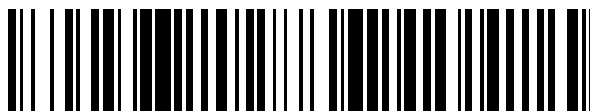


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 663**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2011 PCT/US2011/022810**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011 WO2011094465**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2011 E 11701933 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2528946**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes con antagonistas del DII4**

30 Prioridad:

01.10.2010 US 388697 P

06.07.2010 US 361687 P

29.01.2010 US 299801 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.04.2017

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 2 609 663 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 el tratamiento de enfermedades autoinmunes con antagonistas del Dll4.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a antagonistas del ligando de tipo delta 4 (Dll4) para su uso en métodos para el tratamiento de la esclerosis múltiple, específicamente mediante el bloqueo de la unión del Dll4 a un receptor Notch con antagonistas del Dll4, aumentando así el número de Tregs. La invención también se refiere a antagonistas del Dll4 para su uso en métodos para la prevención de la aparición de la esclerosis múltiple o de su reaparición en un sujeto que está predispuesto o que es susceptible.

Descripción de la técnica relacionada

15 Las interacciones entre los receptores Notch y sus ligandos representan una importante ruta conservada evolutivamente, no sólo para las decisiones del destino de la célula, sino también en la regulación de las decisiones de estirpe 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 Dll4-Notch1 da lugar a un bloqueo completo en el desarrollo de los linfocitos T, acompañado por la aparición ectópica de linfocitos B y una expansión de las células dendríticas (CD) que pueden surgir a partir de la conversión del destino de una célula Pro-T en una CD en el 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). Por lo tanto, se acumulan pruebas de que la señalización Notch es crítica para la determinación de la decisión del destino celular a partir de las células progenitoras hematopoyéticas. Adicionalmente, se ha demostrado un control por retroalimentación de la homeostasis de los linfocitos T reguladores (Treg) por parte de las CD *in vivo* (Darrasse-Jèze et al., 2009, J Exp Med 206 (9): 1853-1862). Sin embargo, el papel de la señalización Notch en el control del origen y el desarrollo de las CD, y consecuentemente en la homeostasis de los Treg, todavía se desconoce. Es una cuestión críticamente importante debido a que la identificación de nuevos métodos de inducción de la expansión de los Treg podría usarse como tratamiento de enfermedades y trastornos de la autoinmunidad.

30 Se ha demostrado que la inhibición del Notch3 con anticuerpos anti-Notch3 atenúa la encefalomiелitis autoinmune experimental (Jurynczyk et al., 2008, J Immunol 180 (4): 2634-2640).

35 Las secuencias de los ácidos nucleicos y de los aminoácidos del Dll4 humano (hDll4) se muestran en las SEQ ID NOS: 1 y 2, respectivamente. Los antagonistas del Dll4 y sus usos se divulgan en el documento WO 2007/143689, en el documento WO 2007/070671, en el documento WO 2008/076379, en el documento WO 2008/042236 y en el documento WO/2008/019144.

Sumario breve de la invención

40 La presente invención se basa en parte en la observación por parte del presente inventor de que un anticuerpo, que se une específicamente al Dll4 y bloquea la unión del Dll4 a los receptores Notch, es capaz de prevenir completamente la progresión de una Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) en ratones, un modelo animal de la esclerosis múltiple humana, mientras que un anticuerpo de control no previene la EAE. Adicionalmente, el presente inventor ha descubierto que este efecto del anticuerpo anti-Dll4 está asociado con un aumento en el número de linfocitos Treg. Además, se ha observado adicionalmente que un anticuerpo anti-Dll4 previene un aumento en el nivel de glucosa en sangre y preserva el número y la morfología de los islotes pancreáticos en ratones NOD/ShiLtJ, un modelo animal de la diabetes de tipo 1, y dichos efectos están mediados, al menos en parte, por la expansión de los Tregs.

50 Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención presenta un antagonista del ligando de tipo delta 4 (Dll4) para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de la esclerosis múltiple, en el que el antagonista del Dll4 es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente al Dll4 humano (hDll4) y bloquea las rutas de señalización Dll4-Notch y el antagonista bloquea la interacción entre el Dll4 y el receptor Notch, aumentando así el número de linfocitos T reg y se previene, se trata o se mejora la esclerosis múltiple, y en el que el anticuerpo o el fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) que comprende las secuencias de las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 22, 24 y 26, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende las secuencias de las cadenas ligeras CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 30, 32 y 34, respectivamente.

60 En un segundo aspecto, la invención presenta el uso de un antagonista del ligando de tipo delta 4 (Dll4) en la preparación de un medicamento para la prevención, el tratamiento o la mejora de la esclerosis múltiple, en el que el antagonista del Dll4 es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente al Dll4 humano (hDll4) y bloquea las rutas de señalización Dll4-Notch y el antagonista bloquea una interacción entre el Dll4 y el receptor Notch, aumentando así el número de linfocitos Treg y se previene, se trata o se mejora la esclerosis múltiple, y en el que el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) que

comprende las secuencias de las cadenas pesadas CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 22, 24 y 26, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende las secuencias de las cadenas ligeras CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 30, 32 y 34, respectivamente.

5 En una realización, el antagonista del Dll4 para dicho uso es un anticuerpo contra el Dll4 o un fragmento del mismo ("Ac anti-Dll4" o "Ac contra el Dll4") que se une específicamente al Dll4 con una elevada afinidad y bloquea la unión del Dll4 a los receptores Notch y/o bloquea las rutas de señalización Dll4-Notch. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, monoclonal (AcMc), quimérico, humanizado o humano completo, o un fragmento de los mismos. El fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo de cadena única, un Fab o un (Fab')₂.

10 En una realización, el Ac contra el Dll4 o el fragmento de unión al antígeno del mismo se une a un epítipo del dominio N terminal (residuos S27-R172) o del dominio Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) (residuos V173-C217) o del dominio DSL N terminal (residuos S27-C217) del hDll4 (SEQ ID NO: 2). En otra realización, el Ac contra el Dll4 o el fragmento de unión al antígeno del mismo se une a un epítipo de uno de los dominios del EGF, es decir, aproximadamente en los residuos de aminoácidos 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), del hDll4 (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo puede unirse a un epítipo conformacional que implica a más de uno de los epítopos enumerados anteriormente. El Ac contra el Dll4 o un fragmento del mismo puede ser capaz de unirse al Dll4 humano con una elevada afinidad, y tiene una constante de disociación en equilibrio (K_d) de aproximadamente 1 nM o menos, de aproximadamente 500 pM o menos, de aproximadamente 300 pM o menos, de aproximadamente 200 pM o menos, de aproximadamente 100 pM o menos o de aproximadamente 50 pM o menos, medida mediante una resonancia de plasmón superficial.

25 El Ac contra el Dll4 o un fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 22, 24 y 26, respectivamente. El anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 30, 32 y 34, respectivamente. En una realización, el Ac contra el Dll4 comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 o 116, o una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 o 118. En otra realización, el Ac contra el Dll4 comprende una combinación de HCVR/LCVR de las SEQ ID NO: 20/28 (REGN281) o de las 116/118 (REGN421).

35 En ciertos aspectos descritos en el presente documento, el Ac contra el Dll4 comprende una combinación de las CDR1/CDR2/CDR3 de la cadena pesada y una combinación de las CDR1/CDR2/CDR3 de la cadena ligera seleccionada entre: las SEQ ID NO: 6/8/10 y las SEQ ID NO: 14/16/18, respectivamente; las SEQ ID NO: 38/40/42 y las SEQ ID NO: 46/48/50, respectivamente; las SEQ ID NO: 54/56/58 y las SEQ ID NO: 62/64/66, respectivamente; las SEQ ID NO: 70/72/74 y las SEQ ID NO: 78/80/82, respectivamente; las SEQ ID NO: 86/88/90 y las SEQ ID NO: 94/96/98, respectivamente; y las SEQ ID NO: 102/104/106 y las SEQ ID NO: 110/112/114, respectivamente. En otro aspecto descrito en el presente documento, el Ac contra el Dll4 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 otro aspecto más, descrito en el presente documento, el Ac contra el Dll4 comprende una combinación de HCVR/LCVR seleccionada entre: las SEQ ID NO: 4/12 (REGN279); las SEQ ID NO: 36/44 (REGN290); las SEQ ID NO: 52/60 (REGN306); las SEQ ID NO: 68/76 (REGN309); las SEQ ID NO: 84/92 (REGN310); y las SEQ ID NO: 100/108 (REGN289).

50 Las secuencias de nucleótidos que codifican para la 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 las 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.

55 En ciertos aspectos descritos en el presente documento, el antagonista del Dll4 es una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular del Dll4 o un fragmento del mismo fusionado con un dominio Fc de una IgG humana.

60 En algunas realizaciones, la invención presenta el antagonista del Dll4 como se ha descrito anteriormente para su uso en un método para la prevención o la reducción de la aparición o de la reaparición de la esclerosis múltiple, en un sujeto que está predispuesto o que es susceptible al desarrollo de una esclerosis múltiple, que comprende la administración al sujeto de una cantidad profilácticamente eficaz del antagonista del Dll4.

65 En algunas realizaciones, la invención presenta el antagonista del Dll4 como se ha descrito anteriormente para su uso en un método para la prevención, el tratamiento o la mejora de la esclerosis múltiple, que comprende la administración a un sujeto en necesidad de la misma de una cantidad eficaz del antagonista del Dll4 junto con un

agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente inmunosupresor, un agente antiinflamatorio, un agente analgésico, un agente reductor de la glucosa en sangre (por ejemplo, insulina, análogos de la insulina, y similares), muchos de los cuales pueden tener unos efectos terapéuticos solapantes entre sí. Algunos inmunosupresores adecuados para ser usados junto con el antagonista del DII4 incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, ciclosporina, metotrexato, interferón β (IFN- β), tacrolimus, sirolimus, azatioprina, mercaptopurina, opioides, micofenolato, proteínas de unión al TNF, tales como infliximab, etanercept, adalimumab, y similares, antibióticos citotóxicos, tales como dactinomina, antraciclinas, mitomicina C, bleomicina, mitramicina, y similares, anticuerpos dirigidos a las células inmunitarias, tales como anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-CD3, y similares. Algunos agentes antiinflamatorios y/o analgésicos adecuados para las terapias de combinación con antagonistas anti-DII4 incluyen corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno y similares, antagonistas del TNF- α , antagonistas de la IL-1, antagonistas de la IL-6, paracetamol, morfomiméticos, y similares.

En el presente documento también se describe una composición farmacéutica que comprende un antagonista del DII4, al menos un agente terapéutico adicional, y un portador farmacéuticamente aceptable. El antagonista del DII4 puede ser un Ac contra el DII4 o un fragmento del mismo que se une específicamente al DII4 con una elevada afinidad y neutraliza las actividades del DII4, y al menos un agente terapéutico adicional es cualquiera de los agentes inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, agentes analgésicos, agentes reductores de la glucosa, y similares, descritos anteriormente.

En el presente documento también se describe un kit que comprende un envase que comprende la composición farmacéutica y un prospecto con instrucciones para su uso. El kit puede comprender un envase que comprende en el mismo un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente al hDII4, otro envase que comprende en el mismo al menos un agente terapéutico adicional descrito anteriormente.

Otros objetos y ventajas serán evidentes a partir de una revisión de la descripción detallada que sigue.

Breve descripción de las figuras

Las **Fig. 1A - 1B** muestran los efectos del bloqueo del DII4 sobre el desarrollo de los linfocitos T y de los linfocitos B. Se inyectaron ratones con el anticuerpo anti-DII4 (REGN577) o con un fragmento Fc humano de control (hFc). Catorce días después se recogieron los timos y se evaluaron los subconjuntos de linfocitos T y de linfocitos B mediante una citometría de flujo. **Fig. 1A:** gráficas de puntos que muestran el número de linfocitos T CD4⁺CD8⁻ (precursores tímicos dobles negativos o "DN"), CD4⁺CD8⁺ (precursores tímicos dobles positivos o "DP"), CD4⁺ o CD8⁺ (precursores tímicos positivos simples o "SP") y DN/CD44⁺CD25⁻ (precursores tímicos en el estadio DN1). Las cifras de las gráficas de puntos representan los porcentajes (media \pm EEM) de las subpoblaciones de linfocitos T entre el total de las células tímicas. **Fig. 1B:** histogramas que muestran el porcentaje (media \pm DT) de linfocitos B (B220⁺) entre las células DN1 (es decir, los clasificados como CD4⁺CD8⁻CD44⁺CD25⁻).

Las **Fig. 2A - 2B** muestran los efectos del bloqueo del DII4 en los estadios de desarrollo de los linfocitos B en la médula ósea (Fig. 2A) y en la homeostasis de los linfocitos B en el bazo (Fig. 2B). Las cifras de las gráficas de puntos representan los porcentajes (media \pm EEM) de los subconjuntos de linfocitos B entre el total de células en la médula ósea o en el bazo. GC: centro germinal de los linfocitos B; T1 y T2: subconjuntos de linfocitos B; M: linfocitos B marginales; y Fo: linfocitos B foliculares.

Las **Fig. 3A - 3D** muestran los efectos del bloqueo del DII4 sobre el desarrollo de las células dendríticas (CD). **Fig. 3A:** gráficas de puntos que muestran la expansión de las CD convencionales ("cCD"; B220-CD11c⁺) y de las CD plasmacitoides ("pCD"; PDCA1⁺B220⁺CD11c⁺) en el timo tras el tratamiento con el Ac anti-DII4. Las cifras de las gráficas de puntos representan los porcentajes medios (media \pm EEM) de las CD entre las células totales en el día 14. **Fig. 3B:** el gráfico de barras muestra la cinética de la expansión de las cCD y de las pCD en el timo de ratones tratados con el Ac contra el DII4 (■) y de ratones tratados con un control de hFc (□). **Fig. 3C:** gráficas de puntos que muestran los efectos del Ac contra el DII4 en las pre-CD (MHCII^{lo}CD11c^{int}CD135⁺Sip- α ^{int}) y en las pre-CD tardías (MHCII^{lo}CD11c^{int}) en el timo. Las cifras de las gráficas de puntos representan los porcentajes medios (media \pm EEM) de las pre-CD entre las células totales en el día 14. **Fig. 3D:** gráficas de puntos que muestran la presencia de MHCII^{lo}CD11c^{int}CD en la población de linfocitos pro-T DN1 (CD4⁺CD8⁻CD44⁺CD25⁻) en el timo de ratones tratados con el Ac contra el DII4, pero no en el timo de los ratones tratados con el Ac de control hFc. Las cifras de las gráficas de puntos representan el número medio (media \pm EEM) de CD MHCII^{lo}CD11c^{int} entre la población de linfocitos pro-T DN1 en el día 3.

La **Fig. 4** muestra el efecto del bloqueo del DII4 sobre el desarrollo de una estirpe alternativa intratímica de CD en CD inmaduras (imCD) procedentes de un progenitor común DN1 T/CD. Las células clasificadas como DN1 CD45.1⁺Lin⁻ fueron transferidas intratímicamente a ratones hospedadores CD45.2⁺ tratados con el Ac contra el DII4 (■) o con el Ac de control hFc (□).

La **Fig. 5** muestra el efecto del bloqueo del DII4 sobre los niveles séricos del CSF-1 (M-CSF), una citocina claramente implicada en el desarrollo de las CD. Los niveles séricos del CSF-1 de los ratones sin tratar (☐), o de los tratados con el Ac de control de isotipo (□) o con el Ac contra el DII4 (■), se midieron mediante un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA).

La **Fig. 6** muestra los efectos de la delección genética del Dll4 tras un tratamiento con tamoxifeno, en los linfocitos B y en la homeostasis de las CD en ratones Dll4COIN que contienen un constructo de recombinasa Cre inducible por tamoxifeno, CreERT2. Las cifras de las gráficas de puntos representan los porcentajes medios (media \pm EEM) de los linfocitos B y tanto de las pCD como de las cCD entre las células totales en el timo.

Las **Fig. 7A - 7C** muestran los efectos del bloqueo/delección del Dll4 en la homeostasis de los Treg. **Fig. 7A:** gráficas de puntos que muestran una expansión de los Tregs en el timo de los ratones tratados con el Ac contra el Dll4 durante dos semanas, en comparación con los ratones tratados con el Ac de control hFc. Las cifras de las gráficas de puntos representan los porcentajes medios (media \pm EEM) de los Tregs entre los linfocitos T CD3⁺CD4⁺ en el timo. **Fig. 7B:** las gráficas de barras muestran la cinética del desarrollo de los Treg en el timo (panel superior) y en el bazo (panel inferior), respectivamente, de los ratones tratados con el Ac contra el Dll4 (■) y con el Ac de control hFc (□). **Fig. 7C:** gráficas de puntos que muestran una expansión de los Tregs en el timo de ratones Dll4COIN tratados con tamoxifeno (TAM), en comparación con el control de Dll4COIN tratado con aceite de maíz de control. Las cifras de las gráficas de puntos representan los porcentajes medios (media \pm EEM) de los Tregs entre los linfocitos T CD3⁺CD4⁺ en el timo.

Las **Fig. 8A - 8B** muestran los efectos del bloqueo del Dll4 sobre la homeostasis de las CD (**Fig. 8A**) y de los Treg (**Fig. 8B**) en el timo de ratones que expresan el Dll4 humano (hDll4) observados en los días 7 y 14 después del tratamiento con el Ac contra el Dll4 (REGN421) (1 mg/kg o 5 mg/kg) o del tratamiento con el hFc (5 mg/kg), dos veces por semana durante 2 semanas, y en el día 28, después del cese del tratamiento. Las cifras de las gráficas de puntos representan los porcentajes medios (media \pm EEM) de las pCD y de las cCD (**Fig. 8A**) o de los Tregs (**Fig. 8B**) entre las células totales en el timo.

Las **Fig. 9A - 9B** muestran los efectos del bloqueo del Dll4 en un modelo de ratón de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). **Fig. 9A:** la gráfica muestra las tasas de incidencia de la enfermedad EAE (%) por grupo de tratamiento. **Fig. 9B:** la gráfica muestra el desarrollo de la EAE basada en las puntuaciones promedio de la enfermedad. El tratamiento fue con un Ac anti-Dll4 (REGN577) (▼) antes de la inducción; Ac de control de isotipo (◆) antes de la inducción; REGN577 tras la inducción (A); o un Ac anti-VLA-4 (PS/2) antes de la inducción (■).

La **Fig. 10** muestra los efectos del bloqueo del Dll4 sobre la producción de IL-17 y de IFN- γ en los nódulos linfáticos de ratones con EAE. Los niveles de la IL-17 (panel izquierdo) y del IFN- γ (panel derecho) en los nódulos linfáticos de los ratones con EAE tratados con el Ac contra el Dll4 (■) o con el Ac de control hFc (□) se midieron en los días 12 y 18 mediante un ELISA.

Las **Fig. 11A - 11E** muestran los efectos del Ac contra el Dll4 en un modelo de ratón diabético NOD. La **Fig. 11A** muestra el % de incidencia de diabetes (dos lecturas consecutivas de un nivel de glucosa en sangre mayor de 250 mg/dl) entre los ratones que recibieron bien el Ac de control hFc (•) o bien el Ac anti-Dll4 (REGN577) (■) a las 9 semanas de edad. También se muestra el % de incidencia de diabetes en cinco ratones que habían sido tratados con el Ac contra el Dll4 y posteriormente se les inyectó el Ac PC61 a las 20 semanas (◆). El Ac PC61 es un anticuerpo anti-CD25 y agota los linfocitos Treg. La **Fig. 11B** muestra la medición mediante un ELISA de las producciones del autoanticuerpo anti-insulina (□) y del autoanticuerpo anti-decarboxilasa de ácido glutámico 65 (GAD65) (■) en ratones NOD tratados con el Ac contra el Dll4 o con el control de hFc, en comparación con los ratones naturales sin tratar (WT). La **Fig. 11C** muestra secciones de páncreas teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) de ratones NOD tratados con el Ac contra el Dll4 (panel izquierdo) o con el control de hFc (panel derecho). Las flechas negras indican los islotes pancreáticos individuales, y las flechas blancas indican las células infiltrantes en el islote (panel derecho). La **Fig. 11D** muestra el número de islotes pancreáticos (panel izquierdo) o el % de islotes pancreáticos infiltrados (panel derecho) en el páncreas de los ratones tratados con el control de hFc (□) o con el Ac contra el Dll4 (■). La **Fig. 11E** muestra los cambios en el nivel de glucosa en sangre en los ratones tratados, al inicio de la enfermedad, con el Ac contra el Dll4 (•) o con el control de hFc (□), durante 42 días después del tratamiento.

Descripción detallada

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

Según se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural salvo que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por lo tanto, 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 las personas expertas en la materia tras la lectura de esta divulgación.

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

Definiciones

El término "antagonistas del DII4", según se usa en el presente documento, incluye anticuerpos contra el DII4 y fragmentos de los mismos capaces de bloquear la unión del DII4 a un receptor Notch (tal como Notch1 y Notch4) y/o de bloquear las rutas de señalización DII4-Notch (véase, por ejemplo, el documento WO 2008/076379), proteínas de fusión que comprenden el dominio extracelular del DII4 fusionado a un componente multimerizante, o fragmentos de los mismos (véanse por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. n° 2006/0134121 y 2008/0107648), péptidos y peptidocuerpos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 7.138.370), y similares, que bloquean la interacción entre el DII4 y un receptor Notch. El término engloba antagonistas, tales como moléculas pequeñas, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, y similares, que se unan específicamente a los receptores Notch (por ejemplo, anticuerpos anti-Notch1, anticuerpos anti-Notch4, etc.) y bloqueen las rutas de señalización DII4-Notch.

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

Los métodos y las técnicas para la identificación de las CDR en las secuencias de aminoácidos de la HCVR y de la LCVR son conocidos en la materia y pueden ser aplicados para la identificación de las CDR en las secuencias de aminoácidos especificadas de la HCVR y/o de la LCVR divulgadas en el presente documento. Las convenciones que pueden usarse para la identificación de los límites de las CDR incluyen la definición de Kabat, la definición de Chotia y la definición de AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de la secuencia, la definición de Chotia se basa en la ubicación de las regiones estructurales en bucle y la definición de AbM es un compromiso entre las metodologías de Kabat y de Chotia. 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. EE.UU. 86: 9268-9272 (1989). También hay disponibles bases de datos públicas para la identificación de las secuencias de las CDR en un anticuerpo

También es posible la sustitución de uno o más residuos de la CDR o la omisión de una o más CDR. En la bibliografía científica se han descrito anticuerpos en los que pueden dispensarse una o dos CDR para la unión. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9: 133-139) analizaron las regiones de contacto entre los anticuerpos y sus antígenos, basándose en las estructuras cristalinas publicadas, y concluyeron que sólo aproximadamente entre un quinto y un tercio de los residuos de la CDR entran realmente en contacto con el antígeno. Padlan también descubrió 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).

Los residuos de la CDR que no entran en contacto con el antígeno pueden ser identificados basándose en los estudios previos (por ejemplo, a menudo, los residuos H60-H65 en la CDRH2 no son necesarios), en las regiones de CDR de Kabat que está fuera de las CDR de Chotia, mediante un modelado molecular y/o empíricamente. Si una CDR o algún residuo de la misma está omitido, habitualmente está sustituido por un aminoácido que ocupa la posición correspondiente en otra secuencia de un anticuerpo humano o un consenso de dichas secuencias. Las posiciones para las sustituciones en las CDR y los aminoácidos que se van a sustituir también pueden seleccionarse empíricamente. Las sustituciones empíricas pueden ser unas sustituciones conservativas o no conservativas.

El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos que tienen un patrón de glucosilación modificado. En algunas aplicaciones, puede ser útil una modificación para eliminar los sitios de glucosilación indeseables, o por ejemplo, la eliminación de una fracción de fucosa para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ACDC) (véase Shield et al. (2002) JBC 277: 26733). En otras aplicaciones, la eliminación del sitio de N-glucosilación puede reducir unas reacciones inmunitarias indeseables frente a los anticuerpos terapéuticos, o aumentar la afinidad de los anticuerpos. En otras aplicaciones más, puede realizarse una modificación en la galactosilación con objeto de modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CCD).

El término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "fragmento de anticuerpo"), según se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente al hDII4, o a cualquier otra proteína objetivo prevista. 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 dAb, unas unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los residuos de aminoácidos que mimetizan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, un fragmento que contiene una

CDR, o una CDR aislada). Otras moléculas modificadas, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos, también están englobadas en la expresión "fragmento de unión al antígeno", según se usa en el presente documento. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o los fragmentos de anticuerpos de la invención pueden estar conjugados con una fracción terapéutica ("inmunoconjugado"), tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, un inmunosupresor o un radioisótopo.

Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo comprenderá normalmente al menos un dominio variable. El dominio variable puede tener cualquier tamaño o composición de aminoácidos, y generalmente comprenderá al menos una CDR que será adyacente o estará en marco con una o más secuencias en marco. En los fragmentos de unión al antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L , los dominios V_H y V_L pueden estar situados el uno respecto del otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimerica y contener dímeros de V_H-V_H , de V_H-V_L o de V_L-V_L . Alternativamente, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

En ciertas realizaciones, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Algunos ejemplos no limitantes de configuraciones de dominios variables y constantes que pueden encontrarse en un fragmento de unión al 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 variable y constante, incluyendo cualquiera de los ejemplos de configuraciones indicados anteriormente, los dominios variable y constante pueden estar unidos directamente entre sí, o pueden estar unidos por una bisagra completa o parcial, o por una región de conexión. 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 una unión flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula de polipéptido. Además, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente invención puede comprender un homodímero o un heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante indicadas anteriormente en una asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, mediante puentes de disulfuro).

Al igual que con las moléculas de anticuerpos completas, los fragmentos de unión al antígeno pueden ser mono-específicos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Un fragmento de unión al antígeno multiespecífico de un anticuerpo comprenderá normalmente al menos dos dominios variables diferentes, en el que cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno distinto o a un epítipo diferente del mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico puede ser adaptado para su uso en el contexto de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente invención mediante el uso de técnicas rutinarias disponibles en la materia.

El término "anticuerpo humano", según se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas germinales humanas. Los AcMc humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos que no son codificados por las secuencias de las inmunoglobulinas germinales humanas (por ejemplo, mutaciones inducidas mediante una mutagénesis aleatoria o dirigida *in vitro* o mediante una mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR, y en particular en la CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", según se usa en el presente documento, no pretende incluir AcMc en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero (por ejemplo, de ratón), en secuencias de FR humanas.

Los anticuerpos anti-Dll4 completamente humanos divulgados en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en las regiones en marco y/o CDR de los dominios variables de la cadena pesada y ligera en comparación con las correspondientes secuencias germinales. Dichas mutaciones pueden ser fácilmente verificadas mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento con las secuencias germinales disponibles, por ejemplo, en bases de datos públicas de secuencias de anticuerpos. La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento, en los que uno más aminoácidos de una o más regiones en marco y/o CDR están mutados en los correspondientes residuos de la secuencia germinal de la que derivó el anticuerpo, o en los correspondientes residuos de otra secuencia germinal humana, o con respecto a las sustituciones conservativas de aminoácidos de los correspondientes residuos germinales (dichos cambios en las secuencias se denominan conjuntamente en el presente documento "mutaciones germinales"). Un experto habitual en la materia, partiendo de las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera, divulgadas en el presente documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que comprenden una o más retromutaciones individuales germinales o combinaciones de las mismas. En ciertas realizaciones, todos los residuos en marco y/o de la CDR de los dominios V_H y/o V_L están retromutados a los residuos que se encuentran en la secuencia germinal original a partir de la cual derivó el anticuerpo. En otras realizaciones, únicamente están retromutados algunos residuos de la secuencia germinal original, por ejemplo, únicamente los residuos mutados que se encuentran en los primeros 8 aminoácidos de la FR1 o en los últimos 8 aminoácidos de la FR4, o únicamente los residuos mutados que se encuentran en la CDR1, en la CDR2 o en la CDR3. En otras realizaciones, uno o más de los residuos en marco y/o

de la CDR están mutados en los correspondientes residuos de una secuencia germinal diferente (es decir, una secuencia germinal que es diferente de la secuencia germinal a partir de la cual derivó originalmente el anticuerpo). Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones germinales en las regiones en marco y/o CDR, por ejemplo, en las que ciertos residuos individuales están mutados en los correspondientes residuos de una secuencia germinal en particular, mientras que otros ciertos residuos que difieren de la secuencia germinal original se mantienen o se mutan en los correspondientes residuos de una secuencia germinal diferente. Una vez obtenidos, puede comprobarse fácilmente que los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno que contienen una o más mutaciones germinales, tienen una o más de las propiedades deseadas, tales como, una especificidad de unión mejorada, una afinidad de unión mejorada, unas propiedades biológicas antagonistas o agonistas mejoradas o potenciadas (según sea el caso), una inmunogenicidad reducida, etc. Los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno obtenidos de esta forma general están englobados en la presente invención.

En el presente documento se describen anticuerpos anti-DII4 que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la HCVR, de la LCVR y/o de la CDR divulgadas en el presente documento que tienen una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, en el presente documento se describen anticuerpos anti-DII4 que tienen unas secuencias de aminoácidos de la HCVR, de la LCVR y/o de la CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, 2 o 1, sustituciones conservativas de aminoácidos con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la HCVR, de la LCVR y/o de la CDR divulgadas en el presente documento. En una realización, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116 con 10 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos en la misma. En otra realización, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116 con 8 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos en la misma. En otra realización, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116 con 6 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos en la misma. En otra realización, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116 con 4 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos en la misma. En otra realización más, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116 con 2 o 1 sustituciones conservativas de aminoácidos en la misma. En una realización, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118 con 10 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos en la misma. En otra realización, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118 con 8 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos en la misma. En otra realización, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118 con 6 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos en la misma. En otra realización, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118 con 4 o menos sustituciones conservativas de aminoácidos en la misma. En otra realización más, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118 con 2 o 1 sustituciones conservativas de aminoácidos en la misma.

Un anticuerpo "neutralizante" o "bloqueante" pretende referirse a un anticuerpo cuya unión al DII4 da como resultado la inhibición de la actividad biológica del DII4. Esta inhibición de la actividad biológica del DII4 puede ser evaluada mediante la medición de uno o más indicadores de la actividad biológica del DII4. Estos indicadores de la actividad biológica del DII4 pueden ser evaluados mediante uno o más de los diversos ensayos estándar *in vitro* o *in vivo* conocidos en la materia. Por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo para neutralizar la actividad del DII4 es evaluada mediante la inhibición de la unión del DII4 a un receptor Notch. Asimismo, el término también es aplicable a los anticuerpos contra otros objetivos, tales como Notch1 y Notch4; dichos anticuerpos inhiben las actividades biológicas de los objetivos, inhibiendo así las interacciones o las rutas de señalización DII4-Notch.

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

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

El término anticuerpo de "elevada afinidad" se refiere a aquellos anticuerpos que se unen al DII4 con una K_D de aproximadamente 1 nM o menos, de aproximadamente 500 pM o menos, de aproximadamente 400 pM o menos, de aproximadamente 300 pM o menos, de aproximadamente 200 pM o menos o de aproximadamente 100 pM o menos, o de aproximadamente 50 pM o menos, medida mediante una resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™, o mediante un ELISA de afinidad en disolución.

El término "resonancia de plasmón superficial", según se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de las interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de las

alteraciones en las concentraciones de proteínas en una matriz de un biosensor, por ejemplo, mediante el uso del sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia, y Piscataway, N.J.).

El término "epítipo" es una región de un antígeno a la que se une un anticuerpo. Los epítipos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítipos funcionales son generalmente un subconjunto de los epítipos estructurales y tienen aquellos residuos que contribuyen a directamente a la afinidad de la interacción. Los epítipos pueden ser conformacionales, es decir, estar formados por aminoácidos no lineales. En ciertas realizaciones, los epítipos pueden incluir determinantes que son agrupamientos de moléculas superficiales químicamente activos tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo, y, en ciertas realizaciones, pueden tener unas características estructurales tridimensionales específicas y/o unas características de carga específicas. Un epítipo normalmente incluye al menos 3 y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

El término "tratamiento" o "tratar", según se usa en el presente documento, pretende indicar procedimientos tanto profilácticos (o preventivos) como terapéuticos, salvo que se indique de otro modo. Los sujetos en necesidad de tratamiento incluyen no sólo aquellos que han desarrollado una afección, un trastorno o una enfermedad en particular, sino también aquellos que están predispuestos o son susceptibles al desarrollo de dicha afección, trastorno o enfermedad y que se benefician de los procedimientos profilácticos, de forma que la aparición o la reaparición, o la progresión si se produce, de dicha afección, trastorno o enfermedad se reduce, en comparación con aquellas en ausencia del tratamiento.

Por la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", "cantidad profilácticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se entiende una cantidad que produce el efecto deseado para el cual es administrada. La cantidad exacta dependerá del fin del tratamiento, de la edad y del tamaño del sujeto que se va a tratar, de la vía de administración, y similares y podrá ser determinada por el experto en la materia mediante el uso de 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 los hallazgos de que el bloqueo del Dll4 por parte de un anticuerpo específico para el Dll4 da como resultado un aumento en el número de linfocitos Treg, que a su vez, previene, reduce o retrasa la progresión de la EAE o de la diabetes en ratones. Para una descripción de un Ac totalmente humano contra el Dll4, incluyendo un Ac recombinante humano contra el Dll4, véase la Publicación de Patente Internacional nº WO 2008/076379.

Administración terapéutica y formulaciones

La presente invención proporciona un antagonista del ligando de tipo delta 4 (Dll4) según se define en las reivindicaciones para su uso en métodos para la prevención, el tratamiento o la mejora de la esclerosis múltiple, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende el antagonista del Dll4. La composición farmacéutica que comprende el antagonista del Dll4 puede comprender adicionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, agentes analgésicos, agentes reductores de la glucosa en sangre, y similares (véase la siguiente sección). Las composiciones terapéuticas pueden ser administradas con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que son incorporados en formulaciones para proporcionar una mejora en la transferencia, la administración, la tolerancia, y similares. Una multitud de formulaciones apropiadas puede encontrarse 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, ungüentos, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, 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 una administración sistémica, la dosis terapéuticamente eficaz puede ser estimada inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en circulación que incluya la CI_{50} según se determina en el cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos. Las dosis iniciales también pueden ser estimadas a partir de los datos *in vivo*, por ejemplo, de modelos animales, mediante el uso de técnicas que son bien conocidas en la materia. El experto habitual en la materia podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos basándose en los datos con animales.

La dosis puede variar dependiendo de la edad y del tamaño (por ejemplo, del peso corporal o del área superficial corporal) del sujeto al que se le va a administrar, de la enfermedad objetivo, de las condiciones, de la vía de administración, y similares. Para la administración sistémica de los antagonistas del Dll4, en particular, para los anticuerpos contra el Dll4, los intervalos de dosificación típicos para una administración intravenosa están en una

dosis diaria de desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 50 mg/kg o desde aproximadamente 0,2 hasta aproximadamente 10 mg/kg. Para una administración subcutánea, los anticuerpos pueden ser administrados a desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 800 mg, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 500 mg, desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 400 mg, desde aproximadamente 30 mg hasta aproximadamente 300 mg o desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 200 mg, a una concentración de anticuerpo, al menos, de aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 75 mg/ml, de aproximadamente 100 mg/ml, de aproximadamente 125 mg/ml, de aproximadamente 150 mg/ml, de aproximadamente 175 mg/ml, de aproximadamente 200 mg/ml o de aproximadamente 250 mg/ml, al menos, entre 1 y 5 veces al día, entre 1 y 5 veces por semana o entre 1 y 5 veces al mes. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser administrados inicialmente a través de una inyección intravenosa, seguido de una administración subcutánea secuencial.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden ser usados para la administración de la composición farmacéutica, por ejemplo, una encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar virus mutantes, endocitosis mediada por un receptor (véase, por ejemplo, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). Algunos métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición puede ser administrada mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante una infusión o una inyección en bolo, mediante su absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, la mucosa oral, rectal y la mucosa intestinal, etc.), y pueden ser administrados junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

La composición farmacéutica también puede ser administrada en una vesícula, en particular en 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 y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, páginas 353-365; Lopez-Berestein, *ibid.*, páginas 317-327; véase de forma general *ibid.*).

En ciertas situaciones, la composición farmacéutica puede ser administrada 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 y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, Florida (1974). En otra realización más, puede colocarse un sistema de liberación controlada en las proximidades del objetivo de la composición, requiriendo así únicamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, páginas 115-138, 1984).

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden ser preparadas mediante métodos conocidos públicamente. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden ser preparadas, por ejemplo, mediante la disolución, la suspensión o la emulsificación del anticuerpo o de su sal descrito anteriormente en un medio acuoso o en un medio oleoso estéril 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 junto 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 (polioxietileno (50 mol) un aducto de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio oleoso se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que pueden usarse junto con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección así preparada se introduce preferentemente en una ampolla apropiada. La composición farmacéutica puede ser administrada por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y una jeringa estándar. Además, con respecto a la administración subcutánea, un dispositivo de administración en pluma tiene fácilmente aplicaciones en la administración de una composición farmacéutica. Dicho dispositivo de administración en pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de administración en pluma reutilizable utiliza generalmente un cartucho sustituible que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica del cartucho, y el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede ser fácilmente desechado y sustituido por un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo de administración en pluma puede entonces ser reutilizado. En un dispositivo de administración en pluma desechable no hay ningún cartucho sustituible. Más bien, el dispositivo de administración en pluma desechable está precargado con la composición farmacéutica, contenida en un depósito en el interior del dispositivo. Una vez que el depósito se ha vaciado de la composición farmacéutica, se desecha la totalidad del dispositivo.

Numerosos dispositivos de administración en pluma y autoinyectores reutilizables tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica. Algunos ejemplos incluyen, pero ciertamente no se limitan a, 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 y Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™,

OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (Sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar sólo unos pocos. Algunos ejemplos de dispositivos de administración en pluma desechables que tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica incluyen, pero ciertamente no se limitan a, la pluma SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), la FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y la KWIKPEN™ (Eli Lilly).

Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para un uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para que se ajuste a una dosis de los principios activos. Dichas formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del antagonista del Dll4, tal como de un anticuerpo contra el Dll4, contenida es generalmente de desde aproximadamente 0,1 hasta 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 desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 100 mg, y en desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 250 mg para las demás formas de dosificación.

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

Terapias de combinación

El antagonista del Dll4 de la invención puede ser proporcionado solo o junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, agentes analgésicos, agentes reductores de la glucosa en sangre directos o indirectos, y similares. Algunos inmunosupresores adecuados incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, ciclosporina, metotrexato, interferón β (IFN- β), tacrolimus, sirolimus, azatioprina, mercaptopurina, opioides, micofenolato, proteínas de unión al TNF, tales como infliximab, etanercept, adalimumab, y similares, antibióticos citotóxicos, tales como dactinomicina, antraciclinas, mitomicina C, bleomicina, mitramicina, y similares, anticuerpos dirigidos a células inmunitarias, tales como anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-CD3, y similares. Algunos agentes antiinflamatorios y/o analgésicos adecuados para las terapias de combinación con antagonistas anti-Dll4 incluyen, corticosteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno y similares, antagonistas del TNF- α (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 la IL-1 (por ejemplo, proteínas de fusión de unión a la IL-1, por ejemplo, ARCALYST® de Regeneron Pharmaceuticals, Inc., véase la Patente de EE.UU. n° 6.927.044; KINERET® de Amgen, y similares), antagonistas de la IL-6 (por ejemplo, anticuerpos anti-receptor de la IL-6, según se divulga en la Patente de EE.UU. n° 7.582.298 y ACTEMRA® de Roche), paracetamol, morfínomiméticos, y similares. Algunos agentes reductores de la glucosa adecuados incluyen, pero no se limitan a, insulina y análogos de la misma, biguanidas, sulfonamidas y derivados de urea derivados de los mismos, inhibidores de la alfa-glucosidasa, tiazolidinadiona y derivados de la misma, inhibidores de la peptidasa de dipeptidilo 4, goma guar, repaglinida, nateglinida, exenatida, pramlintida, benfluorex, liraglutida, mitiglinida, inhibidores de la reductasa de aldosa, y similares.

El antagonista del Dll4, tal como un hAc contra el Dll4 o un fragmento del mismo y el (los) agente(s) terapéutico(s) adicional(es) descritos anteriormente pueden ser coadministrados conjuntamente o por separado. Cuando se usan formulaciones de dosis individuales, el anticuerpo o un fragmento del mismo de la invención y los agentes adicionales pueden ser administrados simultáneamente, o por separado en momentos escalonados, es decir, secuencialmente, en los órdenes apropiados.

Kits

En el presente documento también se describe un artículo de elaboración o kit, que comprende un material de envasado, un recipiente y un agente farmacéutico contenido en el recipiente, en el que el agente farmacéutico comprende al menos un antagonista del Dll4, tal como un anticuerpo contra el Dll4 y al menos un agente terapéutico adicional, y en el que el material de envasado comprende una etiqueta o un prospecto que muestra las indicaciones y las instrucciones para su uso. El antagonista del Dll4 y el agente terapéutico adicional pueden estar contenidos en recipientes individuales.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se establecen para proporcionar a los expertos habituales en la materia una divulgación y una descripción completa de cómo elaborar y usar las composiciones de la invención, y no pretenden limitar el ámbito de lo que los inventores contemplan como su invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar una precisión con respecto a las cifras usadas (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero también deberían tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, la temperatura está en grados centígrados, la presión es la atmosférica o cercana, y las barras de

error en las figuras = media \pm EEM.

En los ejemplos que siguen, se usaron los siguientes anticuerpos en PBS de Dulbecco (GIBCO® INVITROGEN™) 1X complementado con un 3 % de FCS, para la tinción de las células con el fin de una citometría de flujo: para las CD, anticuerpos contra la proteína reguladora de la señalización α (Sirp- α ; n° de catálogo P84; BD Biosciences), los B220 (n° de catálogo RA3-6B2), el PDCA-1 (n° de catálogo eBio927), el CD8 (n° de catálogo 53-6.7), el CD11 b (n° de catálogo M1/70), el MHCII (n° de catálogo M5/114.15.2), el CD11c (n° de catálogo N418) y el CD135 (n° de catálogo A2F10), respectivamente; para los linfocitos T, B y NK, anticuerpos contra el CD4 (n° de catálogo GK1.5 o L3T4), el CD3 (n° de catálogo 145-2C11), el CD25 (n° de catálogo PC61 o 7D4), el CD44 (n° de catálogo IM7), FoxP3 (n° de catálogo FJK16s); y F4/80 (n° de catálogo BM8), NK1.1 (n° de catálogo PK136), IgM (n° de catálogo II/41), IgD (n° de catálogo 26-11c), CD43 (n° de catálogo S7), CD21 (n° de catálogo eBio4E3), HSA (n° de catálogo M1/69) y CD23 (n° de catálogo B3B4), respectivamente, (todos de eBioscience).

Ejemplo 1: efecto del bloqueo del DII4 sobre el desarrollo de los linfocitos B, las células dendríticas y los linfocitos T

Se ha demostrado que la inhibición DII4-Notch1 da lugar a un bloqueo completo en el desarrollo de los linfocitos T, acompañado por la aparición ectópica de linfocitos B y por una expansión de las células dendríticas (CD) que puede surgir a partir de la conversión del destino de una célula Pro-T a una CD en el 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, todavía se desconoce qué estadio específico del desarrollo de las CD se ve directamente afectado por el bloqueo del DII4.

Para responder a esta pregunta, a ratones C57B1/6 de 6 semanas de edad (Jackson Labs) se les inyectaron por vía subcutánea 5 o 25 mg/kg del Ac anti-DII4 (REGN577) (n = 5) o un fragmento Fc humano (control) (n = 5), dos veces a la semana durante dos semanas. El REGN577 se preparó internamente basándose en la secuencia publicada (documento WO 2007/143689). El REGN 577 se une al DII4 humano y de ratón, pero no se une de forma detectable a los DII1 y JAG1 humanos. Catorce (14) días después de la inyección, se recogieron los timos y los bazo y se digirieron a 37 °C durante 30 min en medio RPMI 1640 completo (Invitrogen) complementado con un 10 % de suero bovino fetal (FCS) 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 colador de células de 70 μ m. Se recogió la médula ósea (BM) de cada ratón mediante el lavado de los fémures y de las tibias con medio RPMI 1640 completo complementado con un 10 % de FCS, y las células se resuspendieron en medio RPMI. Los subconjuntos de linfocitos T, de linfocitos B y de CD fueron evaluados mediante una citometría de flujo, tras lo cual las células se tiñeron con los anticuerpos contra los marcadores específicos descritos anteriormente. Las células teñidas se analizaron con un citómetro de flujo BD™ LSR II (BD Biosciences) y los datos fueron analizados mediante el uso del programa informático FlowJo (versión 8.8.6; Tree Star Inc.).

La Fig. 1A y la 1B se muestran las poblaciones de linfocitos T y B en el timo. Según se muestra en la Fig. 1A, el bloqueo del DII4 indujo un aumento significativo en el número de linfocitos T dobles negativos ("DN"; CD4⁻CD8⁻) y una disminución en el número de linfocitos T dobles positivos ("DP"; CD4⁺CD8⁺) en el timo. Además, el mismo tratamiento indujo una aparición ectópica de linfocitos B en el timo, que surgieron a partir de Pro-linfocitos T (es decir, células CD44⁺CD25⁺CD4⁻CD8⁻ en el estadio DN1) (véase la Fig. 1 B). Por el contrario, el bloqueo del DII4 no tuvo ningún efecto sobre el desarrollo de los linfocitos B en la médula ósea (Fig. 2A) ni en las subpoblaciones de linfocitos B periféricos esplénicos (Fig. 2B). Adicionalmente, el bloqueo del DII4 indujo la expansión de las CD convencionales ("cCD"; B220-CD11c⁺) y de las CD plasmacitoides ("pCD"; PDCA1⁺B220⁺CD11c⁺) en el timo (Fig. 3A), con una expansión significativa comenzando el día 7 (p < 0,001) hasta el día 14 (p < 0,001) y que continuó hasta el día 21 (p < 0,01) (Fig. 3B) después de la inyección inicial del Ac contra el DII4. Las cifras de los gráficos de puntos de la Fig. 3A representan los porcentajes medios de las CD entre las células totales en el día 14. Además, las CD estaban expandidas en la periferia de los ratones tratados con el Ac contra el DII4 (REGN577). En la Tabla 1 se muestra el número de veces de aumento en el porcentaje y en las cifras absolutas de CD en el bazo tras el tratamiento con el Ac contra el DII4, en comparación con los ratones de control (tratados con el hFc).

Tabla 1

Días después de la inyección inicial	Número de veces de aumento en el porcentaje	Número de veces de aumento en las cifras absolutas
3	1,0	1,0
7	1,1	1,1
14	1,6	2,0
21	1,3	1,7

Se sabe que las cCD, las pCD y los monocitos del tejido linfoide comparten un progenitor común denominado "precursor de macrófagos y de CD" o "MDP", que puede ser identificado por su fenotipo de superficie "Lin⁻cKit^{hi}CD115⁺FLT3⁺", mientras que un progenitor distinto denominado "precursor común de las CD" o "CDP" con "Lin⁻

cKit^{lo}CD115⁺FLT3⁺ está restringido a la producción de cCD y de pCD. Aunque los monocitos pueden desarrollar muchas de las características fenotípicas de las CD en condiciones inflamatorias, las estirpes de cCD, de pCD y de monocitos se separan en el momento que alcanzan sus tejidos, y ni los monocitos ni las pCD se desarrollan en cCD en unas condiciones de estado estacionario. Al contrario que los monocitos y las pCD, se cree que las cCD del tejido linfóide emergen a partir de la médula ósea en forma de células inmaduras que deben diferenciarse y dividirse adicionalmente en los órganos linfoides. Las pre-CD (MHCII^{lo}CD11c^{int}CD135+Sirp- α ^{int}) y las pre-CD tardías (MHCII^{lo}CD11c^{int}), son precursores principalmente de las cCD que aparecen en la médula ósea (Liu et al., 2009, Science 324: 392-397).

Para la identificación de cualquier efecto del Ac contra el Dll4 sobre la homeostasis de las CD progenitoras, se evaluaron los niveles de los MDP y de los CDP en el timo, en la médula ósea y en el bazo mediante una citometría de flujo. Los MDP y los CDP sólo fueron detectados en la médula ósea, pero no en el timo ni en el bazo (datos no mostrados). Adicionalmente, el bloqueo del Dll4 no indujo la expansión de los progenitores tempranos en la médula ósea en comparación con los ratones tratados con el control. Por lo tanto, el resultado sugirió que el Ac contra el Dll4 podría actuar en un estadio tardío, es decir, en un estadio pre-CD, en el desarrollo de las CD, en lugar de los MDP y los CDP.

Consecuentemente, se buscaron las pre-CD y las pre-CD tardías en el timo y en la médula ósea mediante el uso de la citometría de flujo. Según se muestra en la Fig. 3C, las CD MHCII^{lo}CD11c^{int}, que normalmente están presentes en la médula ósea, sólo se expandieron en el timo 14 días después del tratamiento con el Ac contra el Dll4 ($p < 0,001$), mientras que no se detectó expansión de las CD MHCII^{lo}CD11c^{int} en la BM de los mismos ratones (datos no mostrados). Por lo tanto, la expansión de las CD originada a partir del estadio pre-CD estaba restringida al timo. Para la evaluación del origen de las CD MHCII^{lo}CD11c^{int} en el timo, se llevó a cabo una citometría de flujo para la identificación de las CD MHCII^{lo}CD11c^{int} en la población de células pro-T DN1 (CD4⁻CD8⁻CD44⁺CD25⁻). Según se muestra en la Fig. 3D, las CD MHCII^{lo}CD11c^{int} se detectaron en la población de células pro-T DN1 tras el bloqueo con el Dll4 en el día 3. No se detectaron CD MHCII^{lo}CD11c^{int} en ausencia del tratamiento con el Ac contra el Dll4, así como en las poblaciones de células T DN2, DN3 y DN4 tras el tratamiento con el Ac contra el Dll4 (datos no mostrados). No se observó ningún cambio en la homeostasis de las CD periféricas tras el tratamiento con el Ac contra el Dll4 (datos no mostrados). Por lo tanto, el bloqueo del Dll4 indujo una expansión significativa de las CD MHCII^{lo}CD11c^{int} en la población de células pro-T DN1 en el timo en el día 3 ($p < 0,01$) (Fig. 3D), con un pico de expansión en el día 14 ($p < 0,001$) (datos no mostrados). Mientras tanto, los subconjuntos de CD maduras se expandieron en el día 7 ($p < 0,001$) hasta el día 21 ($p < 0,01$) en el timo, según se ha analizado más arriba (véase la Fig. 3B).

Para analizar si la expansión de las CD podría originarse a partir de precursores de linfocitos T no comprometidos, las células clasificadas DN1 CD45.1⁺Lin⁻ se transfirieron intratímicamente a ratones hospedadores CD45.2⁺ tratados con el Ac anti-Dll4. Se averiguó que las células CD45.1⁺ se acumulaban en el estadio DN1 (datos no mostrados) y se detectaron y se expandieron CD inmaduras (imCD) en el timo (Fig. 4) ($p < 0,01$). No se detectaron células en los ratones tratados con el Ac de control, posiblemente debido a que la mayor parte de las células DN1 transferidas fueron eliminadas por una selección negativa de los linfocitos T. Se concluyó que el bloqueo del Dll4 promueve el desarrollo de una estirpe alternativa de CD intratímica originaria de un progenitor común DN1 de T/CD.

El ligando de cinasa de tirosina 3 de tipo Fms (Flt3-L) es suficiente y esencial para la diferenciación de los progenitores de la médula ósea en las CD y para el desarrollo de las CD periféricas. Los niveles séricos del Flt3-L no se modificaron en los animales WT tratados con el Ac anti-Dll4 (datos no mostrados). Adicionalmente, según se muestra en las siguientes Tablas 2 y 3, los porcentajes de CD en el timo se expandieron en los ratones naturales (WT) (Tablas 2 y 3), en los ratones inactivados para el Flt3-L (Flt3-L^{-/-}) ($p < 0,05$) (Tabla 2) y en los ratones inactivados para el Flt3-R (Flt3-R^{-/-}) ($p < 0,001$) (Tabla 3), todos tratados con el Ac contra el Dll4, en comparación con los tratados con el Ac de control. Por lo tanto, el bloqueo del Dll4 induce una expansión de las CD independiente del Flt3 en el timo.

Tabla 2

Ratones	% de CD en el timo de los ratones tratados con:	
	El Ac de control	El Ac contra el Dll4
WT	0,04 ± 0,005	0,58 ± 0,13
Flt3-L ^{-/-}	0,04 ± 0,006	0,45 ± 0,13

Tabla 3

Ratones	% de CD en el timo de los ratones tratados con:	
	El Ac de control	El Ac contra el Dll4
WT	0,03 ± 0,003	0,37 ± 0,03
Flt3-R ^{-/-}	0,06 ± 0,01	0,44 ± 0,02

Se ha observado la capacidad de los progenitores de los linfocitos T tempranos para redirigirse hacia un fenotipo que no es de linfocito T (James P. Di Santo, 2010, Science 329: 44-45). Se llevó a cabo un análisis de matriz génica en timocitos y en pro-linfocitos T para la determinación del efecto del tratamiento con el Ac anti-Dll4 en los genes implicados en la especificación de estirpe de los linfocitos T frente a los B y a las CD. Se averiguó que los genes esenciales para el compromiso de los linfocitos T (por ejemplo, *Tcf7*, *Gata3* y *Ets1*) estaban regulados por disminución, mientras que los genes (*Lyl1*, *Sfpil*) que pueden bloquear, cada uno, el desarrollo de los linfocitos T, estaban regulados por aumento (datos no mostrados; véase Di Santo, 2010, *supra*). Lo más interesante es que los genes que controlan el desarrollo de las CD (*PU.1* y *Spi-B*) y de los linfocitos B también estaban regulados por aumento (datos no mostrados; véase M. Merad et al., 2009, Blood 113: 3418-3427). Además, la expresión de *RelB* y de *Id2*, así como la de los factores reguladores del interferón (*IRF* 2, 4 y 8, unos factores de transcripción clave implicados en el desarrollo del subconjunto de CD, estaba aumentada (datos no mostrados; véase Merad et al., 2009, *supra*). Finalmente, se averiguó que la expresión génica del CSF-1 (M-CSF), una citocina clave implicada en el desarrollo de las CD, estaba regulada por aumento tras el tratamiento con el Ac anti-Dll4 ($p < 0,05$; datos no mostrados). Adicionalmente, los niveles séricos del CSF-1 estaban aumentados tras el tratamiento con el Ac anti-Dll4 (Fig. 5; $p < 0,05$) (véase B. Francke, et al., 2008, Blood 111: 150-159). Por lo tanto, puede concluirse que el bloqueo de la señalización Dll4 Notch regula por disminución los factores de transcripción específicos para el compromiso de la estirpe de linfocitos T, mientras que regula por aumento otros cruciales en el desarrollo de las CD.

Ejemplo 2: efecto de la delección del Dll4 sobre el desarrollo de los linfocitos T

Para evaluar si el efecto del Dll4 sobre el desarrollo de las CD observado en el Ejemplo 1 anterior era intrínseco al Dll4, se prepararon ratones Dll4COIN, en los que el Dll4 está inactivado condicionalmente. Los alelos "condicionales por inversión (COIN)" son alelos que se basan en un elemento invertible ("elemento COIN") para proporcionar mutaciones condicionales mediadas por la recombinasa. Los ratones Dll4COIN contienen un constructo de recombinasa Cre inducible con tamoxifeno, el CreERT2, que codifica para una recombinasa Cre fusionada con un dominio de unión al ligando de estrógenos mutante (ERT2). El CreERT2 es esencialmente inactivo en ausencia de tamoxifeno, y tampoco es activado por los estrógenos endógenos. El tratamiento con tamoxifeno de los ratones activará el CreERT2 y provocará la inversión del elemento COIN, que anula la transcripción de todos los exones secuencia abajo del punto de inserción del COIN, inactivando así el Dll4. Para los detalles del sistema de recombinasa CreERT2, véase Feil et al., 1997, Biochemical and Biophysical Research Communications 237: 752-757.

A los ratones Dll4COIN ($n = 6$) se les inyectó intraperitonealmente (i.p.) tamoxifeno (TAM) (n° de catálogo T-5648, Sigma) a 3 mg/150 μ l de aceite de maíz por ratón tres (3) veces a la semana durante 2 semanas. A los ratones de control Dll4COIN ($n = 6$) se les administró aceite de maíz sin tamoxifeno. Asimismo, se trataron ratones naturales C5B1/6 con tamoxifeno ($n = 6$) o únicamente con aceite de maíz ($n = 6$). Se monitorizaron los signos de distrés (por ejemplo, aspecto del pelaje, baja actividad, etc.), infecciones y una excesiva pérdida de peso corporal en los ratones. Los ratones se pesaron aproximadamente tres veces por semana. Cualquier ratón que perdió más de un 20 % de peso corporal se eliminó del experimento. Después de 2 semanas de tratamiento, se recogieron los timos y se analizaron las células tímicas mediante una citometría de flujo.

Según se muestra en la Fig. 6, en ausencia del Dll4 (es decir, en los ratones tratados con tamoxifeno), los linfocitos B, y tanto las pCD como las cCD, se expandieron en el timo, en comparación con los ratones tratados con aceite de maíz, lo que indica que los efectos del Dll4 sobre el desarrollo y la homeostasis de las CD observado en el Ejemplo 1 eran de hecho intrínsecos al Dll4. Por lo tanto, parece que la señalización Dll4-Notch sostiene el compromiso de los linfocitos T mediante la supresión de la potencial estirpe no linfocítica T entre la población de células pro-T.

Ejemplo 3: efecto del bloqueo del Dll4 o de la delección del Dll4 sobre la homeostasis de los Tregs

Recientemente se ha demostrado que los Tregs son esenciales para el mantenimiento del número normal de CD. Tras el agotamiento de los Treg existe un aumento por compensación de las CD dependiente de la cinasa de tirosina de tipo Fms 3 (Flt3) (Liu et al., 2009, *supra*). Adicionalmente, dos grupos independientes demostraron un control por retroalimentación de la homeostasis de los linfocitos T reguladores por parte de las CD *in vivo*; es decir, un aumento en las cifras de las CD da lugar a un aumento en la división y la acumulación de los Treg, que podría prevenir el desarrollo de una enfermedad autoinmune (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 del Dll4 podría afectar a la homeostasis de los Treg, se midieron las cifras de los Treg en los timos de los ratones tratados con el Ac contra el Dll4 o con el Fc humano (control) del Ejemplo 1 mediante una citometría de flujo. Según se muestra en la Fig. 7A, el bloqueo del Dll4 dio como resultado una robusta expansión de los Tregs en el timo en el día 14 después de la inyección inicial. La expansión de los Tregs comenzó en el día 7 ($p < 0,001$) y aumentó hasta un efecto máximo en el día 14 en el timo ($p < 0,001$) después de la inyección inicial (véase la Fig. 7B), mientras que la periferia (es decir, en el bazo) los Tregs empezaron a aparecer únicamente los días 14 y 21 ($p < 0,05$) (Fig. 7B y Tabla 4). En la Tabla 4 se muestra el número de veces de aumento en el porcentaje y en el número absoluto de Tregs en el bazo tras el tratamiento con el Ac contra el Dll4, en comparación con los ratones de control (tratados con el hFc).

Tabla 4

Días después de la inyección inicial	Número de veces de aumento en el porcentaje	Número de veces de aumento en las cifras absolutas
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 observada de los Treg era intrínseca a la molécula de Dll4, también se midieron las cifras de los Treg en el timo de los ratones Dll4COIN del Ejemplo 2 mediante una citometría de flujo. Según se observa con el bloqueo del Dll4 por parte del Ac contra el Dll4, la inactivación condicional del Dll4 con el tratamiento con tamoxifeno también dio como resultado la expansión de los Tregs en el timo, en comparación con los ratones tratados con aceite de maíz (véase la Fig. 7C) así como con los ratones naturales tratados con tamoxifeno (datos no mostrados). Por lo tanto, la señalización Dll4-Notch sostiene las CD y consecuentemente la homeostasis de los Treg y el compromiso de los linfocitos T.

Se llevó a cabo un experimento similar en ratones que expresan el Dll4 humano ("ratones Dll4 humanizados") mediante el uso del Ac anti-Dll4 (el REGN421, que tiene las secuencias de la HCVR y de la LCVR de las SEQ ID NO: 116 y 118, respectivamente), del que se sabe que se une a un dominio DSL N terminal del Dll4 humano. El ratón Dll4 humanizado se preparó mediante la sustitución de la totalidad del dominio extracelular del gen Dll4 de ratón por la correspondiente región extracelular del gen del Dll4 humano (7 kb) en células madre embrionarias (ES) de F1 C57BL/6/129. Se generaron ratones hDll4 homocigóticos y se cruzaron en un trasfondo de C57BL/6. Los ratones Dll4 humanizados se trataron con 5 mg/kg del hFc (control; n = 6) o con 1 mg/kg (n = 6) o con 5 mg/kg (n = 6) del Ac REGN421 dos veces por semana durante dos semanas. Se sacrificaron dos ratones de cada grupo de tratamiento en el día 7, y se sacrificaron 2 ratones más por grupo en el día 14. Se recogieron los timos, y las células se tiñeron y se analizaron mediante una citometría de flujo. El resto de los ratones se dejó en recuperación durante 4 semanas adicionales sin ningún tratamiento, y en el día 28 después del cese del tratamiento, fueron sacrificados y las células del timo se analizaron mediante el uso de una citometría de flujo. Después de dos semanas de tratamiento se observó un aumento en las cCD y en las pCD (Fig. 8A), así como un aumento significativo en la población de Treg (Fig. 8B) en el timo de los ratones tratados con el Ac anti-Dll4 ($p < 0,01$). En el timo de los ratones que recibieron el Ac contra el Dll4 durante 2 semanas, seguido de 4 semanas sin tratamiento, las cifras tanto de las CD como de los Treg volvieron a los niveles normales al final del periodo (Fig. 8A y 8B). Mientras tanto, también se observó una expansión de las CD y de los Tregs en la periferia de los ratones tratados con el Ac contra el Dll4, en comparación con los ratones tratados con hFc (datos no mostrados).

Ejemplo 4: efecto del bloqueo del receptor Notch sobre los Tregs

Se ha demostrado que una expansión de las CD da lugar a una expansión de los Tregs (Darrasse-Jeze G. et al., 2009). Como se ha analizado anteriormente, se observó que después del bloqueo del Dll4, tanto las CD como los Tregs se expandieron en el timo (Fig. 3A y Fig. 7A). Además, también se encontró una expansión tanto de los porcentajes como de las cifras absolutas de las CD y de los Tregs en la periferia de los ratones tratados con el Ac contra el Dll4 (Tablas 1 y 4). Con objeto de determinar si el bloqueo de los receptores Notch daría lugar al mismo fenotipo que la delección del Dll4, se estudiaron ratones inactivados para la nicastrina (KO) ($Nic^{-/-}$). La nicastrina es una molécula implicada en la ruta de señalización Notch, y la ablación genética de la nicastrina en ratones deficientes en nicastrina da como resultado un bloqueo en la transducción de señales secuencia debajo de los receptores Notch 1, 2, 3 y 4 (Aifantis et al., datos no publicados). Se demostró que los ratones inactivados para la nicastrina mostraban un fenotipo similar al de los ratones con el Dll4 deleccionado/bloqueado, con un aumento en las cifras de los Tregs, tanto en el porcentaje como en las cifras absolutas, tanto en el timo como en el bazo (véase Tabla 5).

Tabla 5

Treg	Timo		Bazo	
	Ratones de control	Ratones inactivados para la nicastrina	Ratones de control	Ratones inactivados para la nicastrina
Treg (%) en las células CD3 ⁺ CD4 ⁺	3,3 ± 0,2	15,2 ± 2,0 ($p < 0,1$)	16,0 ± 1,3	33,9 ± 2,1 ($p < 0,0001$)
Proporción entre las cifras absolutas (Treg/Teff)	0,04 ± 0,002	0,2 ± 0,03 ($p < 0,01$)	0,2 ± 0,01	0,6 ± 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 los Tregs del timo en quimeras $Nic^{-/-} \rightarrow WT$, lo que sugiere que dicha expansión era un efecto autónomo de la célula; y el bloqueo del Dll4 de los ratones receptores del Ac anti-Dll4 no tenía ningún efecto aditivo (véase Tabla 6).

Tabla 6

Donantes de BM	% de Treg en las células CD3 ⁺ CD4 ⁺ de los ratones WT receptores tratados con:	
	El Ac de control	El Ac anti-DII4
WT	3,6 ± 0,4	35 ± 4
Nic ^{-/-}	37 ± 2	41 ± 2

Estos resultados sugieren que la interrupción de la señalización DII4-Notch mediante el bloqueo del DII4 o de los receptores Notch da lugar a unos fenotipos similares con respecto a la expansión de los Tregs.

Para determinar si la expansión de los Tregs tras el bloqueo del DII4 se correlaciona con las cifras de las CD (Darrasse-Jeze G. et al., 2009, *supra*), se prepararon ratones que carecen de CD y se probaron con el Ac contra el DII4 igual que en el Ejemplo 1. A ratones transgénicos que expresan el receptor de la toxina diftérica de primate (DTR) se les confiere sensibilidad a la toxina (DT) en sus células, que de otro modo serían insensibles a la DT. La DT entra en las células a través de una interacción de su subunidad B con el DTR celular y, después de una endocitosis, la subunidad A de la DT es liberada y cataliza la ADP-ribosilación del factor de elongación 2, que da como resultado la inhibición de la síntesis de proteínas, seguido de una rápida apoptosis tanto en las células en mitosis como en las diferenciadas a término. La especificidad y la cronología de la ablación celular pueden ser determinadas mediante elementos promotores/potenciadores restringidos al tipo celular, y mediante el régimen de la administración de la toxina, respectivamente. Para dirigir la sensibilidad frente a la DT a las CD, Jung et al. (2002, *Immunity* 17: 211-220) han generado ratones (ratones cre-DTR CD11) que portan un transgen que codifica para una proteína de fusión de DTR de simio-GFP (proteína fluorescente verde) bajo el control del promotor CD11 c murino. Dado que el CD11 c codifica para todas las CD, todos los subconjuntos de CD murinas que expresan el CD11c son deletados tras la administración de la DT.

Los ratones transgénicos así preparados que carecen de CD se trataron con el Ac contra el DII4 o con el control de hFc según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Catorce (14) días después del tratamiento, se recogieron los timos y los bazo y se prepararon para su análisis. El nivel de expresión del DII4 en las superficies de los subconjuntos específicos de células CD o de linfocitos T fue evaluado mediante una citometría con objeto de determinar a qué subconjunto específico se unía el Ac contra el DII4. Los resultados demostraron que las células CD y los linfocitos T no expresaban unos niveles detectables de DII4 en su superficie (datos no mostrados). Esta observación está corroborada por el informe de que el DII4 es expresado en la superficie de las células epiteliales del timo (TEC) (Koch et al. 2008, *supra*). Sin embargo, lo más importante era que se averiguó que el tratamiento con el Ac contra el DII4 de los ratones que carecen de CD no era capaz de inducir la expansión de los Treg, mientras que en los ratones naturales (es decir, en los ratones con las CD no deletadas) tratados con el Ac contra el DII4, aumentó significativamente la proporción de Tregs entre las células CD3⁺CD4⁺ ($p < 0,001$), lo que sugiere que la expansión de los Tregs después del tratamiento con el Ac contra el DII4 estaba mediada al menos en parte a través de la expansión de las CD.

Ejemplo 5: efecto del bloqueo del DII4 en una Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE)

Los linfocitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ reguladores naturales (es decir, los Tregs) juegan un importante papel en el mantenimiento de la autotolerancia y en la supresión de las enfermedades autoinmunes, tales como la diabetes de tipo 1, la encefalomiелitis autoinmune, la GVHD y la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (Darrasse-Jeze G. et al., 2009, *supra*; Swee LK et al., 2009, *supra*; y McGreachy et al., 2005, 175 (5): 3025-3032).

Para ver si el aumento en el número de Tregs como resultado del bloqueo del DII4 podría prevenir enfermedades autoinmunes, se estudió el impacto del bloqueo del DII4 sobre una EAE en un modelo de ratón. El modelo de ratón de EAE fue establecido mediante la inyección en la almohadilla plantar de ratones C57B1/6 del péptido glucoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG) emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA), seguido (24 horas después) por una inyección de toxina tosferínica (PTX) para inducir la enfermedad. La puntuación de la enfermedad se determinó basándose en los siguientes síntomas: (0) sin síntomas; (1) cola flácida; (2) cola flácida con debilidad en las extremidades posteriores; (3) parálisis parcial en las extremidades posteriores; (4) parálisis completa en las extremidades posteriores; (5) parálisis en todas las extremidades; y (6) moribundo. Entre doce y veinticuatro horas antes de la inmunización, los ratones del grupo de inducción previa ($n = 10$) también recibieron una inyección subcutánea de 25 mg/kg, bien del Ac anti-DII4 (REGN577), o bien del Ac de control de isotipo (un anticuerpo humano específico para las CD20, preparado internamente según la divulgación del documento US 2008/0260641) o PS/2 (IgG2b de rata/ratón contra la molécula de adhesión celular de tipo integrina murina VLA-4; nº de catálogo de la ATCC CRL-1911), mientras que los ratones del grupo posterior a la inducción ($n = 10$) la recibieron el mismo día que aparecieron los síntomas. Se sabe que el Ac PS/2 exacerba las recaídas de la enfermedad y aumenta la acumulación de linfocitos T CD4⁺ en el sistema nervioso central en un modelo de ratón de recaída de la encefalomiелitis autoinmune experimental (R-EAE) (Theien BE et al., 2001, *J Clin Invest* 107 (8): 995-1006). Las inyecciones de los anticuerpos se llevaron a cabo dos veces por semana, durante dos semanas. Al finalizar el experimento, se extrajeron cuidadosamente las médulas espinales de los ratones, se trituraron y después se incubaron en un medio RPMI 1640 que contiene colagenasa D (Sigma Aldrich). Se añadió EDTA a 2 mM para

detener la reacción y la mezcla se pasó a través de un colador de células de 70 mm, y el contenido celular se analizó mediante una citometría de flujo.

Según se muestra en la Fig. 9A y en la 9B, los ratones tratados con el Ac de control de isotipo desarrollaron síntomas (es decir, tenían unas puntuaciones de enfermedad mayores de "0") que comenzaban alrededor de los 10-14 días, y que tenían un pico entre los días 15 y 21, después de las inyecciones de la MOG. Por el contrario, los ratones tratados con el Ac contra el DII4 estaban totalmente protegidos frente a la progresión de la enfermedad en comparación con los ratones tratados con el Ac de control. La Tabla 7 muestra el número de veces de aumento en el porcentaje y en las cifras absolutas de los Tregs en el timo y en el bazo de los ratones tratados con el Ac contra el DII4, en comparación con los ratones tratados con el Ac de control.

Tabla 7

Días después de la inyección de la MOG	Treg en el timo		Treg en el bazo	
	Número de veces de aumento en el porcentaje	Número de veces de aumento en las cifras absolutas	Número de veces de aumento en el porcentaje	Número de veces de aumento en las cifras absolutas
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

Parecía que los Treg se expandían principalmente en el timo alrededor del día 18, y se observa una expansión significativa en la periferia (es decir, en el bazo) únicamente después del día 21.

En estas condiciones experimentales en particular, el tratamiento con el Ac contra el DII4 en la fase posterior a la inducción no mostró ninguna mejora significativa en la progresión de la enfermedad. Las dosis y/o la frecuencia de las administraciones del Ac contra el DII4 pueden ajustarse adicionalmente con el conocimiento del experto en la materia. De forma importante, sin embargo, los ratones que habían recibido una inducción previa con el Ac contra el DII4 mostraron una disminución significativa en la infiltración celular en la médula espinal el día 18, en comparación con aquellos que recibieron el Ac de control (véase la siguiente Tabla 8). La infiltración celular observada en la médula espinal de los ratones tratados con el Ac de control podría ser una contribución importante al proceso patológico en esos ratones.

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

Tabla 8

Días después de la inyección de la MOG	Número absoluto de células infiltrantes en la médula espinal ($\times 10^6$)							
	Macrófagos		Linfocitos NK		Linfocitos B		Células mieloides CD11b ⁺	
	Control	Ac contra el DII4	Control	Ac contra el DII4	Control	Ac contra el DII4	Control	Ac contra el 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

Adicionalmente, la producción de IL-17 y de IFN- γ en los nódulos linfáticos de los ratones tratados con el Ac contra el DII4 había disminuido significativamente ($p < 0,001$) (Fig. 10). Por lo tanto, el DII4 podría estar implicado en la patogenia de la EAE mediante la mediación en el desarrollo de las Th1, y el tratamiento con el Ac contra el DII4 puede prevenir la inducción de la enfermedad mediante el bloqueo de la secreción de las citocinas Th1 y Th17.

Ejemplo 6. Efecto del bloqueo del DII4 sobre la diabetes

También se probó el efecto sobre la diabetes del bloqueo del DII4 en ratones NOD/ShiLtJ ("ratones NOD"), un modelo poligénico de 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 está caracterizada por una insulinitis y una infiltración de leucocitos en los islotes pancreáticos. Espontáneamente se producen unas notables disminuciones en el contenido de insulina en el páncreas de las hembras de aproximadamente 12 semanas de edad, y varias semanas después en los machos. Consecuentemente, los niveles de glucosa en plasma aumentan hasta más de 250 mg/dl. Dos veces por semana, se comprobaron los niveles de glucosa en sangre de los ratones NOD, mediante

el uso de un ONETOUCH® mini (LifeScan, Inc.). Los ratones se consideraban diabéticos después de dos lecturas consecutivas superiores a 250 mg/dl de glucosa en sangre. La aparición de la diabetes se establece a partir de las primeras mediciones diabéticas secuenciales. A los ratones se les inyectó el hFc (n = 5) o el Ac anti-DII4 (Regn577) (n = 10) a 25 mg/kg dos veces por semana durante 7 semanas, comenzando a las 9 semanas de edad. Los niveles de glucosa en sangre se monitorizaron una vez por semana a partir de muestras sanguíneas de la cola.

Según se muestra en la Fig. 11A, los ratones tratados con el hFc comenzaron a desarrollar una diabetes espontánea, con unos niveles de glucosa en sangre mayores de 250 mg/dl después de las 13 semanas de edad (*). Por el contrario, los ratones tratados con el Ac anti-DII4 (REGN577) no mostraron ningún signo de aumento en el nivel de glucosa a lo largo de las 25 semanas de edad (■), y las mediciones continuaron durante 10 semanas adicionales. El tratamiento con el Ac contra el DII4 antes de la aparición de la diabetes previno al desarrollo de la diabetes, y los animales tratados no parecían haber desarrollado nunca una diabetes. De forma interesante, cuando a 5 de los 10 ratones tratados con el Ac contra el DII4 se les inyectó un AcMc anti-CD25 (PC61) a las 20 semanas de edad con objeto de agotar los Tregs (◆), sus niveles de glucosa en sangre comenzaron a aumentar 1-2 semanas después, y los ratones se volvieron diabéticos. Esto indicaba que el efecto preventivo del Ac contra el DII4 sobre la diabetes de tipo I estaba mediado, al menos en parte, por los Tregs (Fig. 11A).

La insulina y el GAD65 son dos autoanticuerpos habituales que se encuentran en los sueros de los ratones NOD diabéticos, así como en los individuos diabéticos. Consecuentemente, se midieron los niveles séricos de los autoanticuerpos en los ratones tratados con el hFc de control o con el Ac contra el DII4 mediante un ELISA. Según se muestra en la Fig. 11B, el tratamiento con el Ac contra el DII4 bloqueó la producción de autoanticuerpos anti-insulina (□) y anti-GAD65 (■) a unos niveles similares a los de los WT C57Bl/6 sin tratar (es decir, ratones no NOD; los animales de control negativo). Por el contrario, los ratones NOD (diabéticos) que recibieron el hFc de control tenían unos elevados niveles de auto-anticuerpos en sus sueros. Además, cuando se tiñeron secciones del páncreas de ratones de 23 semanas de edad, que habían sido tratados con el Ac contra el DII4 y que no mostraban síntomas diabéticos, con H&E (hematoxilina y eosina), se observaron unas cifras normales de islotes pancreáticos (las células que producen la insulina o el glucagón, y cuya destrucción se correlaciona directamente con la incidencia de diabetes) con una morfología preservada (Fig. 11C, panel izquierdo y Fig. 11D, panel izquierdo). Además, no se observó ninguna infiltración celular en los islotes de los ratones tratados con el Ac contra el DII4 (Fig. 11C, panel izquierdo y Fig. 11D, panel derecho). Por el contrario, los animales diabéticos, que habían sido tratados con el hFc de control, tenían unas cifras significativamente bajas de islotes pancreáticos (Fig. 11C, panel derecho y Fig. 11D, panel izquierdo) en sus páncreas con respecto a los ratones tratados con el Ac contra el DII4, y los restantes muy pocos islotes contenían unos elevados niveles de infiltración celular (Fig. 11C, panel derecho y Fig. 11D, panel derecho). Por lo tanto, el Ac contra el DII4 era capaz de prevenir completamente la diabetes durante un periodo prolongado, y parecía que su efecto estaba mediado, al menos en parte, por la expansión de los Tregs; sin embargo, es posible que haya implicado algún mecanismo adicional en el efecto protector del Ac contra el DII4 en los islotes pancreáticos y/o en la insulina.

Se determinaron los niveles reales de glucosa en sangre de los ratones diabéticos tratados con el Ac contra el DII4, y se compararon con los de los ratones tratados con el hFc de control. Los ratones diabéticos se trataron con 25 mg/kg del Ac contra el DII4 (n = 3) o con el hFc de control (n = 4) al aparecer la enfermedad (día 0). Después del tratamiento con el Ac contra el DII4, los ratones diabéticos redujeron significativamente el nivel de glucosa desde aproximadamente 350 mg/dl hasta un nivel normal (de aproximadamente 120-130 mg/dl) (Fig. 11E). Este efecto se prolongó durante una media de entre 4 y 5 semanas. En general, adicionalmente se observó que, cuando los ratones diabéticos que tenían menos de 350 mg/dl de glucosa en sangre se trataban con el Ac contra el DII4, sus niveles de glucosa caían hasta el nivel normal, y este efecto se prolongaba más que en aquellos que tenían más de 350 mg/dl de glucosa en sangre en el momento del tratamiento. Esto indica que existe una cierta ventana de oportunidad para un tratamiento prolongado y eficaz para el control de los niveles de glucosa en sangre con el Ac contra el DII4. Por lo tanto, sin estar ligados a ningún mecanismo específico descrito en el presente documento, estas observaciones sugieren que los anticuerpos contra el DII4 tienen un gran potencial terapéutico en la diabetes de tipo I.

Los resultados de los experimentos anteriores han revelado la existencia de un bucle regulador previamente desconocido que controla las cifras de los linfocitos Treg y de las CD *in vivo*. Es probable que este circuito regulador sea esencial en el equilibrio entre la inmunidad y la tolerancia, pero lo más importante, por primera vez, establece la conexión entre tres componentes importantes del sistema inmunitario, es decir, DII4-CD-Tregs. Por lo tanto, una terapia con antagonistas del DII4 presenta una metodología eficaz para el control de las cifras de los Treg *in vivo*, y consecuentemente para el control de la progresión de las enfermedades autoinmunes y de las afecciones relacionadas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Métodos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes con antagonistas del DII4

ES 2 609 663 T3

<130> 6050A-WO

<140> A asignar
<141> Presentada con la presente

5

<150> 61/299.801
<151> 29-01-2010

10

<150> 61/361.687
<151> 06-07-2010

<150> 61/388.697
<151> 01-10-2010

15

<160> 118

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

20

<210> 1
<211> 2058
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

25

atggcggcag	cgtcccggag	cgccctctggc	tgggcgctac	tgctgctggt	ggcacttttg	60
cagcagcgcg	cggccggctc	cggcgtcttc	cagctgcagc	tgcaggagtt	catcaacgag	120
cgccggctac	tggccagtgg	gcggccttgc	gagcccggt	gccggacttt	cttcgcgctc	180
tgcccttaagc	acttccaggc	ggctcgtctcg	cccggaccct	gcaccttcgg	gaccgtctcc	240
acgccgggat	tgggcaccaa	ctccttcgct	gtccgggacg	acagtagcgg	cggggggccc	300
aaccctctcc	aactgccctt	caatttcacc	tggccgggta	ccttctcgtc	catcatcgaa	360
gcttggcacc	cgccaggaga	cgacctgcgg	ccagaggcct	tgccaccaga	tgcactcatc	420
agcaagatcg	ccatccaggg	ctccctagct	gtgggtcaga	actgggtatt	ggatgagcaa	480
accagcacc	tcacaaggct	gcgtactct	taccgggtca	tctgcagtga	caactactat	540
ggagacaact	gctcccgcct	gtgcaagaag	cgcaatgacc	acttcggcca	ctatgtgtgc	600
cagccagatg	gcaacttgtc	ctgcctgccc	ggttggactg	gggaatattg	ccaacagcct	660
atctgtcttt	cgggctgtca	tgaacagaat	ggctactgca	gcaagccagc	agagtgcctc	720
tgccgcccag	gctggcaggg	ccggctgtgt	aacgaatgca	tccccacaa	tggtgtgctc	780
cacggcacct	gcagcactcc	ctggcaatgt	acttgtgatg	agggtgggg	aggcctggtt	840
tgtgaccaag	atctcaacta	ctgcacccac	cactccccat	gcaagaatgg	ggcaacgtgc	900
tccaacagtg	ggcagcgaag	ctacacctgc	acctgtcgcc	caggctacac	tggtgtggac	960
tgtgagctgg	agctcagcga	gtgtgacagc	aaccctgtc	gcaatggagg	cagctgtaag	1020
gaccaggagg	atggctacca	ctgcctgtgt	cctccgggct	actatggcct	gcattgtgaa	1080
caagcacct	tgagctgcgc	cgactcccc	tgcttcaatg	ggggctcctg	ccgggagcgc	1140
aaccaggggg	ccaactatgc	ttgtgaatgt	cccccaact	tcaccggctc	caactgcgag	1200
aagaaagtgg	acaggtgcac	cagcaacccc	tgtgccaacg	ggggacagtg	cctgaaccga	1260
ggtccaagcc	gcatgtgccg	ctgcctgctc	ggattcacgg	gcacctactg	tgaactccac	1320
gtcagcgact	gtgcccgtaa	cccttgcgcc	cacgggtgca	cttgccatga	cctggagaat	1380
gggtcatgt	gcacctgccc	tgcggcttc	tctggccgac	gctgtgaggt	gcgacatcc	1440
atcgatgcct	gtgcctcgag	tcctgtctc	aacagggcca	cctgctacac	cgacctctcc	1500
acagacacct	ttgtgtgcaa	ctgcccttat	ggctttgtgg	gcagccgctg	cgagttcccc	1560
gtgggcttgc	cgcccagctt	cccctgggtg	gccgtctcgc	tgggtgtggg	gctggcagtg	1620
ctgctggtac	tgctgggcat	ggtggcagtg	gctgtgcggc	agctgcccgt	tcgacggccg	1680
gacgacggca	gcaggaagc	catgaacaac	ttgtcggact	tccagaagga	caacctgatt	1740
cctgcccgcc	agcttaaaaa	cacaaaccag	aagaaggagc	tggaaagtga	ctgtggcctg	1800
gacaagtcca	actgtggcaa	acagcaaac	cacacattgg	actataatct	ggccccaggg	1860
cccctggggc	gggggacct	gccaggaaag	tttccccaca	gtgacaagag	cttaggagag	1920
aaggcgccac	tgcggttaca	cagtgaagag	ccagagtgtc	ggatatacgc	gatatgctcc	1980
cccagggact	ccatgtacca	gtctgtgtgt	ttgatatacag	aggagaggaa	tgaatgtgtc	2040
attgccacgg	aggtataa					2058

30

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

ES 2 609 663 T3

<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

ES 2 609 663 T3

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
	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			

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

<220>
 <223> Sintético

<400> 3

```

caggtgcagc tgggtgcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagaa cctctcactc 60
acctgtgccca tctccggaga cagtgtctct agtgatagtg ctgcttgga ctggatcagg 120
cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtgggat 180
aatgattatg cagtatctgt gaaaagtoga ataaccttca acccagatac atccaagaac 240
cacatctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctatcta ttactgtgca 300
agagagggggg ataattgaa ttacggctgg ctcgaccctc ggggccaggg aaccacggtc 360
accgtctcct ca 372
    
```

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

20 <220>

ES 2 609 663 T3

<223> Sintético

<400> 4

	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		
5	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
			115					120								

<210> 5

<211> 30

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

15 <400> 5

ggagacagtg tctctagtga tagtgctgct 30

<210> 6

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

25 <400> 6

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

<210> 7

<211> 27

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

35 <400> 7

acatactaca ggtccaagtg gtataat 27

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

45 <400> 8

ES 2 609 663 T3

Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn
 1 5

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

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 9
 gcaagagagg gggataattg gaattacggc tggctcgacc cc 42

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

20 <220>
 <223> Sintético

<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

30 <220>
 <223> Sintético

<400> 11

35 gacatccagt tgaccagtc tccactctcc ctgcccgtca ccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca gaggcctcct cttagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacaa ctctgatct atttggtttc tagtcggggc 180
 tccgggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatccggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga ttttgaatt tattattgta tgcaagctct acaaactccg 300
 tacacttttg gccgggggac caagtgga atcaaa 336

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

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 12

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

ES 2 609 663 T3

			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> Sintético

<400> 13
 cagagcctcc ttcttagtaa tggatacaac tat 33

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

20 <220>
 <223> Sintético

<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> Sintético

35 <400> 15
 ttggttct 9

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

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 16

Leu Val Ser
 1

50 <210> 17
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 609 663 T3

<220>
 <223> Sintético

<400> 17
 5 atgcaagctc taaaaactcc gtacact 27

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

15 <400> 18

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

25 <400> 19

gaggtgcagc tgggtgcagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggaggctc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt cgcagaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtgtcattt ttatggtatg atggaactaa taaaaactat 180
 gtagagtccg tgaagggccg attcaccatc tcaagagaca attccaagaa tatgctgtat 240
 ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcac 300
 gatttttagga gtggttatga ggggtggttc gaccctctggg gccagggaac cctggtcacc 360
 gtctcctca 369

30

<210> 20
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Sintético

40 <400> 20

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

ES 2 609 663 T3

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

 <220>
 <223> Sintético

 10 <400> 21
 ggattcacct tcagtagtta tggc 24

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

 <220>
 <223> Sintético

 20 <400> 22

 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

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

 <220>
 <223> Sintético

 30 <400> 23
 ttatggtatg atggaactaa taaa 24

 35 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Sintético

 <400> 24

 Leu Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Lys
 1 5

 50 <210> 25
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético

 55 <400> 25
 gcgagagatc acgattttag gagtgggtat gaggggtggt tcgacccc 48

 60 <210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 609 663 T3

<220>
 <223> Sintético

<400> 26

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

<210> 27
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

15 <400> 27

gaaatagtga tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggetc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtggttc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcaacac cgtagcaact ggctcccac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

20 <210> 28
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Sintético

<400> 28

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

30 <210> 29
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

40 <400> 29
 cagagtgtta gcagctac 18

<210> 30
 <211> 6

ES 2 609 663 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Sintético

<400> 30

10

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 31
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Sintético

<400> 31
 gatgcatcc 9

20

<210> 32
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> Sintético

30

<400> 32

Asp Ala Ser
 1

35

<210> 33
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Sintético

<400> 33
 caacacogta gcaactggcc tccact 27

45

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> Sintético

<400> 34

55

Gln His Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr
 1 5

60

<210> 35
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 609 663 T3

<223> Sintético

<400> 35

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctgatgg ctccatcaac agtgttgaat cctactggac ctggatccgc 120
cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt ggatacatca aatacactgg gggcatccac 180
tataaccctg ccctcaagag tcgacttgcc atatcagtgg acacgtcaaa gaaccagttc 240
tccctgaaaa tgagctctgt gactgccgcg gacacggcgg tgtattactg tgcgagagca 300
5 cgtggaagtc atacttttga tgtctggggc caggggacaa tggtcaccgt ctcttca 357

```

<210> 36

<211> 119

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

15 <400> 36

```

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
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

```

<210> 37

20 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Sintético

<400> 37

gatggctcca tcaacagtgt tgaatcctac 30

30 <210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Sintético

<400> 38

```

Asp Gly Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Tyr
40      1      5      10

```

<210> 39

ES 2 609 663 T3

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Sintético

<400> 39
 atcaaataca ctgggggcat c 21

10

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

15

<220>
 <223> Sintético

<400> 40

20

Ile Lys Tyr Thr Gly Gly Ile
 1 5

<210> 41
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> Sintético

30

<400> 41
 gcgagagcac gtggaagtca tactttgat gtc 33

35

<210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Sintético

<400> 42

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

45

<210> 43
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> Sintético

<400> 43

55

gaaattgtgc	tgaactcagtc	tccaggcacc	ctgtcttggg	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtea	gagtattage	agtaactact	tagcctggta	ccagcagaaa	120
cctggccagg	ctcccagact	cctcatttat	ggatcatcca	gcagggtcac	tggcatccca	180
gacagggtca	gtggcagtg	gtctgggaca	gacttcaetc	tcaccatcag	cagaactggag	240
cctgaagatt	ttgcactgta	ttattgtcag	cagtatagta	ggtcaccgat	caccttcggc	300
caagggacca	aagtggatat	caaa				324

ES 2 609 663 T3

5 <210> 44
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 44

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						

15 <210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

20 <400> 45

cagagtatta gcagtaacta c 21

25 <210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

30 <400> 46

Gln Ser Ile Ser Ser Asn Tyr
 1 5

35 <210> 47
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

40 <400> 47

ggtgcatcc 9

<210> 48
 <211> 3

ES 2 609 663 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sintético

<400> 48

10 Gly Ala Ser
 1

<210> 49
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Sintético

<400> 49
 20 cagcagtata gtaggtcacc gatcacc 27

<210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Sintético

30 <400> 50

Gln Gln Tyr Ser Arg Ser Pro Ile Thr
 1 5

35 <210> 51
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Sintético

<400> 51

caggtgcagc	tgcaggagtc	gggcccagga	ctggtgaagc	cttcacagac	cctgtccctc	60
acctgcactg	tctctggtgg	ctccatcaac	agtgttactt	actactggac	ctggatccgc	120
cagcaccag	ggaggggct	agagtggatt	gggtacatca	aattcagtgg	gagcacctac	180
tacaaccctg	cctcaaggg	tcgagtcacc	atatcagtgg	acacgtctaa	gaaccaattc	240
tcccttaaaa	ttaactctgt	gactgccgcg	gacacggcgc	tgttttactg	tgcgagagct	300
tctggaagtc	atacttttga	tatctggggc	caagggacaa	tggtcaccct	ctcctca	357

45 <210> 52
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Sintético

<400> 52

55

ES 2 609 663 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

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 53
 ggtggctcca tcaacagtgt tacttactac 30

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

<220>
 <223> Sintético

20 <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> Sintético

<400> 55
 atcaaattca gtgggagcac c 21

35 <210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Sintético

45 <400> 56

ES 2 609 663 T3

Ile Lys Phe Ser Gly Ser Thr
 1 5

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

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 57
 gcgagagctt ctggaagtca tacttttgat atc 33

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

20 <220>
 <223> Sintético

<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> Sintético

35 <400> 59

```

gaaacgacac tcacgcagtc tccaggeacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtggttagc aacagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctct ggtgcttcca gcagggtcac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttggaatgta ttactgtcag cagtatagta ggtcaccgat caccttggc 300

```

```

caagggacca agctggagat caaa 324

```

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

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 60

ES 2 609 663 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> Sintético

<400> 61
 cagagtgtta gcaacagcta c 21

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

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 62

Gln Ser Val Ser Asn Ser Tyr
 1 5

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

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 63
 ggtgctcc 9

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

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 64

Gly Ala Ser
 1

ES 2 609 663 T3

<210> 65
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 65
 10 cagcagtata gtaggtcacc gatcacc 27
 <210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 20 <400> 66
 Gln Gln Tyr Ser Arg Ser Pro Ile Thr
 1 5
 <210> 67
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Sintético
 30 <400> 67
 gaagtgcagc tgggtgcagtc tgggggagcc ttggtacaac ctggggggtc cctgagactc 60
 tctctgtcag cctctggatt cacctttaac aactttgcca tgacctgggt cccgccaggt 120
 ccaggggaagg gctctggagtg ggtctcaact attagtggta gtggcgttga cacatactgc 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgttc gaaagatggc 300
 gcttctata gtggctacga aactactgg ggccaggaa ccacggtcac cgtctctca 360
 35
 <210> 68
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 68
 45

ES 2 609 663 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> Sintético

<400> 69
 ggattcacct ttaacaact tgcc 24

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

20 <220>
 <223> Sintético

<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> Sintético

<400> 71
 attagtgga gggcggtga caca 24

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

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 72

Ile Ser Gly Ser Gly Val Asp Thr
 1 5

ES 2 609 663 T3

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

 <220>
 <223> Sintético

 10 <400> 73
 tcgaaagatg ggcgcttcta tagtggctac gaacactac 39

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

 <220>
 <223> Sintético
 20
 <400> 74

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

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

 30 <220>
 <223> Sintético

 <400> 75

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

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

 <220>
 <223> Sintético

 45 <400> 76

 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

ES 2 609 663 T3

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> Sintético

<400> 77
 cagagtgtta gcagcagcta c 21

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

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 78

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

25 <210> 79
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 79
 ggtacatcc 9

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

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 80

Gly Thr Ser
 1

50 <210> 81
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 609 663 T3

<220>
 <223> Sintético

<400> 81
 5 cagcagtatg gtagctcacc tcggacg 27

<210> 82
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

15 <400> 82

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr
 1 5

<210> 83
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

25 <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
 tggaaacaagc actggttcga cccctggggc caggaacca tggtcaccgt ctcttca 357

30

<210> 84
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Sintético

<400> 84

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

40

ES 2 609 663 T3

<210> 85
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 85
 10 ggttacacct ttacctacta tgggt 24
 <210> 86
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 20 <400> 86
 Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr Gly
 1 5
 <210> 87
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Sintético
 30 <400> 87
 atcagcgcctt acgatggtaa caca 24
 <210> 88
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Sintético
 40 <400> 88
 Ile Ser Ala Tyr Asp Gly Asn Thr
 45 1 5
 <210> 89
 <211> 36
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintético
 55 <400> 89
 gcgaggtata gttggaacaa gcactggttc gacccc 36
 <210> 90
 <211> 12
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

ES 2 609 663 T3

<220>
 <223> Sintético

<400> 90

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

<210> 91
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

15 <400> 91

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

<210> 92
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

25 <400> 92

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

<210> 93
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 93

40 cagagtgtta ccggcagcta c 21

<210> 94
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45

ES 2 609 663 T3

<220>
 <223> Sintético

 <400> 94
 5

 Gln Ser Val Thr Gly Ser Tyr
 1 5

 <210> 95
 <211> 9
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético
 15
 <400> 95
 ggtgcatcc 9

 <210> 96
 <211> 3
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético
 25
 <400> 96

 Gly Ala Ser
 1
 30 <210> 97
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético
 35
 <400> 97
 caacagtctg cttctcacc gtggacg 27
 40
 <210> 98
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Sintético

 <400> 98
 50

 Gln Gln Ser Ala Phe Ser Pro Trp Thr
 1 5

 <210> 99
 <211> 363
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintético
 60
 <400> 99

ES 2 609 663 T3

```

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctgggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ttggatccgc 120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtagatcc attatagtgg gaacaccac 180
tacaatccga ccctcaagag tcgaattacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tcccttgagg tgaactctgt gactgccgcg gacacggccg tatactactg tgcgaggaat 300
atggttcggg gagttcactg gttcgacccc tggggccagg gaaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

```

5 <210> 100
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 100

```

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

```

15 <210> 101
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 101

ggtggctcca tcagcagtg tggttactac 30

25 <210> 102
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Sintético

<400> 102

```

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

```

35 <210> 103
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 609 663 T3

```

<220>
<223> Sintético

<400> 103
5 atccattata gtggaacac c 21

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

15 <400> 104

Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr
1 5

<210> 105
20 <211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> Sintético

<400> 105
gcgaggaata tggtcgggg agttcactgg ttcgacccc 39

30 <210> 106
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Sintético

<400> 106

Ala Arg Asn Met Val Arg Gly Val His Trp Phe Asp Pro
40 1 5 10

<210> 107
45 <211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintético

50 <400> 107

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

```

ES 2 609 663 T3

5
 <210> 108
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10
 <220>
 <223> Sintético

<400> 108

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	Tyr	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro
				85					90					95	
Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

15
 <210> 109
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20
 <220>
 <223> Sintético

<400> 109
 cggagtgtta gcagcagcta c 21

25
 <210> 110
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30
 <220>
 <223> Sintético

<400> 110

Arg	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr
1					5	

35
 <210> 111
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40
 <220>
 <223> Sintético

45
 <400> 111
 ggtgcatcc 9

50
 <210> 112
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 609 663 T3

<220>
 <223> Sintético

5 <400> 112

Gly Ala Ser
1

10 <210> 113
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Sintético

<400> 113
 caacagtata gtagttcacc gctcact 27

20 <210> 114
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Sintético

<400> 114

30 Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro Leu Thr
 1 5

<210> 115
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Sintético

40 <400> 115

caggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cgtctggatt	caccttcagt	agttatggca	tgcactgggt	ccgccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtgtcattt	ttatggtatg	atggaactaa	taaaaactat	180
gtagagtccg	tgaagggccg	attcaccatc	tcaagagaca	attccaagaa	tatgctgtat	240
ctggaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatcac	300
gatttttagga	gtggttatga	gggggtggttc	gaccctctggg	gccagggaac	cctggtcacc	360
gtctcctca						369

45 <210> 116
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Sintético

<400> 116

ES 2 609 663 T3

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

5 <210> 117
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 117

gaaatagtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtggtc tggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcaacac cgtagcaact ggcctcccac ttcgpgcgga 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

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

20 <220>
 <223> Sintético

<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, el tratamiento o la mejora de la esclerosis múltiple, en el que el antagonista del DII4 es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente al DII4 humano (hDII4) y bloquea las rutas de señalización DII4-Notch, y el antagonista bloquea una interacción entre el DII4 y el receptor Notch, aumentando así el número de linfocitos Treg, y la esclerosis múltiple se previene, se trata o se mejora, y en el que el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesadas de las SEQ ID NO: 22, 24 y 26, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas ligeras de las SEQ ID NO: 30, 32 y 34, respectivamente.
2. El antagonista del DII4 para su uso según la reivindicación 1, en el que:
- (i) el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una secuencia de la HCVR de la SEQ ID NO: 20 o de la SEQ ID NO: 116; y
 - (ii) el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una secuencia de la LCVR de la SEQ ID NO: 28 o de la SEQ ID NO: 118.
3. El antagonista del DII4 para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una combinación de HCVR/LCVR de la SEQ ID NO: 20/28 o de la 116/118.
4. El antagonista del DII4 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores junto con al menos un agente terapéutico adicional seleccionado entre un inmunosupresor, un agente antiinflamatorio y un agente analgésico, opcionalmente en el que:
- (i) el agente terapéutico adicional es al menos uno seleccionado entre glucocorticoides, ciclosporina, metotrexato, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), antagonistas del TNF- α , antagonistas de la IL-1, antagonistas de la IL-6 y opioides;
o
 - (ii) el antagonista del DII4 y al menos un agente terapéutico adicional son para una administración simultánea o secuencial.
5. Uso de un antagonista del ligando de tipo delta 4 (DII4) en la preparación de un medicamento para la prevención, el tratamiento o la mejora de la esclerosis múltiple, en el que el antagonista del DII4 es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente al DII4 humano (hDII4) y bloquea las rutas de señalización DII4-Notch, y el antagonista bloquea una interacción entre el DII4 y el receptor Notch, aumentando así el número de linfocitos Treg, y la esclerosis múltiple se previene, se trata o se mejora, y en el que el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesadas de las SEQ ID NO: 22, 24 y 26, respectivamente y una región variable de la cadena ligera (LCVR) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas ligeras de las SEQ ID NO: 30, 32 y 34, respectivamente.
6. El uso según la reivindicación 5, en el que:
- (i) el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una secuencia de la HCVR de la SEQ ID NO: 20 o de la SEQ ID NO: 116; y
 - (ii) el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una secuencia de la LCVR de la SEQ ID NO: 28 o de la SEQ ID NO: 118.
7. El uso según la reivindicación 5 o 6, en el que el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una combinación de HCVR/LCVR de la SEQ ID NO: 20/28 o de la 116/118.

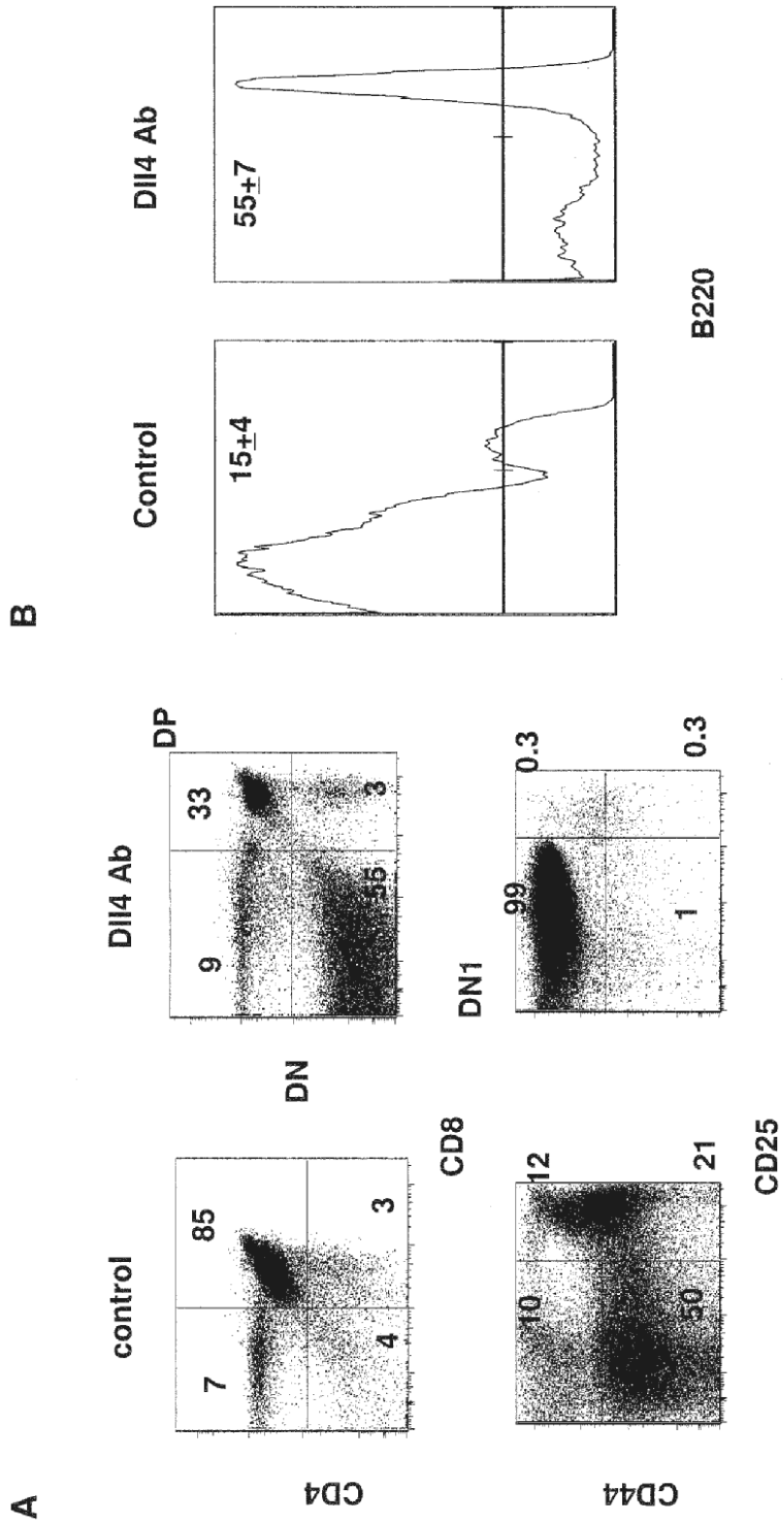


Fig. 1A-B

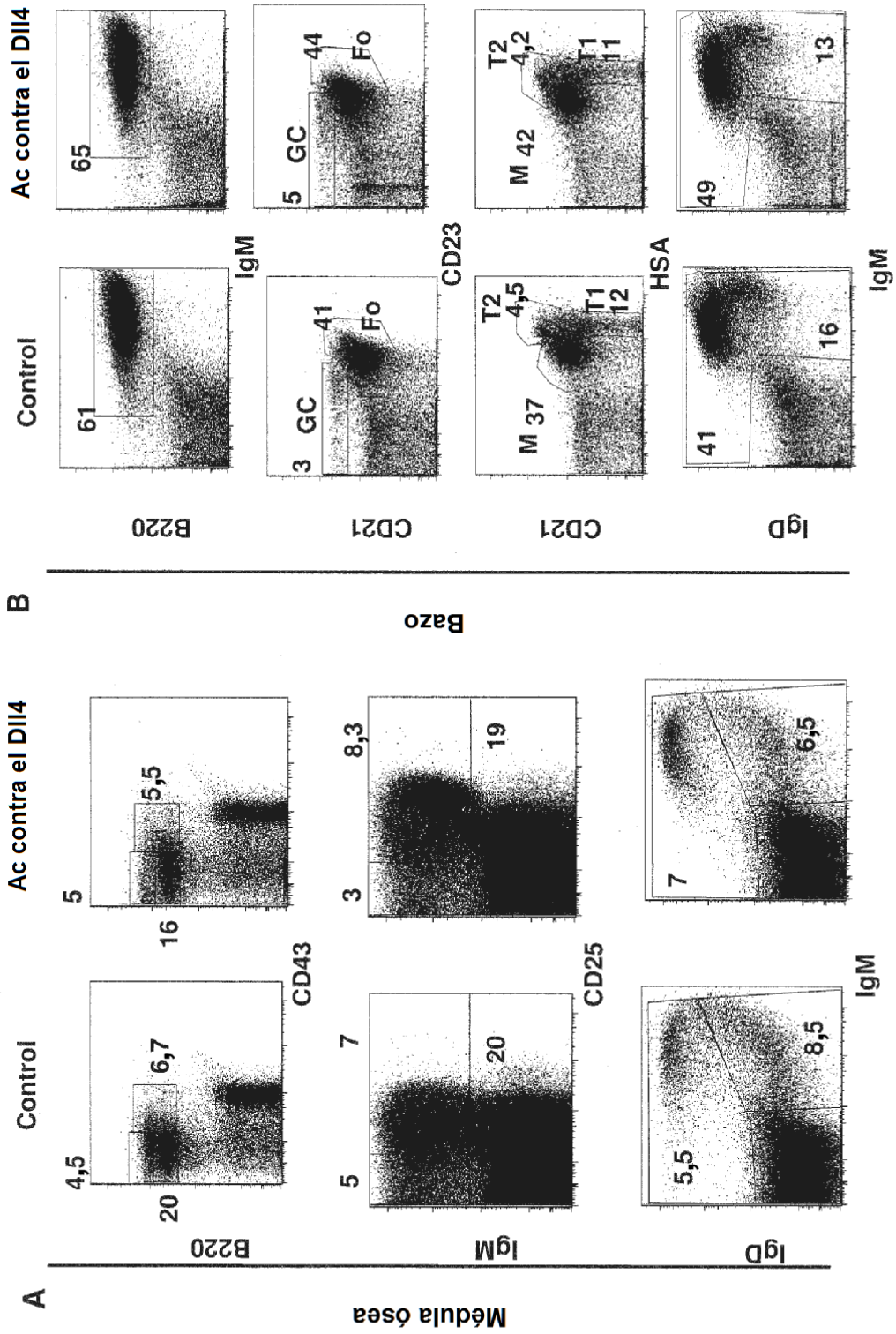


Fig. 2A-B

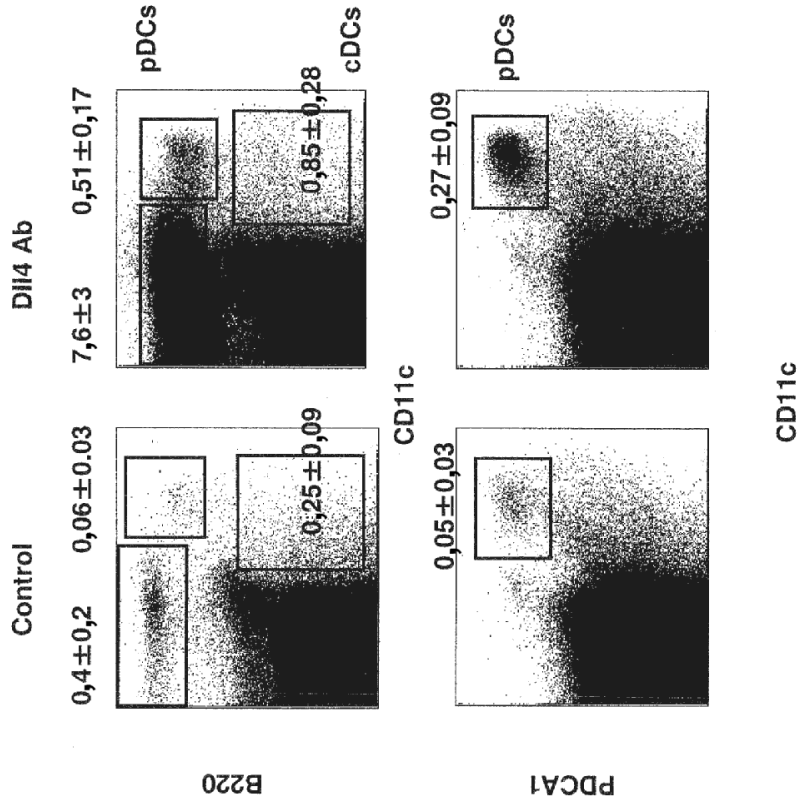


Fig. 3A

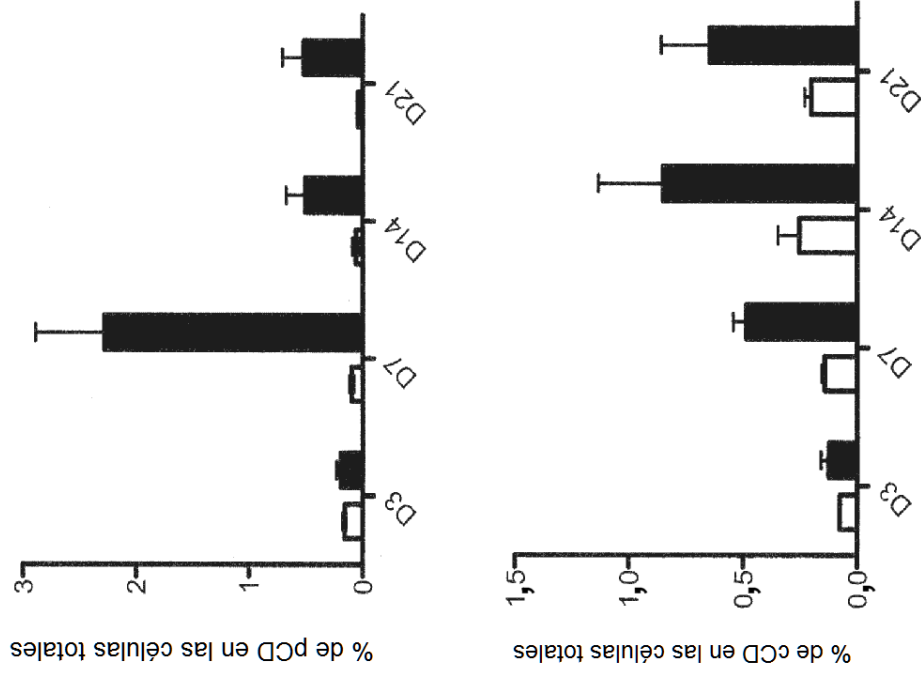


Fig. 3B

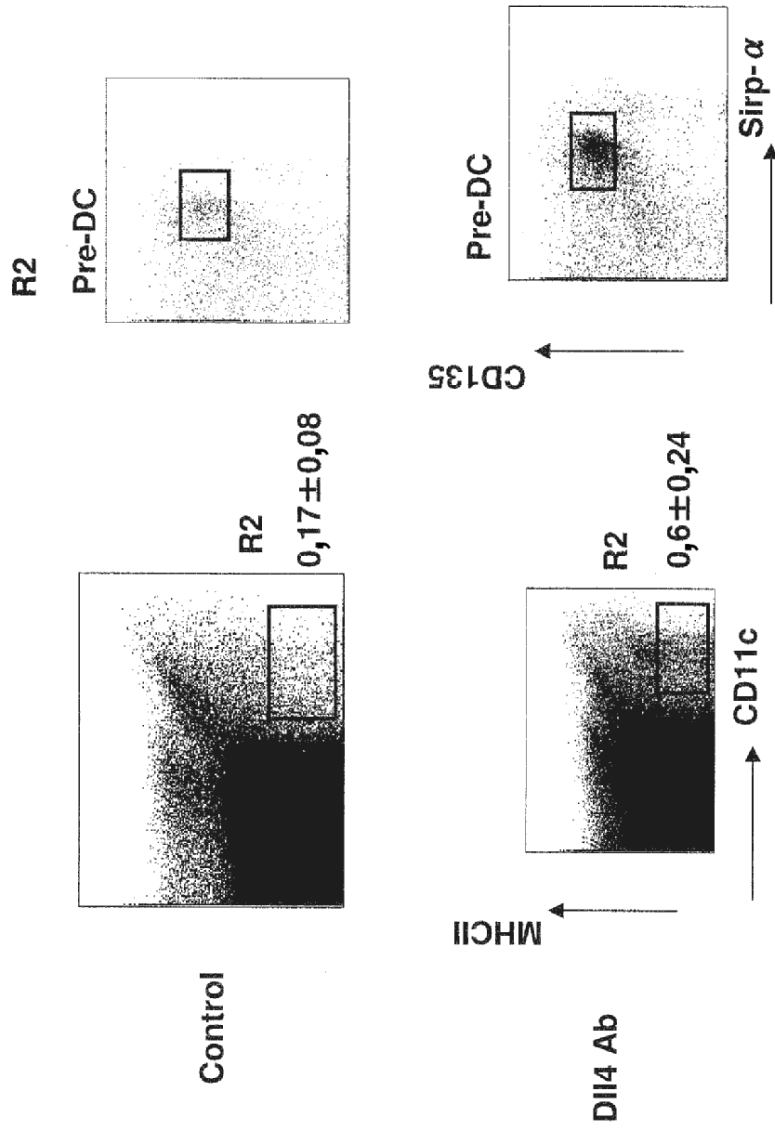


Fig. 3C

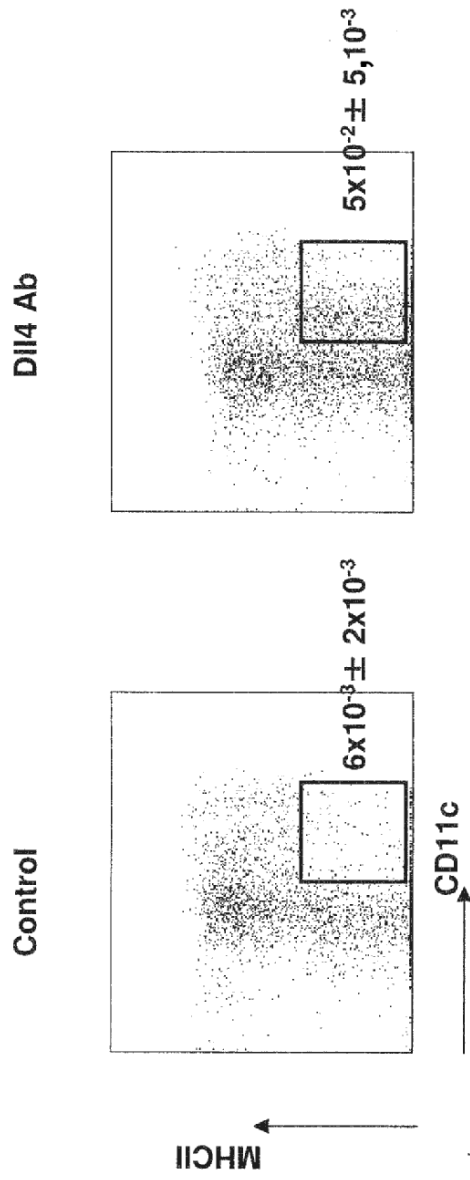


Fig. 3D

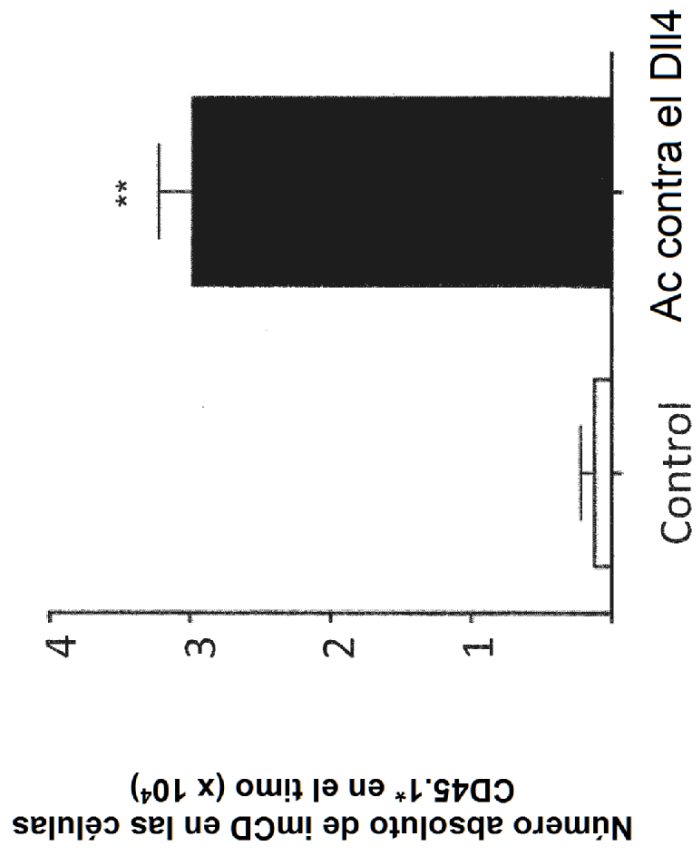


Fig. 4

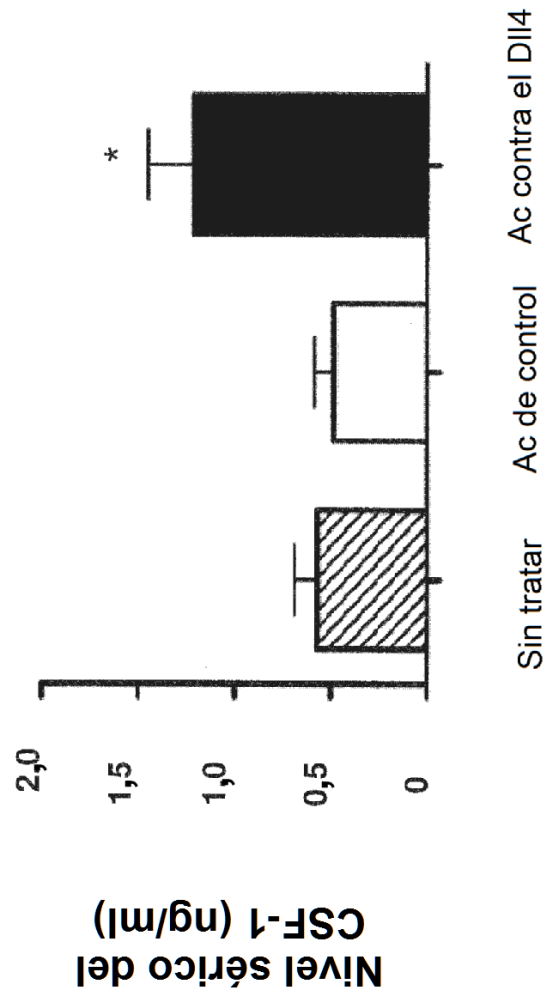


Fig. 5

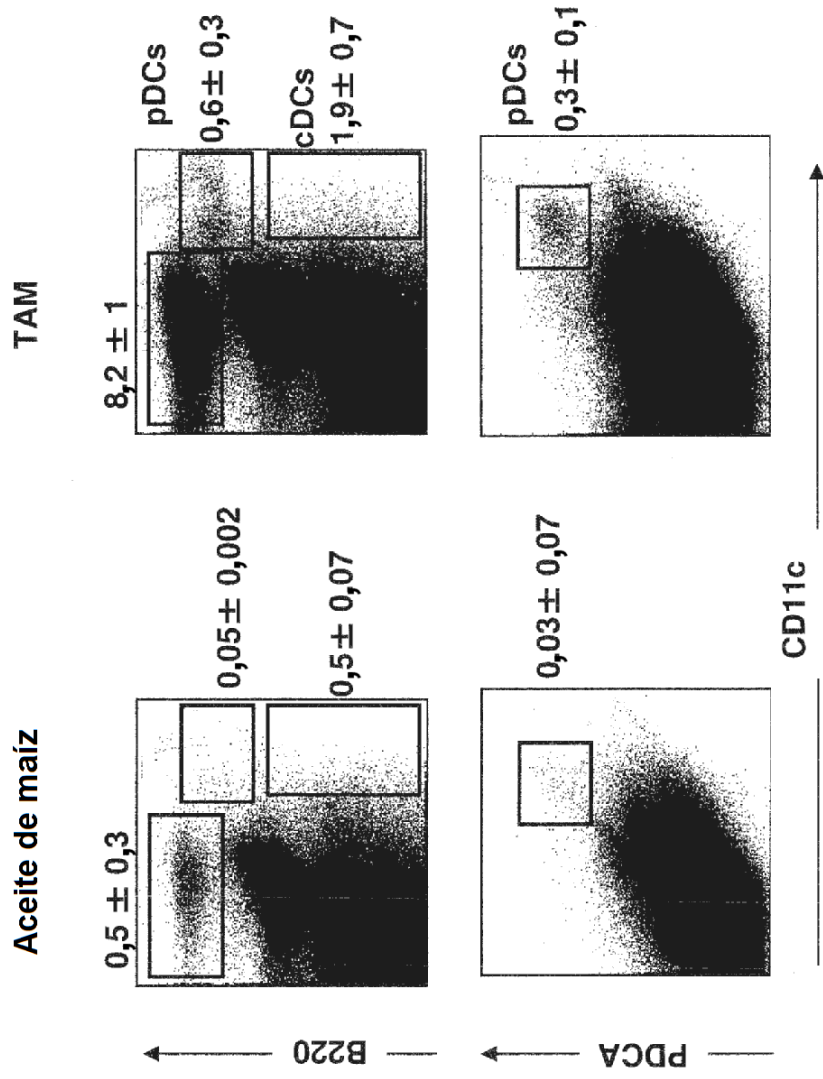


Fig. 6

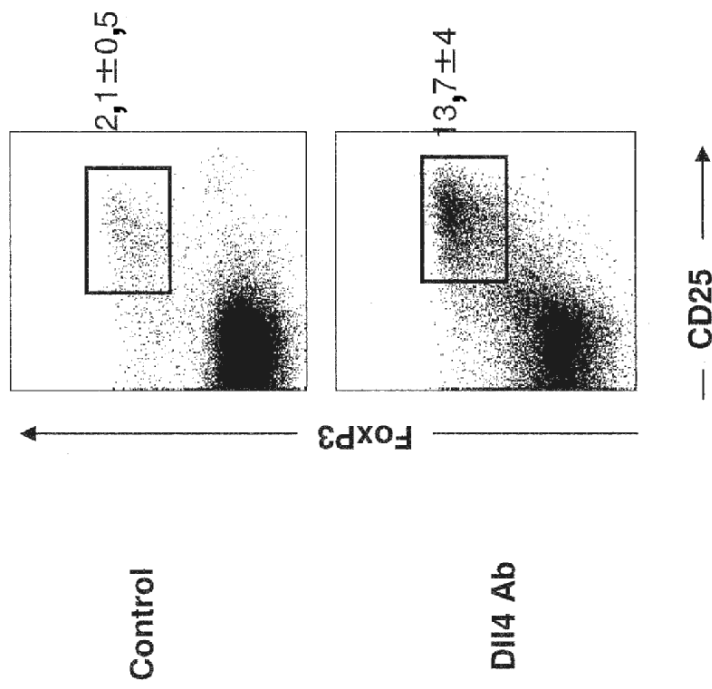


Fig. 7A

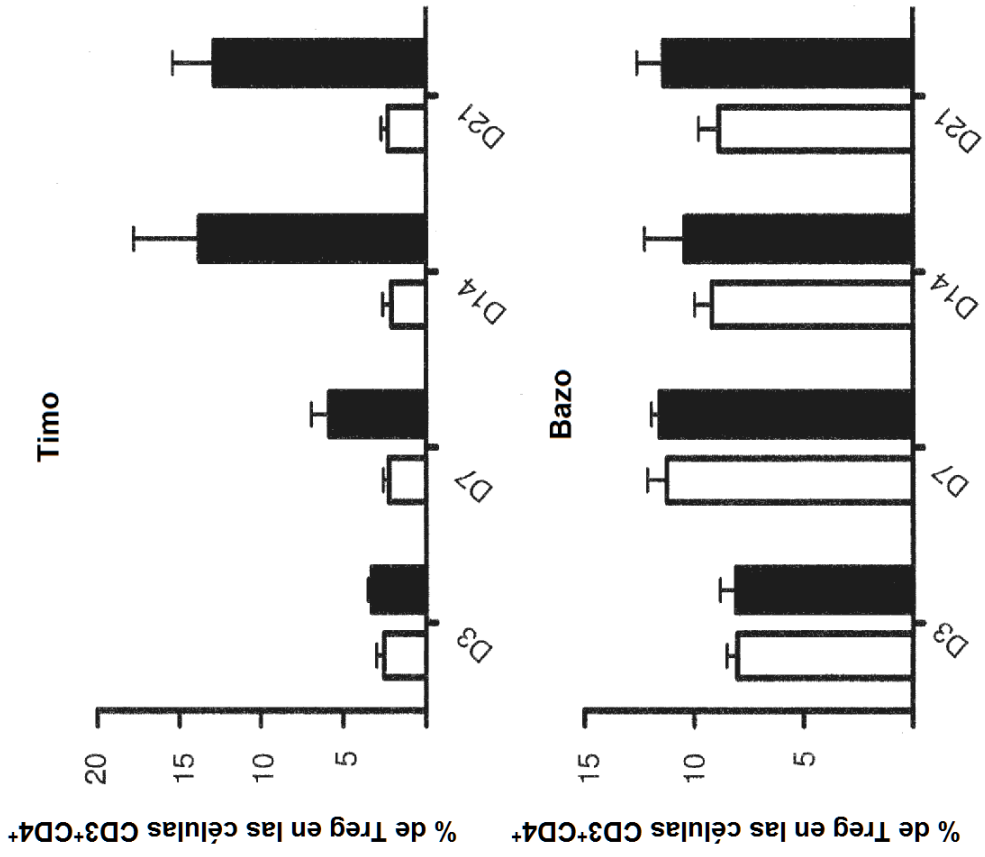


Fig. 7B

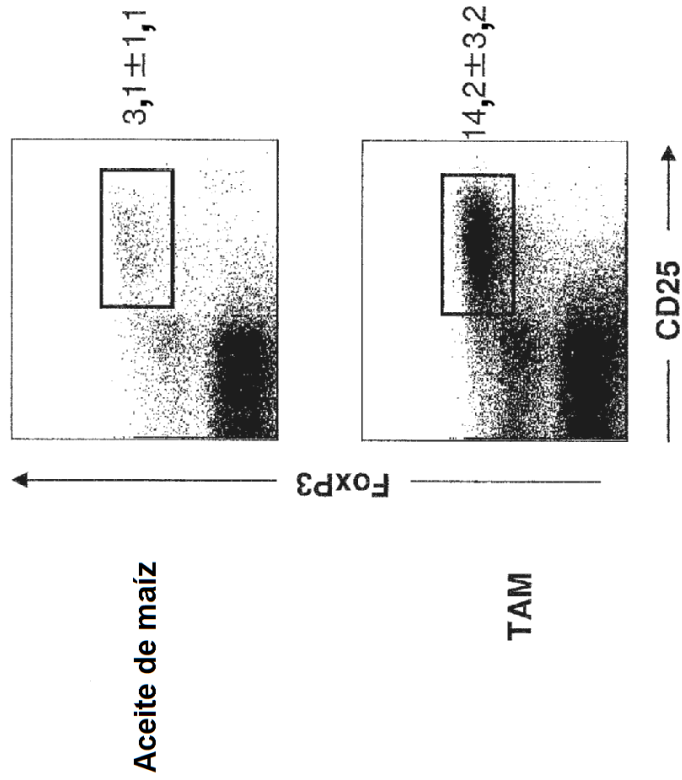


Fig. 7C

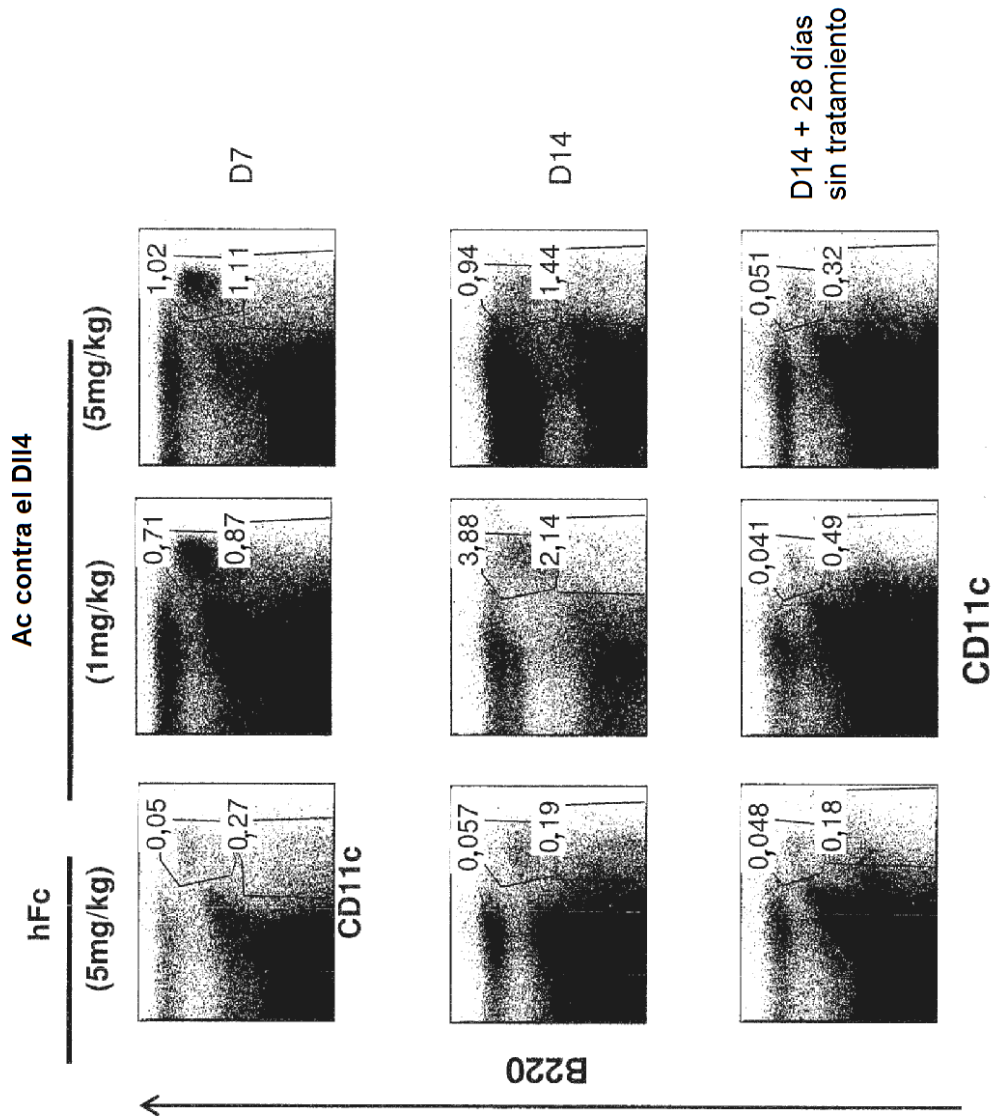


Fig. 8A

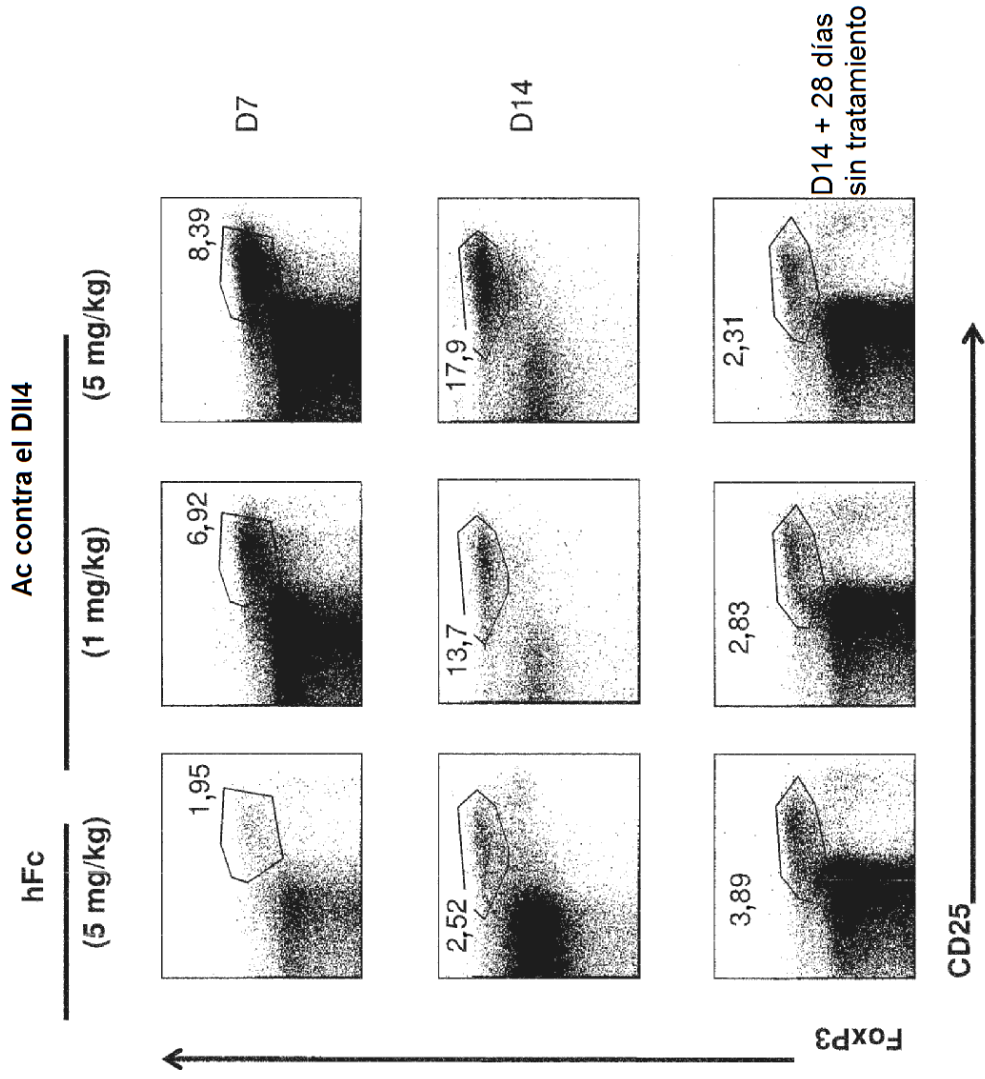


Fig. 8B

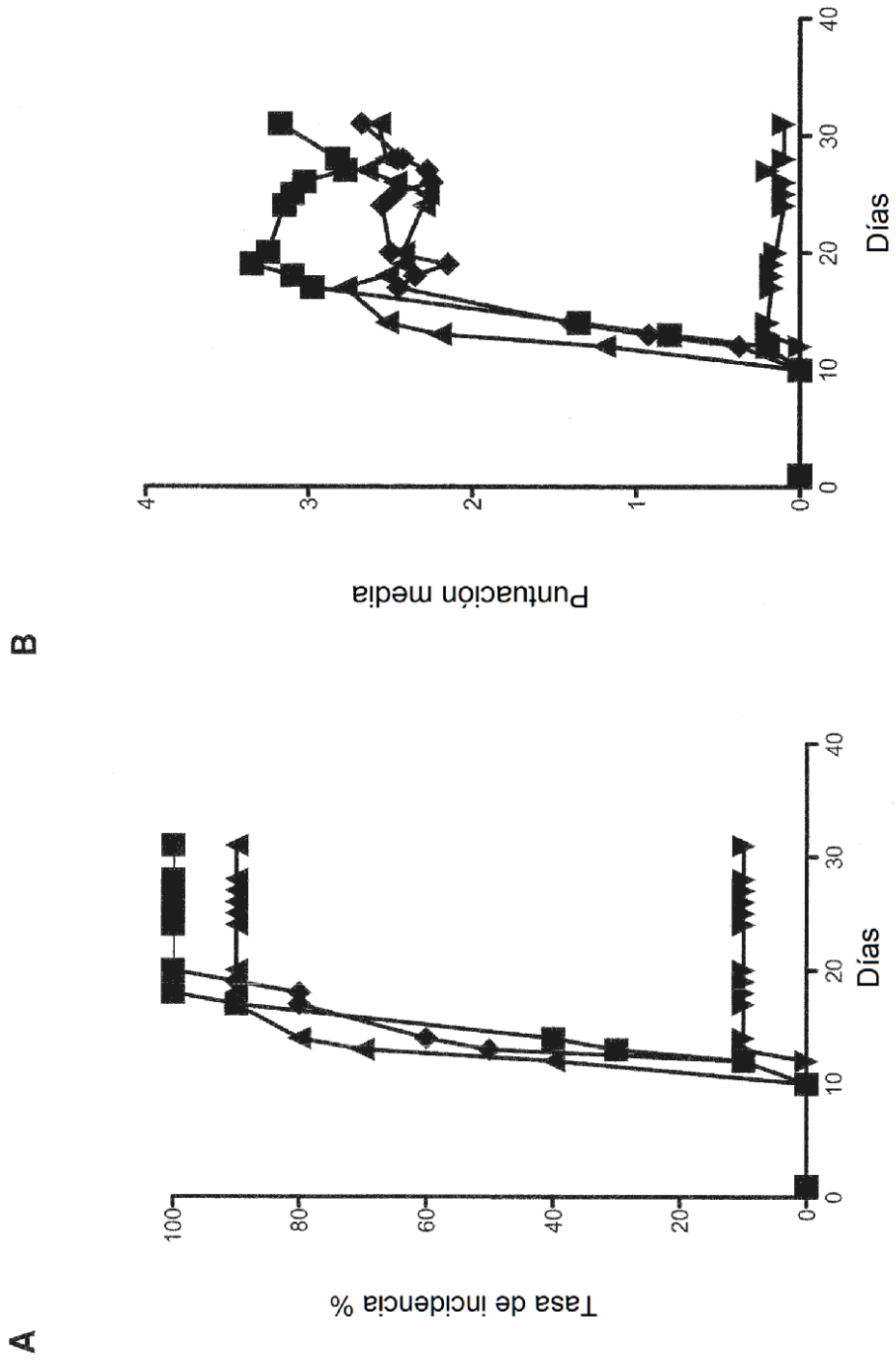


Fig. 9A-B

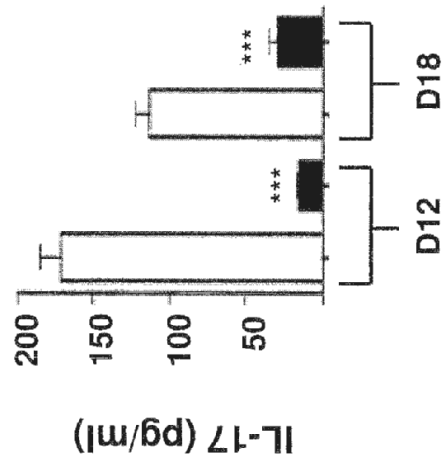
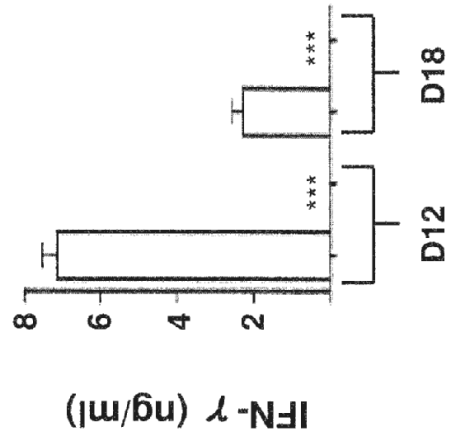


Fig. 10

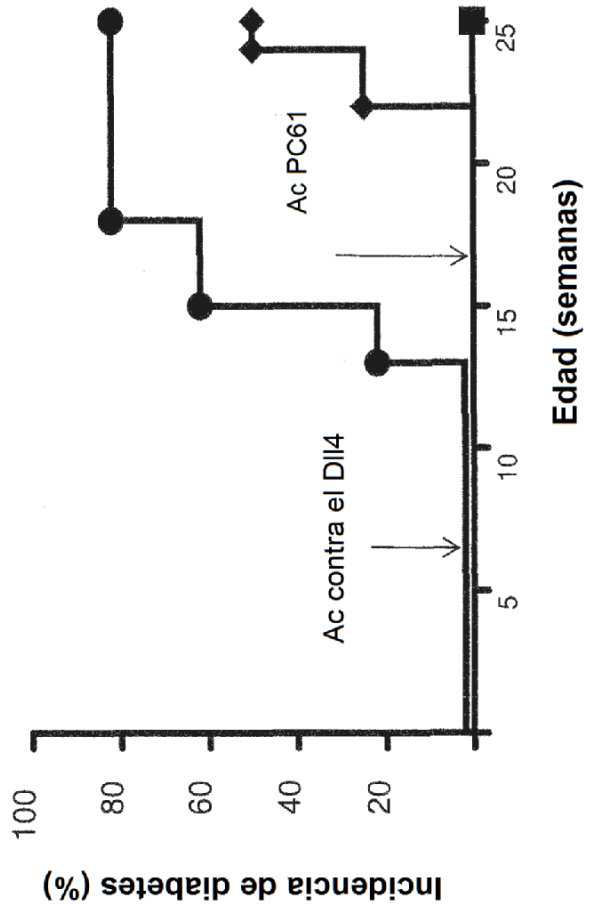


Fig. 11A

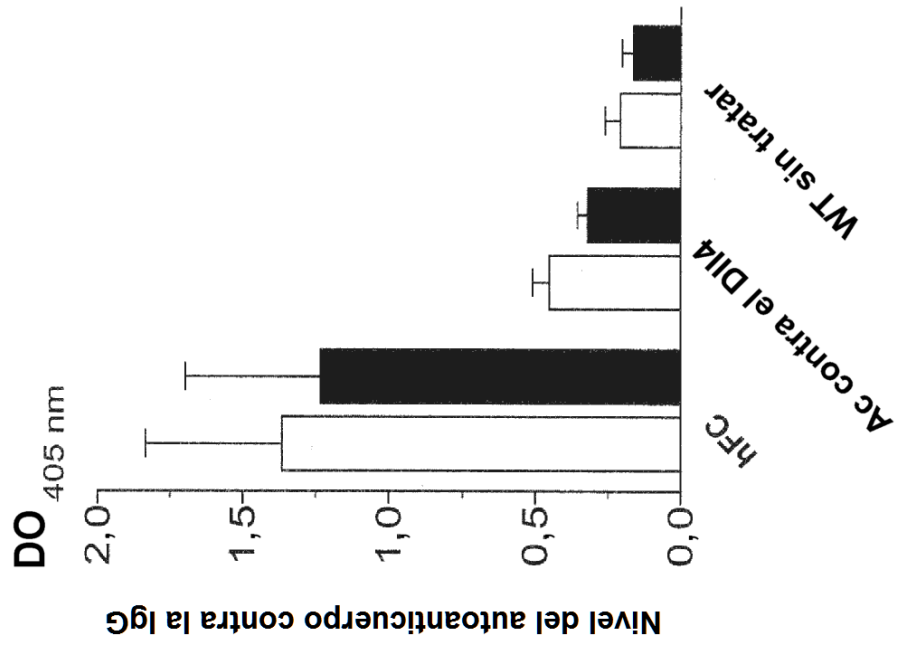
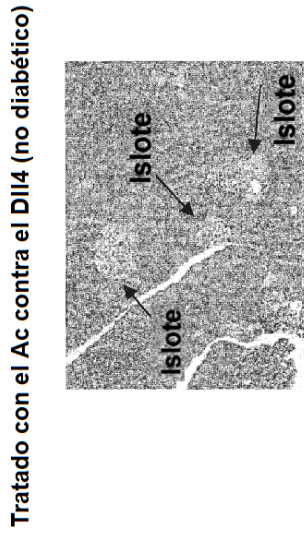
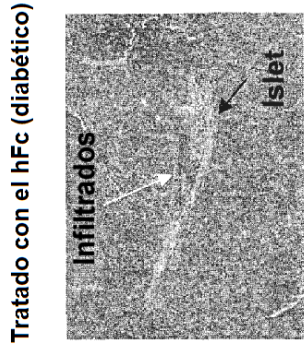
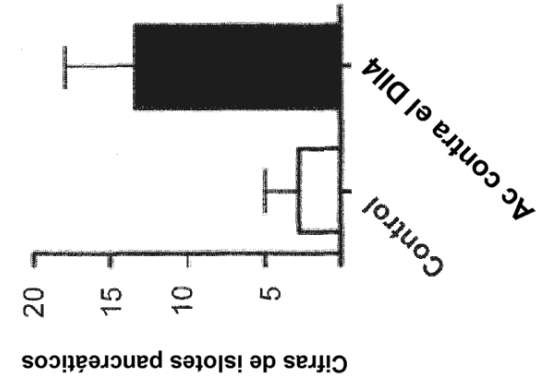
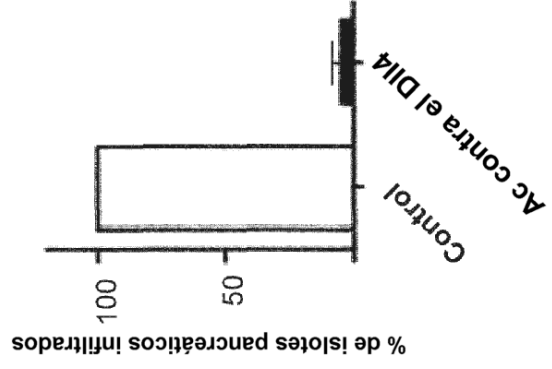


Fig. 11B



C



D

Fig. 11C-D

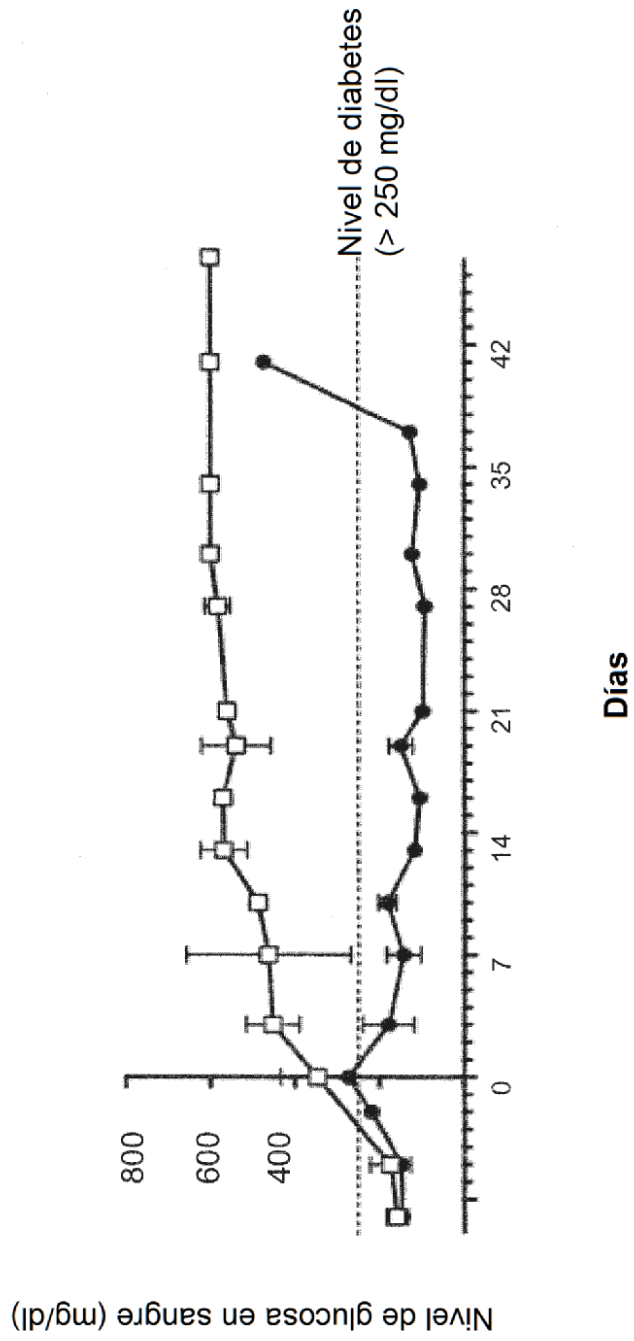


Fig. 11E