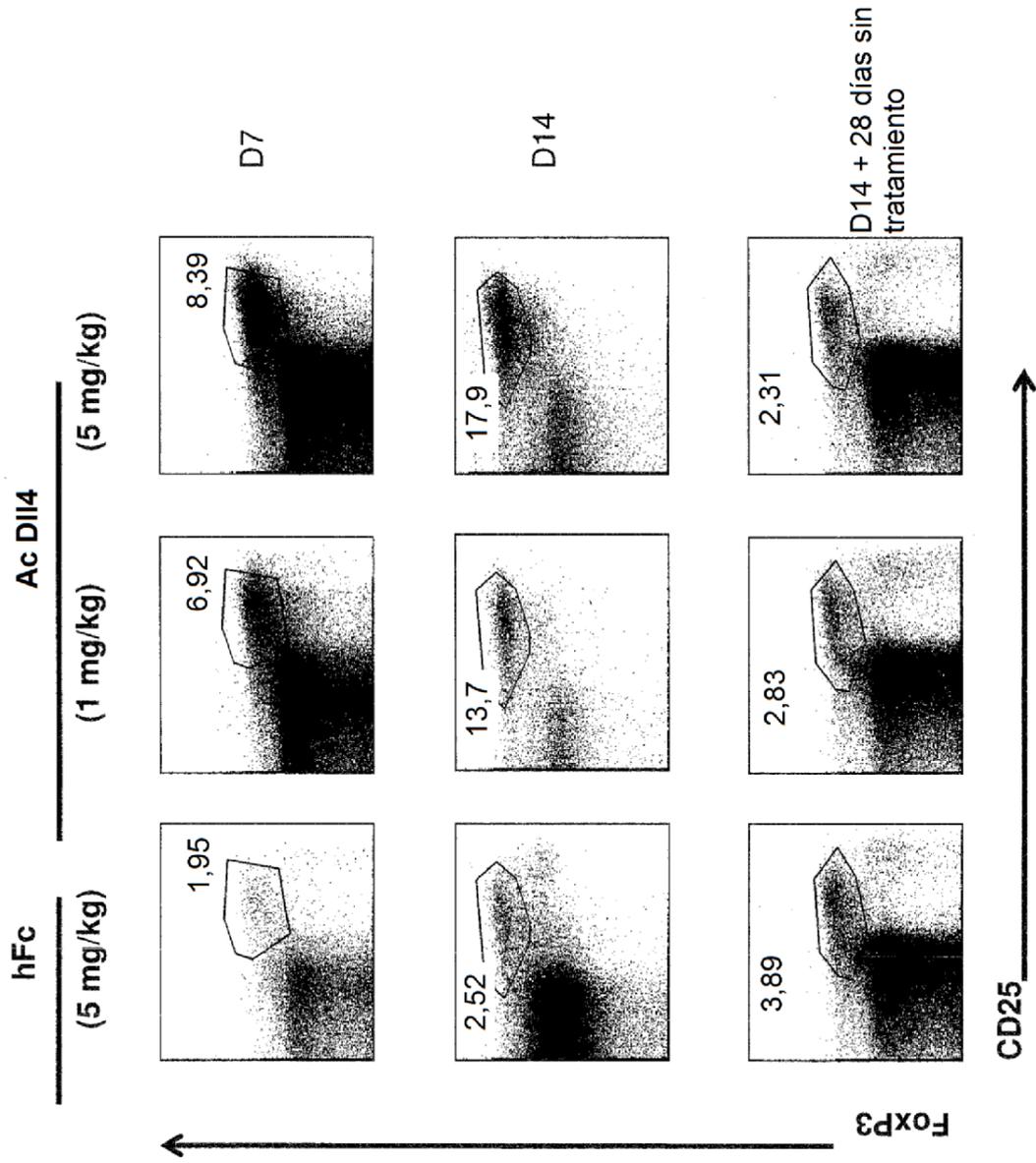


Fig. 8B

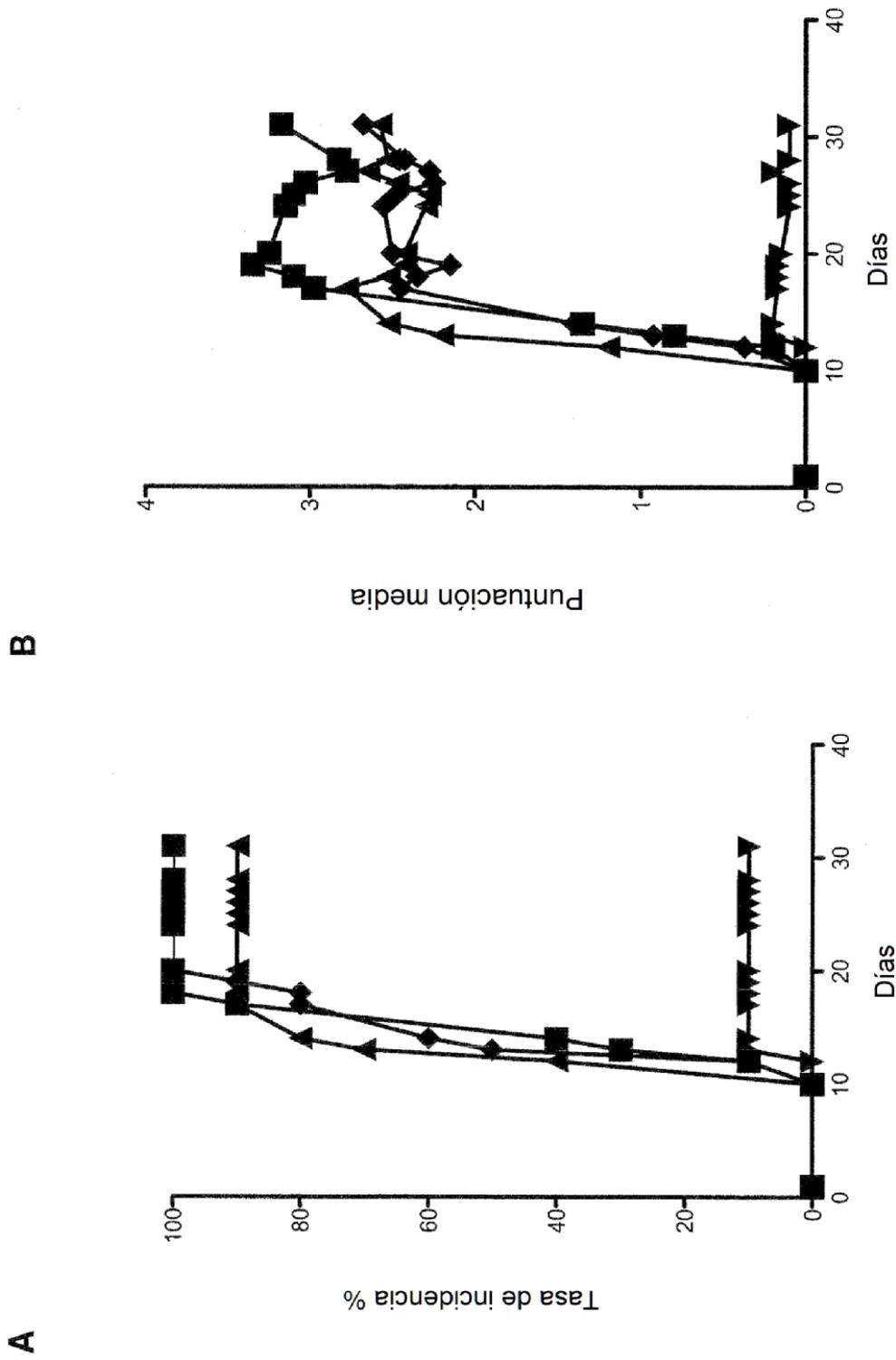


Fig. 9A-B

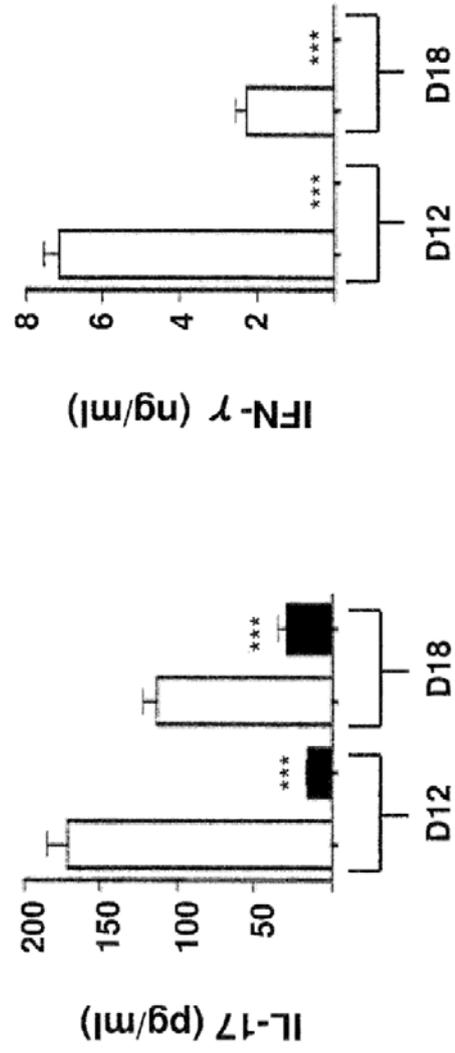


Fig. 10

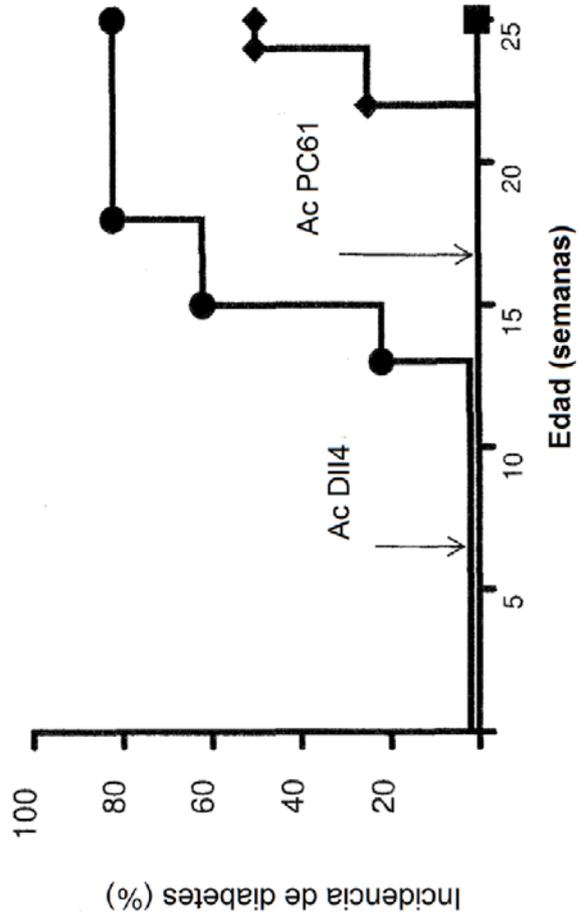


Fig. 11A

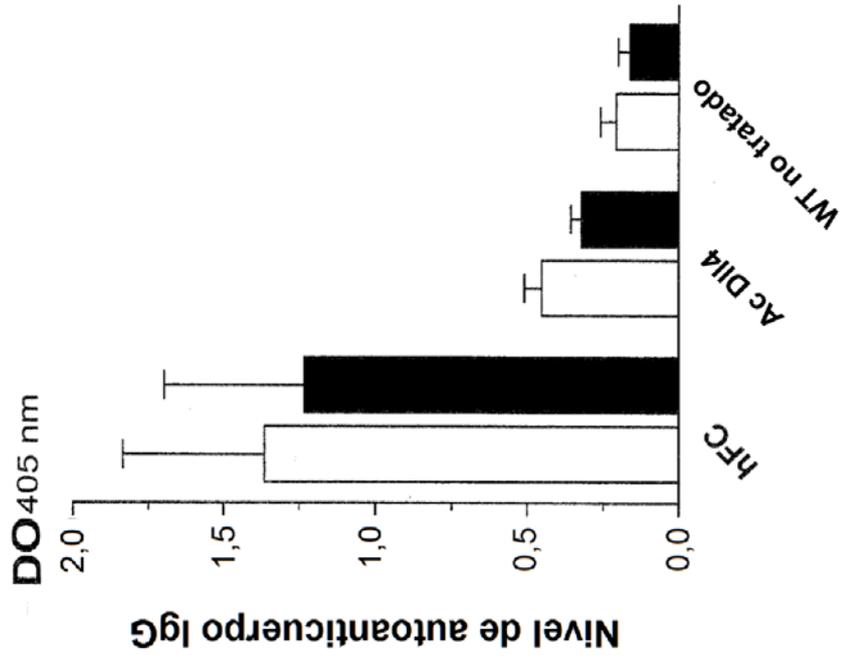


Fig. 11B

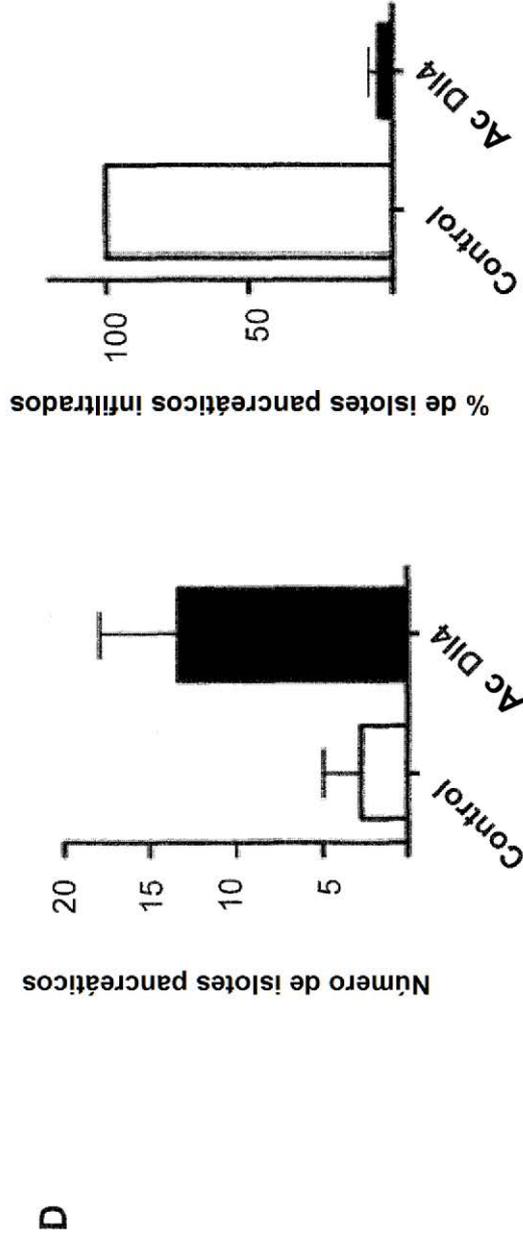
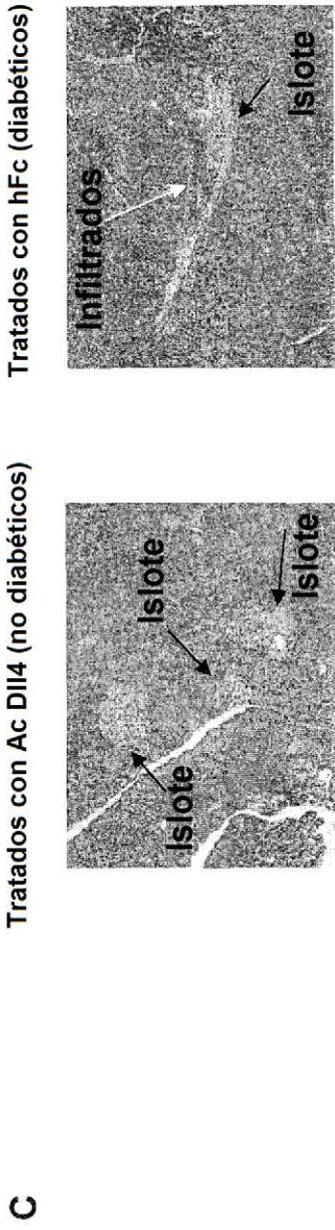


Fig. 11C-D

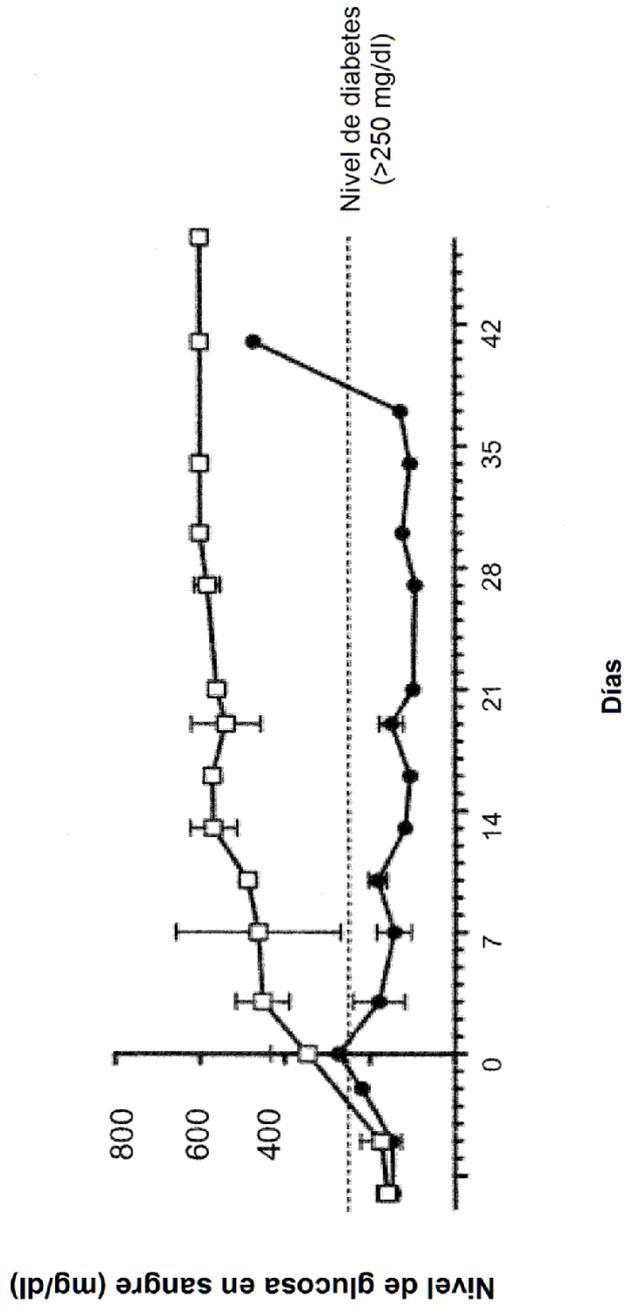


Fig. 11E