

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 153**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)
A61K 31/282	(2006.01)
A61K 31/519	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2015 PCT/US2015/058327**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16070051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2015 E 15856100 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3212233**

54 Título: **Terapia de combinación para tratamiento de enfermedad**

30 Prioridad:

31.10.2014 US 201462073634 P
02.03.2015 US 201562127172 P
14.07.2015 US 201562192133 P
16.10.2015 US 201562242567 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2021

73 Titular/es:

MEREO BIOPHARMA 5, INC. (100.0%)
800 Chesapeake Drive
Redwood City, CA 94063-4748, US

72 Inventor/es:

MURRIEL, CHRISTOPHER LAMOND;
HOEY, TIMOTHY CHARLES;
GURNEY, AUSTIN L.;
RODA, JULIE MICHELLE;
SRIVASTAVA, MINU K.;
PARK, INKYUNG y
DUPONT, JAKOB

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 808 153 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

Terapia de combinación para tratamiento de enfermedad

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. N.º 62/073.634, presentada el 31 de octubre de 2014, solicitud provisional de EE.UU. N.º 62/127.172, presentada el 2 de marzo de 2015, solicitud provisional de EE.UU. N.º 62/192.133, presentada el 14 de julio de 2015, y la solicitud provisional de EE.UU. N.º 62/242.567, presentada el 16 de octubre de 2015

Campo de la invención

10 La presente descripción proporciona procedimientos que comprenden terapia de combinación para la modulación de respuestas inmunitarias y el tratamiento de cáncer y otras enfermedades. En particular, la presente descripción proporciona inhibidores de la ruta Notch, incluyendo antagonistas de DLL4 y antagonistas del receptor Notch, en combinación con al menos un agente inmunoterapéutico adicional para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

15 El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo desarrollado, con más de un millón de personas diagnosticadas con cáncer y 500.000 muertes al año solo en Estados Unidos. En general, se estima que más de 1 de cada 3 personas desarrollarán algún tipo de cáncer durante su vida. Hay más de 200 tipos diferentes de cáncer, cuatro de los cuales, mama, pulmón, colorrectal y próstata, representan más de la mitad de todos los casos nuevos (Siegel y col., 2012, CA: *Cancer J. Clin.*, 62:10-29).

20 Las rutas de señalización conectan señales extracelulares al núcleo que conducen a la expresión de genes que controlan directa o indirectamente el crecimiento, diferenciación, supervivencia y muerte celular. En una amplia diversidad de cánceres, las rutas de señalización están desreguladas y pueden estar relacionadas con el inicio y/o progresión del tumor. Las rutas de señalización implicadas en la oncogénesis humana incluyen, pero no se limitan a, la ruta Wnt, la ruta Ras-Raf-MEK-ERK o MAPK, la ruta PI3K-AKT, la ruta CDKN2A/CDK4, la ruta Bcl-2/TP53, y la ruta Notch.

25 La ruta Notch está implicada en múltiples aspectos del desarrollo vascular, incluyendo la proliferación, la migración, la diferenciación del músculo liso, la angiogénesis y la diferenciación arteriovenosa (Iso y col., 2003, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23:543). El ligando DLL4 (ligando 4 tipo delta) del receptor Notch es un componente importante de la ruta Notch y desempeña un papel en la angiogénesis.

30 La pérdida heterocigota de DLL4 da como resultado defectos graves en el desarrollo arterial y la vascularización del saco vitelino, lo que conduce a la letalidad embrionaria (Duarte y col., 2004, *Genes Dev.*, 18:2474-78; Gale y col., 2004, *PNAS*, 101:15949-54; Krebs y col., 2004, *Genes Dev.*, 18:2469-73). Además, las células tumorales y la vasculatura tumoral a menudo sobreexpresan DLL4, lo que sugiere que la expresión de DLL4 es una función importante en la angiogénesis tumoral (Patel y col., 2005, *Cancer Res.*, 65:8690-97; Yan y col., 2001, *Blood*, 98:3793-99). Por lo tanto, el bloqueo de la señalización de DLL4 y/o la señalización de Notch se ha convertido en un camino prometedor para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

35 Se ha demostrado que el bloqueo de la señalización de la ruta Notch, tal como por un anticuerpo anti-DLL4, reduce el crecimiento tumoral mediante múltiples mecanismos diferentes (Ridgway y col., 2006, *Nature*, 444:1083-87; Noguera-Troise y col., *Nature*, 444:1032-37; Hoey y col., 2009, *Cell Stem Cell*, 5:168-77). Por ejemplo, se ha informado que los anticuerpos de bloqueo de DLL4 provocan la proliferación de células endoteliales y el desarrollo de vasos sanguíneos, sin embargo, estos vasos sanguíneos carecen de un lumen funcional. Se ha informado que este efecto disangiogénico bloquea el crecimiento tumoral al promover el desarrollo de vasos sanguíneos no funcionales (Ridgway y col., 2006, *Nature*, 444:1083-87; Noguera-Troise y col., *Nature*, 444:1032-37; Schemet y col., 2007, *Blood*, 109:4753-60). Además, se ha demostrado que los anticuerpos de bloqueo de DLL4 inhiben el crecimiento tumoral al reducir la proliferación de células tumorales y al reducir la frecuencia de células madre cancerosas. Aunque se desconoce el mecanismo detrás de la reducción de células madre cancerosas o CSC, se plantea la hipótesis de que se requiere DLL4 para la autorrenovación de CSC y mantiene estas células en un estado indiferenciado (Hoey y col., 2009, *Cell Stem Cell*, 5:168-77).

40 A diferencia de los enfoques terapéuticos que intentan bloquear la señalización de los factores angiogénicos tumorales, el bloqueo de la señalización de DLL4 por los anticuerpos anti-DLL4 humanos puede dar como resultado hipertrofia endotelial y la creación de microvasos no funcionales. En consecuencia, incluso en presencia de factores angiogénicos tumorales, el bloqueo de la señalización de DLL4 a través de la administración de anticuerpos anti-DLL4 humanos puede provocar una disangiogénesis que inhibe la capacidad del tumor para inducir la formación funcional de vasos sanguíneos necesaria para soportar el crecimiento tumoral.

55 La base para la inmunoterapia es la manipulación y/o modulación del sistema inmunitario, que incluye tanto las respuestas inmunitarias innatas como las respuestas inmunitarias adaptativas. El objetivo general de la inmunoterapia

es tratar enfermedades controlando la respuesta inmunitaria a un "agente extraño", por ejemplo, un patógeno o una célula tumoral. Sin embargo, en algunos casos, la inmunoterapia se usa para tratar enfermedades autoinmunes que pueden surgir de una respuesta inmunitaria anormal contra proteínas, moléculas y/o tejidos normalmente presentes en el cuerpo. La inmunoterapia puede incluir procedimientos para inducir o mejorar respuestas inmunitarias específicas o para inhibir o reducir respuestas inmunitarias específicas. El sistema inmunitario es un sistema altamente complejo compuesto por una gran cantidad de tipos de células, incluyendo, pero no limitándose a, linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales, células presentadoras de antígeno, células dendríticas, monocitos, granulocitos y macrófagos. Estas células poseen sistemas complejos y sutiles para controlar sus interacciones y respuestas. Las células utilizan mecanismos de activación e inhibición y circuitos de retroalimentación para mantener las respuestas bajo control y no permitir las consecuencias negativas de una respuesta inmunitaria no controlada (por ejemplo, enfermedades autoinmunes).

Generalmente, una respuesta inmunitaria se inicia a través del reconocimiento de antígeno por el receptor de linfocitos T (TCR) y se regula mediante un equilibrio entre las señales estimuladoras e inhibitoras (es decir, los puntos de control inmunitarios). En condiciones normales, los puntos de control inmunitarios son necesarios para mantener un equilibrio entre las señales de activación e inhibitoras y para garantizar el desarrollo de una respuesta inmunitaria eficaz mientras se protege contra el desarrollo de autoinmunidad o daño a los tejidos cuando el sistema inmunitario responde a un agente extraño o patógeno. Un receptor del punto de control inmunitario importante es CTLA-4, que se expresa en los linfocitos T y se expresa altamente en los linfocitos T reguladores (Treg). Se considera que CTLA-4 actúa como una molécula inhibidora o un "freno" de respuesta inmunitaria y regula principalmente la amplitud de la activación de los linfocitos T. CTLA-4 contrarresta la actividad del receptor coestimulador, CD28, que actúa en concierto con el TCR para activar los linfocitos T. CTLA-4 y CD28 comparten ligandos o contrarreceptores idénticos, B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) y el equilibrio de la respuesta inmunitaria probablemente implica la competencia de CTLA-4 y CD28 para unirse a los ligandos. Otro receptor importante del punto de control inmunitario es PD-1, que se expresa en los linfocitos T después de la activación, se expresa altamente en los Treg y se expresa en otras células activadas, incluyendo los linfocitos B y las células asesinas naturales (NK). Similar a CTLA-4, se considera que PD-1 actúa como una molécula inhibidora y un "freno" en la respuesta inmunitaria. Existen dos ligandos/contrarreceptores para PD-1, PD-L1 (también conocido como B7-H1 y CD274) y PD-L2 (también conocido como B7-DC y CD273). (Véase, Pardoll, 2012, *Nature Reviews Cancer*, 12:252-264).

El concepto de inmunovigilancia del cáncer se basa en la teoría de que el sistema inmunitario puede reconocer las células tumorales, montar una respuesta inmunitaria, y suprimir el desarrollo y/o progresión de un tumor. Sin embargo, resulta evidente que muchas células cancerosas han desarrollado mecanismos para evadir el sistema inmunitario que pueden permitir el crecimiento desinhibido de tumores. Los puntos de control inmunitarios pueden estar desregulados por tumores y pueden ser manipulados por tumores para ser utilizados como un mecanismo de resistencia inmunitaria. La inmunoterapia contra el cáncer se centra en el desarrollo de agentes que pueden activar y/o estimular el sistema inmunitario para lograr una respuesta más eficaz para inhibir el crecimiento tumoral y/o destruir las células tumorales.

Uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar procedimientos mejorados para el tratamiento del cáncer, particularmente procedimientos que usan inhibidores de la ruta Notch en combinación con agentes inmunoterapéuticos.

Rizzo P y col. describen el direccionamiento racional de la señalización de Notch en el cáncer (*Oncogene* 27, n.º 38 (septiembre de 2008): 5124-31). Gurney A y Hoey T describen anti-DLL4 como un producto terapéutico contra el cáncer con múltiples mecanismos de acción (*Vascular Cell* 3, n.º. 1 (10 de agosto de 2011): 18). El documento US 2014/206853 A1 describe agentes de unión de direccionamiento dirigidos a DLL4 y usos de los mismos. El documento US 2012/288496 A1 describe agentes de unión a Notch y antagonistas y procedimientos de uso de los mismos. El documento US 2013/164295 A1 describe los agentes de unión a VEGF/DLL4 y usos de los mismos. El documento US 2013/309750 A1 describe la inmunoterapia contra el cáncer al interrumpir la señalización de PD-1/PD-L1. El documento US 2012/245151 A1 describe compuestos de bisfluoroalquil-1,4-benzodiazepinona.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo antagonista del ligando 4 tipo delta (DLL4) para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer, inhibir el crecimiento tumoral, mejorar la respuesta de memoria específica de antígeno a un tumor o inducir la activación o mejora de una respuesta inmunitaria persistente a un tumor, en el que el procedimiento comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista de DLL4 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, y en el que el segundo agente es un inhibidor del punto de control inmunitario, y en el que el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo que se une específicamente a PD-1 o un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1.

Las realizaciones de la invención se describen en algunos de los casos a continuación.

Se describen anticuerpos para su uso en procedimientos de tratamiento de enfermedades tal como el cáncer, en los que los procedimientos comprenden administrar a un sujeto que lo necesita un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) en combinación con un segundo agente, en los que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. La terapia de combinación con al menos dos agentes terapéuticos

a menudo usa agentes que funcionan mediante diferentes mecanismos de acción y/o se dirigen a diferentes rutas y pueden producir efectos aditivos o sinérgicos. La terapia de combinación puede permitir una dosis más baja de cada agente que la utilizada en monoterapia, reduciendo así los efectos secundarios tóxicos y/o aumentando el índice terapéutico del agente o agentes. La terapia de combinación puede disminuir la probabilidad de que se desarrolle resistencia a un agente. La terapia de combinación puede permitir que un agente sensibilice las células tumorales (incluidas las células madre cancerosas) a una actividad mejorada por un segundo agente. La terapia de combinación que comprende un agente inmunoterapéutico puede permitir que un agente mejore la respuesta inmunitaria a un tumor o células tumorales, mientras que el segundo agente puede ser eficaz para destruir células tumorales más directamente. Además, el orden y/o el momento de la administración de cada agente terapéutico pueden afectar a la eficacia general de una combinación farmacológica.

También se describen inhibidores de la ruta Notch, incluyendo, pero no limitándose a, antagonistas del ligando 4 de tipo Delta (DLL4) y antagonistas del receptor Notch. Los antagonistas de DLL4 incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y otros polipéptidos que se unen a DLL4, moléculas pequeñas que se unen a DLL4, y proteínas Notch solubles. El "antagonista de DLL4", como se emplea en esta memoria, incluye anticuerpos biespecíficos, moléculas biespecíficas heterodiméricas, moléculas biespecíficas homodiméricas, y/o moléculas bifuncionales que comprenden un anticuerpo anti-DLL4 y un agente inmunoterapéutico. Los antagonistas de los receptores Notch incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y otros polipéptidos que se unen a Notch1, Notch2, Notch3 y/o Notch4, moléculas pequeñas que se unen a Notch1, Notch2, Notch3 y/o Notch4, y ligandos de Notch solubles (DLL1, DLL3, DLL4, Jag1 y Jag2). El "antagonista del receptor Notch", como se emplea en esta memoria, incluye anticuerpos biespecíficos, moléculas biespecíficas heterodiméricas, moléculas biespecíficas homodiméricas, y/o moléculas bifuncionales que comprenden un anticuerpo anti-Notch y un agente inmunoterapéutico.

También se describen agentes inmunoterapéuticos, incluyendo pero sin limitación, un modulador de la actividad de PD-1, un modulador de la actividad de PD-L1, un modulador de la actividad de PD-L2, un modulador de la actividad de CTLA-4, un modulador de la actividad de CD28, un modulador de la actividad de CD80, un modulador de la actividad de CD86, un modulador de la actividad de 4-1BB, un modulador de la actividad de OX40, un modulador de la actividad de KIR, un modulador de la actividad de Tim-3, un modulador de la actividad de LAG3, un modulador de la actividad de CD27, un modulador de la actividad de CD40, un modulador de la actividad de GITR, un modulador de la actividad de TIGIT, un modulador de la actividad de CD20, un modulador de la actividad de CD96, un modulador de la actividad de IDO 1, una citocina, un quimiocina, un interferón, una interleucina, una linfoquina, un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), y un oligonucleótido inmunoestimulador.

Se proporcionan composiciones que comprenden un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) y/o al menos un agente inmunoterapéutico adicional. Se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los inhibidores de la ruta Notch y/o los agentes inmunoterapéuticos.

A medida que avanza el descubrimiento y el desarrollo de fármacos, especialmente en el campo del cáncer, el enfoque de "un fármaco para todos" está cambiando a una estrategia de "medicina personalizada". Las estrategias de medicina personalizada pueden incluir regímenes de tratamiento basados en biomarcadores, incluidos marcadores pronósticos, marcadores farmacodinámicos y marcadores predictivos. En general, los biomarcadores predictivos evalúan la probabilidad de que un tumor o cáncer responda o sea sensible a un agente terapéutico específico o una combinación de agentes, y puede permitir la identificación y/o la selección de pacientes con mayores probabilidades de beneficiarse del uso de ese agente o agentes. La descripción proporciona el uso de PD-L1 como un biomarcador predictivo para determinar la capacidad de respuesta al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un agente inmunoterapéutico. También se proporcionan procedimientos para usar el biomarcador predictivo para identificar y/o seleccionar tumores y/o pacientes con cáncer que puedan responder o no al tratamiento. También se proporcionan procedimientos para tratar pacientes que se predice y/o se identifica que responden al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un agente inmunoterapéutico.

En un aspecto, la descripción proporciona procedimientos para inhibir el crecimiento tumoral. En algunos casos, un procedimiento comprende poner en contacto células tumorales con una cantidad eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad eficaz de un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. El procedimiento puede ser *in vivo* o *in vitro*. En ciertos casos, el tumor está en un sujeto, y poner en contacto las células tumorales con el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cada uno de los agentes al sujeto. En algunos casos, un procedimiento para inhibir el crecimiento tumoral comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4 y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para inhibir el crecimiento tumoral comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para tratar el cáncer. En algunos casos, un procedimiento para tratar el cáncer comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el segundo

agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para tratar el cáncer comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4 y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para tratar el cáncer comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de. En algunos casos, un procedimiento para modular la respuesta inmunitaria comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, la respuesta inmunitaria es una respuesta antitumoral. En algunos casos, la respuesta inmunitaria se mejora, se aumenta, se activa, y/o se induce. En algunos casos, la modulación de la respuesta inmunitaria comprende una respuesta aumentada de tipo Th1. En algunos casos, la modulación de la respuesta inmunitaria comprende una respuesta disminuida de tipo Th2. En algunos casos, la modulación de la respuesta inmunitaria comprende una respuesta disminuida de tipo T_H17.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para inhibir la actividad de los linfocitos T reguladores (Treg). En algunos casos, un procedimiento para inhibir la actividad de los Treg comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para inhibir la actividad de los Treg comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4 y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para inhibir la actividad de los Treg comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, la inhibición de la actividad de los Treg comprende inhibir la supresión de las respuestas inmunitarias. En algunos casos, la inhibición de la actividad de los Treg da como resultado la inhibición de la supresión de las respuestas inmunitarias.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para inhibir la actividad de las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC). En algunos casos, un procedimiento para inhibir la actividad de las MDSC comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para inhibir la actividad de las MDSC comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4 y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para inhibir la actividad de las MDSC comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, la inhibición de la actividad de las MDSC comprende inhibir la supresión de las respuestas inmunitarias. En algunos casos, la inhibición de la actividad de las MDSC da como resultado la inhibición de la supresión de las respuestas inmunitarias.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para mejorar la respuesta de memoria específica de antígeno a un tumor. En algunos casos, un procedimiento para mejorar la respuesta de memoria específica de antígeno a un tumor comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para mejorar la respuesta de memoria específica de antígeno a un tumor comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch

es un antagonista de DLL4 y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para mejorar la respuesta de memoria específica de antígeno a un tumor comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para activar o mejorar una respuesta inmunitaria persistente o a largo plazo frente a un tumor. En algunos casos, un procedimiento para activar o mejorar una respuesta inmunitaria persistente a un tumor comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para activar o mejorar una respuesta inmunitaria persistente a un tumor comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor

de la ruta Notch es un antagonista de DLL4 y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para activar o mejorar una respuesta inmunitaria persistente a un tumor comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para inducir una inmunidad persistente o a largo plazo que inhibe la recidiva tumoral o el rebrote tumoral. En algunos casos, un procedimiento para inducir una inmunidad persistente que inhibe la recidiva tumoral o el rebrote tumoral comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para inducir una inmunidad persistente que inhibe la recidiva tumoral o el rebrote tumoral comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4 y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para inducir una inmunidad persistente que inhibe la recidiva tumoral o el crecimiento tumoral comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para aumentar la eficacia de un modulador del punto de control inmunitario. En algunos casos, un procedimiento para aumentar la eficacia de un modulador del punto de control inmunitario comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador del punto de control inmunitario. En algunos casos, un procedimiento para aumentar la eficacia de un modulador del punto de control inmunitario comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador del punto de control inmunitario, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. En algunos casos, un procedimiento para aumentar la eficacia de un modulador del punto de control inmunitario comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador del punto de control inmunitario, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch. En algunos casos, el modulador del punto de control inmunitario es un inhibidor del punto de control inmunitario. En algunos casos, el modulador del punto de control inmunitario es un potenciador o estimulador del punto de control inmunitario.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o prevenir la metástasis en un sujeto. En algunos casos, un procedimiento para reducir o prevenir la metástasis en un sujeto comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para reducir o prevenir la metástasis en un sujeto comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunoterapéutico, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. En algunos casos, un procedimiento para reducir o prevenir la metástasis en un sujeto comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunoterapéutico, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para mejorar el tratamiento para un sujeto que está siendo tratado con un inhibidor del punto de control inmunitario, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para mejorar o inducir una respuesta inmunitaria antitumoral en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para identificar un tumor humano susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del tumor. En algunos casos, un procedimiento para identificar un tumor humano susceptible de responder al tratamiento de combinación con un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico, comprende: a) obtener una muestra del tumor humano; b) medir el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra; y c) identificar el tumor como susceptible de responder o no al tratamiento de combinación con un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico basándose en el nivel de expresión de PD-L1.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para determinar la capacidad de respuesta (o sensibilidad) de un tumor humano al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo

agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, comprendiendo el procedimiento: (a) obtener una muestra del tumor humano; (b) medir el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra; y (c) determinar la capacidad de respuesta del tumor al tratamiento basándose en el nivel de expresión de PD-L1. En algunos casos, el procedimiento comprende determinar la capacidad de respuesta o sensibilidad de un tumor humano al tratamiento con un antagonista de DLL4 en combinación con al menos un agente terapéutico adicional. En algunos casos, el procedimiento comprende determinar la capacidad de respuesta o sensibilidad de un tumor humano al tratamiento con un antagonista del receptor Notch en combinación con al menos un agente terapéutico adicional.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para identificar a un paciente con cáncer que es probable que responda al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, comprendiendo el procedimiento: (a) obtener una muestra del paciente; (b) medir el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra; y (c) identificar al paciente susceptible de responder al tratamiento basándose en el nivel de expresión de PD-L1. En algunos casos, la muestra es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra es una muestra de sangre o plasma. En algunos casos, el procedimiento comprende identificar a un paciente con cáncer susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico en combinación con al menos un agente terapéutico adicional.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para seleccionar un sujeto con un tumor para el tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, comprendiendo el procedimiento: a) determinar el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto; b) identificar el tumor como susceptible de responder o no al tratamiento con el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico basándose en el nivel de expresión de PD-L1; y c) seleccionar el sujeto para el tratamiento si se identifica que el tumor es susceptible de responder al tratamiento. En algunos casos, la muestra es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra es una muestra de sangre o plasma.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para tratar el cáncer en un paciente, que comprende: (a) identificar si el paciente es susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, en el que la identificación comprende: (i) obtener una muestra del paciente; (ii) medir el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra; e (iii) identificar al paciente que es susceptible de responder al tratamiento basándose en el nivel de expresión de PD-L1; y (b) administrar al paciente que es susceptible de responder al tratamiento una cantidad eficaz del inhibidor de la ruta Notch en combinación con el agente inmunoterapéutico. En algunos casos, la muestra es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra es una muestra de sangre o plasma. En algunos casos, el procedimiento comprende identificar si el paciente es susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un agente quimioterapéutico. En algunos casos, el procedimiento comprende administrar al paciente el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico en combinación con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente quimioterapéutico).

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para tratar el cáncer en un paciente, que comprende: administrar al paciente una cantidad eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico; en el que se predice que el paciente responderá al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch y/o un agente inmunoterapéutico basándose en el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra del paciente. En algunos casos, la muestra es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra es una muestra de sangre o plasma. En algunos casos, se predice que el paciente responderá al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico en combinación con un agente quimioterapéutico. En algunos casos, el procedimiento comprende administrar al paciente el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico en combinación con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente quimioterapéutico).

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para aumentar la probabilidad de un tratamiento eficaz con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, que comprende: (a) identificar si un paciente tiene un tumor que es susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch y/o un agente inmunoterapéutico, en el que la identificación comprende: (i) obtener una muestra del paciente; (ii) medir el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra; e (iii) identificar al paciente que es susceptible de responder al tratamiento basándose en el nivel de expresión de PD-L1; y (b) administrar una cantidad eficaz del inhibidor de la ruta Notch en combinación con el agente inmunoterapéutico al paciente. En algunos casos, la muestra es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra es una muestra de sangre o plasma. En algunos casos, el procedimiento comprende identificar si un paciente tiene un tumor que es susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un agente quimioterapéutico. En algunos casos, el procedimiento comprende administrar al paciente el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico en combinación con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente quimioterapéutico).

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para aumentar la probabilidad de un tratamiento eficaz con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, que comprende: administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y/o un agente inmunoterapéutico a un paciente; en el que el paciente se identifica como susceptible de responder al tratamiento con el inhibidor de la ruta Notch y/o el agente inmunoterapéutico basándose en el nivel de expresión de PD-L1 en una

muestra. En algunos casos, la muestra es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra es una muestra de sangre o plasma. En algunos casos, el paciente se identifica como susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un agente quimioterapéutico. En algunos casos, el procedimiento comprende administrar al paciente el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico en combinación con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente quimioterapéutico).

En ciertos casos de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como en otros aspectos y casos descritos en otra parte en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. En algunos casos, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo que se une específicamente a DLL4 humano. En algunos casos, el anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de DLL4 humano. En algunos casos, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo dentro de los aminoácidos 27-217 del dominio extracelular de DLL4 humano (SEQ ID NO: 17). En algunos casos, el antagonista de DLL4 se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 66-73 (QAVVSPGP, SEQ ID NO: 18) de DLL4 humano. En algunos casos, el antagonista de DLL4 se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 139-146 (LISKIAIQ, SEQ ID NO:19) de DLL4 humano. En algunos casos, el antagonista de DLL4 se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 66-73 (QAVVSPGP, SEQ ID NO:18) y los aminoácidos 139-146 (LISKIAIQ, SEQ ID NO:19) de DLL4 humano. En algunos casos, el antagonista de DLL4 se une a DLL4 humano con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 0,1 nM.

En algunos casos, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISCYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:2), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3), o YISVYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:4), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5); y/o una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8). En algunos casos, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8).

En ciertos casos de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como en otros aspectos y casos descritos en otra parte en esta invención, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11, y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:12. En algunos casos, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 12.

En algunos casos, el antagonista de DLL4 es el anticuerpo codificado por el plásmido que tiene el N.º de depósito de la ATCC PTA-8425 que se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC (*American Type Culture Collection*)), en 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110, bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 10 de mayo de 2007. En algunos casos, el antagonista de DLL4 es el anticuerpo codificado por el ADN plasmídico que tiene el N.º de depósito de la ATCC PTA-8427 que se depositó en la ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 10 de mayo de 2007. En algunos casos, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo que comprende la CDR del anticuerpo producido por el hibridoma que tiene el N.º de depósito de la ATCC PTA-8670 que se depositó en la ATCC bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 28 de septiembre de 2007. En algunos casos, el anticuerpo anti-DLL4 es demcizumab (OMP-h21M18).

En algunos casos, el antagonista DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en el que el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22); en el que el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:25), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5); y en el que tanto el primer como el segundo sitio de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8). En algunos casos, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:30; una segunda región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:29; y una primera y una segunda región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 12. En algunos casos, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera cadena pesada de SEQ ID NO:32; una segunda cadena pesada de SEQ ID NO:31; y una primera y una segunda cadena ligera de SEQ ID NO:33. En algunos casos, el antagonista de DLL4 es OMP-305B83.

En ciertos casos de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como en otros aspectos y casos

descritos en otra parte en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos. En algunos casos, el anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de Notch2 y/o Notch3 humanos.

5 En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de Notch2 y/o Notch3 humanos, y comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:34), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35), y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO:36), y/o una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37), una CDR2 de cadena ligera que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:38), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:39). En algunos casos, el antagonista de Notch2/3
10 es un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:34), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35), y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO:36), y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37), una CDR2 de cadena ligera que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:38), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:39).

15 En ciertos casos de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como otros aspectos y casos descritos en otra parte en esta invención, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:40; y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ
20 ID NO:41. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:40 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:41.

25 En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es el anticuerpo codificado por el ADN plasmídico que tiene el N.º de depósito de la ATCC PTA-10170 que se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC (*American Type Culture Collection*)), en 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110, bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 6 de julio de 2009. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es el anticuerpo anti-Notch2/3 tarextumab (OMP-59R5).

30 En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano. En algunos casos, el anticuerpo se une específicamente a una región proximal de la membrana que no se une al ligando del dominio extracelular de Notch1. En algunos casos, el anticuerpo que se une específicamente a Notch1 comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende RGYWIE (SEQ ID NO:46), una CDR2 de cadena pesada que comprende QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47), y una CDR3 de cadena pesada que comprende FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:48), y/o una CDR1 de cadena ligera que comprende RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID
35 NO:49), una CDR2 de cadena ligera que comprende GTNNRAP (SEQ ID NO:50), y una CDR3 de cadena ligera que comprende ALWYSNHWWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51). En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende RGYWIE (SEQ ID NO:46), una CDR2 de cadena pesada que comprende QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47), y una CDR3 de cadena pesada que comprende FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:48), y una CDR1 de cadena ligera que comprende RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49), una CDR2 de cadena ligera que comprende GTNNRAP (SEQ ID NO:50), y una CDR3 de cadena
40 ligera que comprende ALWYSNHWWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51).

45 En ciertos casos de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como otros aspectos y casos descritos en otra parte en esta invención, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:52; y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ
ID NO:53. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:52 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:53.

50 En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es el anticuerpo codificado por el ADN plasmídico que tiene el N.º de depósito de la ATCC PTA-9549 que se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC (*American Type Culture Collection*)), en 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110, bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 15 de octubre de 2008. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es el anticuerpo anti-Notch1 brontictzumab (OMP-h52M51).

55 En ciertos casos de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como en otros aspectos y casos descritos en otra parte en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a DLL4 humano. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico,
60 un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano. En algunos casos, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo

que comprende un sitio de unión a antígeno. En ciertos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es monovalente, mono-específico, bivalente, bio-específico o multi-específico. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo forma parte de un agente bio-específico. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo forma parte de una molécula bio-específica heterodimérica. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo forma parte de una molécula bio-específica homodimérica. En ciertos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está aislado. En otros casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es sustancialmente puro.

En ciertos casos de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como otros aspectos y casos descritos en otra parte en esta invención, el agente inmunoterapéutico es un agente que modula las respuestas inmunitarias.

En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que mejora las respuestas inmunitarias antitumorales. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que aumenta la inmunidad mediada por las células. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que aumenta la actividad de los linfocitos T. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que aumenta la actividad de los linfocitos T citotóxicos (CTL). En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que aumenta la actividad de las células NK. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que inhibe la supresión de una respuesta inmunitaria. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que inhibe las células supresoras o la actividad de las células supresoras. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que inhibe la actividad de los Treg. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que inhibe la actividad de MDSC. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que inhibe la actividad de los receptores inhibitorios del punto de control inmunitario. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que inhibe la actividad de PD-1. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que inhibe la actividad de PD-L1 y/o PD-L2. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que inhibe la actividad de CTLA-4. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que inhibe la actividad de CD80 y/o CD86. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que inhibe la actividad de TIGIT. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que inhibe la actividad de KIR. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que inhibe la actividad de IDO 1. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que mejora o estimula la actividad de activación de los receptores del punto de control inmunitario. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que mejora o estimula la actividad de GITR. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que mejora o estimula la actividad de OX40. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agente que mejora o estimula la actividad de CD40.

En algunos de los casos de los procedimientos descritos en esta invención, el agente inmunoterapéutico es un antagonista de PD-1, un antagonista de PD-L1, un antagonista de PD-L2, un antagonista de CTLA-4, un antagonista de CD80, un antagonista de CD86, un antagonista de TIGIT, un antagonista de KIR, un antagonista de Tim-3, un antagonista de LAG3, un antagonista de CD96, un antagonista de CD20, o un antagonista de IDO1. En algunos casos, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo que se une específicamente a PD-1. En algunos casos, el anticuerpo que se une a PD-1 es pembrolizumab (KEYTRUDA; MK-3475), pidilizumab (CT-011) o nivolumab (OPDIVO; BMS-936558). En algunos casos, el antagonista de PD-L1 es un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1. En algunos casos, el anticuerpo que se une a PD-L1 es RG7446 (MPDL3280A), durvalumab (MEDI4736), o BMS-936559. En algunos casos, el antagonista de CTLA-4 es un anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4. En algunos casos, el anticuerpo que se une a CTLA-4 es ipilimumab (YERVOY) o tremelimumab (CP-675,206). En algunos casos, el antagonista de KIR es un anticuerpo que se une específicamente a KIR. En algunos casos, el anticuerpo que se une a KIR es lirilumab.

En algunos de los casos de los procedimientos descritos en esta invención, el agente inmunoterapéutico es un agonista de CD28, un agonista de 4-1BB, un agonista de OX40, un agonista de CD27, un agonista de CD80, un agonista de CD86, un agonista de CD40, o un agonista de GITR.

En algunos de los casos de los procedimientos descritos en esta invención, el agente inmunoterapéutico es una citocina. En algunos casos, la citocina es una quimiocina, un interferón, una interleucina, linfocina, o un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral. En algunos casos, la citocina es IL-2, IL-15 o interferón-gamma.

En ciertos casos de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como otros aspectos y casos descritos en otra parte en esta invención, un procedimiento comprende administrar al menos un agente terapéutico adicional.

En algunos casos, el al menos un agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico.

En ciertos casos de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como otros aspectos y casos descritos en otra parte en esta invención, un procedimiento comprende administrar un anticuerpo que se une específicamente a DLL4 humano en combinación con un anticuerpo que se une específicamente a PD-1 humano. En algunos casos, un procedimiento comprende administrar demcizumab en combinación con pembrolizumab. En algunos casos, un procedimiento comprende administrar demcizumab en combinación con pembrolizumab y al menos un agente quimioterapéutico. En algunos casos, un procedimiento comprende administrar demcizumab en combinación con pembrolizumab, carboplatino y pemetrexed. En algunos casos, un procedimiento comprende administrar un anticuerpo

biespecífico que se une específicamente a DLL4 humano y VEGF humano en combinación con un anticuerpo que se une específicamente a PD-1 humano. En algunos casos, un procedimiento comprende administrar OMP-305B83 en combinación con pembrolizumab. En algunos casos, un procedimiento comprende administrar OMP-305B83 en combinación con pembrolizumab y al menos un agente quimioterapéutico. En algunos casos, un procedimiento comprende administrar OMP-305B83 en combinación con pembrolizumab, carboplatino y pemetrexed.

En ciertos casos de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como en otros aspectos y casos descritos en otra parte en esta invención, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, glioma, glioblastoma, glioblastoma multiforme, cáncer cervical, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, y hepatoma. En algunos casos, el cáncer es cáncer de pulmón. En algunos casos, un cáncer o célula cancerosa expresa PD-L1. En algunos casos, un cáncer o célula cancerosa sobreexpresa PD-L1. En algunos casos, un cáncer o célula cancerosa expresa PD-L2. En algunos casos, un cáncer o célula cancerosa sobreexpresa PD-L2. En algunos casos, un cáncer o una célula cancerosa tiene un mayor nivel de expresión de PD-L1 en comparación con un nivel predeterminado de expresión de PD-L1.

En ciertos casos de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como en otros aspectos y casos descritos en otra parte en esta invención, el tumor es un tumor seleccionado del grupo que consiste en tumor de pulmón, tumor de páncreas, tumor de mama, tumor de colon, tumor colorrectal, melanoma, tumor gastrointestinal, tumor gástrico, tumor renal, tumor de ovario, tumor de hígado, tumor de endometrio, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor de tiroides, neuroblastoma, glioma, glioblastoma, glioblastoma multiforme, tumor cervical, tumor de estómago, tumor de vejiga, tumor de cabeza y cuello, y hepatoma. En algunos casos, el tumor es un tumor de pulmón. En algunos casos, un tumor expresa PD-L1. En algunos casos, un tumor sobreexpresa PD-L1. En algunos casos, un tumor expresa PD-L2. En algunos casos, un tumor sobreexpresa PD-L2. En algunos casos, un tumor tiene un mayor nivel de expresión de PD-L1 en comparación con un nivel predeterminado de expresión de PD-L1.

En ciertos casos de cada uno de los aspectos mencionados anteriormente, así como otros aspectos y casos descritos en otra parte en esta invención, los procedimientos comprenden además administrar al menos un agente terapéutico adicional. En algunos casos, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico. En algunos casos, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo.

En algunos de los aspectos y casos mencionados anteriormente, un procedimiento comprende obtener una muestra del sujeto o paciente. En algunos casos, la muestra es una muestra de biopsia. En algunos casos, la muestra es de un tumor. En algunos casos, la muestra comprende células tumorales, células inmunes infiltrantes de tumor, células estromales, y cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, la muestra es una muestra incluida en parafina fijada en formalina (FFPE). En algunos casos, la muestra es tejido de archivo, fresco o congelado. En algunos casos, la muestra es sangre o plasma. En algunos casos, el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra se compara con un nivel de expresión predeterminado de PD-L1. En algunos casos, el nivel de expresión predeterminado de PD-L1 es un nivel de expresión de PD-L1 en una muestra de referencia, una muestra de tumor de referencia, una muestra de tejido normal de referencia, una serie de muestras de tumor de referencia, o una serie de muestras de tejido normal de referencia. En algunos casos, el nivel de expresión de PD-L1 se determina usando un ensayo de inmunohistoquímica (IHC). En algunos casos, el nivel de expresión de PD-L1 se determina usando un ensayo que comprende una evaluación de puntuación H. En algunos casos, el nivel de expresión de PD-L1 se determina usando un ELISA. En algunos casos, el nivel de expresión de PD-L1 se determina usando un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1. En algunos casos, PD-L1 se detecta en células tumorales. En algunos casos, PD-L1 se detecta en células inmunes infiltrantes de tumor. En algunos casos, el nivel de expresión de PD-L1 se determina usando un ensayo basado en PCR. En algunos casos, PD-L1 se detecta en un lisado celular.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) descrito en esta invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable usado en combinación con composiciones farmacéuticas que comprenden un agente inmunoterapéutico descrito en esta invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Cuando los aspectos o casos de la descripción se describen en términos de un grupo Markush u otras alternativas de agrupación, la presente descripción abarca no solo todo el grupo enumerado como un conjunto, sino también cada miembro del grupo individualmente y todos los subgrupos posibles del grupo principal, y también el grupo principal ausente o uno o más de los miembros del grupo. La presente descripción también prevé la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la descripción.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A y 1B. Efecto del anticuerpo anti-DLL4 en la expresión de PD-1 en células de tumores CT26.WT. Figura 1A. Nivel de PD-1 en lisados de células tumorales de ratones tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30, proteína SIRP α -Fc, o control. Figura 1B. Un análisis de transferencia Western representativo de cuatro tumores individuales de cada grupo de tratamiento.

Figuras 2A, 2B y 2C. Inhibición del crecimiento tumoral. Figura 2A y figura 2B. Se inyectaron células de tumor CT26.WT por vía subcutánea en ratones Balb/C. Los ratones se trataron con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (- ■ -), mIL-2-Fc (- ▲ -), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y mIL-2-Fc (-X-), o un control (- ◆ -). Los datos se muestran como volumen tumoral (mm³) durante los días posteriores al tratamiento. Figura 2C. Se inyectaron células de tumor KP_LUN01 por vía subcutánea en ratones Balb/C. Los ratones se trataron con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (- ■ -), mIL-2-Fc (- ▲ -), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y mIL-2-Fc (-X-), o un control (- ◆ -). Los datos se muestran como volumen tumoral (mm³) durante los días posteriores al tratamiento.

Figuras 3A, 3B y 3C. Ensayos de citotoxicidad de las células NK. Figura 3A y figura 3B. Las células se extrajeron de los bazo de ratones portadores de tumor CT26.WT tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30, mIL-2-Fc, una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y mIL-2-Fc, o un control. Las células diana (células YAC-1 o células CT26.WT) se marcaron con calceína AM 10 μM y se mezclaron con los esplenocitos a una relación efector:diana de 25:1. Los sobrenadantes se extrajeron y la liberación de calceína se cuantificó en un fluorómetro a una excitación de 485 nm y una emisión de 535 nm. Figura 3C. Las células se extrajeron de los bazo de ratones portadores de tumor KP_LUN01 tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30, mIL-2-Fc, una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y mIL-2-Fc, o un control. Las células diana (células YAC-1) se marcaron con calceína AM 10 μM y se mezclaron con los esplenocitos a una relación efector:diana de 25:1. Los sobrenadantes se extrajeron y la liberación de calceína se cuantificó en un fluorómetro a una excitación de 485 nm y una emisión de 535 nm.

Figuras 4A y 4B. Ensayos de citotoxicidad de los linfocitos T. Figura 4A. Las células se extrajeron de los bazo de ratones portadores de tumor CT26.WT tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30, mIL-2-Fc, una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y mIL-2-Fc, o un control. Los esplenocitos se estimularon con el péptido AH-1. Las células diana (células CT26.WT) se marcaron con calceína AM 10 μM y se mezclaron con los esplenocitos estimulados. Los sobrenadantes se extrajeron y la liberación de calceína se cuantificó en un fluorómetro a una excitación de 485 nm y una emisión de 535 nm. Figura 4B. Las células se extrajeron de los bazo de ratones portadores de tumor KP_LUN01 tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30, mIL-2-Fc, una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y mIL-2-Fc, o un control. Los esplenocitos se estimularon con células KP_LUN01 tratadas con mitomicina. Las células diana (células KP_LUN01) se marcaron con calceína AM 10 μM y se mezclaron con los esplenocitos estimulados. Los sobrenadantes se extrajeron y la liberación de calceína se cuantificó en un fluorómetro a una excitación de 485 nm y una emisión de 535 nm.

Figura 5. Ensayo ELISpot para IFN-gamma. Las células se extrajeron de los bazo de ratones portadores de tumor CT26.WT tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30, mIL-2-Fc, una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y mIL-2-Fc, o un control. Se muestra el número de células que producen IFN-gamma.

Figura 6. Células CD45⁺PD-1⁺ en tumores CT26.WT. Se extrajeron tumores de ratones tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30, mIL-2-Fc, una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y mIL-2-Fc, o un control y se prepararon suspensiones de células individuales. Las células se analizaron para determinar la expresión de CD45 y la expresión de PD-1 mediante análisis FACS.

Figuras 7A, 7B y 7C. Inhibición del crecimiento de tumor CT26.WT. Figura 7A. Se inyectaron células de tumor CT26.WT por vía subcutánea en ratones Balb/C. Los ratones se trataron con el anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (- ▲ -), un anticuerpo anti-PD-L1 (-X-), un anticuerpo anti-CTLA-4 (- ■ -), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y un anticuerpo anti-CTLA-4 (-X-), una combinación de anticuerpo 21R30 anti-mDLL4 y un anticuerpo anti-PD-L1 (- ● -), o un control (- ◆ -). Los datos se muestran como volumen tumoral (mm³) durante los días posteriores al tratamiento. Figuras 7B y 7C. Resultados de ratones individuales de cada grupo de tratamiento.

Figuras 8A y 8B. Inhibición del crecimiento de tumor CT26.WT. Figura 8A. Se inyectaron células de tumor CT26.WT por vía subcutánea en ratones Balb/C. Los ratones se trataron con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (- ■ -), un anticuerpo anti-PD-1 (- ▲ -), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y un anticuerpo anti-PD-1 (- ● -), o un control (- ◆ -). Los datos se muestran como volumen tumoral (mm³) durante los días posteriores a la inyección celular. Figura 8B.

Resultados de ratones individuales de cada grupo de tratamiento.

Figura 9. Crecimiento de tumor CT26.WT en ratones tratados después de la reexposición al tumor. Los ratones previamente tratados con anticuerpo anti-PD-1 (- ▲ -) o una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y un anticuerpo anti-PD-1 (- ● -) cuyos tumores habían regresado a niveles indetectables se expusieron de nuevo a células de tumor CT26.WT. Los datos se muestran como volumen tumoral (mm³) durante los días posteriores a la reexposición.

Figuras 10A, 10B, 10C y 10D. Ensayos ELISpot y ELISA. Las células se extrajeron de los bazo de ratones portadores de tumor CT26.WT tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30, un anticuerpo anti-PD-1, una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y un anticuerpo anti-PD-1, o un control anticuerpo. Figura 10A. Se muestra el número de células que producen IFN-gamma. Figura 10B. Se muestra el número de células que producen IL-2. Figura 10C. Se muestra el número de células que producen IL-17. Figura 10D. Se muestra la cantidad de IL-6 producida.

Figura 11. Análisis FACS de células supresoras derivadas de mieloides y células mieloides activadas.

Figura 12. Análisis FACS de linfocitos T de memoria.

Figura 13. Ensayo de linfocitos T reguladores (Treg).

Figura 14. Ensayo de citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺.

5 Figuras 15A y 15B. Inhibición del crecimiento de tumor CT26.WT e inhibición del crecimiento de tumor Renca. Figura 15A. Se inyectaron células de tumor CT26.WT por vía subcutánea en ratones Balb/C. Los ratones se trataron con un anticuerpo anti-PD-1 (- ▲ -), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y un anticuerpo anti-mVEGF (- ■ -), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30, un anticuerpo anti-mVEGF, y un anticuerpo anti-PD-1 (-X-), o un control (- ◆ -). Los datos se muestran como volumen tumoral (mm³) durante los días posteriores a la inyección celular.

10 Figura 15B. Se inyectaron Renca por vía subcutánea células tumorales en ratones Balb/C. Los ratones se trataron con un anticuerpo anti-PD-1 (- ■ -), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R50 y anticuerpo anti-mVEGF B20 (-X-), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R50, anticuerpo anti-mVEGF B20 y un anticuerpo anti-PD-1 (- ● -), o un control (- ◆ -). Los datos se muestran como volumen tumoral (mm³) durante los días posteriores a la inyección celular.

15 Figura 16. Análisis FACS de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria central.

Figuras 17A y 17B. Expresión de citocinas en el sitio de tumor.

Figura 18. Inhibición del crecimiento de tumor CT26.WT. Se inyectaron células de tumor CT26.WT por vía subcutánea en ratones Balb/C. Los ratones se trataron con el anticuerpo anti-Notch2/3 59R5 (- ▲ -), un anticuerpo anti-PD-1 (- ■ -), una combinación de anticuerpo anti-Notch2/3 59R5 y un anticuerpo anti-PD-1 (- ○ -), o un control (- ● -). Los datos se muestran como volumen tumoral (mm³) durante los días posteriores a la inyección celular.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se describen procedimientos para modular las respuestas inmunitarias, particularmente respuestas inmunitarias antitumorales, procedimientos para inhibir el crecimiento tumoral, y procedimientos para tratar el cáncer. Los procedimientos proporcionados en esta invención comprenden administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en los que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a DLL4 humano. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico incluye, pero no se limita a, un modulador de la actividad de PD-1, un modulador de la actividad de PD-L1, un modulador de la actividad de PD-L2, un modulador de la actividad de CTLA-4, un modulador de la actividad de CD28, un modulador de la actividad de CD80, un modulador de la actividad de CD86, un modulador de la actividad de 4-1BB, un modulador de la actividad de OX40, un modulador de la actividad de KIR, un modulador de la actividad de Tim-3, un modulador de la actividad de LAG3, un modulador de la actividad de CD27, un modulador de la actividad de CD40, un modulador de la actividad de GITR, un modulador de la actividad de TIGIT, un modulador de la actividad de CD20, un modulador de la actividad de CD96, un modulador de la actividad de IDO 1, una citocina, un quimiocina, un interferón, una interleucina, una linfoquina, un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), y un oligonucleótido inmunostimulador. La descripción también proporciona procedimientos para identificar un tumor susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un agente inmunoterapéutico, comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del tumor. La descripción proporciona procedimientos para seleccionar un sujeto o paciente para el tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un agente inmunoterapéutico, comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto.

25

30

35

40

45 I. Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente descripción, a continuación, se definen varios términos y frases.

Los términos "antagonista" y "antagonista", como se usan en esta invención, se refieren a cualquier molécula que bloquee, inhiba, reduzca o neutralice parcial o totalmente una actividad biológica de una diana y/o ruta de señalización.

El término "antagonista" se usa en esta invención para incluir cualquier molécula que bloquee, inhiba, reduzca o neutralice parcial o totalmente la actividad de una proteína. Las moléculas antagonistas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos antagonistas, fragmentos de anticuerpo, receptores solubles y moléculas pequeñas.

50

El término "agonista", como se emplea en esta memoria, se refiere o describe un agente que es capaz, directa o indirectamente, de inducir, activar, promover, aumentar o mejorar sustancialmente la actividad biológica de una diana y/o una ruta de señalización. El término "agonista" se usa en esta invención para incluir cualquier agente que induzca,

active, promueva, aumente o aumente parcial o totalmente la actividad de una proteína. Los agonistas adecuados incluyen específicamente, pero no se limitan a, anticuerpos agonistas o fragmentos de los mismos, receptores solubles, otras proteínas de fusión, y moléculas pequeñas.

5 El término "biomarcador" como se usa en esta invención puede incluir, pero no se limita a, ácidos nucleicos y proteínas, y variantes y fragmentos de los mismos. Un biomarcador puede incluir ADN que comprende la secuencia de ácido nucleico completa o parcial que codifica el biomarcador, o el complemento de tal secuencia. Se considera que los ácidos nucleicos de biomarcadores útiles en la descripción incluyen tanto ADN como ARN que comprenden la secuencia completa o parcial de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de interés. Se considera que las proteínas biomarcadoras comprenden la secuencia de aminoácidos completa o parcial de cualquiera de las proteínas o polipéptidos biomarcadores.

10 El término "anticuerpo", como se emplea en esta memoria, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido, o combinaciones de los anteriores, a través de al menos un sitio de unión a antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en esta invención, el término incluye anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión a antígeno (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), anticuerpos Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos, anticuerpos mono-específicos, anticuerpos monovalentes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de unión a antígeno siempre que los anticuerpos exhiban la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas:

15 IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basándose en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y bien caracterizadas. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas, incluyendo, pero no limitándose a, toxinas y radioisótopos.

20 El término "fragmento de anticuerpo", como se emplea en esta memoria, se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y generalmente incluye la región variable determinante antigénica o el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos monocatenarios, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. El "fragmento de anticuerpo", como se emplea en esta memoria, comprende al menos un sitio de unión a antígeno o sitio de unión a epítipo.

25 El término "región variable" de un anticuerpo como se usa en esta invención se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo, o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, en solitario o en combinación. La región variable de la cadena pesada o ligera generalmente consiste en cuatro regiones marco conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), también conocidas como "regiones hipervariables". Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones marco y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno del anticuerpo. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Rabat y col., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Edición, National Institutes of Health, Bethesda MD), y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-Lazikani y col., 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948). Las combinaciones de estos dos enfoques a veces se usan en la técnica para determinar las CDR.

30 El término "anticuerpo monoclonal", como se emplea en esta memoria, se refiere a una población de anticuerpos homogénea implicada en el reconocimiento altamente específico y la unión de un único determinante antigénico o epítipo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que típicamente incluyen una mezcla de diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término "anticuerpo monoclonal" abarca anticuerpos tanto intactos como de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos monocatenarios (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda al menos un sitio de unión a antígeno. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a dichos anticuerpos producidos por cualquier número de técnicas, incluyendo, pero no limitándose a, producción de hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, y animales transgénicos.

35 El término "anticuerpo humanizado", como se emplea en esta memoria, se refiere a anticuerpos que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas, o fragmentos de los mismos que contienen secuencias mínimas no humanas. Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de aminoácidos de las CDR se reemplazan por residuos de aminoácidos de las CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo o hámster) que tienen la especificidad, afinidad, y/o capacidad de unión deseadas.

40 El término "anticuerpo humano", como se emplea en esta memoria, se refiere a un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un

ser humano elaborado usando cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica.

El término "anticuerpo quimérico", como se emplea en esta memoria, se refiere a un anticuerpo en el que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Típicamente, la región variable de las cadenas tanto ligeras como pesadas corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y/o capacidad de unión deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en los anticuerpos derivados de otras especies (usualmente ser humano).

El término "anticuerpo madurado por afinidad", como se emplea en esta memoria, se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más CDR que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee estas alteraciones. En algunos casos, se realizan modificaciones en las regiones marco. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica que incluyen la combinación de regiones variables de cadena pesada y cadena ligera, mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos marco, o mutagénesis de sitio dirigido de CDR y/o residuos marco.

Los términos "epítipo" y "determinante antigénico" se usan indistintamente en esta invención y se refieren a esa porción de un antígeno capaz de ser reconocida y de unirse específicamente por un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítipos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos y aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos (también denominados epítipos lineales) se conservan típicamente en la desnaturalización de proteínas, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario (también denominados epítipos conformacionales) se pierden típicamente en la desnaturalización de proteínas. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más usualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

Los términos "se une selectivamente" o "se une específicamente", como se usan en esta invención, significan que un agente de unión o un anticuerpo reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad, o con alguna combinación de los anteriores al epítipo, la proteína o la molécula diana que con sustancias alternativas, incluidas las proteínas no relacionadas o relacionadas. En ciertos casos, "se une específicamente" significa, por ejemplo, que un anticuerpo se une a una diana con una K_D de aproximadamente 0,1 mM o menos, pero más usualmente menos de aproximadamente 1 μ M. En ciertos casos, "se une específicamente" significa que un anticuerpo se une a una diana con una K_D de al menos aproximadamente 0,1 μ M o menos, al menos aproximadamente 0,01 μ M o menos, o al menos aproximadamente 1 nM o menos. Debido a la identidad de secuencia entre proteínas homólogas en diferentes especies, la unión específica puede incluir un anticuerpo que reconoce una proteína en más de una especie. Asimismo, debido a la homología dentro de ciertas regiones de secuencias de polipéptidos de diferentes proteínas, la unión específica puede incluir un anticuerpo (u otro polipéptido o agente de unión) que reconozca más de una proteína. Se entiende que, en ciertos casos, un anticuerpo o agente de unión que se une específicamente a una primera diana puede o no unirse específicamente a una segunda diana. Como tal, la "unión específica" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva, es decir, la unión a una única diana. Por lo tanto, un anticuerpo puede unirse, en ciertos casos, específicamente a más de una diana. En ciertos casos, múltiples dianas pueden estar unidas por el mismo sitio de unión a antígeno en el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede comprender, en ciertos casos, dos sitios de unión a antígeno idénticos, cada uno de los cuales se une específicamente al mismo epítipo en dos o más proteínas. En ciertos casos alternativos, un anticuerpo puede ser biespecífico y comprender al menos dos sitios de unión a antígeno con especificidades diferentes. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa unión específica.

El término "receptor soluble", como se emplea en esta memoria, se refiere a un fragmento extracelular (o una porción del mismo) de una proteína receptora que precede al primer dominio transmembrana del receptor que puede secretarse de una célula en forma soluble.

Los términos "polipéptido" y "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en esta invención y se refieren a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede ser interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de etiquetado. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, debido a que los polipéptidos de esta descripción pueden basarse en anticuerpos, en ciertos casos, los polipéptidos pueden aparecer como cadenas individuales o cadenas asociadas.

El término "aminoácido", como se emplea en esta memoria, se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina. La frase "análogo de aminoácidos" se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un

aminoácido de origen natural, por ejemplo, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos de péptidos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. La frase "mimético de aminoácidos" se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a un aminoácido de origen natural.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" y "secuencia de nucleótidos" se usan indistintamente en esta invención y se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse a un polímero mediante ADN o ARN polimerasa.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, al compararse y alinearse (introduciendo huecos, si es necesario) para una correspondencia máxima, sin considerar ninguna sustitución conservadora de aminoácidos como parte de la identidad de secuencia. El porcentaje de identidad puede medirse utilizando software o algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Pueden usarse diversos algoritmos y software para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o nucleótidos que se conocen bien en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, BLAST y variaciones de BLAST, ALIGN y variaciones de ALIGN, Megalign, BestFit, GCG Wisconsin Package, etc. En algunos casos, dos ácidos nucleicos o polipéptidos de la descripción son sustancialmente idénticos, lo que significa que tienen al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % y, en algunos casos, al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de residuos de nucleótidos o aminoácidos, cuando se comparan y se alinean para obtener la correspondencia máxima, según lo medido con un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. En algunos casos, existe identidad sobre una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40-60, al menos aproximadamente 60-80 residuos de nucleótidos o aminoácidos de longitud o cualquier valor integral entre los mismos. En algunos casos, existe identidad en una región más larga de 60-80 residuos de nucleótidos o aminoácidos, tal como al menos aproximadamente 80-100 residuos de nucleótidos o aminoácidos, y en algunos casos las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las secuencias que se comparan, tal como la región codificante de una secuencia de nucleótidos.

El término "sustitución conservadora de aminoácidos", como se emplea en esta memoria, se refiere a una sustitución en la que un residuo de aminoácido se reemplaza por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluyendo, cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. Preferiblemente, las sustituciones conservadoras en las secuencias de los polipéptidos y anticuerpos de la descripción no anulan la unión del polipéptido o anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos al antígeno o antígenos. Los procedimientos para identificar sustituciones conservadoras de aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno se conocen bien en la técnica.

El término "vector", como se emplea en esta memoria, significa una construcción, que es capaz de administrar, y usualmente expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, vectores de plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, y vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas.

Como se usa en esta invención, un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está "aislado" es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está en una forma que no se encuentra en la naturaleza. Los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o composiciones aislados incluyen aquellos que se han purificado hasta el punto de que ya no están en una forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunos casos, un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que se aísla es sustancialmente puro.

El término "sustancialmente puro", como se emplea en esta memoria, se refiere a material que es al menos un 50 % puro (es decir, libre de contaminantes), al menos un 90 % puro, al menos un 95 % puro, al menos un 98 % puro, o al menos un 99 % puro.

Los términos "cáncer" y "canceroso", como se usan en esta invención, se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos en los que una población de células está caracterizada por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma, sarcoma y cánceres hematológicos tales como linfoma y leucemia.

Los términos "trastorno proliferativo" y "enfermedad proliferativa", como se usan en esta invención, se refieren a trastornos asociados con la proliferación celular anormal tal como el cáncer.

5 Los términos "tumor" y "neoplasia", como se usan en esta invención, se refieren a cualquier masa de tejido que es resultado del crecimiento o proliferación celular excesiva, ya sea benigna (no cancerosa) o maligna (cancerosa), incluidas las lesiones precancerosas.

El término "metástasis", como se emplea en esta memoria, se refiere al proceso por el cual un cáncer se propaga o se transfiere desde el sitio de origen a otras regiones del cuerpo con el desarrollo de una lesión cancerosa similar en la nueva ubicación. Una célula "metastásica" o "metastatizante" es generalmente una que pierde contactos adhesivos con las células vecinas y migra desde el sitio primario de la enfermedad para invadir los sitios de tejido vecinos.

10 Los términos "célula madre cancerosa" y "CSC" y "célula madre tumoral" y "célula iniciadora de tumor" se usan indistintamente en esta invención y se refieren a células de un cáncer o tumor que: (1) tienen una capacidad proliferativa extensa; 2) son capaces de realizar una división celular asimétrica para generar uno o más tipos de progenie celular diferenciada en la que las células diferenciadas tienen un potencial proliferativo o de desarrollo reducido; y (3) son capaces de realizar divisiones celulares simétricas para autorrenovación o automantenimiento.
 15 Estas propiedades confieren a las células madre cancerosas la capacidad de formar o establecer un tumor o cáncer tras un trasplante en serie en un huésped inmunocomprometido (por ejemplo, un ratón) en comparación con la mayoría de las células tumorales que no forman tumores. Las células madre cancerosas experimentan autorrenovación frente a la diferenciación de manera caótica para formar tumores con tipos de células anormales que pueden cambiar con el tiempo a medida que ocurren las mutaciones.

20 Los términos "célula cancerosa" y "célula tumoral", como se usan en esta invención, se refieren a la población total de células derivadas de un cáncer o tumor o lesión precancerosa, incluidas tanto las células no tumorigénicas, que comprenden la mayor parte de la población de células cancerosas, como las células tumorigénicas (células madre cancerosas). Como se usa en esta invención, los términos "célula cancerosa" o "célula tumoral" serán modificados por
 25 el término "no tumorigénica" cuando se refieran únicamente a aquellas células que carecen de la capacidad de renovarse y diferenciarse para distinguir estas células tumorales de las células madre cancerosas.

El término "sujeto", como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), que incluye, pero no se limita a, seres humanos, primates no humanos, caninos, felinos, roedores y similares, que serán el receptor de un tratamiento particular. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en esta invención en referencia a un sujeto humano.

30 El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un agente, compuesto, molécula, etc. aprobado o que puede aprobarse por una agencia reguladora del gobierno federal, un gobierno estatal, y/o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, incluidos los seres humanos.

35 Las frases "excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable" y "vehículo farmacéutico aceptable" se refieren a un excipiente, vehículo o adyuvante que puede administrarse a un sujeto, junto con un agente terapéutico, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para entregar un efecto terapéutico. En general, los expertos en la técnica y la FDA consideran que un excipiente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable es un principio inactivo de cualquier formulación o composición farmacéutica.

40 Los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" y "efecto terapéutico", como se usan en esta invención, se refieren a una cantidad de un agente de unión, un anticuerpo, un polipéptido, un polinucleótido, una molécula pequeña u otro agente terapéutico eficaz para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz de un agente (por ejemplo, un anticuerpo) tiene un efecto terapéutico y, como tal, puede aumentar la respuesta inmunitaria, aumentar la respuesta antitumoral, aumentar la actividad citolítica de las células inmunes, reducir el número de células cancerosas; disminuir la tumorigenicidad, la
 45 frecuencia tumorigénica o la capacidad tumorigénica; reducir la cantidad o frecuencia de células madre cancerosas; reducir el tamaño del tumor; reducir la población de células cancerosas; inhibir y/o detener la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos, incluyendo, por ejemplo, la propagación del cáncer en tejidos blandos y huesos; inhibir y detener la metástasis tumoral o de células cancerosas; inhibir y/o detener el crecimiento de células tumorales o cancerosas; aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer; reducir la morbilidad y la mortalidad; mejorar la calidad de vida; o una combinación de dichos efectos. En la medida en que el agente previene el crecimiento y/o destruye las células cancerosas existentes, puede denominarse citostático y/o citotóxico.

55 Los términos "tratar" y "tratamiento" y "para tratar" y "aliviar" y "para aliviar" se refieren tanto a 1) medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas de, y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado, como a 2) medidas profilácticas o preventivas que previenen o retrasan el desarrollo de una afección o trastorno patológico específico. Por lo tanto, aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen un trastorno; aquellos propensos a tener un trastorno; y aquellos en quienes se debe prevenir un trastorno. En algunos casos, un sujeto es "tratado" con éxito según los procedimientos descritos si el paciente muestra uno o más de los siguientes: un aumento de la respuesta inmunitaria, un aumento de la respuesta antitumoral, un aumento de la

actividad citolítica de las células inmunes, un aumento de la muerte de las células tumorales por células inmunes, una reducción en el número o ausencia total de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; inhibición o ausencia de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, incluyendo la propagación de células cancerosas a tejidos blandos y huesos; inhibición o ausencia de metástasis tumorales o de células cancerosas; inhibición o ausencia de crecimiento de cáncer; inhibición o ausencia de crecimiento tumoral; alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer específico; reducción de la morbilidad y mortalidad; mejora en la calidad de vida; reducción en tumorigenicidad; reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas; o alguna combinación de efectos.

Como se usa en la presente descripción y las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen formas plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Se entiende que siempre que se describan casos en esta invención con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan casos análogos de otro modo descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en". También se entiende que siempre que los casos se describan en esta invención con el lenguaje "que consiste esencialmente en" también se proporcionan casos análogos de otro modo descritos en términos de "que consiste en".

El término "y/o", como se usa en una frase tal como "A y/o B" en esta invención pretende incluir tanto A como B; A o B; A (en solitario); y B (en solitario). Asimismo, el término "y/o", como se usa en una frase tal como "A, B y/o C" pretende abarcar cada uno de los siguientes casos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (en solitario); B (en solitario); y C (en solitario).

II. Procedimientos de uso y composiciones farmacéuticas

Un inhibidor de la ruta Notch descrito en esta invención en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico es útil en una diversidad de aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a, procedimientos de tratamiento terapéutico, tales como inmunoterapia para el cáncer. En ciertos casos, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, es útil para activar, promover, aumentar y/o mejorar una respuesta inmunitaria, inhibir el crecimiento tumoral, reducir el volumen tumoral, aumentar la apoptosis de las células tumorales, y/o reducir la tumorigenicidad de un tumor. Los procedimientos de uso pueden ser *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En algunos casos, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico actúa como un agonista de una respuesta inmunitaria. En algunos casos, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico actúa como un potenciador, activador o estimulador de una respuesta inmunitaria. En algunos casos, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico actúa como un agonista de una respuesta inmunitaria antitumoral.

En algunos casos, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un antagonista de la ruta PD-1/PD-L1. En algunos casos, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un antagonista de PD-1 o la actividad de PD-1. En algunos casos, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un antagonista de PD-L1 o la actividad de PD-L1. En algunas realizaciones, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un antagonista de la ruta CTLA-4. En algunas realizaciones, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un antagonista de CTLA-4 o la actividad de CTLA-4. En algunas realizaciones, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un antagonista de Tim-3 o la actividad de Tim-3. En algunas realizaciones, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un antagonista de LAG3 o la actividad de LAG3. En algunas realizaciones, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un antagonista de TIGIT o la actividad de TIGIT. En algunas realizaciones, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un antagonista de KIR o la actividad de KIR.

En algunas realizaciones, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un agonista de la ruta CTLA-4/CD28.

En algunas realizaciones, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un agonista de CD28 o la actividad de CD28. En algunas realizaciones, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un agonista de 4-1BB o la actividad de 4-1BB. En algunas realizaciones, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un agonista

de OX40 o la actividad de OX40. En algunas realizaciones, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un agonista de GITR o la actividad de GITR. En algunas realizaciones, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) con un agente inmunoterapéutico funciona como un agonista de CD40 o la actividad de CD40.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento para inhibir el crecimiento tumoral comprende poner en contacto células tumorales con una cantidad eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad eficaz de un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico.

El procedimiento puede ser *in vivo* o *in vitro*. En ciertos casos, el tumor está en un sujeto, y poner en contacto las células tumorales con el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cada uno de los agentes al sujeto. En algunos casos, un procedimiento para inhibir el crecimiento tumoral comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4 y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para inhibir el crecimiento tumoral comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al inhibir o suprimir la actividad de Treg. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al inhibir o suprimir la actividad de MDSC. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al aumentar la actividad de las células citolíticas. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al aumentar la actividad de los linfocitos T citolíticos CD8+. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al aumentar la actividad de las células NK. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al disminuir la expresión de PD-1 en los linfocitos T. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al disminuir el número o porcentaje de linfocitos T que expresan PD-1. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al disminuir el número o porcentaje de MDSC. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al aumentar el número o porcentaje de células mieloides activadas. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al aumentar el número o porcentaje de linfocitos T de memoria. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al aumentar o mejorar las respuestas inmunitarias de tipo Th1. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al aumentar la producción de IFN-gamma. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al aumentar la producción de IL-2. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al disminuir o inhibir las respuestas inmunitarias T_H17.

En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al disminuir la producción de IL-17. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al disminuir o inhibir las respuestas inmunitarias de tipo Th2. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico inhiben el crecimiento tumoral al disminuir la producción de IL-6. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. En algunos casos, un antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch2/3. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch1.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento para tratar el cáncer comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para tratar el cáncer comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4 y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para tratar el cáncer comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al inhibir o suprimir la actividad de Treg. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al inhibir o suprimir la actividad de MDSC. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al aumentar la actividad de las células citolíticas. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al aumentar la actividad de las células NK. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al aumentar la actividad de las células citolíticas. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al aumentar la actividad de los linfocitos T citolíticos CD8+. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente

inmunoterapéutico tratan el cáncer al disminuir la expresión de PD-1 en los linfocitos T. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al disminuir el número o porcentaje de linfocitos T que expresan PD-1. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al disminuir el número o porcentaje de MDSC. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al aumentar el número o porcentaje de células mieloides activadas. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al aumentar el número o porcentaje de linfocitos T de memoria. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al aumentar las respuestas inmunitarias de tipo Th1. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al aumentar la producción de IFN-gamma. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al aumentar la producción de IL-2. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al disminuir la producción de IL-17.

En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico tratan el cáncer al disminuir la producción de IL-6. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. En algunos casos, un antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch2/3. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch1.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento de inmunoterapia contra el cáncer comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, y en el que la combinación da como resultado una eficacia terapéutica mejorada en comparación con la administración de cualquier agente en solitario. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. En algunos casos, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch2/3. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch1.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento para inhibir la actividad de los Treg comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para inhibir la actividad de los Treg comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4 y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para inhibir la actividad de los Treg comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch2/3. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch1.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento para inhibir la supresión de las respuestas inmunitarias mediante los Treg comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para inhibir la supresión de las respuestas inmunitarias mediante los Treg comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4 y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para inhibir la supresión de las respuestas inmunitarias mediante los Treg comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch2/3. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch1.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento para inhibir la actividad de las MDSC comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para inhibir la actividad de las MDSC comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4 y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para inhibir la actividad de las MDSC comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch y el segundo agente es un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch2/3. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch1.

casos, un antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch2/3. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch1.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento para aumentar la eficacia de un modulador del punto de control inmunitario comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador del punto de control inmunitario. En algunos casos, un procedimiento para aumentar la eficacia de un inhibidor del punto de control inmunitario comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador del punto de control inmunitario, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. En algunos casos, un procedimiento para aumentar la eficacia de un inhibidor del punto de control inmunitario comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador del punto de control inmunitario, en el que el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch. En algunos casos, el modulador del punto de control inmunitario es un inhibidor del punto de control inmunitario. En algunos casos, el modulador del punto de control inmunitario es un potenciador o estimulador del punto de control inmunitario. En algunos casos, un antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch2/3. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch1.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento para mejorar el tratamiento para un sujeto que está siendo tratado con un modulador del punto de control inmunitario comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch. En algunos casos, un procedimiento para mejorar el tratamiento para un sujeto que está siendo tratado con un modulador del punto de control inmunitario comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de DLL4. En ciertos casos, un procedimiento para mejorar el tratamiento para un sujeto que está siendo tratado con un modulador del punto de control inmunitario comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del receptor Notch. En algunos casos, el modulador del punto de control inmunitario es un inhibidor del punto de control inmunitario. En algunos casos, el inhibidor del punto de control inmunitario es un antagonista de PD-1. En algunos casos, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo que se une específicamente a PD-1. En algunos casos, el inhibidor del punto de control inmunitario es un antagonista de PD-L1. En algunos casos, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1. En algunos casos, el inhibidor del punto de control inmunitario es un antagonista de CTLA-4. En algunos casos, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4. En algunos casos, un antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch2/3. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch1.

En algunos casos, el procedimiento para inhibir el crecimiento tumoral comprende poner en contacto el tumor o las células tumorales con un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) y un agente inmunoterapéutico *in vivo*. En ciertos casos, se pone en contacto un tumor o una célula tumoral con un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico en un modelo animal. Por ejemplo, un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico se pueden administrar a ratones que tienen tumores. En algunos casos, un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico aumentan, promueven y/o potencian la actividad de las células inmunes en los ratones. En algunos casos, se administra un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico a un animal para inhibir el crecimiento de tumores. En algunos casos, se administran un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico al mismo tiempo o poco después de la introducción de células tumorales en el animal (modelo preventivo). En algunos casos, se administran un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico después de que las células tumorales se hayan establecido y crecido hasta un tumor de tamaño específico (modelo terapéutico).

En ciertos casos, un procedimiento para inhibir el crecimiento de un tumor comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, un antagonista de DLL4 o un antagonista del receptor Notch) y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunoterapéutico. En ciertos casos, el sujeto es un ser humano. En ciertos casos, el sujeto tiene un tumor o ha tenido un tumor que fue extirpado. En ciertos casos, el tumor comprende células madre cancerosas. En ciertos casos, la frecuencia de las células madre cancerosas en el tumor se reduce mediante la administración del inhibidor de la ruta Notch.

La descripción también proporciona un procedimiento para reducir o prevenir la metástasis en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch. En algunos casos, la reducción o prevención de metástasis comprende la inhibición de la invasividad de un tumor. En ciertos casos, el sujeto es un ser humano. En ciertos casos, el sujeto tiene un tumor o ha tenido un tumor extirpado. En algunos casos, un antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch2/3. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch1.

Además, la descripción proporciona un procedimiento para reducir la tumorigenicidad de un tumor en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una

cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch. En ciertos casos, el tumor comprende células madre cancerosas. En algunos casos, la tumorigenicidad de un tumor se reduce al reducir la frecuencia de las células madre cancerosas en el tumor. En ciertos casos, la frecuencia de las células madre cancerosas en el tumor se reduce mediante la administración del inhibidor de la ruta Notch. En algunos casos, la tumorigenicidad del tumor se reduce al inducir la apoptosis de las células tumorales. En algunos casos, la tumorigenicidad del tumor se reduce al aumentar la apoptosis de las células tumorales. En algunos casos, un antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch2/3. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch1.

La descripción también proporciona un procedimiento para reducir la frecuencia de las células madre cancerosas en un tumor que comprende células madre cancerosas, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch. En algunos casos, un antagonista de DLL4 es un anticuerpo anti-DLL4. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch2/3. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo anti-Notch1. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch en combinación con un agente inmunoterapéutico es capaz de reducir la tumorigenicidad de un tumor que comprende células madre cancerosas en un modelo animal, tal como un modelo de ratón. En ciertos casos, la cantidad o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor tratado se reduce al menos aproximadamente dos veces, aproximadamente tres veces, aproximadamente cinco veces, aproximadamente diez veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, o aproximadamente 1000 veces en comparación con el número o la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor no tratado. En ciertos casos, la reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas se determina limitando el ensayo de dilución usando un modelo animal.

En algunos casos para los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch aumenta la actividad del agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch aumenta la actividad del agente inmunoterapéutico en un sujeto que no ha sido tratado previamente con el agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch aumenta la actividad del agente inmunoterapéutico en un sujeto que ha sido tratado previamente con el agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un antagonista de DLL4 aumenta la actividad de un anticuerpo anti-PD-1. En algunos casos, un antagonista de DLL4 aumenta la actividad de un anticuerpo anti-PD-L1. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch aumenta la actividad de un anticuerpo anti-PD-1. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch aumenta la actividad de un anticuerpo anti-PD-L1.

En algunos casos para los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch aumenta la actividad del agente inmunoterapéutico en un sujeto que ha sido tratado previamente con el agente inmunoterapéutico, en el que el sujeto se ha vuelto insensible o resistente al agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch restaura la sensibilidad de un sujeto a la actividad del agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un antagonista de DLL4 restaura la sensibilidad de un sujeto a un anticuerpo anti-PD-1. En algunos casos, un antagonista de DLL4 restaura la sensibilidad de un sujeto a un anticuerpo anti-PD-L1. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch restaura la sensibilidad de un sujeto a un anticuerpo anti-PD-1. En algunos casos, un receptor Notch restaura la sensibilidad de un sujeto a un anticuerpo anti-PD-L1.

En algunos casos para los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch aumenta la sensibilidad de un sujeto a la actividad del agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch aumenta la sensibilidad de un sujeto a la actividad del agente inmunoterapéutico, en el que se ha encontrado que el sujeto es insensible al agente inmunoterapéutico.

La descripción también proporciona un procedimiento para identificar un tumor humano susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, comprendiendo el procedimiento determinar el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del tumor. En algunos casos, un procedimiento para identificar un tumor humano susceptible de responder al tratamiento de combinación con un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico, comprende: a) obtener una muestra del tumor humano; b) medir el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra; y c) identificar el tumor como susceptible de responder o no al tratamiento de combinación con un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico basándose en el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra.

La descripción también proporciona un procedimiento para determinar la capacidad de respuesta (o sensibilidad) de un tumor humano al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, comprendiendo el procedimiento: (a) obtener una muestra del tumor humano; (b) medir el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra; y (c) determinar la capacidad de respuesta del tumor al tratamiento basándose en el nivel de expresión de PD-L1. En algunos casos, el procedimiento comprende determinar la capacidad de respuesta o sensibilidad de un tumor humano al tratamiento con un antagonista de DLL4. En algunos casos, el procedimiento comprende determinar la capacidad de respuesta o sensibilidad de un tumor humano al tratamiento con un antagonista de DLL4 en combinación con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente quimioterapéutico). En algunos casos, el procedimiento comprende determinar la capacidad de respuesta o sensibilidad de un tumor humano al tratamiento con un antagonista del receptor Notch. En algunos casos,

el procedimiento comprende determinar la capacidad de respuesta o sensibilidad de un tumor humano al tratamiento con un antagonista del receptor Notch en combinación con al menos un agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente quimioterapéutico).

5 La descripción también proporciona un procedimiento para identificar a un paciente con cáncer que es probable que responda al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, comprendiendo el procedimiento: (a) obtener una muestra del paciente; (b) medir el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra; y (c) identificar al paciente susceptible de responder al tratamiento basándose en el nivel de expresión de PD-L1. En algunos casos, la muestra es

10 una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra es una muestra de sangre o plasma. En algunos casos, el procedimiento comprende identificar a un paciente con cáncer susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico en combinación con al menos un agente terapéutico adicional.

15 La descripción también proporciona un procedimiento para seleccionar un sujeto con un tumor para el tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, comprendiendo el procedimiento: a) determinar el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra obtenida del sujeto; b) identificar el tumor como susceptible de responder o no al tratamiento con el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico basándose en el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra; y c) seleccionar el sujeto para el tratamiento si se identifica que el tumor es susceptible de responder al tratamiento. En algunos casos, la muestra es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra es una muestra de sangre o plasma. En algunos casos, el procedimiento comprende además administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una cantidad eficaz de un agente inmunoterapéutico al sujeto.

20 La descripción también proporciona un procedimiento para tratar el cáncer en un paciente, que comprende: (a) identificar si el paciente es susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, en el que la identificación comprende: (i) obtener una muestra del paciente; (ii) medir el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra; e (iii) identificar al paciente que es susceptible de responder al tratamiento basándose en el nivel de expresión de PD-L1; y (b) administrar al paciente que es susceptible de responder al tratamiento una cantidad eficaz del inhibidor de la ruta Notch en combinación con el agente inmunoterapéutico. En algunos casos, la muestra es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra es una muestra de sangre o plasma. En algunos casos, el procedimiento comprende identificar si el paciente es susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un agente terapéutico adicional. En algunos casos, el procedimiento comprende administrar al paciente el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico en combinación con al menos un agente terapéutico adicional.

25 La descripción también proporciona un procedimiento para tratar el cáncer en un paciente, que comprende: administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, al paciente; en el que se predice que el paciente responderá al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch y/o un agente inmunoterapéutico basándose en el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra del paciente. En algunos casos, la muestra es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra es una muestra de sangre o plasma. En algunos casos, se predice que el paciente responderá al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico en combinación con un agente quimioterapéutico. En algunos casos, el procedimiento comprende administrar al paciente el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico en combinación con al menos un agente terapéutico adicional.

30 La descripción también proporciona un procedimiento para aumentar la probabilidad de un tratamiento eficaz con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, que comprende: (a) identificar si un paciente tiene un tumor que es susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch y/o un agente inmunoterapéutico, en el que la identificación comprende: (i) obtener una muestra del paciente; (ii) medir el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra; e (iii) identificar al paciente que es susceptible de responder al tratamiento basándose en el nivel de expresión de PD-L1; y (b) administrar una cantidad eficaz del inhibidor de la ruta Notch en combinación con el agente inmunoterapéutico al paciente. En algunos casos, la muestra es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra es una muestra de sangre o plasma. En algunos casos, el procedimiento comprende identificar si un paciente tiene un tumor que es susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un agente quimioterapéutico. En algunos casos, el procedimiento comprende administrar al paciente el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico en combinación con al menos un agente terapéutico adicional.

35 La descripción también proporciona un procedimiento para aumentar la probabilidad de un tratamiento eficaz con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un segundo agente, en el que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico, que comprende: administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de la ruta Notch y/o un agente inmunoterapéutico a un paciente; en el que el paciente se identifica como susceptible de responder al tratamiento con el inhibidor de la ruta Notch y/o el agente inmunoterapéutico basándose en el nivel de expresión de PD-L1 en una muestra. En algunos casos, la muestra es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra es una muestra de sangre o plasma. En algunos casos, el paciente se identifica como susceptible de responder al tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un agente quimioterapéutico. En algunos casos, el procedimiento

comprende administrar al paciente el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico en combinación con al menos un agente terapéutico adicional.

5 En algunos casos de los procedimientos descritos en esta invención, la muestra es una muestra de biopsia. En algunos casos, la muestra es una muestra de sangre o plasma. En algunos casos, la muestra es una muestra tumoral. En algunos casos, la muestra comprende células tumorales, células inmunes infiltrantes de tumor, células estromales, y cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, la muestra es una muestra incluida en parafina fijada en formalina (FFPE). En algunos casos, la muestra es tejido de archivo, fresco o congelado. En algunos casos, el nivel de expresión de PD-L1 en la muestra se compara con un nivel de expresión predeterminado de PD-L1. En algunos casos, el nivel de expresión predeterminado de PD-L1 es un nivel de expresión de PD-L1 en una muestra de tumor de referencia, una muestra de tejido normal de referencia, una serie de muestras de tumor de referencia, o una serie de muestras de tejido normal de referencia. En algunos casos, el nivel de expresión de PD-L1 se determina usando un ensayo de inmunohistoquímica (IHC). En algunos casos, el nivel de expresión de PD-L1 se determina usando un ensayo que comprende una evaluación de puntuación H. En algunos casos, el nivel de expresión de PD-L1 se determina usando un ELISA. En algunos casos, el nivel de expresión de PD-L1 se determina usando un ensayo basado en PCR.

10 En algunos casos, el nivel de expresión de PD-L1 se determina usando un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1. En algunos casos, el anticuerpo que se une específicamente a PD-L1 humano es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo de ratón, un anticuerpo de conejo, un anticuerpo de rata, o un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno.

15 En algunos casos, PD-L1 se detecta en células tumorales. En algunos casos, PD-L1 se detecta en células inmunes infiltrantes de tumor. En algunos casos, las células inmunes infiltrantes del tumor son linfocitos. En algunos casos, las células inmunes infiltrantes de tumor son linfocitos T. En algunos casos, PD-L1 se detecta en las células presentadoras de antígeno (APC). En algunos casos, PD-L1 se detecta en macrófagos y/o células dendríticas. En algunos casos, las APC, los macrófagos y/o las células dendríticas están dentro del microambiente tumoral.

20 En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el tumor es un tumor seleccionado del grupo que consiste en tumor de pulmón, tumor de páncreas, tumor de mama, tumor de colon, tumor colorrectal, melanoma, tumor gastrointestinal, tumor gástrico, tumor renal, tumor de ovario, tumor de hígado, tumor de endometrio, tumor de riñón, tumor de próstata, tumor de tiroides, neuroblastoma, glioma, glioblastoma, glioblastoma multiforme, tumor cervical, tumor de estómago, tumor de vejiga, tumor de cabeza y cuello, y hepatoma. En ciertos casos, el tumor es un tumor de mama. En ciertos casos, el tumor es un tumor de mama que es un tumor de mama triple negativo. En algunos casos, el tumor es un tumor de ovario. En ciertos casos, el tumor es un tumor de pulmón. En ciertos casos, el tumor de pulmón es un tumor de pulmón de células no pequeñas. En ciertos casos, el tumor de pulmón es un tumor de pulmón de células pequeñas. En ciertos casos, el tumor es un tumor de páncreas. En algunos casos, el tumor es un tumor de riñón. En algunos casos, el tumor de riñón es un carcinoma de células renales. En algunos casos, el tumor expresa PD-L1. En algunos casos, el tumor sobreexpresa PD-L1. En algunos casos, el tumor expresa PD-L2. En algunos casos, el tumor sobreexpresa PD-L2. En algunos casos, el tumor tiene un mayor nivel de expresión de PD-L1 en comparación con un nivel predeterminado.

25 En algunos casos, el "nivel predeterminado" de expresión de PD-L1 es la cantidad de expresión de PD-L1 en una célula inmune normal. En algunos casos, el "nivel predeterminado" de expresión de PD-L1 es la cantidad de expresión de PD-L1 en un tejido normal. En algunos casos, el "nivel predeterminado" de expresión de PD-L1 es la cantidad de expresión de PD-L1 en un tipo de tumor similar. En algunos casos, el "nivel predeterminado" de expresión de PD-L1 es la cantidad de expresión de PD-L1 en una mezcla de tipos de tumores.

30 En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, glioma, glioblastoma, glioblastoma multiforme, cáncer cervical, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, y hepatoma. En algunos casos, el cáncer es cáncer de pulmón. En algunos casos, el cáncer es cáncer de ovario.

35 En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, o un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4.

40 En algunos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a DLL4 humano. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de DLL4 humano. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a un

epítopo dentro de los aminoácidos 27-217 del dominio extracelular de DLL4 humano (SEQ ID NO:17). En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente dentro de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO:14). En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une a un epítopo que comprende los aminoácidos 66-73 (QAVVSPGP, SEQ ID NO: 18) de DLL4 humano. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une a un epítopo que comprende los aminoácidos 139-146 (LISKIAIQ, SEQ ID NO:19) de DLL4 humano. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo que comprende los aminoácidos 66-73 (QAVVSPGP, SEQ ID NO:18) y los aminoácidos 139-146 (LISKIAIQ,

SEQ ID NO: 19) de DLL4 humano. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une a DLL4 humano con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 0,1 nM.

En algunos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a DLL4 humano, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:2), YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3), o YISVYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:4), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5); y/o una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8). En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a DLL4 humano, en el que el anticuerpo

comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5), y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO: 8).

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a DLL4 humano, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5), y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8) y se administra en combinación con un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo que se une específicamente a PD-1. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1.

En ciertos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a DLL4 humano, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:9; SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 11, y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12. En algunos casos, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:10, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12. En ciertos casos, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:10 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:12.

En algunos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo biespecífico, en el que el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en el que el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEFKR (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22); en el que el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:25), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5); y en el que tanto el primer como el segundo sitio de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8).

En algunos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo biespecífico, en el que el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en el que el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende

NYWMH (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22); en el que el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:25), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5); y en el que tanto el primer como el segundo sitio de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8). En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo que se une específicamente a PD-1. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1.

En ciertos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo biespecífico, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en el que el primer sitio de unión a antígeno comprende una primera región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:30, el segundo sitio de unión a antígeno comprende una segunda región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:29; y en el que el primer y el segundo sitio de unión a antígeno comprenden una primera y una segunda región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 12.

En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es el anticuerpo biespecífico 305B83.

En ciertos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de PD-1. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de PD-L1. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de PD-L2. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CTLA-4. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CD80. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CD86. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de KIR. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de Tim-3. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de LAG3. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de TIGIT. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CD96. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de IDO1. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de CD28. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de 4-1BB. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de OX40. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de CD27. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de CD80. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de CD86. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de CD40. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de GITR. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es una citocina. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es un interferón. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente al DLL4 humano, y el agente inmunoterapéutico es una linfocina.

En algunos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1, Notch2 y/o Notch3 humanos. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y Notch3 humanos.

En algunos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de Notch2 y/o Notch3 humanos, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:34), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKKG (SEQ ID NO:35), y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO:36), y/o una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37), una CDR2 de cadena

ligera que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:38), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:39). En algunos casos, el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:34), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35), y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO:36); y una CDR1 de cadena ligera que comprende

5 RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37), una CDR2 de cadena ligera que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:38), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:39).

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:34), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35), y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO:36), y/o una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37), una CDR2 de cadena ligera que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:38), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:39) y se administra en combinación con un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo que se une específicamente a PD-1. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1.

En ciertos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en esta invención, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:40; y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:41. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:40, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:41. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:40 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:41.

En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es el anticuerpo tarextumab (OMP-59R5).

En ciertos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de PD-1. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de PD-L1. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de PD-L2. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CTLA-4. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CD80. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CD86. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de KIR. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de Tim-3. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de LAG3. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de TIGIT. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CD96. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de IDO1. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CD28. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de 4-1BB. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de OX40. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CD27. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CD80. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CD86. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CD40. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de GITR. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un

citocina. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un interferón. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es una linfocina.

5 En algunos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende RGYWIE (SEQ ID NO:46), una CDR2 de cadena pesada que comprende QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47), y una CDR3 de cadena pesada que comprende FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:48), y/o una CDR1 de cadena ligera que comprende RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49), una CDR2 de cadena ligera que comprende GTNNRAP (SEQ ID NO:50), y una CDR3 de cadena ligera que comprende ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51).
 10 En algunos casos, el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende RGYWIE (SEQ ID NO:46), una CDR2 de cadena pesada que comprende QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47), y una CDR3 de cadena pesada que comprende FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:48), y una CDR1 de cadena ligera que comprende RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49), una CDR2 de cadena ligera que comprende GTNNRAP (SEQ ID NO:50), y una CDR3 de cadena ligera que comprende ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51).

15 En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, en el que el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende RGYWIE (SEQ ID NO:46), una CDR2 de cadena pesada que comprende QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47), y una CDR3 de cadena pesada que comprende FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:48), y una CDR1 de cadena ligera que comprende RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49), una CDR2 de cadena ligera que comprende GTNNRAP (SEQ ID NO:50), y una CDR3 de cadena ligera que comprende ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51) y se administra en combinación con un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo que se une específicamente a PD-1. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1.

20 En ciertos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en esta invención, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:52; y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:53. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:52, y una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:53. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:52 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:53.

25 En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es el anticuerpo brontictuzumab (OMP-52M51).

30 En ciertos casos de cualquiera de los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de PD-1. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de PD-L1. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de PD-L2.

35 En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CTLA-4. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CD80. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CD86. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de KIR. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de Tim-3. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de LAG3. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de TIGIT. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de CD96. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un antagonista de IDO1. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de CD28. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de 4-1BB. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de OX40. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente

inmunoterapéutico es un agonista de CD27. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de CD80. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de CD86. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de CD40. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un agonista de GITR. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es una citocina. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es un interferón. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, y el agente inmunoterapéutico es una linfoquina.

La presente descripción proporciona además composiciones que comprenden inhibidores de la ruta Notch y composiciones que comprenden agentes inmunoterapéuticos. En algunos casos, una composición comprende un antagonista de DLL4 descrito en esta invención. En algunos casos, una composición comprende un anticuerpo que se une específicamente a DLL4 descrito en esta invención. En algunos casos, una composición comprende un antagonista del receptor Notch descrito en esta invención. En algunos casos, una composición comprende un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 descritos en esta invención. En algunos casos, una composición comprende un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 descrito en esta invención. En algunos casos, una composición comprende un agente inmunoterapéutico descrito en esta invención.

En algunos casos, una composición es una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la ruta Notch y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, una composición es una composición farmacéutica que comprende un agente inmunoterapéutico y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas encuentran uso en la modulación de respuestas inmunitarias en pacientes humanos, particularmente respuestas inmunitarias a tumores. Las composiciones farmacéuticas encuentran uso en la inhibición del crecimiento de células tumorales en pacientes humanos. Las composiciones farmacéuticas encuentran uso en el tratamiento del cáncer en pacientes humanos. Las composiciones farmacéuticas encuentran uso en cualquiera de los procedimientos descritos en esta invención. En algunos casos, un inhibidor de la ruta Notch descrito en esta invención encuentra uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con al menos un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un antagonista de DLL4 descrito en esta invención encuentra uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con al menos un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un antagonista del receptor Notch descrito en esta invención encuentra uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con al menos un agente inmunoterapéutico.

Las formulaciones y/o composiciones farmacéuticas se preparan para su almacenamiento y uso combinando un agente terapéutico de la presente descripción con un vehículo, excipiente y/o estabilizador farmacéuticamente aceptable como un polvo liofilizado estéril, solución acuosa, etc. (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22^a Edición, 2012, Pharmaceutical Press, Londres*). Los expertos en la materia generalmente consideran que los vehículos, excipientes y/o estabilizadores farmacéuticamente aceptables son principios inactivos de una formulación o composición farmacéutica.

Los vehículo, excipientes o estabilizadores adecuados comprenden tampones no tóxicos tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro de sodio; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (por ejemplo, cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (tales como menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; carbohidratos tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones iónicos formadores de sal tal como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polisorbato (TWEEN) o polietilenglicol (PEG).

La formulación terapéutica puede estar en forma de dosificación unitaria. Dichas formulaciones incluyen comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones en agua o medios no acuosos, o supositorios para administración oral, parenteral o rectal o para administración por inhalación. En composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un vehículo farmacéutico. Como se describe en la presente memoria, los vehículos farmacéuticos se consideran principios inactivos de una formulación o composición. Los ingredientes de formación de comprimidos convencionales incluyen almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas y otros diluyentes (por ejemplo, agua) para formar una composición sólida de preformulación que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente descripción, o una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable del mismo. La composición sólida de preformulación se subdivide a continuación en formas de dosificación unitarias del tipo descrito anteriormente. Los comprimidos, píldoras, etc., de la composición novedosa pueden recubrirse o componerse de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede

comprender una composición interna cubierta por un componente externo. Además, los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración y permite que el componente interno pase intacto a través del estómago o se retrase su liberación. Se puede usar una diversidad de materiales para dichas capas o recubrimientos entéricos, incluyendo varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formulaciones farmacéuticas pueden incluir los inhibidores de la ruta Notch y/o los agentes inmunoterapéuticos de la presente descripción complejados con liposomas. Los liposomas se pueden generar mediante la evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

Los inhibidores de la ruta Notch y/o los agentes inmunoterapéuticos también pueden quedar atrapados en microcápsulas. Dichas microcápsulas se preparan, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetakrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones como se describe en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22ª Edición, 2012, Pharmaceutical Press, Londres*.

Además, se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida que comprenden inhibidores de la ruta Notch y/o agentes inmunoterapéuticos. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente, cuyas matrices están en forma de artículos conformados (por ejemplo, películas o microcápsulas). Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles tales como poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tal como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), isobutirato de acetato de sacarosa y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Los inhibidores de la ruta Notch y los agentes inmunoterapéuticos se administran como composiciones farmacéuticas apropiadas a un paciente humano según procedimientos conocidos. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de varias maneras para tratamiento local o sistémico. Los procedimientos de administración adecuados incluyen, pero no se limitan a, intravenosa (administración en bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo), intraarterial, intramuscular (inyección o infusión), intratumoral, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutáneo, intraarticular, intrasinovial, intracraneal (por ejemplo, intratecal o intraventricular) u oral. Además, la administración puede ser tópica (por ejemplo, parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos) o pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluso por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica).

Para el tratamiento de una enfermedad, la dosificación o dosificaciones apropiadas de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un agente inmunoterapéutico de la presente descripción depende del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y el curso de la enfermedad, la capacidad de respuesta de la enfermedad, ya sea que los inhibidores se administren con fines terapéuticos o preventivos, la terapia anterior, el historial clínico del paciente, etc., todo a discreción del médico tratante. El inhibidor de la ruta Notch se puede administrar una vez o como una serie de tratamientos extendidos durante varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución de la patología (por ejemplo, reducción del tamaño del tumor). El agente inmunoterapéutico se puede administrar una vez o como una serie de tratamientos extendidos durante varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución de la patología (por ejemplo, reducción del tamaño del tumor). Los horarios de dosificación óptimos para cada agente se pueden calcular a partir de las mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente y variarán dependiendo de la potencia relativa de un agente individual. El médico administrador puede determinar las dosis óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición.

En algunos casos, la administración combinada incluye la administración conjunta en una sola formulación farmacéutica. En algunos casos, la administración combinada incluye el uso de formulaciones separadas y la administración consecutiva en cualquier orden, pero generalmente dentro de un periodo de tiempo tal que todos los agentes activos puedan ejercer sus actividades biológicas simultáneamente. En algunos casos, la administración combinada incluye el uso de formulaciones separadas y un régimen de dosificación escalonado. En algunos casos, la administración combinada incluye el uso de formulaciones separadas y la administración en un orden específico. En algunos casos, la administración combinada incluye el uso de formulaciones separadas y la administración de los agentes en un orden específico y en un régimen de dosificación escalonado.

En ciertos casos, la dosificación de un inhibidor de la ruta Notch es de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. En ciertos casos, la dosis del inhibidor de la ruta Notch es de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente

10 mg/kg de peso corporal. En ciertos casos, la dosis del inhibidor de la ruta Notch es de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal. En ciertos casos, la dosis del inhibidor de la ruta Notch es de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal. En ciertos casos, la dosis del inhibidor de la ruta Notch es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal. En ciertos casos, la dosis del inhibidor de la ruta Notch es de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch se administra al sujeto en una dosis de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch se administra al sujeto en una dosis de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch se administra una o más veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch se administra una vez por semana. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch se administra una vez cada dos semanas. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch se administra una vez cada tres semanas. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch se administra una vez cada cuatro semanas.

En ciertos casos, la dosificación de un agente inmunoterapéutico es de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. En ciertos casos, la dosis de un agente inmunoterapéutico es de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. En ciertos casos, la dosis de un agente inmunoterapéutico es de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. En ciertos casos, la dosis de un agente inmunoterapéutico es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, un agente inmunoterapéutico se administra al sujeto en una dosis de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch se administra al sujeto en una dosis de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. En ciertos casos, un agente inmunoterapéutico se administra una o más veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente. En ciertos casos, un agente inmunoterapéutico se administra dos veces por semana. En ciertos casos, un agente inmunoterapéutico se administra una vez por semana. En ciertos casos, un agente inmunoterapéutico se administra una vez cada dos semanas. En ciertos casos, un agente inmunoterapéutico se administra una vez cada tres semanas. En ciertos casos, un agente inmunoterapéutico se administra una vez cada cuatro semanas.

En algunos casos, la dosificación de un agente inmunoterapéutico se determina por lo que los expertos en la técnica consideran "estándar de atención" para un agente particular (por ejemplo, médicos tratantes).

En algunos casos, se puede administrar un inhibidor a una dosis inicial de "carga" más alta, seguida de una o más dosis más bajas. En algunos casos, la frecuencia de administración también puede cambiar. En algunos casos, un régimen de dosificación puede comprender la administración de una dosis inicial, seguida de dosis adicionales (o dosis de "mantenimiento") una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez al mes. Por ejemplo, un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de, por ejemplo, la mitad de la dosis inicial. O un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial, seguida de dosis de mantenimiento de, por ejemplo, la mitad de la dosis inicial cada dos semanas. O un régimen de dosificación puede comprender la administración de tres dosis iniciales durante 3 semanas, seguidas de dosis de mantenimiento de, por ejemplo, la misma cantidad cada dos semanas.

Como saben los expertos en la técnica, la administración de cualquier agente terapéutico puede conducir a efectos secundarios y/o toxicidades. En algunos casos, los efectos secundarios y/o toxicidades son tan graves que impiden la administración del agente particular a una dosis terapéuticamente eficaz. En algunos casos, la terapia farmacológica debe suspenderse y se pueden probar otros agentes. Sin embargo, muchos agentes en la misma clase terapéutica a menudo muestran efectos secundarios y/o toxicidades similares, lo que significa que el paciente tiene que suspender la terapia o, si es posible, padecer los efectos secundarios desagradables asociados con el agente terapéutico.

La presente descripción proporciona procedimientos para tratar el cáncer en un sujeto que comprende usar una estrategia de dosificación para administrar dos o más agentes que pueden reducir los efectos secundarios y/o toxicidades asociadas con la administración de un inhibidor de la ruta Notch y/o un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, un procedimiento para tratar el cáncer en un sujeto humano comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la ruta Notch en combinación con una dosis terapéuticamente eficaz de un agente inmunoterapéutico, en el que uno o ambos de los inhibidores se administran según una estrategia de dosificación intermitente. En algunos casos, la estrategia de dosificación intermitente consiste en administrar una dosis inicial de un inhibidor de la ruta Notch al sujeto, y administrar dosis posteriores del inhibidor de la ruta Notch aproximadamente una vez cada 2 semanas. En algunos casos, la estrategia de dosificación intermitente consiste en administrar una dosis inicial de un inhibidor de la ruta Notch al sujeto, y administrar dosis posteriores del inhibidor de la ruta Notch aproximadamente una vez cada 3 semanas. En algunos casos, la estrategia de dosificación intermitente consiste en administrar una dosis inicial de un inhibidor de la ruta Notch al sujeto, y administrar dosis posteriores del inhibidor de la ruta Notch aproximadamente una vez cada 4 semanas. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch

se administra utilizando una estrategia de dosificación intermitente y el agente inmunoterapéutico se administra una vez por semana, una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas.

5 La terapia de combinación con dos o más agentes terapéuticos a menudo usa agentes que funcionan mediante diferentes mecanismos de acción, aunque esto no es necesario. La terapia de combinación que usa agentes con diferentes mecanismos de acción puede producir efectos aditivos o sinérgicos. La terapia de combinación puede permitir una dosis más baja de cada agente que se usa en monoterapia, reduciendo así los efectos secundarios tóxicos y/o aumentando el índice terapéutico del agente o agentes. La terapia de combinación puede disminuir la probabilidad de que se desarrollen células cancerosas resistentes. La terapia de combinación que comprende un agente inmunoterapéutico puede permitir que un agente mejore la respuesta inmunitaria a un tumor o células tumorales, mientras que el segundo agente puede ser eficaz para destruir células tumorales más directamente.

10 En algunos casos, la combinación de un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico da como resultado resultados aditivos o sinérgicos. En algunos casos, la terapia de combinación da como resultado un aumento en el índice terapéutico del inhibidor de la ruta Notch. En algunos casos, la terapia de combinación da como resultado un aumento en el índice terapéutico del agente inmunoterapéutico. En algunos casos, la terapia de combinación da como resultado una disminución de la toxicidad y/o los efectos secundarios del inhibidor de la ruta Notch. En algunos casos, la terapia de combinación da como resultado una disminución de la toxicidad y/o los efectos secundarios del agente inmunoterapéutico.

15 El médico tratante puede estimar fácilmente las tasas de repetición para la dosificación basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales. El progreso de la terapia puede monitorizarse mediante técnicas y ensayos convencionales.

20 En ciertos casos, además de administrar un inhibidor de la ruta Notch en combinación con un agente inmunoterapéutico, los procedimientos de tratamiento pueden comprender además administrar al menos un agente terapéutico adicional antes, simultánea y/o posteriormente a la administración del inhibidor de la ruta Notch y/o el agente inmunoterapéutico.

25 En algunos casos, el agente o agentes terapéuticos adicionales se administrarán de manera sustancialmente simultánea o concurrente con el inhibidor de la ruta Notch o el agente inmunoterapéutico. Por ejemplo, un sujeto puede recibir el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico mientras se somete a un tratamiento con el agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente quimioterapéutico).

30 En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico se administrarán a 1 año del tratamiento con el agente terapéutico adicional. En ciertos casos alternativos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico se administrarán dentro de los 10, 8, 6, 4 o 2 meses de cualquier tratamiento con el agente terapéutico adicional. En ciertos otros casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico se administrarán dentro de las 4, 3, 2 o 1 semanas de cualquier tratamiento con el agente terapéutico adicional. En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch y el agente inmunoterapéutico se administrarán dentro de los 5, 4, 3, 2 o 1 días de cualquier tratamiento con el agente terapéutico adicional. Se apreciará además que los agentes o el tratamiento pueden administrarse al sujeto en cuestión de horas o minutos (es decir, de forma sustancialmente simultánea) con el inhibidor de la ruta Notch o el agente inmunoterapéutico.

35 Los agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico incluyen agentes quimioterapéuticos. Por lo tanto, en algunos casos, el procedimiento o tratamiento implica la administración de un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico de la presente descripción en combinación con un agente quimioterapéutico o cóctel de múltiples agentes quimioterapéuticos diferentes. El tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico puede ocurrir antes, simultáneamente o después de la administración de quimioterapias. Los horarios de preparación y dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden usar según las instrucciones del fabricante o según lo determine empíricamente el experto. Los horarios de preparación y dosificación para dicha quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service*, 1992, M. C. Perry, Editor, Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

40 Los agentes quimioterapéuticos útiles según la descripción incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán, y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilaminasas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamima; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, caminomina, carcinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina, epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales

como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antisuiprarrenales tales como aminogluluetimida, mitotano, trilostano; rellenador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK; razoxana; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclortrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino o complejo de platino tal como cisplatino y carboplatino; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Los agentes quimioterapéuticos también incluyen agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como antiestrógenos, incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

En ciertos casos, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de topoisomerasa. Los inhibidores de topoisomerasa son agentes de quimioterapia que interfieren con la acción de una enzima topoisomerasa (por ejemplo, Topoisomerasa I o II). Los inhibidores de topoisomerasa incluyen, pero no se limitan a, doxorubicina HCl, citrato de daunorubicina, mitoxantrona HCl, actinomicina D, etopósido, topotecán HCl, tenipósido (VM-26) e irinotecán.

En ciertos casos, el agente quimioterapéutico es un antimetabolito. Un antimetabolito es un producto químico con una estructura similar a un metabolito requerido para las reacciones bioquímicas normales, pero lo suficientemente diferente como para interferir con una o más funciones normales de las células, tal como la división celular. Los antimetabolitos incluyen, pero no se limitan a, gemcitabina, fluorouracilo, capecitabina, metotrexato de sodio, ralitrexed, pemetrexed, tegafur, citosina arabinósido, tioguanina, 5-azacitidina, 6-mercaptopurina, azatioprina, 6-tioguanina, pentostatina, fosfato de fludarabina, y cladribina, así como sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los mismos.

En ciertos casos, el agente quimioterapéutico es un agente antimitótico, que incluye, pero no se limita a, agentes que se unen a tubulina. En algunos casos, el agente es un taxano. En ciertos casos, el agente es paclitaxel o docetaxel, o una sal, ácido o derivado farmacéuticamente aceptable de paclitaxel o docetaxel. En ciertos casos, el agente es paclitaxel (TAXOL), docetaxel (TAXOTERE), paclitaxel unido a albúmina (nab-paclitaxel; ABRAXANE), DHA-paclitaxel o PG-paclitaxel. En ciertos casos alternativos, el agente antimitótico comprende un alcaloide de la vinca, tal como vincristina, vinblastina, vinorelbina o vindesina, o sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. En algunos casos, el agente antimitótico es un inhibidor de la quinesina Eg5 o un inhibidor de una cinasa mitótica tal como Aurora A o Plk1.

En algunos casos, se administra un antagonista de DLL4 en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario y al menos un agente quimioterapéutico. En algunos casos, un anticuerpo anti-DLL4 se administra en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 y al menos un agente quimioterapéutico. En algunos casos, demcizumab se administra en combinación con pembrolizumab y al menos un agente quimioterapéutico. En algunos casos, demcizumab se administra en combinación con pembrolizumab, carboplatino y pemetrexed. En algunos casos, demcizumab se administra en combinación con pembrolizumab, carboplatino y pemetrexed para el tratamiento del cáncer de pulmón. En algunos casos, demcizumab se administra en combinación con pembrolizumab, carboplatino y pemetrexed para el tratamiento de NSCLC. En algunos casos, demcizumab se administra en combinación con nivolumab y al menos un agente quimioterapéutico. En algunos casos, demcizumab se administra en combinación con nivolumab, carboplatino y pemetrexed. En algunos casos, demcizumab se administra en combinación con nivolumab, carboplatino y pemetrexed para el tratamiento del cáncer de pulmón. En algunos casos, demcizumab se administra en combinación con nivolumab, carboplatino y pemetrexed para el tratamiento de NSCLC.

En algunos casos, un agente terapéutico adicional que puede administrarse en combinación con un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico es un agente tal como una molécula pequeña. Por ejemplo, el tratamiento puede implicar la administración combinada de un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico con una molécula pequeña que actúa como un inhibidor contra las proteínas asociadas a tumor, incluyendo, pero no limitándose a, EGFR, HER2 (ErbB2) y/o VEGF. En algunos casos, se administran un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico en combinación con un inhibidor de proteína cinasa seleccionado del grupo que consiste en: gefitinib (IRESSA), erlotinib (TARCEVA), sunitinib (SUTENT), lapatanib, vandetanib (ZACTIMA), AEE788, CI-1033, cediranib (RECENTIN), sorafenib (NEXAVAR), mereletinib (AZD9291) y pazopanib (GW786034B). En algunos casos, un agente terapéutico adicional comprende un inhibidor de mTOR.

En algunos casos, un agente terapéutico adicional comprende una molécula biológica, tal como un anticuerpo. Por ejemplo, el tratamiento puede implicar la administración combinada de un inhibidor de la ruta Notch y un agente

inmunoterapéutico con anticuerpos contra proteínas asociadas a tumor incluyendo, pero no limitándose a, anticuerpos que se unen a EGFR, HER2/ErbB2 y/o VEGF. En ciertos casos, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo específico para un marcador de células madre cancerosas. En ciertos casos, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo que inhibe una ruta de células madre cancerosas. En ciertos casos, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo que es un inhibidor de la angiogénesis (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF o receptor VEGF). En ciertos casos, el agente terapéutico adicional es bevacizumab (AVASTIN), ramucirumab, trastuzumab (HERCEPTIN), pertuzumab (OMNITARG), panitumumab (VECTIBIX), nimotuzumab, zalutumumab o cetuximab (ERBITUX).

Además, el tratamiento puede implicar la administración combinada de un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico con otras moléculas biológicas, tales como una o más citocinas (por ejemplo, linfocinas, interleucinas, factores de necrosis tumoral y/o factores de crecimiento) o puede ir acompañado de extirpación quirúrgica de tumores, extirpación de células cancerosas o cualquier otra terapia que un médico tratante considere necesaria.

En algunos casos, el tratamiento puede implicar la administración combinada de un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico con un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste, pero sin limitación: adrenomedulina (AM), angiopoyetina (Ang), BMP, BDNF, EGF, eritropoyetina (EPO), FGF, GDNF, G-CSF, GM-CSF, GDF9, HGF, HDGF, IGF, factor estimulante de la migración, miostatina (GDF-8), NGF, neurotrofinas, PDGF, trombopoyetina, TGF- α , TGF- β , TNF- α , VEGF, PIGF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15 e IL-18.

En ciertos casos, el tratamiento puede implicar la administración combinada de un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico con radioterapia. El tratamiento con un inhibidor de la ruta Notch y un agente inmunoterapéutico puede tener lugar antes, simultáneamente o después de la administración de radioterapia. Los horarios de dosificación para dicha radioterapia pueden ser determinados por el médico experto.

III. Inhibidores de la ruta Notch

La presente descripción proporciona inhibidores de la ruta Notch descritos en esta invención para su uso en procedimientos de modulación de respuestas inmunitarias, en procedimientos de inhibición del crecimiento tumoral, y/o en procedimientos de tratamiento del cáncer, en combinación con un segundo agente, en los que el segundo agente es un agente inmunoterapéutico.

En algunos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista de DLL4. Los antagonistas de DLL4 pueden denominarse en esta invención "agentes de unión a DLL4". En ciertos casos, el agente de unión a DLL4 se une específicamente a DLL4 humano. En ciertos casos, además de unirse específicamente a DLL4, el agente de unión a DLL4 se une específicamente al menos a una diana o antígeno adicional. En algunos casos, el agente de unión a DLL4 es un polipéptido. En algunos casos, el agente de unión a DLL4 es un anticuerpo. En ciertos casos, el agente de unión a DLL4 es un anticuerpo biespecífico. En ciertos casos, el agente de unión a DLL4 es una molécula biespecífica heterodimérica. En algunos casos, el agente de unión a DLL4 es una molécula biespecífica homodimérica. En algunos casos, el agente de unión a DLL4 es una molécula bifuncional que comprende un agente de unión a DLL4 y un agente inmunoterapéutico.

En ciertos casos, el antagonista de DLL4 se une específicamente al dominio extracelular de DLL4 humano. En algunos casos, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo. En algunos casos, el antagonista de DLL4 se une específicamente a un epítipo dentro de los aminoácidos 27-217 del dominio extracelular de DLL4 humano (SEQ ID NO:17). En ciertos casos, el antagonista de DLL4 se une específicamente dentro de la región N-terminal de DLL4 humano (SEQ ID NO:14). En algunos casos, el antagonista de DLL4 se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 66-73 (QAVVSPGP; SEQ ID NO:18) de DLL4 humano. En algunos casos, el antagonista de DLL4 se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 139-146 (LISKIAIQ; SEQ ID NO:19) de DLL4 humano. En algunos casos, el antagonista de DLL4 se une a un epítipo que comprende los aminoácidos 66-73 (QAVVSPGP, SEQ ID NO:18) y los aminoácidos 139-146 (LISKIAIQ, SEQ ID NO:19) de DLL4 humano.

En ciertos casos, el antagonista de DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se une a DLL4 humano con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1 μ M o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos. En ciertos casos, el antagonista de DLL4 se une a DLL4 humano con una K_D de aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos. En ciertos casos, el antagonista de DLL4 se une a DLL4 humano con una K_D de aproximadamente 1 nM. En ciertos casos, el antagonista de DLL4 se une a DLL4 humano con una K_D de aproximadamente 0,8 nM. En ciertos casos, el antagonista de DLL4 se une a DLL4 humano con una K_D de aproximadamente 0,6 nM. En ciertos casos, el antagonista de DLL4 se une a DLL4 humano con una K_D de aproximadamente 0,5 nM. En ciertos casos, el antagonista de DLL4 se une a DLL4 humano con una K_D de aproximadamente 0,4 nM. En algunos casos, la K_D se mide por resonancia por plasmones superficiales. En algunos casos, la constante de disociación del antagonista con respecto a DLL4 es la constante de disociación determinada usando una proteína de fusión DLL4 que comprende un dominio extracelular DLL4 (por ejemplo, una proteína de fusión DLL4 ECD-Fc) inmovilizada en un chip Biacore.

En ciertos casos, el antagonista de DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se une a DLL4 con una concentración efectiva media máxima (CE₅₀) de aproximadamente 1 μM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos. En ciertos casos, el antagonista de DLL4 se une a DLL4 humano con una CE₅₀ de aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos.

En algunos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el inhibidor de la ruta Notch es un antagonista del receptor Notch. Los antagonistas del receptor Notch pueden denominarse en esta invención "agentes de unión a Notch". En ciertos casos, el agente de unión a Notch se une específicamente a Notch1, Notch2 y/o Notch3 humanos.

En ciertos casos, además de unirse específicamente al menos a un receptor Notch, el agente de unión a Notch se une específicamente al menos a una diana o antígeno adicional. En algunos casos, el agente de unión a Notch es un polipéptido. En algunos casos, el agente de unión a Notch es un anticuerpo. En ciertos casos, el agente de unión a Notch es un anticuerpo biespecífico. En ciertos casos, el agente de unión a Notch es una molécula biespecífica heterodimérica. En algunos casos, el agente de unión a Notch es una molécula biespecífica homodimérica. En algunos casos, el agente de unión a Notch es una molécula bifuncional que comprende un agente de unión a Notch y un agente inmunoterapéutico.

En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch se une específicamente a Notch1, Notch2 y/o Notch3 humanos. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch se une específicamente a Notch1 humano. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch se une específicamente a Notch2 y Notch3 humanos. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo.

En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch (por ejemplo, un anticuerpo) se une a uno o más receptores Notch humanos con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1 μM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch se une a uno o más receptores Notch humanos con una K_D de aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch se une a uno o más receptores Notch humanos con una K_D de aproximadamente 1 nM. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch se une a uno o más receptores Notch humanos con una K_D de aproximadamente 0,8 nM. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch se une a uno o más receptores Notch humanos con una K_D de aproximadamente 0,6 nM. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch se une a uno o más receptores Notch humanos con una K_D de aproximadamente 0,5 nM. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch se une a uno o más receptores Notch humanos con una K_D de aproximadamente 0,4 nM. En algunos casos, la K_D se mide por resonancia por plasmones superficiales. En algunos casos, la constante de disociación del antagonista o anticuerpo con respecto a uno o más receptores Notch humanos es la constante de disociación determinada usando una proteína de fusión del receptor Notch que comprende un dominio extracelular del receptor Notch (por ejemplo, una proteína de fusión Notch2 ECD-Fc) inmovilizada en un Chip Biacore.

En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch (por ejemplo, un anticuerpo) se une a uno o más receptores Notch humanos con una concentración efectiva media máxima (CE₅₀) de aproximadamente 1 μM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch se une a uno o más receptores Notch humanos con una CE₅₀ de aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos.

En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un polipéptido. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo. En ciertos casos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4. En ciertos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En ciertos casos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En ciertos casos, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En ciertos casos, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno.

Los inhibidores de la ruta Notch (por ejemplo, anticuerpos) de la presente descripción se pueden ensayar para determinar la unión específica mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como análisis Biacore, análisis FACS, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, análisis de transferencia Western, radioinmunoensayo, ELISA, inmunoensayo "sandwich", ensayo de inmunoprecipitación, reacción de precipitación, reacción de precipitación de difusión en gel, ensayo de inmunodifusión, ensayo de aglutinación, ensayo de fijación del complemento, ensayo inmunoradiométrico, inmunoensayo fluorescente, e inmunoensayo de proteína A. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel y col., Editores, 1994-presente, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY).

En un ejemplo no limitante, la unión específica de un antagonista de DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) a DLL4 humano

puede determinarse usando ELISA. Un ensayo ELISA comprende preparar el antígeno DLL4, recubrir pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con antígeno, añadir a los pocillos el antagonista o anticuerpo de DLL4 conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina), incubar durante un periodo de tiempo, y detectar la presencia del agente de unión o anticuerpo. En algunos casos, el antagonista o anticuerpo de DLL4 no se conjuga con un compuesto detectable, sino que se añade al pocillo un segundo anticuerpo conjugado que reconoce el antagonista o anticuerpo de DLL4. En algunos casos, en lugar de recubrir el pocillo con antígeno DLL4, el antagonista o anticuerpo de DLL4 puede recubrirse en el pocillo, se añade antígeno al pocillo recubierto y después se añade un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable. Un experto en la técnica conocerá los parámetros que se pueden modificar y/u optimizar para aumentar la señal detectada, así como otras variaciones de ELISA que se pueden utilizar (véase, por ejemplo, Ausubel y col., Editores, 1994-presente, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY).

En un ejemplo alternativo no limitante, la unión específica de un antagonista de DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) al DLL4 humano puede determinarse usando FACS. Un ensayo de cribado de FACS puede comprender generar una construcción de ADNc que exprese un antígeno como una proteína de fusión, transfectar la construcción en células, expresar el antígeno en la superficie de las células, mezclar el antagonista de DLL4 con las células transfectadas, e incubar durante un periodo de hora. Las células unidas por el antagonista de DLL4 pueden identificarse usando un anticuerpo secundario conjugado con un compuesto detectable (por ejemplo, anticuerpo anti-Fc conjugado con PE) y un citómetro de flujo. Un experto en la técnica conocerá los parámetros que pueden modificarse para optimizar la señal detectada, así como otras variaciones de FACS que pueden mejorar el cribado.

La afinidad de unión de un antagonista (por ejemplo, anticuerpo) a su diana (por ejemplo, DLL4 o receptor Notch) y la tasa de asociación/disociación de una interacción agente de unión-antígeno se puede determinar mediante ensayos de unión competitivos. En algunos casos, un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno marcado (por ejemplo, ³H o ¹²⁵I), o un fragmento o variante del mismo, con el agente de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado seguido de la detección del agente unido al antígeno marcado. La afinidad del agente por el antígeno y las tasas de asociación/disociación pueden determinarse a partir de los datos mediante análisis de representación de Scatchard. En algunos casos, se utiliza el análisis cinético de Biacore para determinar las afinidades de unión y las tasas de asociación/disociación de antagonistas o agentes de unión. El análisis cinético de Biacore comprende analizar la unión y disociación de agentes de unión de antígenos (por ejemplo, proteínas DLL4 o Notch) que se han inmovilizado en la superficie de un chip Biacore. En algunos casos, los análisis cinéticos de Biacore se pueden utilizar para estudiar la unión de diferentes agentes de unión en ensayos cualitativos de unión de competencia de epitopos.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un inhibidor de la ruta Notch que es un agente de unión a DLL4. En algunos casos, el agente de unión a DLL4 es un antagonista de DLL4. En algunos casos, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo que se une específicamente a DLL4 humano. En algunos casos, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de DLL4 humano. En algunos casos, el anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de DLL4 humano comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISCYNGATNYNPKFKG (SEQ ID NO:2), YISSYNGATNYNPKFKG (SEQ ID NO:3), o YISVYNGATNYNPKFKG (SEQ ID NO:4), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5). En algunos casos, el anticuerpo comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8). En algunos casos, el anticuerpo comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8). En algunos casos, el antagonista de DLL4 es un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO: 1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNPKFKG (SEQ ID NO:3), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5), y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO: 8).

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de DLL4 humano, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, o SEQ ID NO:11; y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 11. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera

que tiene al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:9; y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un

95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:9 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 12. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:9 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 12. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10, y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:10 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:12. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 12. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:11; y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:11 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 12. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 11 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 12.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende el anticuerpo producido por el hibridoma depositado con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), en 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110, bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 28 de septiembre de 2007 y con el número de depósito de la ATCC PTA-8670, también conocido como 21M18 murino. El anticuerpo murino 21M18 se describe en detalle en la Patente de EE.UU. N.º 7.750.124, presentada el 28 de septiembre de 2007.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un anticuerpo que comprende las CDR de cadena pesada y las CDR de cadena ligera del anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la ATCC el 28 de septiembre de 2007 y que tiene el número de depósito de la ATCC PTA-8670.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera codificada por el ADN plasmídico depositado en la ATCC en 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110, bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 10 de mayo de 2007, y que tiene el número de depósito de la ATCC PTA-8425.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende el anticuerpo codificado por el ADN plasmídico depositado en la ATCC el 10 de mayo de 2007, que tiene el número de depósito de la ATCC PTA-8425, también conocido como 21M18 H7L2 y OMP-21M18. El anticuerpo OMP-21M18 se describe en detalle en la Patente de EE.UU. N.º 7.750.124, presentada el 28 de septiembre de 2007. Este anticuerpo también se conoce como demcizumab.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un inhibidor de la ruta Notch es un polipéptido. Los polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que se unen específicamente al DLL4 humano. En ciertos casos, un polipéptido comprende una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDR de demcizumab (OMP-21M18). En algunos casos, un polipéptido comprende CDR con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones de aminoácidos por CDR. En ciertos casos, las CDR de la cadena pesada están contenidas dentro de una región variable de cadena pesada. En ciertos casos, las CDR de la cadena ligera están contenidas dentro de una región variable de cadena ligera.

En algunos casos, un inhibidor de la ruta Notch comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, y SEQ ID NO:12.

En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de demcizumab. En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch comprende la cadena pesada y la cadena ligera del demcizumab (con o sin la secuencia líder). En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, demcizumab.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un antagonista de DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que compite por la unión específica a DLL4 humano con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 12. En ciertos casos, el antagonista de DLL4 compite con demcizumab por la unión específica a DLL4 humano. En algunos casos, el antagonista de DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) compite con demcizumab por la unión específica a DLL4 humano en un ensayo de unión competitiva *in vitro*.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un antagonista de DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) que se une al mismo epítipo, o esencialmente el mismo epítipo, en el DLL4 humano que un anticuerpo descrito en esta invención. En otro caso, un antagonista de DLL4 es un anticuerpo que se une a un epítipo en DLL4 humano que se superpone con el epítipo en DLL4 unido por un anticuerpo descrito en esta invención. En ciertos casos, el antagonista de DLL4 (por ejemplo, un anticuerpo) se une al mismo epítipo o esencialmente al mismo epítipo en DLL4 humano que demcizumab. En otro caso, el antagonista de DLL4 es un

anticuerpo que se une a un epítipo en DLL4 humano que se superpone con el epítipo en DLL4 unido por demcizumab.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un inhibidor de la ruta Notch que es un agente de unión a Notch. En algunos casos, el agente de unión a Notch es un antagonista del receptor Notch. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de Notch2 y/o Notch3 humanos. En algunos casos, el anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de Notch2 y/o Notch3 humanos comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:34), una CDR2 de cadena pesada que comprende

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35), y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO:36). En algunos casos, el anticuerpo comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37), una CDR2 de cadena ligera que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:38), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:39). En algunos casos, el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37), una CDR2 de cadena ligera que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:38), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:39). En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende SSSGMS (SEQ ID NO:34), una CDR2 de cadena pesada que comprende VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:35), y una CDR3 de cadena pesada que comprende SIFYTT (SEQ ID NO:36); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:37), una CDR2 de cadena ligera que comprende GASSRAT (SEQ ID NO:38), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQYSNFPI (SEQ ID NO:39).

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de Notch2 y/o Notch3 humanos, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:40; y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:41. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:40. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:41. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:40; y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:41. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:40 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:41. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:40 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:41.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera codificada por el ADN plasmídico depositado en la ATCC en 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110, bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 6 de julio de 2009, y que tiene el número de depósito de la ATCC PTA-10170, también conocido como 59R5 y OMP-59R5. El anticuerpo OMP-59R5 se describe en detalle en la Patente de EE.UU. N.º 8.226.943, presentada el 8 de julio de 2009. Este anticuerpo también se conoce como tarextumab.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une específicamente a una región proximal de la membrana que no se une al ligando del dominio extracelular de Notch1 humano. En algunos casos, el anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende RGYWIE (SEQ ID NO:46), una CDR2 de cadena pesada que comprende QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47), y una CDR3 de cadena pesada que comprende FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:48). En algunos casos, el anticuerpo comprende además una CDR1 de cadena ligera que comprende RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49), una CDR2 de cadena ligera que comprende GTNNRAP (SEQ ID NO:50), y una CDR3 de cadena ligera que comprende ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51). En algunos casos, el anticuerpo comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49), una CDR2 de cadena ligera que comprende GTNNRAP (SEQ ID NO:50), y una CDR3 de cadena ligera que comprende ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51). En algunos casos, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende RGYWIE (SEQ ID NO:46), una CDR2 de cadena pesada que comprende QILPGTGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO:47), y una CDR3 de cadena pesada que comprende FDGNYGYYAMDY (SEQ ID NO:48); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:49), una CDR2 de cadena ligera que comprende GTNNRAP (SEQ ID NO:50), y una CDR3 de cadena ligera que comprende ALWYSNHWVFGGGTKL (SEQ ID NO:51).

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un anticuerpo que se une específicamente a Notch1 humano, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:52; y/o una región variable

de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:53. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:52. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:53. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:52; y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:53. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:52 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:53. En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:52 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:53.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un anticuerpo que comprende las CDR de cadena pesada y CDR de cadena ligera del anticuerpo producido por el hibridoma depositado con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), en 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110, bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 7 de agosto de 2008 y con el número de depósito de la ATCC PTA9405, también conocido como 52M51 murino. El anticuerpo murino 52M51 se describe en detalle en la Patente de EE.UU. N.º 8.435.513, presentada el 8 de julio de 2009.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera codificada por el ADN plasmídico depositado en la ATCC en 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110, bajo las condiciones del Tratado de Budapest el 15 de octubre de 2008, y que tiene el número de depósito de la ATCC PTA-9549, también conocido como 52M51-H4L3 y OMP-h52M51. El anticuerpo OMP-h52M51 se describe en detalle en la Patente de EE.UU. N.º 8.435.513, presentada el 8 de julio de 2009. Este anticuerpo también se conoce como brontictuzumab.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un inhibidor de la ruta Notch es un polipéptido. Los polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que se unen específicamente a Notch2 y/o Notch3 humanos, y anticuerpos que se unen específicamente a Notch1 humano. En ciertos casos, un polipéptido comprende una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDR de tarextumab (OMP-59R5). En ciertos casos, un polipéptido comprende una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis de las CDR de brontictuzumab (OMP-h52M51). En algunos casos, un polipéptido comprende CDR con hasta cuatro (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4) sustituciones de aminoácidos por CDR. En ciertos casos, las CDR de la cadena pesada están contenidas dentro de una región variable de cadena pesada. En ciertos casos, las CDR de la cadena ligera están contenidas dentro de una región variable de cadena ligera.

En algunos casos, un inhibidor de la ruta Notch comprende un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO:40 y/o SEQ ID NO:41.

En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de tarextumab. En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch comprende la cadena pesada y la cadena ligera del tarextumab (con o sin la secuencia líder). En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch comprende, consiste esencialmente en, o consiste en tarextumab.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un antagonista del receptor Notch (por ejemplo, anticuerpo) que compite por la unión específica a Notch2 y/o Notch3 humanos con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:40 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:41. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch compite con tarextumab por la unión específica a Notch2 y/o Notch3 humanos. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch (por ejemplo, un anticuerpo) compite con tarextumab por la unión específica a Notch2 y/o Notch3 humanos en un ensayo de unión competitivo *in vitro*.

En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un antagonista del receptor Notch (por ejemplo, un anticuerpo) que se une al mismo epítipo, o esencialmente el mismo epítipo, en el Notch2 y/o Notch3 humanos que un anticuerpo descrito en esta invención. En otro caso, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une a un epítipo en Notch2 y/o Notch3 humanos que se superpone con el epítipo en Notch2 y/o Notch3 unidos por un anticuerpo descrito en esta invención. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch (por ejemplo, un anticuerpo) se une al mismo epítipo o esencialmente al mismo epítipo en Notch2 y/o Notch3 humanos que tarextumab. En otro caso, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une a un epítipo en Notch2 y/o Notch3 humanos que se superpone con el epítipo en Notch2 y/o Notch3 unidos por tarextumab.

En algunos casos, un inhibidor de la ruta Notch comprende un polipéptido que comprende una secuencia de SEQ ID NO:52 y/o SEQ ID NO:53.

En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de brontictuzumab. En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch comprende la cadena pesada y la cadena ligera del brontictuzumab (con o sin la secuencia líder). En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch

comprende, consiste esencialmente en, o consiste en brontictuzumab.

5 En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un antagonista del receptor Notch (por ejemplo, anticuerpo) que compite por la unión específica a Notch1 humano con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:52 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:53. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch compite con brontictuzumab por la unión específica a Notch1 humano. En algunos casos, el antagonista del receptor Notch (por ejemplo, un anticuerpo) compite con brontictuzumab por la unión específica a Notch1 humano en un ensayo de unión competitivo *in vitro*.

10 En ciertos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un procedimiento comprende un antagonista del receptor Notch (por ejemplo, un anticuerpo) que se une al mismo epítipo, o esencialmente el mismo epítipo, en Notch1 humano que un anticuerpo descrito en esta invención. En otro caso, un antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une a un epítipo en Notch1 humano que se superpone con el epítipo en Notch1 unido por un anticuerpo descrito en esta invención. En ciertos casos, el antagonista del receptor Notch (por ejemplo, un anticuerpo) se une al mismo epítipo o esencialmente al mismo epítipo en Notch1 humano brontictuzumab. En otro caso, el antagonista del receptor Notch es un anticuerpo que se une a un epítipo en Notch1 humano que se superpone con el epítipo en Notch1 unido por brontictuzumab.

20 En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo policlonal. Los anticuerpos policlonales se pueden preparar por cualquier procedimiento conocido. En algunos casos, los anticuerpos policlonales se generan inmunizando a un animal (por ejemplo, un conejo, rata, ratón, cabra, burro) mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno relevante (por ejemplo, un fragmento de péptido purificado, proteína recombinante de longitud completa, o proteína de fusión). El antígeno se puede conjugar opcionalmente con un vehículo tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) o albúmina sérica. El antígeno (con o sin una proteína transportadora) se diluye en una solución salina estéril y usualmente se combina con un adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund completo o incompleto) para formar una emulsión estable. Después de un periodo de tiempo suficiente, los anticuerpos policlonales se recuperan de la sangre y/o ascitos del animal inmunizado. Los anticuerpos policlonales pueden purificarse a partir de suero o ascitos según procedimientos estándar en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, y diálisis.

30 En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando procedimientos de hibridoma conocidos por un experto en la técnica. En algunos casos, usando el procedimiento de hibridoma, se inmuniza un ratón, hámster, rata u otro animal huésped apropiado, como se ha descrito anteriormente, para obtener de los linfocitos la producción de anticuerpos que se unirán específicamente al antígeno inmunizante. En algunos casos, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. En algunos casos, el antígeno inmunizante puede ser una proteína humana o una porción de la misma. En algunos casos, el antígeno inmunizante puede ser una proteína de ratón o una porción de la misma.

35 Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que, a continuación, se pueden seleccionar de linfocitos y células de mieloma no fusionadas. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno elegido pueden identificarse mediante una diversidad de procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, inmunoprecipitación, inmunotransferencia, y ensayo de unión *in vitro* (por ejemplo, citometría de flujo, FACS,

40 ELISA y radioinmunoensayo). Los hibridomas pueden propagarse en cultivo *in vitro* utilizando procedimientos estándar o *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales pueden purificarse a partir del medio de cultivo o fluido ascítico según procedimientos estándar en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, y diálisis.

45 En ciertos casos, los anticuerpos monoclonales se pueden hacer usando técnicas de ADN recombinante conocidas por un experto en la técnica. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan de los linfocitos B maduros o células de hibridoma, tal como por medio de RT-PCR usando cebadores oligonucleotídicos que amplifican específicamente genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, y su secuencia se determina usando técnicas convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesadas y ligeras se clonan a continuación en vectores de expresión adecuados que producen los anticuerpos monoclonales cuando se transfectan en células huésped tales como *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteínas de inmunoglobulina. En otros casos, los anticuerpos monoclonales recombinantes, o fragmentos de los mismos, pueden aislarse de bibliotecas de presentación en fagos.

55 El polinucleótido o polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal pueden modificarse adicionalmente de varias maneras diferentes usando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En algunos casos, los dominios constantes de las cadenas ligeras y pesadas de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón, pueden sustituirse por aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico, o por un polipéptido no inmunoglobulínico para generar un anticuerpo de fusión. En algunos casos, las regiones constantes se truncan o se eliminan para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal.

En algunos casos, la mutagénesis de sitio dirigido o de alta densidad de la región variable se puede usar para optimizar la especificidad, afinidad, etc. de un anticuerpo monoclonal.

En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo humanizado. Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de aminoácidos dentro de las CDR se reemplazan por residuos de aminoácidos de CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.) que tienen la especificidad, afinidad y/o capacidad de unión deseados usando procedimientos conocidos por un experto en la técnica.

En algunos casos, los residuos de aminoácidos de la región de estructura de una inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos de aminoácidos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana. En algunos casos, el anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de residuos de aminoácidos adicionales en la región de estructura y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar aún más la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá regiones de dominio variable que contienen todas, o sustancialmente todas, las CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana, mientras que todas, o sustancialmente todas, las regiones marco son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. En algunos casos, el anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente el de una inmunoglobulina humana. En ciertos casos, dichos anticuerpos humanizados se usan terapéuticamente porque pueden reducir las respuestas de antigenicidad y HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando se administran a un sujeto humano.

En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden prepararse directamente usando diversas técnicas conocidas en la técnica. En algunos casos, se pueden generar linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados de un individuo inmunizado que produce un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana. En algunos casos, el anticuerpo humano puede seleccionarse de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos. Como alternativa, la tecnología de visualización en fagos puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Las técnicas para la generación y uso de bibliotecas de fagos de anticuerpos son bien conocidas en la técnica y las bibliotecas de fagos de anticuerpos están disponibles comercialmente. Las estrategias de maduración de afinidad que incluyen, pero no se limitan a, barajado de cadenas y mutagénesis de sitio dirigido, se conocen en la técnica y pueden emplearse para generar anticuerpos humanos de alta afinidad.

En algunos casos, se pueden producir anticuerpos humanos en ratones transgénicos que contienen loci de inmunoglobulina humana. Estos ratones son capaces de producir, tras la inmunización, el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena.

Esta descripción incluye anticuerpos biespecíficos. En algunos casos, un anticuerpo biespecífico reconoce específicamente el DLL4 humano o un receptor Notch humano. Los anticuerpos biespecíficos son capaces de reconocer y unir específicamente al menos dos epítomos diferentes. Los diferentes epítomos pueden estar dentro de la misma molécula (por ejemplo, dos epítomos diferentes en DLL4 humano) o en diferentes moléculas (por ejemplo, un epítomo en DLL4 y un epítomo diferente en una segunda proteína). En algunos casos, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo intacto. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico es un fragmento de anticuerpo. En ciertos casos, el anticuerpo es multiespecífico. En algunos casos, el anticuerpo puede reconocer y unirse específicamente a una primera diana de antígeno (por ejemplo, DLL4 o un receptor Notch) así como a una segunda diana de antígeno (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, CD80 o CD86) o un receptor Fc (por ejemplo, CD64, CD32 o CD16). En algunos casos, el anticuerpo puede usarse para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno diana particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclidos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Los expertos en la técnica conocen técnicas para fabricar anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos.

En algunos casos, los procedimientos descritos comprenden un antagonista de DLL4 que es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a DLL4 humano y VEGF humano. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en el que el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYPLMDY (SEQ ID NO:22); en el que el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIX₁X₂YX₃X₄ATNYNQKFKG (SEQ ID NO:26), en la que X₁ es serina o alanina, X₂ es serina, asparagina, o glicina, X₃ es asparagina o lisina, y X₄ es glicina, arginina, o ácido aspártico, y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5); y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8). En algunos casos, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en el que el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena

pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22); en el que el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIANYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:24), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5); y en el que tanto el primer como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8). En algunos casos, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en el que el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22); en el que el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5); y en el que tanto el primer como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8). En algunos casos, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en el que el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22); en el que el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YIAGYKDATNYNQKFKG (SEQ ID NO:23), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5); y en el que tanto el primer como el segundo sitios de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8). En algunos casos, el anticuerpo biespecífico comprende: a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en el que el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22); en el que el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:25), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5); y en el que tanto el primer como el segundo sitio de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8).

En algunos casos, los procedimientos descritos comprenden un anticuerpo biespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente a DLL4 humano, en el que el primer sitio de unión a antígeno comprende una primera región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:30, el segundo sitio de unión a antígeno comprende una segunda región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:29; y en el que el primer y el segundo sitio de unión a antígeno comprenden una primera y una segunda región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 12.

En algunos casos, los procedimientos descritos comprenden un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a VEGF humano y se une específicamente a DLL4 humano, en el que el anticuerpo comprende una primera cadena pesada de SEQ ID NO:32 y una segunda cadena pesada de SEQ ID NO:31; y una primera y una segunda cadena ligera de SEQ ID NO:33.

En ciertos casos, el anticuerpo biespecífico se une específicamente a DLL4, así como a VEGF. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico descrito en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 13/625.417, presentada el 24 de septiembre de 2012. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico anti-VEGF/DLL4 es 219R45-MB-21M18, 219R45-MB-21R79, 219R45-MB-21R75 o 219R45-MB-21R83 (también conocido como 305B83 u OMP-305B83) como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 13/625.417, presentada el 24 de septiembre de 2012. En algunos casos, el anticuerpo biespecífico es OMP-305B83.

En algunos casos, el anticuerpo biespecífico se une específicamente a DLL4 y se une específicamente a PD-1.

En algunos casos, el anticuerpo biespecífico se une específicamente a DLL4 y se une específicamente a PD-L1.

En ciertos casos, los anticuerpos (u otros polipéptidos) descritos en esta invención pueden ser monoespecíficos. Por ejemplo, en ciertos casos, cada uno de los uno o más sitios de unión a antígeno que contienen un anticuerpo es capaz de unirse (o se une) a un epitopo homólogo en diferentes proteínas.

En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno. Los fragmentos de anticuerpo pueden tener funciones o capacidades diferentes de los anticuerpos intactos; por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden tener una mayor penetración tumoral. Se conocen diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo incluyendo, pero no limitándose a, digestión proteolítica de anticuerpos intactos. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento F(ab')₂ producido por la digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento Fab generado al reducir los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂. En otros casos, los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor. En ciertos casos, los fragmentos de anticuerpo se producen de forma recombinante. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fv o Fv monocatenarios (scFv). Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse y secretarse de E. coli u otras células huésped, lo que permite la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpo se aíslan de las bibliotecas de fagos de anticuerpos como se analiza en esta invención. Por ejemplo, se pueden usar procedimientos para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para DLL4 o un receptor Notch o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpo son fragmentos de anticuerpos lineales. En ciertos casos, los fragmentos de anticuerpo son mono-específicos o bio-específicos. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un scFv.

Se pueden usar diversas técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios específicos para el DLL4 humano o para un receptor Notch humano.

Además, puede ser deseable, especialmente en el caso de fragmentos de anticuerpo, modificar un anticuerpo para aumentar su semivida en suero. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión al receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo mediante la mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o incorporando el epítipo en una etiqueta peptídica que después se fusiona con el fragmento de anticuerpo en cada extremo o en el medio (por ejemplo, por síntesis de ADN o péptido). En algunos casos, un anticuerpo se modifica para disminuir su semivida en suero.

La descripción incluye inhibidores de la ruta Notch que son moléculas bio-específicas y/o bifuncionales. En algunos casos, las moléculas bio-específicas y/o bifuncionales son moléculas heterodiméricas. En algunos casos, las moléculas bio-específicas y/o bifuncionales son moléculas homodiméricas. En algunos casos, las moléculas homodiméricas son polipéptidos. En algunos casos, las moléculas heterodiméricas son polipéptidos. Generalmente, la molécula homodimérica comprende dos polipéptidos idénticos. Generalmente, la molécula heterodimérica comprende dos polipéptidos no idénticos. En algunos casos, una molécula heterodimérica es capaz de unir al menos dos dianas, por ejemplo, un agente bio-específico. Las dianas pueden ser, por ejemplo, dos proteínas diferentes en una sola célula o dos proteínas diferentes en dos células separadas. El término "brazo" puede usarse en esta invención para describir la estructura de una molécula homodimérica, una molécula heterodimérica y/o un anticuerpo bio-específico. En algunos casos, un "brazo" puede comprender un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. En algunos casos, una "molécula bio-específica homodimérica" comprende dos brazos idénticos. En algunos casos, una molécula bio-específica heterodimérica comprende dos brazos diferentes. Como se usa en esta invención, una molécula bio-específica heterodimérica puede ser un anticuerpo bio-específico.

En algunos casos, una molécula bio-específica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a DLL4 y un segundo brazo que comprende un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agonista de una diana. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un antagonista de una diana. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es una lincina o una citocina. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es una inmunoadhesión. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico se selecciona del grupo que consiste en, pero no se limita a, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleucina 3 (IL-3), interleucina 12 (IL-12), interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), ligando 4-1BB, GITRL, ligando OX40, CD40L, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CTLA-4, anticuerpo anti-OX40, anticuerpo anti-GITR, anticuerpo anti-TIGIT, anticuerpo anti-PDI, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-LAG-3, y anticuerpo anti-TIM-3.

En algunos casos, la molécula bio-específica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a DLL4 y un segundo brazo que se une a PD-1. En algunos casos, la molécula bio-específica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a DLL4 y un segundo brazo que se une a PD-L1. En algunos casos, la molécula bio-específica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a DLL4 y un segundo brazo que se une a CTLA-4. En algunos casos, la molécula bio-específica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a DLL4 y un segundo brazo que se une a TIGIT. En algunos casos, la molécula bio-específica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a DLL4 y un segundo brazo que se une a GITR. En algunos casos, la molécula bio-específica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a DLL4 y un segundo brazo que se une a OX40. En algunos casos, la molécula bio-específica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a DLL4 y un segundo brazo que se une a CD40. En algunos casos, la molécula bio-específica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a DLL4 y un segundo brazo que se une a LAG-3.

En algunos casos, una molécula biespecífica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a un receptor Notch y un segundo brazo que comprende un agente inmunoterapéutico. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un agonista de una diana. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es un antagonista de una diana. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es una linfocina o una citocina. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico es una inmunoadhesión. En algunos casos, el agente inmunoterapéutico se selecciona del grupo que consisten, pero no se limitan a, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleucina 3 (IL-3), interleucina 12 (IL-12), interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), ligando 4-1BB, GITRL, ligando OX40, CD40L, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CTLA-4, anticuerpo anti-OX40, anticuerpo anti-GITR, anticuerpo anti-TIGIT, anticuerpo anti-PDI, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-LAG-3, y anticuerpo anti-TIM-3.

En algunos casos, la molécula biespecífica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a un receptor Notch y un segundo brazo que se une a PD-1. En algunos casos, la molécula biespecífica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a un receptor Notch y un segundo brazo que se une a PD-L1. En algunos casos, la molécula biespecífica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a un receptor Notch y un segundo brazo que se une a CTLA-4. En algunos casos, la molécula biespecífica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a un receptor Notch y un segundo brazo que se une a TIGIT. En algunos casos, la molécula biespecífica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a un receptor Notch y un segundo brazo que se une a GITR. En algunos casos, la molécula biespecífica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a un receptor Notch y un segundo brazo que se une a OX40. En algunos casos, la molécula biespecífica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a un receptor Notch y un segundo brazo que se une a CD40. En algunos casos, la molécula biespecífica heterodimérica comprende un primer brazo que se une a un receptor Notch y un segundo brazo se une a LAG-3.

En algunos casos, el agente biespecífico heterodimérico comprende dos brazos, en el que cada brazo comprende un dominio CH3 humano, en el que cada dominio CH3 se modifica para promover la formación de heterodímeros. En algunos casos, el primer y segundo dominios CH3 se modifican usando una técnica de botón en ojal. En algunos casos, el primer y segundo dominios CD3 se modifican en función de los efectos electrostáticos.

También se describen anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir células inmunes a células no deseadas. También se contempla que los anticuerpos heteroconjugados se puedan preparar *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo.

Para los fines descritos, debe apreciarse que los anticuerpos modificados pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo con la diana (es decir, DLL4 humano o un receptor Notch). A este respecto, la región variable puede comprender o derivarse de cualquier tipo de mamífero que pueda inducirse a montar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno asociado a tumor deseado. Como tal, la región variable de los anticuerpos modificados puede ser, por ejemplo, de ser origen humano, murino, primate no humano (por ejemplo, monos cynomolgus, macacos, etc.) u conejo. En algunos casos, las regiones tanto variables como constantes de las inmunoglobulinas modificadas son humanas. En otros casos, las regiones variables de anticuerpos compatibles (usualmente derivados de una fuente no humana) se pueden genomanipular o adaptar específicamente para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. A este respecto, las regiones variables útiles en la presente descripción se pueden humanizar o alterarse de otro modo mediante la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.

En ciertos casos, los dominios variables tanto en la cadena pesada como en la ligera se alteran por al menos el reemplazo parcial de una o más CDR y, si es necesario, por el reemplazo parcial de la región de estructura y la modificación y/o alteración de secuencia. Aunque las CDR pueden derivarse de un anticuerpo de la misma clase o incluso de una subclase como el anticuerpo del que se derivan las regiones marco, se prevé que las CDR se derivarán preferiblemente de un anticuerpo de una especie diferente. Puede no ser necesario reemplazar todas las CDR con todas las CDR de la región variable del donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. Por el contrario, solo puede ser necesario transferir los residuos de aminoácidos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a antígeno.

A pesar de las alteraciones en la región variable, los expertos en la técnica apreciarán que los anticuerpos modificados descritos comprenderán anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa o fragmentos inmunorreactivos de los mismos) en los que al menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante se han eliminado o alterado de otro modo para proporcionar las características bioquímicas deseadas, tales como un aumento de la localización tumoral y/o una mayor semivida en suero en comparación con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o inalterada. En algunos casos, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones a la región constante compatible con los anticuerpos descritos comprenden adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más

aminoácidos en uno o más dominios. Los anticuerpos modificados descritos en esta invención pueden comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o en el dominio constante de cadena ligera (CL). En algunos casos, uno o más dominios se eliminan parcial o totalmente de las regiones constantes de los anticuerpos modificados. En algunos casos, los anticuerpos modificados comprenderán construcciones o variantes eliminadas del dominio en las que se ha eliminado todo el dominio CH2 (construcciones Δ CH2). En algunos casos, el dominio omitido de la región constante se reemplaza por un espaciador de aminoácidos corto (por ejemplo, 10 residuos de aminoácidos) que proporciona parte de la flexibilidad molecular típicamente impartida por la región constante ausente.

En algunos casos, los anticuerpos modificados están genomanipulados para fusionar el dominio CH3 directamente a la región bisagra del anticuerpo. En otros casos, se inserta un espaciador peptídico entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, se pueden expresar construcciones en las que el dominio CH2 se ha eliminado y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) se une a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Tal espaciador puede añadirse para asegurar que los elementos reguladores del dominio constante permanezcan libres y accesibles o que la región de bisagra permanezca flexible. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los separadores de aminoácidos pueden, en algunos casos, probar ser inmunogénicos y provocar una respuesta inmunitaria no deseada contra la construcción. Por consiguiente, en ciertos casos, cualquier espaciador añadido a la construcción será relativamente no inmunogénico para mantener las cualidades biológicas deseadas de los anticuerpos modificados.

En algunos casos, los anticuerpos modificados pueden tener solo una delección parcial de un dominio constante o sustitución de unos pocos o incluso un solo aminoácido. Por ejemplo, la mutación de un solo aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión de Fc y, por lo tanto, aumentar la localización de las células cancerosas y/o la penetración tumoral. De manera similar, puede ser deseable simplemente eliminar la parte de uno o más dominios de región constante que controlan una función efectora específica (por ejemplo, la unión del complemento C1q). Dichas delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (semivida en suero) mientras dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante del sujeto. Además, como se aludió anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden modificarse a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que mejora el perfil de la construcción resultante. A este respecto, puede ser posible interrumpir la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión de Fc) mientras se mantiene sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. En ciertos casos, los anticuerpos modificados comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para mejorar las características deseables, tales como disminuir o aumentar la función efectora o proporcionar más sitios de unión a citotoxinas o carbohidratos.

Se sabe en la técnica que la región constante media en varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a la región Fc de los anticuerpos IgG o IgM (unidos al antígeno) activa el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y la lisis de los patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar involucrada en la hipersensibilidad autoinmune. Además, la región Fc de un anticuerpo puede unirse a una célula que expresa un receptor Fc (FcR). Hay una serie de receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores epsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares desencadena una cantidad de respuestas biológicas importantes y diversas, incluyendo la inmersión y destrucción de partículas recubiertas de anticuerpos, la depuración de complejos inmunes, la lisis de las células diana recubiertas de anticuerpos por las células asesinas, la liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia de placentas, y el control de la producción de inmunoglobulinas.

En ciertos casos, los inhibidores de la ruta Notch son anticuerpos que proporcionan funciones efectoras alteradas. Estas funciones efectoras alteradas pueden afectar el perfil biológico del anticuerpo administrado. Por ejemplo, en algunos casos, la delección o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión al receptor Fc del anticuerpo modificado circulante (por ejemplo, anticuerpo anti-DLL4 o anticuerpo anti-receptor Notch) aumentando así localización de células cancerosas y/o la penetración tumoral. En otros casos, las modificaciones de la región constante aumentan o reducen la semivida en suero del anticuerpo. En algunos casos, la región constante se modifica para eliminar enlaces disulfuro o restos oligosacáridos. Las modificaciones a la región constante según la descripción pueden hacerse fácilmente usando técnicas bioquímicas o de ingeniería molecular bien conocidas dentro del alcance del experto en la técnica.

En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo que no tiene una o más funciones efectoras. Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo no tiene actividad ADCC, y/o no tiene actividad CDC. En ciertos casos, el anticuerpo no se une a un receptor Fc, y/o factores complementarios. En ciertos casos, el anticuerpo no tiene función efectora.

La presente descripción abarca además variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, expuestos en esta invención. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservadoras.

En ciertos casos, los anticuerpos descritos en esta invención están aislados. En ciertos casos, los anticuerpos descritos en esta invención son sustancialmente puros.

En algunos casos de la presente descripción, los inhibidores de la ruta Notch son polipéptidos. Los polipéptidos pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos que comprenden un anticuerpo, o fragmento del mismo, que se une a DLL4 humano o se une a uno o más receptores Notch humanos. Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias de aminoácidos descritas pueden variarse sin un efecto significativo sobre la estructura o función de la proteína. Por lo tanto, la descripción incluye además variaciones de los polipéptidos que muestran una actividad sustancial o que incluyen regiones de un anticuerpo, o fragmento del mismo, contra DLL4 humano o uno o más receptores Notch humanos. En algunos casos, las variaciones de secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de unión a DLL4 o los polipéptidos de unión a Notch incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y/u otros tipos de sustituciones.

Los polipéptidos, análogos y variantes de los mismos, pueden modificarse adicionalmente para contener restos químicos adicionales que normalmente no forman parte del polipéptido. Los restos derivatizados pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica y/o la absorción del polipéptido. Los restos también pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario no deseado de los polipéptidos y variantes. Se puede encontrar una descripción general de los restos químicos en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22ª Edición, 2012*, Pharmaceutical Press, Londres.

Los polipéptidos aislados descritos en esta invención pueden producirse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Dichos procedimientos van desde procedimientos de síntesis directa de proteínas hasta la construcción de una secuencia de ADN que codifica secuencias de polipéptidos y que expresa estas secuencias en un huésped adecuado. En algunos casos, una secuencia de ADN se construye utilizando tecnología recombinante aislando o sintetizando una secuencia de ADN que codifica una proteína natural de interés. Opcionalmente, la secuencia puede mutagenizarse mediante mutagénesis de sitio específico para proporcionar análogos funcionales de la misma.

En algunos casos, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés puede construirse mediante síntesis química usando un sintetizador de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos pueden diseñarse basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando aquellos codones que se favorecen en la célula huésped en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés. Se pueden aplicar procedimientos estándar para sintetizar una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de interés aislado. Por ejemplo, se puede usar una secuencia de aminoácidos completa para construir un gen retrotraducido. Además, se puede sintetizar un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido aislado particular. Por ejemplo, varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones del polipéptido deseado pueden sintetizarse y, a continuación, ligarse. Los oligonucleótidos individuales contienen típicamente salientes 5' o 3' para el ensamblaje complementario.

Una vez ensambladas (por síntesis, mutagénesis de sitio dirigido, u otro procedimiento), las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido particular de interés pueden insertarse en un vector de expresión y unirse operativamente a una secuencia de control de expresión apropiada para la expresión de la proteína en un huésped deseado. El ensamblaje adecuado puede confirmarse mediante secuenciación de nucleótidos, mapeo de enzimas de restricción, y/o expresión de un polipéptido biológicamente activo en un huésped adecuado. Como se conoce bien en la técnica, para obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un huésped, el gen debe estar unido operativamente a secuencias de control de la expresión transcripcional y traduccional que sean funcionales en el huésped de expresión elegido.

En ciertos casos, los vectores de expresión recombinantes se usan para amplificar y expresar polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos), o fragmentos de los mismos, que se unen a DLL4 humano o uno o más receptores Notch humanos. Por ejemplo, los vectores de expresión recombinantes pueden ser construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican una cadena de polipéptidos de un anticuerpo anti-DLL4 o un fragmento del mismo, unidos operativamente a elementos reguladores transcripcionales y/o traduccionales adecuados derivados de genes de mamíferos, microbios, virus o insectos. Una unidad transcripcional generalmente comprende un conjunto de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en la proteína, y (3) secuencias apropiadas de inicio y terminación de la transcripción y la traducción. Los elementos reguladores pueden incluir una secuencia de operador para controlar la transcripción. La capacidad de replicarse en un huésped, usualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes se puede incorporar adicionalmente. Las regiones de ADN están "unidas operativamente" cuando están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (líder secretor) se une operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está posicionado de manera que permita la traducción. En algunos casos, los elementos estructurales destinados para su uso en sistemas de expresión de levadura incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por una célula huésped de levadura. En otros casos, cuando la proteína

recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo de metionina N-terminal. Este residuo opcionalmente se puede escindir posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

5 La elección de una secuencia de control de expresión y un vector de expresión depende de la elección del huésped. Se puede emplear una amplia diversidad de combinaciones huésped/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *E. coli*, incluyendo pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, y plásmidos de rango de huésped más amplio, tales como M13 y otros fagos filamentosos de ADN monocatenario.

10 Las células huésped adecuadas para la expresión de un polipéptido incluyen procariotas, células de levadura, células de insectos o células eucariotas superiores. Los procariotas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacillus*. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero como se describe a continuación. También se pueden emplear sistemas de traducción libres de células. Los expertos en la técnica conocen vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamífero.

15 Se usan diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar polipéptidos recombinantes. Se puede preferir la expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero porque dichas proteínas generalmente están plegadas correctamente, modificadas de manera apropiada, y son biológicamente funcionales. Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero adecuadas incluyen líneas celulares COS-7 (derivadas de riñón de mono), L-929 (derivadas de fibroblastos murinos), C127 (derivadas de tumor de mama murino), 3T3 (derivadas de fibroblastos murinos), CHO (derivadas de ovario de hámster chino), HeLa (derivadas de cáncer cervical humano), BHK (derivadas de fibroblastos de riñón de hámster), HEK-293 (derivadas de riñón embrionario humano), y variantes de las mismas. Los vectores de expresión en mamíferos pueden comprender elementos no transcritos, tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados unidos al gen a expresar, y otras secuencias no transcritas flanqueantes 5' o 3', y secuencias no traducidas 5' o 3', tales como sitios de unión a ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donadores y aceptores de corte y empalme, y secuencias de terminación transcripcional.

20 La expresión de proteínas recombinantes en sistemas de cultivo de células de insecto (por ejemplo, baculovirus) también ofrece un procedimiento robusto para producir proteínas plegadas correctamente y biológicamente funcionales. Los expertos en la técnica conocen bien los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto.

25 Por lo tanto, la presente descripción proporciona células que comprenden un inhibidor de la ruta Notch descrito en esta invención. En algunos casos, las células producen los inhibidores de la ruta Notch (por ejemplo, anticuerpos) descritos en esta invención. En ciertos casos, las células producen un anticuerpo. En ciertos casos, las células producen demcizumab. En ciertos casos, las células producen OMP-305B83. En ciertos casos, las células producen tarextumab. En ciertos casos, las células producen brontictuzumab.

30 Las proteínas producidas por un huésped transformado pueden purificarse según cualquier procedimiento adecuado. Los procedimientos estándar incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía en columna de intercambio iónico, de afinidad y de dimensionamiento), centrifugación, solubilidad diferencial, o cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Las etiquetas de afinidad tales como hexahistidina, el dominio de unión a maltosa, la secuencia de la capa de influenza, y la glutatión-S-transferasa se pueden unir a la proteína para permitir una fácil purificación pasando por una columna de afinidad apropiada. Las proteínas aisladas también pueden caracterizarse físicamente utilizando dichas técnicas como proteólisis, espectrometría de masas (MS), resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), y cristalografía de rayos X.

35 En algunos casos, los sobrenadantes de los sistemas de expresión que secretan proteínas recombinantes en los medios de cultivo se pueden concentrar primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. En algunos casos, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. En algunos casos, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. En algunos casos, se puede emplear un medio de hidroxiapatita, incluyendo, pero no limitándose a, hidroxiapatita cerámica (CHT). En ciertos casos, se pueden emplear una o más etapas de HPLC de fase inversa que emplean medios RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene metilo colgante u otros grupos alifáticos, para purificar adicionalmente un agente de unión. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, también pueden emplearse para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

40 En algunos casos, la proteína recombinante producida en cultivo bacteriano puede aislarse, por ejemplo, mediante la extracción inicial de sedimentos celulares, seguida de una o más etapas de concentración, desalinización, intercambio

iónico acuoso, o cromatografía de exclusión por tamaño. Se puede emplear un análisis por HPLC para las etapas finales de purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante pueden interrumpirse por cualquier procedimiento conveniente, incluido un ciclo de congelación-descongelación, sonicación, interrupción mecánica, o el uso de agentes de lisis celular.

5 En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es una molécula pequeña.

En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch puede usarse en cualquiera de una serie de formas conjugadas (es decir, un inmunoc conjugado o radioconjugado) o no conjugadas. En ciertos casos, los anticuerpos pueden usarse en una forma no conjugada para aprovechar los mecanismos de defensa naturales del sujeto, incluida la citotoxicidad dependiente del complemento y la toxicidad celular dependiente de anticuerpos para eliminar las células neoplásicas o cancerosas.

10 En algunos casos, el inhibidor de la ruta Notch se conjuga con un agente citotóxico. En algunos casos, el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico que incluye, pero no se limita a, metotrexato, adriamicina, doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes. En algunos casos, el agente citotóxico es una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma, incluyendo, pero no limitándose a, cadena de difteria A, fragmentos activos de no unión de toxina de difteria, cadena de exotoxina A, cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII y PAPS), inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de Sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. En algunos casos, el agente citotóxico es un radioisótopo para producir un radioconjugado o un anticuerpo radioconjugado. Hay una diversidad de radionúclidos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados incluyendo, pero no limitándose a, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹¹¹In, ¹³¹In, ¹⁰⁵Rh, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re y ²¹²Bi. En algunos casos, se pueden producir conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una calicheamicina, maytansinoides, un tricoteno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina. En ciertos casos, los conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico se preparan usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-pirididil) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutarealdehído), compuestos de bis-azido (tal como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno).

25 En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, anticuerpo) es un antagonista de DLL4. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch inhibe la actividad de DLL4. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch inhibe al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 90 %, o aproximadamente el 100 % de la actividad de DLL4.

35 En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, anticuerpo) inhibe la unión de DLL4 a un receptor apropiado. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch inhibe la unión de DLL4 a una o más proteínas Notch humanas. En algunos casos, la una o más proteínas Notch humanas se seleccionan del grupo que consiste en: Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4. En ciertos casos, la inhibición de la unión de DLL4 a una proteína Notch por un inhibidor de la ruta Notch es de al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %. En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch que inhibe la unión de DLL4 a una proteína Notch también inhibe la señalización de la ruta Notch. En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch que inhibe la señalización de la ruta Notch humana es demcizumab.

45 En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, anticuerpo) es un antagonista de uno o más receptores Notch. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch inhibe la actividad de Notch1, Notch2 y/o Notch3. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch inhibe al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 90 %, o aproximadamente el 100 % de la actividad de Notch1, Notch2 y/o Notch3.

50 En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch (por ejemplo, anticuerpo) inhibe la unión de un receptor Notch a un ligando apropiado. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch inhibe la unión de un receptor Notch a uno o más ligandos de Notch humano. En algunos casos, el uno o más ligandos de Notch humano se seleccionan del grupo que consiste en: DLL1, DLL3, DLL4, JAG1 y JAG2. En ciertos casos, la inhibición de la unión de un receptor Notch a un ligando de Notch por un inhibidor de la ruta Notch es de al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %. En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch que inhibe la unión de un receptor Notch a un ligando de Notch también inhibe la señalización de la ruta Notch. En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch que inhibe la señalización de la ruta Notch humana es tarextumab. En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch que inhibe la señalización de la ruta Notch humana es brontictuzumab.

En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch tiene uno o más de los siguientes efectos: inhibir la proliferación de células tumorales, inhibir el crecimiento tumoral, reducir la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, reducir la tumorigenicidad de un tumor, reducir la tumorigenicidad de un tumor al reducir la frecuencia de células madre cancerosas en el tumor, desencadenar la muerte celular de las células tumorales, inducir a las células en un tumor a diferenciarse, diferenciar las células tumorigénicas a un estado no tumorigénico, inducir la expresión de marcadores de diferenciación en las células tumorales, prevenir la metástasis de las células tumorales, disminuir la supervivencia de las células tumorales, o modular una respuesta inmunitaria.

En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch es capaz de reducir la tumorigenicidad de un tumor. En ciertos casos, un inhibidor de la ruta Notch es capaz de reducir la tumorigenicidad de un tumor que comprende células madre cancerosas en un modelo animal, tal como un modelo de ratón. En ciertos casos, la cantidad o frecuencia de células madre cancerosas en un tumor se reduce al menos aproximadamente dos veces, aproximadamente tres veces, aproximadamente cinco veces, aproximadamente diez veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1000 veces. En ciertos casos, la reducción en el número o frecuencia de células madre cancerosas se determina limitando el ensayo de dilución usando un modelo animal. Se pueden encontrar ejemplos y directrices adicionales sobre el uso de ensayos de dilución limitantes para determinar una reducción en el número o la frecuencia de células madre cancerosas en un tumor, por ejemplo, en el número de publicación internacional WO 2008/042236, y en las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 2008/0064049 y 2008/0178305.

En ciertos casos, los inhibidores de la ruta Notch descritos en esta invención son activos *in vivo* durante al menos 1 hora, al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 5 horas, al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 1 semana, o al menos aproximadamente 2 semanas. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG2) que es activo *in vivo* durante al menos 1 hora, al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 5 horas, al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 1 semana, o al menos aproximadamente 2 semanas. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es una proteína de fusión que es activa *in vivo* durante al menos 1 hora, al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 5 horas, al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 1 semana, o al menos aproximadamente 2 semanas.

En ciertos casos, los inhibidores de la ruta Notch descritos en esta invención tienen una semivida circulante en ratones, monos cynomolgus o seres humanos de al menos aproximadamente 5 horas, al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 1 semana, o al menos aproximadamente 2 semanas. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es un anticuerpo IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2 o IgG4) que tiene una semivida circulante en ratones, monos cynomolgus o seres humanos de al menos aproximadamente 5 horas, al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 1 semana, o al menos aproximadamente 2 semanas. En ciertos casos, el inhibidor de la ruta Notch es una proteína de fusión que tiene una semivida circulante en ratones, monos cynomolgus o seres humanos de al menos aproximadamente 5 horas, al menos aproximadamente 10 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 1 semana o al menos aproximadamente 2 semanas. En la técnica se conocen procedimientos para aumentar (o disminuir) la semivida de agentes tales como polipéptidos y anticuerpos. Por ejemplo, los procedimientos conocidos para aumentar la semivida circulante de los anticuerpos IgG incluyen la introducción de mutaciones en la región Fc que aumentan la unión dependiente del pH del anticuerpo al receptor Fc neonatal (FcRn). Los procedimientos conocidos para aumentar la semivida circulante de fragmentos de anticuerpos que carecen de la región Fc incluyen técnicas tales como PEGilación.

IV. Agentes inmunoterapéuticos

La presente descripción proporciona inhibidores de la ruta Notch para su uso en terapia de combinación con agentes inmunoterapéuticos para modular las respuestas inmunitarias, inhibir el crecimiento tumoral, y/o para el tratamiento del cáncer. En algunos casos de los procedimientos descritos en esta invención, un agente inmunoterapéutico se selecciona del grupo que consiste en: un modulador de la actividad de PD-1, un modulador de la actividad de PD-L1, un modulador de la actividad de PD-L2, un modulador de la actividad de CTLA-4, un modulador de la actividad de CD28, un modulador de la actividad de CD80, un modulador de la actividad de CD86, un modulador de la actividad de 4-1BB, un modulador de la actividad de OX40, un modulador de la actividad de KIR, un modulador de la actividad de Tim-3, un modulador de la actividad de LAG3, un modulador de la actividad de CD27, un modulador de la actividad de CD40, un modulador de la actividad de GITR, un modulador de la actividad de TIGIT, un modulador de la actividad de CD20, un modulador de la actividad de CD96, un modulador de la actividad deIDO 1, una citocina, un quimiocina, un interferón, una interleucina, una linfoquina, un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), y un oligonucleótido inmunoestimulador.

En algunos casos, un agente inmunoterapéutico se selecciona del grupo que consiste en: un antagonista de PD-1, un antagonista de PD-L1, un antagonista de PD-L2, un antagonista de CTLA-4, un antagonista de CD80, un antagonista

de CD86, un antagonista de KIR, un antagonista de Tim-3, un antagonista de LAG3, un antagonista de TIGIT, un antagonista de CD20, un antagonista de CD96, un antagonista de IDO1, y/o un antagonista de KIR.

5 En algunos casos, un agente inmunoterapéutico se selecciona del grupo que consiste en: un agonista de CD28, un agonista de 4-1BB, un agonista de OX40, un agonista de CD27, un agonista de CD80, un agonista de CD86, un agonista de CD40, y un agonista de GITR.

En algunos casos, un agente inmunoterapéutico incluye, pero no se limita a, citocinas tales como quimiocinas, interferones, interleucinas, linfocinas y miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). En algunos casos, un agente inmunoterapéutico incluye oligonucleótidos inmunoestimuladores, tales como los dinucleótidos CpG.

10 En algunos casos, un agente inmunoterapéutico incluye, pero no se limita a, anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1, anticuerpos anti-PD-L2, anticuerpos anti-CTLA-4, anticuerpos anti-CD28, anticuerpos anti-CD80, anticuerpos anti-CD86, anticuerpos anti-4-1BB, anticuerpos anti-OX40, anticuerpos anti-KIR, anticuerpos anti-Tim-3, anticuerpos anti-LAG3, anticuerpos anti-CD27, anticuerpos anti-CD40, anticuerpos anti-GITR, anticuerpos anti-TIGIT, anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-CD96, y anticuerpos anti-IDO1.

15 En algunos casos, un antagonista de PD-1 es un anticuerpo que se une específicamente a PD-1. En algunos casos, el anticuerpo que se une a PD-1 es pembrolizumab (KEYTRUDA, MK-3475), pidilizumab (CT-011), nivolumab (OPDIVO, BMS-936558, MDX-1106), MEDI0680 (AMP-514), REGN2810, BGB-A317, PDR-001 o STI-A1110. En algunos casos, el anticuerpo que se une a PD-1 se describe en la publicación PCT WO 2014/179664, por ejemplo, un anticuerpo identificado como APE2058, APE1922, APE1923, APE1924, APE 1950 o APE1963, o un anticuerpo que comprende las regiones CDR de cualquiera de estos anticuerpos. En otros casos, un antagonista de PD-1 es una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de PD-L1 o PD-L2, por ejemplo, AMP-224. En otros casos, un antagonista de PD-1 es un inhibidor de péptidos, por ejemplo, AUNP-12.

25 En algunos casos, un antagonista de PD-L1 es un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1. En algunos casos, el anticuerpo que se une a PD-L1 es atezolizumab (RG7446, MPDL3280A), durvalumab (MEDI4736), BMS-936559 (MDX-1105), avelumab (MSB-0010718C), KD033, la porción de anticuerpo de KD033 o STI-A1014. En algunos casos, el anticuerpo que se une a PD-L1 se describe en la publicación PCT WO 2014/055897, por ejemplo, Ab-14, Ab-16, Ab-30, Ab-31, Ab-42, Ab-50, Ab- 52, o Ab-55, o un anticuerpo que comprende las regiones CDR de cualquiera de estos anticuerpos.

30 En algunos casos, un antagonista de CTLA-4 es un anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4. En algunos casos, el anticuerpo que se une a CTLA-4 es ipilimumab (YERVOY) o tremelimumab (CP-675,206). En algunos casos, un antagonista de CTLA-4 es una proteína de fusión de CTLA-4 o un receptor CTLA-4 soluble, por ejemplo, KAHR-102.

En algunos casos, un antagonista de KIR es un anticuerpo que se une específicamente a KIR. En algunos casos, el anticuerpo que se une a KIR es lirilumab.

35 En algunos casos, un antagonista de LAG3 es un anticuerpo que se une específicamente a LAG3. En algunos casos, el anticuerpo que se une a LAG3 es IMP701, IMP731, BMS-986016, LAG525 y GSK2831781. En algunos casos, un antagonista de LAG3 es una proteína de fusión de LAG3 o un receptor LAG3 soluble, por ejemplo, IMP321.

En algunos casos, un antagonista de IDO1 es indoximad (NLG-9189), epacadostat (INCB024360) o NLG0919.

En algunos casos, un agente inmunoterapéutico es un agonista de CD28, un agonista de 4-1BB, un agonista de OX40, un agonista de CD27, un agonista de CD80, un agonista de CD86, un agonista de CD40, o un agonista de GITR.

40 En algunos casos, un agonista de OX40 comprende un ligando OX40, o una porción de unión a OX40 del mismo. En algunos casos, un agonista de OX40 es MEDI6383. En algunos casos, el agonista de OX40 es un anticuerpo que se une específicamente a OX40. En algunos casos, el anticuerpo que se une a OX40 es MEDI6469, MEDI0562 o MOXR0916 (RG7888). En algunos casos, el anticuerpo que se une a OX40 se describe en la publicación PCT WO 2012/027328, por ejemplo, anticuerpo ratón 119-122, Ch119-122, Hu199-122, o 106-222, o un anticuerpo que comprende las regiones CDR de cualquiera de estos anticuerpos. En algunos casos, un agonista de OX40 es un vector (por ejemplo, un vector o virus de expresión, tal como un adenovirus) capaz de expresar el ligando OX40. En algunos casos, el vector que expresa OX40L es Delta-24-RGDOX o DNX2401.

50 En algunos casos, un agonista de 4-1BB (CD137) es una molécula de unión, tal como una anticalina. En algunos casos, la anticalina es PRS-343. En algunos casos, un agonista de 4-1BB es un anticuerpo que se une específicamente a 4-1BB. En algunos casos, el anticuerpo que se une a 4-1BB es PF-2566 (PF-05082566) o urelumab (BMS-663513).

En algunos casos, un agonista de CD27 es un anticuerpo que se une específicamente a CD27. En algunos casos, el anticuerpo que se une a CD27 es varlilumab (CDX-1127).

En algunos casos, un agonista de GITR comprende un ligando GITR o una porción de unión a GITR del mismo.

En algunos casos, un agonista de G1TR es un anticuerpo que se une específicamente a G1TR. En algunos casos, el anticuerpo que se une a G1TR es TRX518, MK-4166 o INBRX-110.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

5 Efecto del anticuerpo anti-DLL4 en la expresión de PD-1 en células de tumores CT26.WT

10 El carcinoma de colon murino CT26.WT se obtuvo en la ATCC. Se inyectaron por vía subcutánea células CT26.WT en el costado trasero de ratones Balb/C de 6-8 semanas de edad. Se permitió que los tumores crecieran hasta alcanzar un tamaño promedio de 200 mm³. Los ratones se asignaron al azar en grupos (n = 10) y se trataron con anticuerpo anti-DLL4 de ratón (mDLL4) 21R30 (10 mg/kg, semanalmente), proteína SIRPα-Fc (10 mg/kg, quincenalmente), o una proteína de control Fc (10 mg/kg, semanalmente). Los agentes se administraron por inyección en la cavidad intraperitoneal. Catorce días después de la dosis inicial, se extrajeron los tumores y se aisló la proteína total de ratones individuales usando tampón de extracción de tejido (Life Technologies). Las proteínas (20 µg) se resolvieron mediante electroforesis en gel SDS-PAGE, y el análisis de transferencia Western se realizó usando un anticuerpo anti-PD-1.

15 Como se muestra en la figura 1A, la expresión de PD-1 en lisados de células tumorales de ratones tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 disminuyó significativamente (p <0,05) en relación con la expresión de PD-1 en lisados de células tumorales de ratones tratados con el control. Esta disminución fue mayor que la disminución en los lisados de células tumorales de ratones tratados con una proteína SIRPα-Fc. La figura 1B muestra un análisis de transferencia Western representativo de cuatro tumores individuales de cada grupo de tratamiento.

20 PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada) se expresa en la superficie de linfocitos T, linfocitos B, células NK y macrófagos activados y se ha demostrado que regula negativamente las respuestas inmunes, incluidas las respuestas antitumorales. Dado que PD-1 no se expresa en la superficie de las células tumorales, estos resultados sugieren que el tratamiento con anticuerpos anti-DLL4 puede afectar directa o indirectamente a la expresión de PD-1 en las células inmunes asociadas a tumores. Esto sugiere que los anticuerpos anti-DLL4 u otros antagonistas de DLL4 podrían inhibir o bloquear potencialmente la actividad supresora de las células de expresión de PD-1 y mejorar las respuestas inmunitarias antitumorales.

Ejemplo 2

Efecto de IL-2-Fc de ratón y anticuerpo anti-mDLL4 sobre el crecimiento tumoral

30 Las células CT26.WT de carcinoma de colon murino se inyectaron por vía subcutánea en los costados de ratones Balb/C de 6-8 semanas de edad. Se permitió que los tumores crecieran hasta un volumen tumoral promedio de 100 mm³. Los ratones se asignaron al azar en grupos (n = 10) y se trataron con el anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (30 mg/kg, semanalmente), proteína mL-2-Fc (1 mg/kg, 5 días a la semana), o una combinación de anticuerpos anti-mDLL4 y mL-2-Fc. Se usaron un anticuerpo anti-GFP y una proteína Fc murina como controles para 21R30 y mL-2-Fc, respectivamente. Los agentes se administraron por inyección intraperitoneal. Se monitorizó el crecimiento tumoral y se midieron los volúmenes tumorales usando calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como volumen tumoral promedio ± SEM.

35 Como se muestra en la figura 2A, el anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y mL-2-Fc inhibieron el crecimiento de tumor CT26.WT como agentes únicos en comparación con el control. Además, una combinación del anticuerpo anti-mDLL4 y mL-2-Fc inhibió el crecimiento tumoral en mayor medida que cualquiera de los agentes en solitario.

40 Este experimento se repitió para evaluar el efecto de los agentes sobre tumores establecidos más grandes. Como se ha descrito anteriormente, se inyectaron células CT26.WT por vía subcutánea en los costados traseros de ratones Balb/C de 6-8 semanas de edad, pero se permitió que los tumores crecieran hasta un volumen tumoral promedio de 400 mm³. Los ratones se asignaron al azar en grupos (n = 6) y se trataron con un anticuerpo de control anti-GFP (30 mg/kg, semanalmente), anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (30 mg/kg, semanalmente), proteína mL-2-Fc (1 mg/kg, 5 días a la semana), o una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 y mL-2-Fc. Los agentes se administraron por inyección intraperitoneal. Se monitorizó el crecimiento tumoral y se midieron los volúmenes tumorales usando calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como volumen tumoral promedio ± SEM.

45 Como se muestra en la figura 2B, cuando los tumores son más grandes y están más establecidos, la combinación del anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y mL-2-Fc tuvo un efecto mucho mayor en la inhibición del crecimiento de tumores CT26.WT que cualquiera de los agentes en solitario o el control.

50 Se realizó un experimento similar con un tumor de pulmón murino. Se estableció un modelo de ratón de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en OncoMed y en esta invención se denomina KP_LUN01. Se observó que esta línea tumoral tenía una morfología poco diferenciada, una latencia tumoral muy corta *in vivo*, y era altamente metastásica.

Se inyectaron por vía subcutánea células KP_LUN01 de tumor de pulmón murino (50.000 células) en los costados de ratones C57BL/6J de 6-8 semanas de edad (Día 0). Se permitió que los tumores crecieran durante 8 días hasta un volumen tumoral promedio de 100 mm³. Los ratones se asignaron al azar en grupos (n = 10) y se trataron con un anticuerpo de control anti-GFP (20 mg/kg), anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (20 mg/kg, los días 8, 15 y 19), mL2-Fc proteína (1 mg/kg, en los días 11, 12, 13, 14, 15 y 19), o una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 y mL2-Fc (mismas dosis y administración como agentes únicos). Los agentes se administraron por inyección intraperitoneal. Se monitorizó el crecimiento tumoral y se midieron los volúmenes tumorales usando calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como volumen tumoral promedio ± SEM.

Como se muestra en la figura 2C, el anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y mL2-Fc inhibieron el crecimiento de los tumores KP_LUN01 como agentes únicos en comparación con el control. Además, la combinación del anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y mL2-Fc tuvo un mayor efecto sobre la inhibición del crecimiento de tumores KP_LUN01 que el agente en solitario o el control.

Estos resultados sugieren que una combinación de un antagonista anti-DLL4 en combinación con un agente inmunoterapéutico podría ser una terapia antitumoral potencial.

Ejemplo 3

Ensayos de citotoxicidad celular

Para los ensayos de citotoxicidad de células asesinas naturales (NK), la línea celular de linfoblastos de ratón YAC-1 y la línea celular de carcinoma de colon de ratón CT26.WT se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY) complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % (v/v), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomina (Gibco) a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %. Se sabe que las células YAC-1 son sensibles a la actividad de las células NK y son un buen objetivo para los ensayos de células NK.

Las células se extrajeron de los bazos de los ratones portadores de tumor CT26.WT descritos anteriormente en el Ejemplo 2. Las células se sembraron en placas con fondo en V de 96 pocillos en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY) complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % (v/v), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomina (Gibco). Las células diana (YAC-1 o CT26.WT) se marcaron con calceína AM 10 µM (Life Technologies) durante 1 hora a 37 °C y, a continuación, se combinaron con los esplenocitos en una relación efector:diana de 25:1. Después de una incubación de 4 horas a 37 °C, se recogieron los sobrenadantes libres de células y se cuantificó la liberación de calceína en un fluorómetro a una excitación de 485 nm y una emisión de 535 nm. El porcentaje de lisis celular específica se determinó como: % de lisis = 100 x (ER-SR)/(MR-SR), donde ER, SR y MR representan la liberación experimental, espontánea y máxima de calceína, respectivamente. La liberación espontánea es la fluorescencia emitida por las células diana incubadas en medio en solitario (es decir, en ausencia de células efectoras), mientras que la liberación máxima se determina mediante la lisis de las células diana con un volumen igual de SDS al 10 %.

Las células NK de ratones portadores de tumor CT26.WT demostraron una mayor capacidad para destruir las células diana YAC-1 y CT26.WT cuando los ratones habían sido tratados con mL2-Fc. El tratamiento con el anticuerpo anti-mDLL4 parecía no tener efecto sobre la citotoxicidad de NK en este experimento, ya sea en solitario o en combinación con mL2 (figura 3A y 3B).

Se realizó un experimento similar con células extraídas de los bazos de los ratones portadores de tumor KP_LUN01 descritos anteriormente en el Ejemplo 2. Las células se aislaron después del tratamiento y los ensayos se realizaron usando células YAC-1 como dianas. Las células NK de ratones portadores de tumor KP_LUN01 demostraron una mayor capacidad para destruir las células diana YAC-1 cuando los ratones habían sido tratados con el anticuerpo anti-mDLL4 21R30 o mL2-Fc como agentes únicos. No hubo aumento en la actividad de NK cuando los agentes se combinaron (figura 3C).

Para los ensayos de citotoxicidad de linfocitos T, las células se extrajeron de los bazos de ratones portadores de tumor CT26.WT después del tratamiento y se cultivaron en medio complementado con 30 U/ml de IL-2 murina recombinante (Peprotech, Rocky Hill, NJ) y 0,1 µg/ml de péptido AH-1 (Anaspec, Fremont, CA). La secuencia de este péptido (SPSYVYHQF) es el epítipo restringido a H2-L^d (aminoácidos 6-14) de la proteína de envoltura gp70 de un provirus ecotrópico de leucemia murina endógeno a la línea celular CT26.WT. Los esplenocitos se cultivaron durante 5 días a 37 °C, se extrajeron, se contaron y se usaron en ensayos de citotoxicidad como se ha descrito anteriormente, con células tumorales CT26.WT como dianas. El fenotipo efector CD8⁺ de las células se confirmó mediante análisis FACS después de la estimulación con péptido/IL-2 (datos no mostrados).

Como se muestra en la figura 4A, las células citotóxicas CD8⁺ de los ratones portadores de tumor CT26.WT demostraron una mayor capacidad para destruir las células diana CT26.WT cuando los ratones habían sido tratados con un anticuerpo anti-mDLL4 en comparación con las células de ratones tratados con control. Las células CD8⁺ de ratones portadores de tumor tratados con mL2-Fc también mostraron una mayor capacidad para destruir las células diana en comparación con el control, aunque el efecto no fue tan fuerte como con el anticuerpo anti-mDLL4. Además, las células de ratones tratados con una combinación de un anticuerpo anti-mDLL4 y mL2-Fc tenían una mayor

capacidad para destruir las células diana que cualquier tratamiento en solitario.

Se realizó un experimento similar con células extraídas de los bazos de los ratones portadores de tumor KP_LUN01 descritos anteriormente en el Ejemplo 2. No se conoce una secuencia de péptido tumoral MHC de clase I específica de linfocitos T CD8⁺ para la línea tumoral KP_LUN01, por lo tanto, las células tumorales KP_LUN01 se usaron como estimuladores. Las células KP_LUN01 se trataron con 25 µg/ml de mitomicina C (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 37 °C, se lavaron y se resuspendieron a 10⁷ células/ml en medio RPMI-1640 que contenía FCS al 10 %, L-glutamina 2 mM, y antibióticos. Los esplenocitos se cultivaron conjuntamente con las células KP_LUN01 tratadas con mitomicina en una relación de 20:1, se incubaron durante 7 días a 37 °C, se extrajeron, se contaron y se usaron en ensayos de citotoxicidad como se ha descrito anteriormente. Las células de tumor KP_LUN01 marcadas con calceína AM se usaron como dianas en una relación efector:diana de 12,5:1. La liberación de calceína se determinó después de 4 horas y la lisis específica se calculó como se ha describió anteriormente.

Como se muestra en la figura 4B, los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ de los ratones portadores de tumor KP_LUN01 demostraron una mayor capacidad para destruir las células diana KP_LUN01 cuando los ratones habían sido tratados con un anticuerpo anti-mDLL4. Los linfocitos T CD8⁺ de ratones portadores de tumor tratados con mL-2-Fc mostraron solo un ligero aumento en la actividad citolítica en comparación con las células de ratones tratados con el control. Las células de ratones tratados con una combinación de un anticuerpo anti-mDLL4 y mL-2-Fc tenían una capacidad significativamente mayor de destruir las células diana que cualquiera de los tratamientos en solitario.

Estos resultados demuestran que el tratamiento con un antagonista de DLL4 puede aumentar la actividad citotóxica de las células NK y los linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor. Además, el tratamiento de combinación con un antagonista de DLL4 y un agente inmunoterapéutico tal como IL-2 puede mejorar aún más la actividad citolítica de las células NK y CTL y, por lo tanto, provocar una respuesta antitumoral más fuerte.

Ejemplo 4

Ensayo ELISpot para IFN-gamma

ELISpot es un inmunoensayo altamente sensible para la detección de células secretoras de citocinas. Brevemente, un ensayo ELISpot emplea un anticuerpo de captura específico para una citocina deseada, recubierta previamente en los pocillos de una microplaca. Las células estimuladas se dividen en alícuotas en los pocillos y el anticuerpo inmovilizado en la proximidad inmediata de cualquier célula secretora de citocinas se une a la citocina secretada. Siguen las etapas de lavado estándar y la incubación con los reactivos de detección apropiados. Por ejemplo, se usa comúnmente un anticuerpo de detección biotinilado seguido de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina y una solución de sustrato coloreada. Se forma un precipitado coloreado en los sitios de localización de citocinas y aparece como una mancha, representando cada mancha individual una célula secretora de citocinas individual. Las manchas se pueden contar con un sistema de lectura automatizado o manualmente con un microscopio.

Las células secretoras de interferón (IFN)-gamma se detectaron usando un kit ELISpot para IFN-gamma de ratón (kit ELISpot PLUS para IFN-gamma de ratón, Mabtech, Cincinnati, OH). Las células se aislaron de los bazos de ratones portadores de tumor CT26.WT tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y/o mL-2-Fc, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. Los esplenocitos de cada ratón (2 x 10⁵ células/pocillo) se colocaron sobre las placas proporcionadas, que fueron recubiertas previamente con un anticuerpo de captura específico para IFN-gamma murino. Las células se cultivaron en presencia o ausencia de un péptido de linfocitos T CD8⁺ específico de tumor (AH-1) y se incubaron durante 48 horas. Las células que secretaron IFN-gamma se detectaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Las manchas se contaron usando un Bioreader 6000 B-z (Biosys, Miami, FL). Los datos se expresan como la media ± S.E.M de manchas/pocillo o la densidad óptica total.

Como se muestra en la figura 5, se aumentaron los linfocitos T CD8⁺ secretores de IFN-gamma específicos de tumor en ratones tratados con mL-2-Fc como agente único. También se observó un aumento modesto pero detectable en los linfocitos T CD8⁺ productores de IFN-gamma en ratones tratados con el anticuerpo anti-mDLL4 21R30. Además, los linfocitos T CD8⁺ secretores de IFN-gamma específicos de tumor de ratones tratados con una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 y mL-2-Fc aumentaron en mayor medida que con cualquier agente en solitario.

Estos datos sugieren que un antagonista de DLL4 puede inducir la actividad de linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor y refuerza la hipótesis de que una combinación de un antagonista de DLL4 y un agente inmunoterapéutico dirigido a linfocitos T sería una buena terapia antitumoral.

Ejemplo 5

Células CD45⁺PD-1⁺ en tumores CT26.WT

Basándose en los resultados de los Ejemplos 1-4, los inventores investigaron adicionalmente el efecto que el tratamiento por un antagonista de DLL4 como agente único o en combinación con un agente inmunoterapéutico tuvo sobre los receptores del punto de control inmunitario, tal como PD-1, en células inmunes.

Se inyectaron por vía subcutánea células CT26.WT en el costado de ratones Balb/C de 6-8 semanas de edad. Se

5 permitió que los tumores crecieran hasta alcanzar un tamaño promedio de 100 mm³. Los ratones se asignaron al azar a grupos (n = 7) y se trataron con anticuerpo anti-mDLL4 21R30, mL-2-Fc, una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 y mL-2-Fc, o una proteína de control. El anticuerpo anti-mDLL4 se dosificó semanalmente a 30 mg/kg y se dosificó mL-2-Fc durante 5 días cada semana a 1 mg/kg. La administración fue por inyección en la cavidad intraperitoneal. Veintiún días después de la inyección de células tumorales y 15 días después del tratamiento inicial, se extrajeron los tumores y se prepararon suspensiones de células individuales. Las células se tiñeron para CD45 usando un anticuerpo anti-CD45 conjugado con FITC y para PD-1 usando un anticuerpo anti-PD-1 conjugado con alofococianina (APC). El análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) se realizó con un instrumento FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA) y los datos se procesaron con el software Diva.

10 CD45 se expresa exclusivamente en células hematolinfoides y se ha denominado un "antígeno leucocitario común". Se expresa a altos niveles en la superficie celular de todas las células hematopoyéticas nucleadas y sus precursores, por lo tanto, esta proteína se puede usar para células inmunes asociadas a tumor detectadas. Como se ha descrito anteriormente, PD-1 es una proteína en la superficie celular de las células inmunes generalmente involucrada en la supresión de las respuestas inmunitarias.

15 El porcentaje de células CD45⁺ y células CD45⁺ PD-1⁺ en tumores de ratones tratados se muestra en la figura 6. El porcentaje de células CD45⁺ se aumentó en tumores de ratones tratados con mL-2-Fc, aunque hubo un alto nivel de variabilidad entre ratones individuales. Curiosamente, el porcentaje de células CD45⁺ PD-1⁺ se redujo en tumores de ratones tratados con anticuerpo anti-mDLL4 y de ratones tratados con mL-2-Fc. Estos resultados son consistentes con los datos de los análisis de transferencia Western descritos en el Ejemplo 1. El porcentaje de células CD45⁺ PD-1⁺ se redujo adicionalmente en tumores de ratones tratados con una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 y mL-2-Fc.

20 Estos resultados sugieren que podría usarse una combinación de un antagonista de DLL4 y un agente inmunoterapéutico tal como IL2 para disminuir el número de células inmunes PD-1⁺ asociadas a tumor y, por lo tanto, inhibir los efectos supresores de esas células.

25 Ejemplo 6

Efecto del anticuerpo anti-DLL4, el anticuerpo anti-CTLA-4 y el anticuerpo anti-PD-L1 sobre el crecimiento de tumores CT26.WT

30 Se inyectaron por vía subcutánea células CT26.WT en el costado de ratones Balb/C de 6-8 semanas de edad. Se permitió que los tumores crecieran hasta un volumen tumoral promedio de 100 mm³. Los ratones se asignaron al azar a grupos (n = 9) y se trataron con un anticuerpo de control (30 mg/kg, semanalmente), anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (30 mg/kg, semanalmente), anticuerpo anti-mPD-L1 (10 mg/kg, 3 veces cada semana), anticuerpo anti-mCTLA-4 (10 mg/kg, 3 veces por semana), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 y anti-mPD-L1, o una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 y anti-mCTLA-4. Los agentes se administraron por inyección intraperitoneal. Se monitorizó el crecimiento tumoral y se midieron los volúmenes tumorales usando calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como volumen tumoral promedio ± SEM.

35 Como se muestra en la figura 7A, como un solo agente, el anticuerpo anti-mDLL4 inhibió el crecimiento de tumor CT26.WT en un grado similar al de los anticuerpos anti-mPD-L1 o anti-mCTLA-4. Cuando se ve como el volumen tumoral promedio, las terapias combinadas no fueron detectablemente mejores que los agentes individuales. Sin embargo, cuando la inhibición del crecimiento tumoral se evaluó ratón por ratón, la combinación del anticuerpo anti-mDLL4 21R30 en combinación con el anticuerpo anti-mCTLA-4 o el anticuerpo anti-mPD-L1 pareció tener un mayor efecto inhibitor sobre crecimiento tumoral en más ratones individuales que cuando los anticuerpos se usaron como agentes únicos (figuras 7B y 7C).

40 Estos resultados sugieren que un antagonista de DLL4 puede potenciar, y puede sinergizar con, los inhibidores del punto de control inmunitario, tales como los anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-PD-L1, para inhibir aún más el crecimiento tumoral.

45 Ejemplo 7

Inhibición del crecimiento de tumor de colon CT26.WT *in vivo*

50 Se inyectaron por vía subcutánea suspensiones de células individuales de células tumorales CT26.WT (20.000 células) en los costados de ratones Balb/C de 6-8 semanas de edad. Una semana después de la inyección de células tumorales, los ratones con tumores palpables se trataron con un anticuerpo anti-mPD-1 (250 µg/ratón), anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (20 mg/kg), una combinación de anticuerpo anti-mPD-1 y anticuerpo anti-mDLL4 21R30, o la misma cantidad de un anticuerpo de control de isotipo. A los ratones se les administraron los anticuerpos dos veces por semana durante 3 semanas mediante inyección intraperitoneal. Se monitorizó el crecimiento tumoral y se midieron los volúmenes tumorales con calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como media ± S.E.M.

Como se muestra en la figura 8A, el tratamiento con la combinación del anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y el anticuerpo anti-mPD-1 redujo significativamente el crecimiento de tumor CT26.WT en comparación con el tratamiento con el anticuerpo de control. El crecimiento tumoral se inhibió un 78 % en comparación con el control el Día 23, $p = 0,0016$. La evaluación de ratones individuales el Día 28 no mostró tumores detectables en 3 de 10 ratones (figura 8B). En un segundo experimento, 14 de 20 ratones tratados con una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-mPD-1 no mostraron tumores detectables.

Un procedimiento para evaluar la presencia y/o funcionalmente de una población de células de memoria antitumorales es volver a exponer a los ratones tratados previamente a células tumorales frescas. Se usaron ratones previamente tratados con anticuerpo anti-mPD-1 ($n = 11$) o una combinación de anticuerpo anti-mPD-1 y anticuerpo anti-mDLL4 21R30 ($n = 14$) de los estudios descritos anteriormente para un estudio de reexposición. Los ratones cuyos tumores habían retrocedido por completo y eran indetectables al menos 85 días después de la primera inyección de tumor se expusieron de nuevo a células tumorales CT26.WT (20.000 células). Los ratones sometidos a una reexposición tumoral habían recibido una última dosis de tratamiento 66 días antes de la reexposición. A ratones Balb/C sin tratar ($n = 10$) se les inyectaron células tumorales CT26.WT (20.000 células) como grupo de control. Se monitorizó el crecimiento tumoral y se midieron los volúmenes tumorales con calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como media \pm S.E.M.

Como se muestra en la figura 9, el volumen tumoral promedio de los tumores CT26.WT en ratones sin tratar creció de manera constante hasta el Día 28, después de lo cual se sacrificaron los ratones. En contraste, el volumen tumoral promedio de los tumores CT26.WT en ratones que habían sido tratados previamente con anticuerpo anti-PD-1 o una combinación de anticuerpo anti-PD-1 y anticuerpo anti-mDLL4 21R30 fue muy pequeño (46 mm^3 y 27 mm^3 , respectivamente). La evaluación de ratones individuales mostró que 5 de 11 (46 %) ratones originalmente tratados con anticuerpo anti-mPD-1 parecían estar completamente protegidos (sin tumores detectables) y 11/14 (79 %) ratones originalmente tratados con una combinación de anti mPD-1 y anti-mDLL4 estaban completamente protegidos.

Cinco ratones de cada grupo que no habían desarrollado tumores en la primera reexposición se expusieron por segunda vez a 50.000 células CT26.WT (2,5 veces el número de células de la dosis inicial). De nuevo como control, a 5 ratones sin tratar se les inyectaron células CT26.WT con el mismo número de células CT26.WT (50.000 células/ratón). Al igual que en el experimento anterior, los 5 ratones en el grupo de control desarrollaron tumores grandes y se sacrificaron el Día 21. Los tumores pequeños (promedio 56 mm^3) crecieron en 3 de los 5 ratones que habían sido tratados originalmente con el anticuerpo anti-mPD-1. No crecieron tumores en los ratones que habían sido tratados originalmente con una combinación de anticuerpo anti-DLL4 y anticuerpo anti-mPD-1. Estos resultados se resumen en la Tabla 1 y se presentan como el porcentaje de ratones libres de tumor en cada grupo.

Tabla 1

	Exposición inicial 20.000 células	1ª reexposición 20.000 células	2ª reexposición 50.000 células
Ratones de control	0 % (0/10)	0 % (0/10)	0 % (0/5)
Ratones tratados con anti-mPD-1 Ab ¹	55 % (11/20)	46 % (5/11)	40 % (2/5)
Ratones tratados con anti-mPD-1 Ab y anti-mDLL4 Ab ¹	70 % (14/20)	79 % (11/14)	100 (5/5)

¹ Ratones tratados con anticuerpo solo después de la exposición tumoral inicial

Estos ratones parecían estar fuertemente protegidos de la reexposición con las células tumorales CT26.WT. Estos resultados sugieren la existencia de memoria inmunogénica después del tratamiento con una combinación de anticuerpos anti-mDLL4 y anti-mPD-1.

Ejemplo 8

Ensayos ELISpot para IFN-gamma, IL-2 e IL-17 y ELISA para IL-6

Las células secretoras de IFN-gamma se detectaron usando un kit ELISpot para IFN-gamma de ratón (MabTech). Las células se aislaron de los bazos de ratones portadores de tumor tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 ($n = 6$), anticuerpo anti-mPD-1 ($n = 6$), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-mPD-1 ($n = 5$), o un anticuerpo de control ($n = 5$). Los esplenocitos (5×10^5 /pocillo) de cada ratón en cada grupo de tratamiento se dispensaron en una placa de 96 pocillos recubierta con un anticuerpo específico para IFN-gamma de ratón. Las células se cultivaron en presencia o ausencia de un péptido de linfocitos T CD8⁺ específico de tumor (AH-1) y se incubaron

durante 48 horas. Las células que secretaron IFN-gamma se detectaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Las manchas se contaron usando un instrumento Bioreader 6000 F-z (BioSys). Los datos se expresan como media \pm S.E.M.

5 Como se muestra en la figura 10A, los linfocitos T CD8⁺ secretores de IFN-gamma específicos de tumor aumentaron en ratones tratados con anticuerpo anti-mPD-1 y en ratones tratados con una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-PD-1.

10 Las células secretoras de IL-2 se detectaron usando un kit ELISpot para IL-2 de ratón (MabTech). Las células se aislaron de los bazo de ratones portadores de tumor tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (n = 6), anticuerpo anti-mPD-1 (n = 6), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-mPD-1 (n = 5), o un anticuerpo de control (n = 5). Los esplenocitos (5 x 10⁵/pocillo) de cada ratón dentro de cada grupo de tratamiento se dispensaron en una placa de 96 pocillos recubierta con un anticuerpo específico para IL-2 de ratón. Las células se incubaron en presencia del péptido AH-1 durante 48 horas. Las células que secretaron IL-2 se detectaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Las manchas se contaron usando un instrumento Bioreader 6000 F-z (BioSys). Los datos se expresan como media \pm S.E.M.

15 Como se muestra en la figura 10B, las células secretoras de IL-2 se aumentaron solo en ratones tratados con una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-PD1.

20 Las células secretoras de IL-17 se detectaron usando un kit ELISPOT para IL-17 de ratón (MabTech). Las células se aislaron de los bazo de ratones portadores de tumor tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (n = 6), anticuerpo anti-mPD-1 (n = 6), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-mPD-1 (n = 5), o un anticuerpo de control (n = 5). Los esplenocitos (5 x 10⁵/pocillo) de cada ratón dentro de cada grupo de tratamiento se dispensaron en una placa de 96 pocillos recubierta con un anticuerpo específico para IL-17 de ratón. Las células se incubaron durante 48 horas. Las células que secretaron IL-17 se detectaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Las manchas se contaron usando un instrumento Bioreader 6000 F-z (BioSys). Los datos se expresan como media \pm S.E.M.

25 Como se muestra en la figura 10C, las células secretoras de IL-17 disminuyeron en ratones tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y en ratones tratados con una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-mPD-1. En experimentos posteriores, se demostró que el anticuerpo anti-mPD-1 como agente único, una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 y anticuerpo anti-mVEGF, y una combinación triple de anticuerpo anti-mDLL4, anticuerpo anti-mVEGF y anticuerpo anti-mPD-1 no redujeron el número de células secretoras de IL-17 en bazo de ratones tratados (datos no mostrados). Esto sugiere que el bloqueo de DLL4 en solitario puede tener un mecanismo diferente que regule las respuestas inmunitarias en comparación con el mecanismo de bloqueo de DLL4 en combinación con VEGF o bloqueo de DLL4 en combinación con VEGF y PD-1.

30 La producción de IL-6 se detectó usando un kit ELISA para IL-6 de ratón (eBioscience). Las células se aislaron de los bazo de ratones portadores de tumor tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (n = 6), anticuerpo anti-mPD-1 (n = 6), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-mPD-1 (n = 5), o un anticuerpo de control (n = 5). Los esplenocitos (5 x 10⁵/pocillo) de cada ratón dentro de cada grupo de tratamiento se dispensaron en una placa de 96 pocillos. Las células se cultivaron en presencia o ausencia de un péptido de linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor (AH-1) y se incubaron durante 48 horas. El nivel de IL-6 se detectó en cada sobrenadante celular siguiendo las instrucciones del fabricante. La placa se leyó usando un instrumento SpectraMax Plus (Molecular Devices). Los datos se expresan como media \pm S.E.M.

35 La producción de IL-6 fue la misma en sobrenadantes de células incubadas en presencia o ausencia del péptido AH-1. Como se muestra en la figura 10D, el nivel de IL-6 producido por esplenocitos de ratones tratados con anticuerpo anti-mPD-1 y en ratones tratados con una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-mPD1 se redujo considerablemente en comparación con IL-6 producido por esplenocitos de ratones tratados solo con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 o el anticuerpo de control.

40 El IFN-gamma generalmente es producido por las células NK, los linfocitos T Th1 CD4⁺, los linfocitos T CD8⁺, las células presentadoras de antígeno, y los linfocitos B. Los estudios han sugerido un papel para IFN-gamma en la inmunidad tumoral y que puede ser un regulador de la actividad antitumoral mediada por otras citocinas, en particular IL-12 e IL-2. La fuente predominante de IL-2 es el linfocito T Th1 CD4⁺ y su función principal es promover la activación y proliferación de linfocitos T y células NK de manera autocrina y paracrina. En particular, la exposición de las células NK a IL-2 da como resultado la proliferación y una mayor actividad citolítica. Además, se requiere IL-2 para el mantenimiento y la supervivencia de los linfocitos T de memoria. Por lo tanto, el tratamiento con un antagonista de DLL4 y/o un anticuerpo anti-mPD-1 que da como resultado un aumento en IFN-gamma y/o IL-2 debería mejorar la inmunidad antitumoral. IL-17 se produce por las células T_H17, un subconjunto de linfocitos T auxiliares que se cree que tienen un papel proinflamatorio en la enfermedad autoinmune. IL-17 contribuye al reclutamiento de células mieloides de los linajes de monocitos y granulocitos a través de la inducción local de quimiocinas y la estimulación de la producción de G-CSF y GM-CSF. Un factor de respuestas inmunitarias ineficaces o ausentes contra los tumores puede ser la presencia de MDSC derivadas de los linajes monocíticos y granulocíticos. Las células T_H17 específicas de tumor pueden desempeñar un papel en la promoción de la atracción de células mieloides hacia el tumor y, por lo

tanto, en la promoción de un entorno inmunosupresor. La capacidad de un antagonista de DLL4 para reducir la frecuencia de células T_H17 específicas de tumor y la producción de IL-17 puede reducir, por lo tanto, la generación de MDSC y promover la inmunidad antitumoral. La IL-6 generalmente es producida por macrófagos, células endoteliales y algunos linfocitos T activados. A diferencia de IFN-gamma e IL-2, la sobreexpresión de IL-6 parece desempeñar un papel en la patogénesis de muchos tipos de cáncer. Por lo tanto, el tratamiento con un antagonista de DLL4 y/o un anticuerpo anti-PD-1 que da como resultado una disminución en la producción de IL-6 debería mejorar la inmunidad antitumoral.

Ejemplo 9

Análisis FACS de células supresoras derivadas de mieloides y células mieloides activadas

Los estudios han identificado células de origen mieloides que son potentes supresores de la inmunidad tumoral y, por lo tanto, un impedimento significativo para la inmunoterapia contra el cáncer (véase, por ejemplo, Ostrand-Rosenberg y col., 2009, *J. Immunol.*, 182:4499-4506). Las MDSC se acumulan en la sangre, los ganglios linfáticos, la médula ósea y en los sitios tumorales

en la mayoría de los pacientes y animales experimentales con cáncer. Se ha demostrado que las MDSC inhiben tanto la inmunidad adaptativa como la innata.

Se cree que las MDSC facilitan la progresión del cáncer al inhibir las respuestas inmunitarias antitumorales, promover la angiogénesis, y crear un entorno premetastásico. Las MDSC suprimen la proliferación y la activación de los linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos T CD8⁺, inhibiendo así la inmunidad antitumoral. Es importante destacar que las MDSC facilitan la generación de linfocitos Treg.

Las MDSC son una familia heterogénea de células mieloides. En ratones, las MDSC se caracterizan por la expresión en la superficie celular de los antígenos de diferenciación del linaje mieloides Gr1 y CD11b. Las MDSC se pueden dividir en dos subpoblaciones: MDSC granulocíticas (G-MDSC) y MDSC monocíticas (M-MDSC). Las G-MDSC típicamente tienen núcleos multilobulados y un fenotipo CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{low}, mientras que las M-MDSC tienen una morfología monocítica y un fenotipo CD11b⁺ Ly6G^{+/+} Ly6C^{high}. Se ha demostrado que ambas poblaciones de MDSC suprimen las respuestas de los linfocitos T mediante múltiples mecanismos, incluida una mayor producción de arginasa, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, las MDSC contribuyen a un microambiente tumoral inmunosupresor y pueden limitar los efectos de las respuestas inmunitarias antitumorales.

Se evaluó el número de MDSC en ratones tratados con un antagonista de DLL4 y/o un anticuerpo anti-PD1. Las células se aislaron de los bazos de ratones portadores de tumor CT26.WT tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (n = 6), anticuerpo anti-mPD-1 (n = 6), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-mPD-1 (n = 5), o un anticuerpo de control (n = 5).

Las suspensiones de células individuales recién preparadas se bloquearon usando una solución de bloqueo durante 10 minutos y a continuación se tiñeron con Gr1 anti-ratón (clon RB6-8C5, BioLegend) y CD11b anti-ratón (clon M1/70, BioLegend) en tampón FACS (HBSS más FCS al 2 %) durante 20 minutos en hielo. La población de células mieloides activadas se analizó tiñendo las células del bazo con CD11b anti-ratón y anticuerpo MHC de clase II anti-ratón. Las células se lavan, se marcan con colorante de viabilidad celular fijable (eBiosciences) y se fijan en paraformaldehído al 2 % para su análisis. Las células se analizaron usando un instrumento FACSCanto II (BD Sciences) y usando el software Diva. Las células muertas se excluyeron usando el tinte de viabilidad y los dobletes celulares y aglutinaciones se excluyeron usando la activación de discriminación de doblete. Las células se analizaron para determinar M-MDSC y poblaciones mieloides activadas.

Como se muestra en la figura 11, el tratamiento con el anticuerpo anti-mDLL4 21R30 en solitario o el anticuerpo 21R30 en combinación con el anticuerpo anti-mPD-1 redujo el porcentaje de M-MDSC en bazos de ratones portadores de tumor en comparación con el tratamiento con anticuerpo anti-mPD-1 en solitario o con un anticuerpo de control. Por el contrario, el tratamiento con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 en solitario, anticuerpo anti-mPD-1 en solitario, o una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-mPD-1 aumentaron el porcentaje de células mieloides activadas en comparación con el tratamiento con anticuerpo de control.

Estos datos sugieren que el direccionamiento a DLL4 puede contribuir a inhibir la actividad supresora de las MDSC al reducir el porcentaje y/o número de estas células inmunosupresoras. Este resultado es consistente con la hipótesis de que el tratamiento con antagonista de DLL4 puede reducir la generación de MDSC y promover una inmunidad antitumoral productiva al reducir la frecuencia de células T_H17 específicas de tumor. La reducción en el número de MDSC y/o la activación de las células mieloides puede ser aún mayor dentro del microambiente tumoral, pero esto no se ha evaluado en este momento debido al pequeño tamaño del tumor después del tratamiento.

Ejemplo 10

Análisis FACS de linfocitos T de memoria

Los linfocitos T de memoria son una población heterogénea de linfocitos T y se separan en dos subconjuntos distintos

(linfocitos T de memoria central y linfocitos T de memoria efectora) basándose en el fenotipo y la función. En ratones, los linfocitos T CD8⁺ de memoria central y efectora pueden separarse en dos poblaciones distintas según sus respectivos niveles de expresión de CD44 y CD62L. Una población de linfocitos T CD44^{high} CD62L^{low} CD8⁺ rápidamente adquiere funciones efectoras que constituyen la memoria efectora, mientras que los linfocitos T CD8⁺ que expresan una población CD44^{high}CD62L^{high} adquieren capacidades proliferativas profundas tras el reconocimiento de antígeno, y constituyen los linfocitos T de memoria central.

Se evaluó la cantidad de células de memoria central o linfocitos T CD8⁺ de memoria efectora en ratones tratados con anticuerpos anti-PD1 y/o anti-mDLL4. Las células se aislaron de los bazo de ratones portadores de tumor CT26.WT tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (n = 6), anticuerpo anti-mPD-1 (n = 6), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-mPD-1 (n = 5), o un anticuerpo de control (n = 5).

La tinción FACS se realizó como se ha descrito anteriormente usando CD8b anti-ratón (clon 53-5.8, BioLegend), CD4 anti-ratón (clon GK1.5, BioLegend, Clon), CD62L anti-ratón (clon MEL-14, BioLegend) y CD44 anti-ratón (clon 1M7, BioLegend). Se analizaron las células para determinar la expresión de CD44^{high}CD62L^{high} (memoria central) y la expresión de CD44^{high} CD62L^{low} CD8⁺ (memoria efectora).

Como se muestra en la figura 12, el tratamiento con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 en solitario o anticuerpo anti-mDLL4 21R30 en combinación con anticuerpo anti-mPD-1 aumentó el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ de memoria central y memoria efectora en bazo en comparación con el tratamiento con anticuerpo anti-mPD-1 en solitario o con un anticuerpo control.

Estos resultados sugieren que la combinación de un antagonista de DLL4 y un anticuerpo anti-PD-1 facilita la generación de linfocitos T CD8⁺ de memoria central y efectora. Estos linfocitos T de memoria pueden proporcionar una función de memoria inmune a largo plazo y trabajar para proporcionar una respuesta inmunitaria contra la recurrencia de tumores y/o metástasis. Estos resultados también son consistentes con la hipótesis de que al reducir la frecuencia de las células T_H17 específicas de tumor, el tratamiento con antagonistas de DLL4 reduce la generación de MDSC y, por lo tanto, permite a los linfocitos T montar una respuesta inmunitaria antitumoral más productiva y sustancial. El mecanismo distintivo del antagonista de DLL4 puede complementar y promover la respuesta antitumoral promovida por un inhibidor del punto de control inmunitario, tal como un anticuerpo anti-PD-1.

Ejemplo 11

Ensayo de linfocitos T reguladores (Treg)

Los Treg son una población de linfocitos T inmunes que suprime las respuestas proliferativas de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. La funcionalidad de los Treg en ratones tratados con un antagonista de DLL4 y/o un anticuerpo PD-1 se evaluó determinando el efecto que tenían los Treg sobre la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ sin tratar.

Los linfocitos T sin tratar se purificaron del bazo de ratones no tratados usando una columna de enriquecimiento de linfocitos T CD3⁺ de ratón (R&D Systems). Los linfocitos T purificados se marcaron con tinte de seguimiento violeta 5 μM (VTD) (Life Technologies). Se estimularon 2 x 10⁵ linfocitos T marcados con VTD con perlas recubiertas con anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28 para estimular la proliferación de linfocitos T. Se aislaron Treg de los bazo de ratones portadores de tumor CT26.WT tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (n = 6), anticuerpo anti-PD-1 (n = 6), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-PD-1 (n = 5), o un anticuerpo de control (n = 5) usando un kit de aislamiento de Treg (Miltenyi Biotec). Para determinar el impacto de los Treg en la proliferación de linfocitos T, los linfocitos T sin tratar marcados con VTD se cultivaron conjuntamente con Treg esplénicos aislados de los ratones tratados con anticuerpo anti-mDLL4, los ratones tratados con anticuerpo anti-mPD-1, los ratones tratados con una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 y anticuerpo anti-mPD-1, y los ratones tratados con el anticuerpo de control. Las células marcadas con VTD estimuladas (efectores) se cultivaron conjuntamente con linfocitos Treg (efector:Treg de 1:0,5 o 1:0,25). El día 4, las células se lavaron y se tiñeron con anticuerpos anti-mCD4 y anti-mCD8. Los cambios en la concentración de VTD se evaluaron mediante análisis FACS y los resultados se usaron para calcular la proliferación de linfocitos T.

Como se muestra en la figura 13, el tratamiento con anticuerpo anti-mPD-1 redujo la función supresora de Treg en la proliferación de linfocitos T CD4⁺. El tratamiento con una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-mPD-1 también redujo la función supresora de Treg en la proliferación de linfocitos T CD4⁺, pero en menor medida. En contraste, el tratamiento con el anticuerpo anti-DLL4 21R30 tuvo un mayor efecto que el anticuerpo anti-mPD-1 en la reducción de la función supresora de Treg en la proliferación de linfocitos T CD8⁺. Y curiosamente, el tratamiento con una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-mPD-1 tuvo un efecto significativamente mayor en la reducción de la función supresora de Treg en la proliferación de linfocitos T CD8⁺ que cualquier anticuerpo en solitario.

Estos resultados sugieren que una combinación de un antagonista de DLL4 y un anticuerpo anti-PD-1 puede conducir a una función de Treg reducida. Una supresión de la función de Treg podría mejorar las respuestas inmunitarias antitumorales totales. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que al reducir la frecuencia de las células T_H17 específicas de tumor, el tratamiento con antagonistas de DLL4 reduce la generación de MDSC y, por lo tanto, promueve una respuesta inmunitaria más sólida. Las MDSC contribuyen al mantenimiento y la expansión de Treg a

través de varios mecanismos, incluidos PD-L1/B7-H1 y arginasa. El mecanismo distintivo del antagonista de DLL4 promueve la inmunidad antitumoral como un agente único y también complementa la acción de los inhibidores del punto de control tal como anti-PD-1.

Ejemplo 12

5 Ensayo de citotoxicidad de los linfocitos T

Se evaluó la funcionalidad de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ en ratones tratados con un antagonista de DLL4 y/o un anticuerpo anti-PD-1. Las células se extrajeron de los bazo de ratones portadores de tumor CT26.WT tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 (n = 6), anticuerpo anti-mPD-1 (n = 6), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y anticuerpo anti-mPD-1 (n = 5), o un anticuerpo de control (n = 5). Los esplenocitos se cultivaron en medios complementados con 30 UI/ml de IL-2 murina recombinante (Peprotech, Rocky Hill, NJ) y 1 µg/ml de péptido de linfocitos T CD8⁺ AH-1. Los esplenocitos se incubaron durante 7 días a 37 °C, se extrajeron, se contaron y se usaron en ensayos de citotoxicidad con células tumorales CT26.WT como dianas. Las células diana CT26.WT se marcaron con calceína AM 10 µM (Life Technologies) durante 1 hora a 37 °C y, a continuación, se combinaron con los esplenocitos en una relación efector:diana de 50:1. Después de una incubación de cuatro horas a 37 °C, se extrajeron los sobrenadantes libres de células y se cuantificó la liberación de calceína en un fluorómetro a una excitación de 485 nm y una emisión de 535 nm. El porcentaje de lisis celular específica se determinó como: % de lisis = 100 x (ER-SR)/(MR-SR), donde ER, SR y MR representan la liberación experimental, espontánea y máxima de calceína, respectivamente. La liberación espontánea es la fluorescencia emitida por las células diana incubadas en medio en solitario (es decir, en ausencia de células efectoras), mientras que la liberación máxima se determina mediante la lisis de las células diana con un volumen igual de SDS al 10 %.

Como se muestra en la figura 14, los linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor de ratones tratados con anticuerpo anti-mDLL4 21R30 o combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R30 y un anticuerpo anti-mPD-1 tenían un mayor nivel de actividad citolítica contra las células tumorales parentales en comparación con el control, y la combinación de anticuerpo anti-mDLL4 y anticuerpo anti-mPD-1 aumentó aún más la actividad de los linfocitos T CD8⁺ en relación con los agentes individuales.

Estos resultados sugieren que una combinación de un antagonista de DLL4 y un anticuerpo anti-PD-1 aumenta la función citolítica de los linfocitos T CD8⁺. Este aumento de la función citolítica de los linfocitos T podría mejorar las respuestas inmunitarias antitumorales totales. Estos resultados también son consistentes con la hipótesis de que al reducir la frecuencia de las células T_H17 específicas de tumor, el tratamiento con antagonistas de DLL4 reduce la generación de MDSC y, promueve así una mayor función citolítica de los linfocitos T y una respuesta inmunitaria antitumoral total más sólida.

Ejemplo 13

Expresión de la proteína PD-L1 evaluada por IHC

Se usa un ensayo de inmunohistoquímica PD-L1 (IHC) para determinar el nivel de expresión de PD-L1 en muestras. Las secciones de FFPE se cortan y se montan en portaobjetos de vidrio recubiertos. Los tejidos se desparafinan y se rehidratan incubándolos sucesivamente en xileno, etanol al 100 %, etanol al 95 %, etanol al 70 %, y agua destilada para la recuperación del antígeno. Los portaobjetos se colocan en una solución de recuperación y se colocan en un Decloaker para la recuperación de antígeno. Para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, los portaobjetos se incuban en peróxido de hidrógeno al 6 % durante 5 minutos y se lavan en PBS. Para bloquear la tinción de fondo no específica, los portaobjetos se incuban en CAS-Block (Life Technologies) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se incuban con un anticuerpo anti-PD-L1. El anticuerpo anti-PD-L1 se detecta usando un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante. El complejo de anticuerpos se visualiza con un sustrato de peróxido de hidrógeno y un cromógeno de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB) que produce un precipitado de color pardo.

Los portaobjetos se analizan manualmente o usando un instrumento automatizado. Se mide la intensidad de tinción de cada célula tumoral (0: sin expresión, 1: expresión débil, 2: expresión moderada, 3: expresión fuerte) y se cuentan las células de cada nivel de tinción y se calcula un porcentaje para cada tipo. Los datos se combinan en una puntuación H ponderada para cada sección de tejido: puntuación H = [3 x (% 3+ células)] + [2 x (% 2+ células)] + [1 x (% 1+ células)]. Este cálculo permite una puntuación H superior de 300. Los controles positivos y negativos pueden incluir secciones de tejido humano adquiridas a un proveedor comercial, así como muestras de xenoinjerto derivadas de paciente del banco de tumores de OncoMed con niveles de expresión conocidos de PD-L1.

Ejemplo 14

Estudio de fase 1 de demcizumab (OMP-h21M18) en combinación con pembrolizumab (anti-PD-1; KEYTRUDA) con o sin quimioterapia en sujetos con tumores sólidos

55 El estudio es un estudio abierto de expansión y de aumento de dosis de Fase 1b de demcizumab (OMP-21M18) en combinación con pembrolizumab (anti-PD-1; KEYTRUDA) con o sin quimioterapia en sujetos con tumores sólidos

avanzados o metastásicos. El objetivo principal del estudio es identificar toxicidades limitantes de la dosis (DLT) y estimar la dosis máxima tolerada (MTD) de demcizumab con pembrolizumab e identificar las DLT y estimar la MTD de demcizumab con pembrolizumab administrado con pemetrexed y carboplatino. Los objetivos secundarios son determinar la seguridad, la incidencia de inmunogenicidad, la farmacocinética de demcizumab y pembrolizumab en comparación con la exposición al fármaco de un agente único respectivo, la tasa de respuesta preliminar según los criterios inmunológicos, y la eficacia preliminar.

Se incluirán aproximadamente 6-12 pacientes en la etapa de aumento de dosis de demcizumab en combinación con pembrolizumab. El aumento de la dosis se realizará para determinar la MTD de demcizumab cuando se administra con pembrolizumab. Se analizarán aproximadamente dos cohortes por nivel de dosis de demcizumab. Los niveles de dosis de demcizumab serán de 2,5 y 5 mg/kg administrados IV una vez cada 3 semanas hasta el Día 63. En ausencia de progresión de la enfermedad, se administrará una segunda dosis del fármaco del estudio (demcizumab a 1, 2,5 o 5 mg/kg) una vez cada 3 semanas por 4 dosis a partir del Día 168 si el sujeto cumple con criterios del estudio. No se permitirá un aumento o reducción de la dosis dentro de una cohorte de dosis y se pueden añadir cohortes de dosificación intermedia. Si dos o más pacientes en una sola cohorte experimentan eventos adversos de grado ≥ 2 atribuidos a demcizumab o pembrolizumab o se observan una o más DLT, habrá cohortes adicionales a dosis crecientes más pequeñas.

Tres pacientes serán tratados inicialmente al nivel de dosis de 2,5 mg/kg de demcizumab y 2 mg/kg de pembrolizumab. Si 1 de 3 sujetos experimenta una DLT, ese nivel de dosis se ampliará a 6 sujetos. Si 2 o más pacientes experimentan una DLT, no se administrará a más pacientes a ese nivel y 3 pacientes adicionales se evaluarán a un nivel de dosis de 1 mg/kg de demcizumab y 2 mg/kg de pembrolizumab. Los pacientes serán evaluados para detectar DLT desde el momento de la primera dosis hasta el Día 21. El aumento de la dosis, si corresponde, ocurrirá después de que todos los pacientes en una cohorte hayan completado su evaluación de DLT el Día 21. La dosis máxima de demcizumab a analizar es de 5 mg/kg. Una vez que se haya establecido la MTD de demcizumab con pembrolizumab, los pacientes se incluirán en la etapa de expansión de cohorte.

Aproximadamente 30 pacientes se incluirán en la etapa de expansión específica de indicación. Esta etapa incluye múltiples cohortes para caracterizar mejor la seguridad, la tolerabilidad, la variabilidad de PK, los biomarcadores de la actividad antitumoral y la eficacia preliminar de demcizumab en combinación con pembrolizumab en diferentes tipos de cáncer. Las cohortes de expansión planificadas incluirán, pero no se limitarán a, pacientes con NSCLC no escamoso en estadio IIIB/IV tratados con hasta 2 líneas anteriores de quimioterapia, pacientes con cualquier tumor sólido que haya progresado en el tratamiento anterior con un inhibidor anti-PD1 o anti-PDL-1, pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración que ha progresado en terapia previa, pacientes con cáncer colorrectal tratados con hasta 3 líneas anteriores de quimioterapia, y pacientes con cáncer pancreático tratados con hasta 2 líneas anteriores de quimioterapia.

En la cohorte de expansión que comprende pacientes con NSCLC, el aumento de dosis con la adición de carboplatino y pemetrexed se iniciará a un nivel de dosis inferior a la MTD de demcizumab en combinación con 2 mg/kg de pembrolizumab. Tres pacientes serán tratados inicialmente con el nivel de dosis -1 de demcizumab y el nivel de dosis de 2 mg/kg de pembrolizumab en combinación con pemetrexed y carboplatino. Demcizumab se administrará por infusión IV una vez cada 3 semanas hasta el Día 63. En ausencia de progresión de la enfermedad, se administrará una segunda dosis de fármaco del estudio (demcizumab a 1, 2,5 o 5 mg/kg) una vez cada 3 semanas durante 4 dosis a partir del Día 168 si el BNP del Día 168 del sujeto es ≤ 100 pg/ml, la velocidad tricúspide máxima es $\leq 3,0$ m/s y la LVEF es ≥ 50 %, y el sujeto cumple los criterios del estudio. Pembrolizumab se administrará por vía IV a una dosis de 2 mg/kg durante 30 minutos cada 3 semanas. Pemetrexed a 500 mg/m² se administrará como una infusión intravenosa durante 10 minutos una vez cada 21 días. El carboplatino a 6 mg/ml x min se administrará como una infusión intravenosa durante 15 a 60 minutos una vez cada 21 días durante 4 ciclos (o menos de 4 ciclos completos si la progresión de la enfermedad o la toxicidad justifican la interrupción o finalización del tratamiento). Si 1 de 3 sujetos experimenta una DLT, ese nivel de dosis se ampliará a 6 sujetos. Si 2 o más pacientes experimentan una DLT, no se administrará a más pacientes a ese nivel y 3 pacientes adicionales se evaluarán a un nivel de dosis de 1 mg/kg de demcizumab y 2 mg/kg de pembrolizumab. Los pacientes serán evaluados para detectar DLT desde el momento de la primera dosis hasta el Día 21. El aumento de la dosis, si corresponde, ocurrirá después de que todos los pacientes en una cohorte hayan completado su evaluación de DLT el Día 21. La dosis máxima de demcizumab a analizar es de 5 mg/kg. Una vez que se haya establecido la MTD de demcizumab con pembrolizumab, aproximadamente 10 pacientes con NSCLC no escamoso en estadio IIIB/IV no tratado previamente se incluirán en la etapa de expansión de cohorte. Esta etapa está diseñada para caracterizar aún más la seguridad y la tolerabilidad de la combinación de demcizumab, pembrolizumab, pemetrexed y carboplatino, y para evaluar la eficacia preliminar. Para otras indicaciones, la quimioterapia generalmente comprenderá combinaciones estándar de atención.

Ejemplo 15

Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* con la combinación de anticuerpos anti-DLL4, anti-VEGF y anti-PD-1

Se inyectaron por vía subcutánea suspensiones de células individuales de células tumorales CT26.WT (30.000 células) en los costados de ratones Balb/C de 6-8 semanas de edad. Diez días después de la inoculación del tumor, los ratones con tumores palpables (aproximadamente 125-130 mm³) se trataron con un anticuerpo anti-mPD-1 (250

µg/ratón, dos veces por semana), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R50 (5 mg/kg, una vez una semana) y anticuerpo anti-mVEGF (2,5 mg/kg, una vez a la semana), una combinación de anticuerpo anti-mPD-1, anticuerpo anti-mDLL4 21R50 y anticuerpo anti-mVEGF, o un anticuerpo de control (20 mg/kg, dos veces a la semana). A los ratones se les administraron los anticuerpos durante 3 semanas mediante inyección intraperitoneal. Se monitorizó el crecimiento tumoral y se midieron los volúmenes tumorales con calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como media ± S.E.M.

Como se muestra en la figura 15A, el tratamiento con la combinación del anticuerpo anti-mDLL4 21R50, anticuerpo anti-mVEGF, y el anticuerpo anti-mPD-1 redujo significativamente el crecimiento de tumor CT26.WT en comparación con el tratamiento con el anticuerpo de control. El Día 27, el crecimiento tumoral promedio en los ratones tratados se inhibió en un 89 % en comparación con los ratones tratados con anticuerpo de control. El tratamiento con la combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R50 y anticuerpo anti-mVEGF redujo significativamente el crecimiento de tumor CT26.WT en comparación con el tratamiento con el anticuerpo de control. El Día 27, el crecimiento tumoral promedio en los ratones tratados se inhibió en un 86% en comparación con los ratones tratados con anticuerpo de control. El anticuerpo anti-mPD-1 como agente único no fue tan eficaz, e inhibió el crecimiento tumoral solo un 59 % en comparación con los ratones tratados con anticuerpo de control.

El Día 27, la evaluación de ratones individuales tratados con la combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R50, anticuerpo anti-mVEGF y anticuerpo anti-mPD-1 mostró que 10 de 20 ratones (50 %) tenían tumores del mismo tamaño o habían retrocedido a un tamaño menor que el tamaño del tumor antes del tratamiento. La evaluación de ratones individuales tratados con la combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R50 y anticuerpo anti-mVEGF mostró que 5 de 10 ratones (50 %) tenían tumores que tenían el mismo tamaño o habían retrocedido a un tamaño menor que el tamaño del tumor antes del tratamiento, y la evaluación de ratones tratados con solo anticuerpo anti-mPD-1 mostró que 6 de 15 ratones (40 %) tenían tumores del mismo tamaño o habían retrocedido a un tamaño menor que el tamaño del tumor antes del tratamiento.

Estos resultados sugieren que un bloqueo de DLL4, VEGF y PD-1 en las células tumorales CT26.WT tiene eficacia antitumoral y que la eficacia puede ser mejor que el bloqueo de PD-1 en solitario.

Se realizó un experimento similar con el adenocarcinoma renal murino, Renca. Se inyectaron por vía subcutánea suspensiones de células individuales de células tumorales Renca (5×10^5 células) en los costados de ratones Balb/C de 6-8 semanas de edad. Ocho días después de la inoculación del tumor, los ratones con tumores palpables (aproximadamente 60 mm^3) se trataron con un anticuerpo anti-mPD-1 (10 mg/kg, dos veces por semana), anti-mDLL4 21R50 (10 mg/kg, una vez por semana), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R50 (10 mg/kg, una vez a la semana) y anticuerpo anti-mVEGF (10 mg/kg, una vez a la semana), una combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R50 (10 mg/kg, una vez a la semana) y anticuerpo anti-mPD-1 (10 mg/kg, dos veces por semana), una combinación de anticuerpo anti-mPD-1, anticuerpo anti-mDLL4 21R50 y anticuerpo anti-mVEGF, o un anticuerpo de control (20 mg/kg, dos veces por semana). A los ratones se les administraron los anticuerpos durante 3 semanas mediante inyección intraperitoneal. Se monitorizó el crecimiento tumoral y se midieron los volúmenes tumorales con calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como media ± S.E.M.

Como se muestra en la figura 15B, el tratamiento con la combinación del anticuerpo anti-mDLL4 21R50, anticuerpo anti-mVEGF, y el anticuerpo anti-mPD-1 redujo significativamente el crecimiento de tumor Renca en comparación con el tratamiento con el anticuerpo de control. El Día 17, el crecimiento tumoral promedio en los ratones tratados se inhibió en un 86% en comparación con los ratones tratados con anticuerpo de control. El tratamiento con la combinación de anticuerpo anti-mDLL4 21R50 y anticuerpo anti-mVEGF también redujo el crecimiento de tumor Renca en comparación con el tratamiento con el anticuerpo de control (78 %). Por el contrario, el tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1 como agente único no inhibió el crecimiento tumoral.

De forma similar a lo observado en las células CT26.WT, estos resultados sugieren que un bloqueo de DLL4, VEGF y PD-1 en las células tumorales tiene eficacia antitumoral.

Ejemplo 16

Análisis FACS de linfocitos T de memoria central

Las células se extrajeron de los bazo de los ratones portadores de tumor CT26.WT descritos anteriormente (Ejemplo 15). El Día 30 posterior a la inyección celular se aislaron los esplenocitos. Los esplenocitos (1×10^6) se incubaron durante 10 minutos con una proteína Fc recombinante para bloquear la unión no específica, y a continuación se incubaron con anticuerpos conjugados con fluorocromo en 100 µl de tampón de tinción FACS (HBSS más suero de ternera inactivado por calor al 2 %) durante 20 min en hielo. Los anticuerpos no unidos se eliminaron mediante lavado y las células muertas se marcaron con un tinte de viabilidad fijable. Las células se fijaron en paraformaldehído al 2 % durante 20 min a temperatura ambiente y se analizaron usando un instrumento FACSCanto II y el software FACSDiva v6.1.3 (BD Biosciences).

Los linfocitos T totales se identificaron usando un anticuerpo anti-CD3e de ratón, los linfocitos T CD4⁺ usando un anticuerpo anti-CD4 de ratón, y los linfocitos T CD8⁺ usando un anticuerpo anti-CD8 de ratón. Las células de memoria

central se identificaron usando un anticuerpo anti-CD44 de ratón/humano y un anticuerpo anti-CD62L humano. La tinción FACS se realizó como se ha descrito anteriormente usando anticuerpo anti-CD8b de ratón (clon 53-5.8, BioLegend), anticuerpo anti-CD4 de ratón (clon GK1.5, BioLegend), anticuerpo anti-CD62L de ratón (clon MEL-14, BioLegend), y anticuerpo anti-CD44 de ratón (clon 1M7, BioLegend). Las células se analizaron para determinar la expresión de CD44^{high}CD62L^{high}, lo que indica células de memoria central (activadas en linfocitos T CD8⁺).

El análisis FACS indicó que los ratones portadores de tumor CT26.WT tratados con una combinación de anticuerpo anti-mDLL4, anticuerpo anti-mVEGF, y anticuerpo anti-mPD-1 tenían un mayor porcentaje de células de memoria central dentro de la población de linfocitos T CD4⁺ y dentro de la población de linfocitos T CD8⁺ en comparación con ratones tratados con un anticuerpo de control (figura 16). En contraste, los ratones tratados con una combinación de anti-mDLL4 y anti-mVEGF, o los ratones tratados con anticuerpo anti-mPD1 como agente único no tuvieron un cambio apreciable en el porcentaje de células de memoria central.

Ejemplo 17

Expresión de citocinas en muestras tumorales

Se tomaron muestras tumorales de los ratones portadores de tumor CT26.WT descritos anteriormente en el Ejemplo 15. Para la expresión génica de respuesta inmunitaria, se realizó una RT-PCR cuantitativa en tiempo real sobre el ARN total obtenido de las muestras tumorales. Se espera que las muestras tumorales contengan células tumorales, células inmunes asociadas con el tumor, y cualquier célula estromal unida a la muestra tumoral. Los especímenes de tumor se extrajeron e inmediatamente se congelaron y se almacenaron a -80 °C antes del aislamiento del ARN. El ARN total se extrajo utilizando el Mini Kit RNeasy Fibrous (Qiagen, Valencia CA, PN N.º 74704) con homogeneización TissueLyzer y tratamiento con DNasa I según el protocolo del fabricante. Los ARN se visualizaron en un Bioanalizador 2100 (Agilent, Santa Clara, CA) y se verificó que estaban intactos con valores RIN >6,0. Todos los ARN tenían relaciones A260/A280 >1,8.

El ADNc se sintetizó a partir de ARN total usando hexámeros aleatorios. El ADNc y la mezcla maestra de PCR se añadieron a una placa de respuesta inmunitaria de matriz TaqMan (Applied Biosystems/Life Technologies) y las reacciones se ejecutaron en un instrumento de PCR en tiempo real según el protocolo del fabricante.

Como se muestra en las figuras 17A y 17B, el tratamiento con una combinación de anti-mDLL4, anti-mVEGF y anti-mPD-1 aumentó la expresión génica de IL-2, granzima B y CCL2 en la muestra tumoral. El tratamiento con anti-mPD-1 como agente único aumentó la expresión génica de IFN-gamma y disminuyó la expresión génica de IL-6 en el sitio tumoral. Además, todos los tratamientos disminuyeron la expresión génica de IL-18.

Se ha demostrado que IL-18 tiene funciones pleiotrópicas y parece desempeñar un doble papel en el cáncer (véase, por ejemplo, Palma y col., 2013, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1836:296-303). Generalmente se considera que IL-18 es parte de una respuesta de tipo Th1 y se podría esperar ver mayores niveles de expresión de IL-18. Estos resultados serán evaluados más a fondo. Se requiere IL-2 para la expansión de la población secundaria de los linfocitos T de memoria CD8⁺, por lo tanto, estos resultados sugieren que el triple bloqueo de DLL4, VEGF y PD-1 puede aumentar la activación de los linfocitos T, el mantenimiento de los linfocitos T, y la función de los linfocitos T de memoria. CCL2 (ligando 2 del motivo C-C) es una quimiocina que también se conoce como proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP1) y citocina inducible pequeña A2. Se ha demostrado que las quimiocinas reclutan monocitos, linfocitos T de memoria y células dendríticas para los sitios de inflamación y tumores. El reclutamiento de células inmunes puede mejorar una respuesta antitumoral. Sin embargo, en algunos estudios, se ha descubierto que las quimiocinas promueven la tumorigénesis, por lo tanto, este resultado deberá estudiarse más a fondo. La granzima B es una serina proteasa que se encuentra en los gránulos de los CTL y las células NK. Se secreta por estas células junto con la proteína formadora de poros perforina para mediar la apoptosis en las células diana. El aumento de expresión de la granzima B sugiere la presencia de células activas destructoras de tumor en el sitio del tumor en ratones tratados con anti-mDLL4, anti-mVEGF y anti-mPD-1.

Ejemplo 18

Inhibición del crecimiento de tumor de colon CT26.WT *in vivo*

Se inyectaron por vía subcutánea suspensiones de células individuales de células tumorales CT26.WT (30.000 células) en los costados de ratones Balb/C de 6-8 semanas de edad. El día 6 después de la inyección del tumor, los ratones con tumores de tamaño promedio de aproximadamente 43 mm³ se asignaron al azar a grupos (n = 10) y se trataron con un anticuerpo anti-mPD-1 (10 mg/kg), anticuerpo anti-Notch2/3 59R5 (40 mg/kg), una combinación de anticuerpo anti-mPD-1 y anticuerpo anti-Notch2/3 59R5, o un anticuerpo de control de isotipo. A los ratones se les administró el anticuerpo anti-Notch2/3 una vez por semana durante 3 semanas y el anticuerpo anti-mPD-1 dos veces por semana durante 3 semanas y el anticuerpo anti-Notch2/3 una vez por semana durante 3 semanas mediante inyección intraperitoneal. Se monitorizó el crecimiento tumoral y se midieron los volúmenes tumorales con calibradores electrónicos en los puntos de tiempo indicados. Los datos se expresan como media ± S.E.M.

Como se muestra en la figura 18, el tratamiento con la combinación del anticuerpo anti-Notch2/3 59R5 y un anticuerpo anti-mPD-1 redujo significativamente el crecimiento de tumor CT26.WT en comparación con el tratamiento con el

anticuerpo de control. El crecimiento tumoral se inhibió un 80 % en comparación con el control el Día 24. En contraste, un anticuerpo anti-PD-1 como agente único inhibió el crecimiento tumoral en solo un 46 % en comparación con el control y se observó el tratamiento con el anticuerpo anti-Notch2/3 59R5 para determinar el aumento del crecimiento tumoral en comparación con el control. En este experimento, los tumores retrocedieron a niveles indetectables en 3 de los 10 ratones tratados con la combinación de anticuerpo anti-Notch2/3 y anticuerpo anti-PD-1 y aún no se pudieron detectar el Día 90. Por el contrario, se observó regresión tumoral solo en un ratón tratado con anticuerpo anti-PD-1 como agente único.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con inhibidores de la ruta Notch, incluidos los antagonistas del receptor Notch, así como los antagonistas de DLL4, en combinación con agentes inmunoterapéuticos, es eficaz para inhibir el crecimiento tumoral. Además, en algunos sujetos el tratamiento es exitoso ya que devuelve los tumores a niveles indetectables sin recidiva.

Las secuencias descritas en la solicitud son:

21M18 CDR1 de cadena pesada (SEQ ID NO:1)

TAYYIH

21M18 - H2 CDR2 de cadena pesada (SEQ ID NO:2)

YISCYNGATNYNQKFKG

21M18 - H7 CDR2 de cadena pesada (SEQ ID NO:3)

YISSYNGATNYNQKFKG

21M18 - H9 CDR2 de cadena pesada (SEQ ID NO:4)

YISVYNGATNYNQKFKG

21M18 CDR3 de cadena pesada (SEQ ID NO:5)

RDYDYDVGMDY

21M18 CDR1 de cadena ligera (SEQ ID NO:6)

RASESVDNYGISFMK

21M18 CDR2 de cadena ligera (SEQ ID NO:7)

AASNQGS

21M18 CDR3 de cadena ligera (SEQ ID NO:8)

QQSKEVPWTFGG

21M18 - H2 Región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:9)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISCYNGATNY
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLTLTVSS

21M18 - H7 Región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 10)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISSYNGATNY
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLTLTVSS

21M18 - H9 Región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:11)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISVYNGATNY
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLTLTVSS

21M18 Región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:12)

ES 2 808 153 T3

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIK

Dominio extracelular DLL4 humano con secuencia señal pronosticada subrayada (SEQ ID NO:13)

MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRV
CLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIE
AWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYY
GDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCCQPICLSGCHEQNGYCSKPAECL
CRPGWQGRCLNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATC
SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGYGLHCE
HSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNR
GPSRMCRCRPGFTGTyceLVSDCARNPCAHHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCVVRTS
IDACASSPCFN RATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCFFVPG

Región N-terminal DLL4 humano con secuencia señal pronosticada subrayada (SEQ ID NO: 14)

MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRV
CLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIE
AWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQN

5

Región DLL4 DSL humana (SEQ ID NO: 15)

WLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTG
EYC

Aminoácidos DLL4 humanos 1-217 con secuencia señal pronosticada subrayada (SEQ ID NO:16)

MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRV
CLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIE
AWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYY
GDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYC

10

Aminoácidos DLL4 humanos 27-217 (SEQ ID NO: 17)

SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGT
NSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQ
GSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNL
SCLPGWTGEYC

Aminoácidos DLL4 humanos 66-73 (SEQ ID NO: 18)

QAVVSPGP

Aminoácidos DLL4 humanos 139-146 (SEQ ID NO:19)

15

LISKIAIQ

219R45 CDR1 de cadena pesada (SEQ ID NO:20)

NYWMH

219R45 CDR2 de cadena pesada (SEQ ID NO:21)

DINPSNGRTSYKEKFKR

20

219R45 CDR3 de cadena pesada (SEQ ID NO:22)

HYDDKYYPLMDY

21R75 CDR2 de cadena pesada (SEQ ID NO:23)

YIAGYKDATNYNQKFKG

21R79 CDR2 de cadena pesada (SEQ ID NO:24)

YIANYNRATNYNQKFKG

21R83 CDR2 de cadena pesada (SEQ ID NO:25)

5

YISNYNRATNYNQKFKG

Secuencia consenso CDR2 de cadena pesada anti-DLL4 (SEQ ID NO:26)

YIX₁X₂YX₃X₄ATNYNQKFKG, en la que X₁ es serina o alanina, X₂ es serina, asparagina o glicina, X₃ es asparagina o lisina, y X₄ es glicina, arginina o ácido aspártico 21R75 Región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:27)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIAGYKDATNY
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLTVTVSS

10

21R79 Región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:28)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYIANYNRATNY
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLTVTVSS

21R83 Región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:29)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNY
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLTVTVSS

219R45 Región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:30)

15

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFITNYWMHWVRQAPGQGLEWMDINPSNGRTSY
KEKFKRRVTLSDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGLTVTVSS

21R83 Cadena pesada (variante de heterodímero) sin secuencia señal pronosticada (SEQ ID NO:31)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTAYYIHWVKQAPGQGLEWIGYISNYNRATNY
NQKFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDYDVGMDYWGQGLTVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

219R45 Cadena pesada (variante de heterodímero) sin secuencia señal pronosticada (SEQ ID NO:32)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFITNYWMHWVRQAPGQGLEWMDINPSNGRTSY
KEKFKRRVTLSDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCTIHYDDKYYPLMDYWGQGLTVTVS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS

SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREKMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

Cadena ligera sin secuencia señal pronosticada (SEQ ID NO:33)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASESVDNYGISFMKWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

59R5 CDR1 de cadena pesada (SEQ ID NO:34)

SSSGMS

59R5 CDR2 de cadena pesada (SEQ ID NO:35)

5 VIASSGSNTYYADSVKG

59R5 CDR3 de cadena pesada (SEQ ID NO:36)

SIFYTT

59R5 CDR1 de cadena ligera (SEQ ID NO:37)

RASQSVRSNYLA

10 59R5 CDR2 de cadena ligera (SEQ ID NO:38)

GASSRAT

59R5 CDR3 de cadena ligera (SEQ ID NO:39)

QQYSNFPPI

59R5 Región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:40)

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGLTVTVSSAST

59R5 Región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:41)

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVP
ARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

59R5 Cadena pesada con secuencia señal pronosticada subrayada (SEQ ID NO:42)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAP
GKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIF
YTTWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVEC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTFRVVSVLTVHVDWLNQKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20 59R5 Cadena pesada sin secuencia señal pronosticada (SEQ ID NO:43)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGLTVTVSSASTKG

PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL
TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

59R5 Cadena ligera con secuencia señal pronosticada subrayada (SEQ ID NO:44)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQK
PGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFG
QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

59R5 Cadena ligera sin secuencia señal prevista (SEQ ID NO:45)

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVP
ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT
TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

52M51 CDR1 de cadena pesada (SEQ ID NO:46)

RGYWIE

52M51 CDR2 de cadena pesada (SEQ ID NO:47)

QILPGTGRTNYNEKFKG

10

52M51 CDR3 Cadena pesada (SEQ ID NO:48)

FDGNYGYAMDY

52M51 CDR1 de cadena ligera (SEQ ID NO:49)

RSSTGAVTTSNYAN

52M51 CDR2 de cadena ligera (SEQ ID NO:50)

15

GTNNRAP

52M51 CDR3 de cadena ligera (SEQ ID NO:51)

ALWYSNHWFVGGGTKL

h52M51 Región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:52)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAPGKGLEWIGQILPGTGRTNY
NEKFKGRVTMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDGNYGYAMDYWGQGTTVTVS
SA

20

h52M51-L3 Región variable de cadena ligera (SEQ ID NO:53)

SGVDSQAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNN
RAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWFVGGGTKLTVLG

h52M51 Secuencia de aminoácidos de cadena pesada con secuencia señal pronosticada subrayada (SEQ ID NO:54)

MDWTWRVFCLLAVAPGVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAP
GKGLEWIGQILPGTGRTNYNEKFKGRVTMTADTSTDAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDG
NYGYYAMDYWGQGT^TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV^DHKPSNTKVDK^TVER
KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI^SRTP^EVTCV^VVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS^VLT^VVH^QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI^SSKTKG
QPREPQVY^TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^TTPPMLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQ^QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

h52M51 Secuencia de aminoácidos de cadena pesada sin secuencia señal pronosticada (SEQ ID NO:55)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKVSGYTLRGYWIEWVRQAPGKGLEWIGQILPGTGRTNY
NEKFKGRVTMTADTSTDAYMELSSLRSEDTAVYYCARFDGNYGYYAMDYWGQGT^TTVTVS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV^DHKPSNTKVDK^TVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV
FLFPPKPKDTLMI^SRTP^EVTCV^VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVS^VLT^VVH^QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI^SSKTKGQPREPQVY^TLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^TTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ^Q
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 h52M51 Secuencia de aminoácidos de cadena ligera con secuencia señal pronosticada subrayada (SEQ ID NO:56)

MSVPTMAWMMLLLGLLAYGSGVDSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN
WFQQKPGQAPRTLIGGTNNRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSN
HWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGS
PVKGVETTKPSKQSN^NKYAASSYLSTPEQW^KSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS

h52M51 Secuencia de aminoácidos de cadena ligera sin secuencia señal pronosticada (SEQ ID NO:57)

SGVDSQAVVTQEP^SSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQQKPGQAPRTLIGGTNN
RAPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKAA
PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKADGSPVKGVETTKPSKQSN^NKY
AASSYLSTPEQW^KSHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antagonista del ligando 4 tipo delta (DLL4) para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer, inhibir el crecimiento tumoral, mejorar la respuesta de memoria específica de antígeno a un tumor o inducir la activación o mejora de una respuesta inmunitaria persistente a un tumor,
 - 5 en el que el procedimiento comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista de DLL4 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente,

en el que el segundo agente es un inhibidor del punto de control inmunitario, y en el que el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo que se une específicamente a PD-1 o un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1.
- 10 2. El anticuerpo antagonista del ligando 4 tipo delta (DLL4) para su uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo antagonista de DLL4 es;
 - 15 (i) un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISSYNGATNYNQKFKG (SEQ ID NO:3), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5), y una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO: 8); o

(ii) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:10 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:12.
- 20 3. El anticuerpo antagonista del ligando 4 tipo delta (DLL4) para su uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo antagonista de DLL4 es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo IgG1, un anticuerpo IgG2, un anticuerpo IgG4, un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico, un fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno o una molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de unión a antígeno.
- 25 4. El anticuerpo antagonista del ligando 4 tipo delta (DLL4) para su uso de cualquiera de la reivindicación 1-3, en el que el anticuerpo antagonista de DLL4 es
 - (i) un anticuerpo biespecífico que comprende:
 - a) un primer sitio de unión a antígeno que se une específicamente a VEGF humano, y
 - b) un segundo sitio de unión a antígeno que se une específicamente al DLL4 humano,

30 en el que el primer sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende NYWMH (SEQ ID NO:20), una CDR2 de cadena pesada que comprende DINPSNGRTSYKEKFKR (SEQ ID NO:21), y una CDR3 de cadena pesada que comprende HYDDKYYPLMDY (SEQ ID NO:22);

en el que el segundo sitio de unión a antígeno comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende TAYYIH (SEQ ID NO:1), una CDR2 de cadena pesada que comprende YISNYNRATNYNQKFKG (SEQ ID NO:25), y una CDR3 de cadena pesada que comprende RDYDYDVGMDY (SEQ ID NO:5); y

35 en el que tanto el primer como el segundo sitio de unión a antígeno comprenden una CDR1 de cadena ligera que comprende RASESVDNYGISFMK (SEQ ID NO:6), una CDR2 de cadena ligera que comprende AASNQGS (SEQ ID NO:7), y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSKEVPWTFGG (SEQ ID NO:8); o
 - (ii) un anticuerpo biespecífico que comprende:
 - 40 a) una primera región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:30;
 - b) una segunda región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:29; y
 - c) una primera y una segunda región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:12.
- 45 5. El anticuerpo antagonista del ligando 4 tipo delta (DLL4) para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab (KEYTRUDA; MK-3475), pidilizumab (CT-011), o nivolumab (OPDIVO; BMS-936558 MDX-1106).
6. El anticuerpo antagonista del ligando 4 tipo delta (DLL4) para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo anti-PD-L1 es atezolizumab (RG7446, MPDL3280A), durvalumab (MEDI4736) o avelumab (MSB- 0010718C).

7. El anticuerpo antagonista del ligando 4 tipo delta (DLL4) para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer o inhibir el crecimiento tumoral según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo antagonista de DLL4 y el inhibidor del punto de control inmunitario inhiben o suprimen la actividad de los linfocitos T reguladores (Treg) o las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC).
- 5 8. El anticuerpo antagonista del ligando 4 tipo delta (DLL4) para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo antagonista de DLL4 y el antagonista inhibidor del punto de control inmunitario mejoran el tratamiento para un sujeto que está siendo tratado con un modulador del punto de control inmunitario.
- 10 9. El anticuerpo antagonista del ligando 4 tipo delta (DLL4) para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el cáncer/tumor se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, glioma, glioblastoma, glioblastoma multiforme, cáncer cervical, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, y hepatoma.
- 15 10. El anticuerpo antagonista del ligando 4 tipo delta (DLL4) para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende administrar al menos un agente terapéutico adicional.
11. El anticuerpo antagonista del ligando 4 tipo delta (DLL4) para su uso de la reivindicación 10, en el que el al menos un agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico.

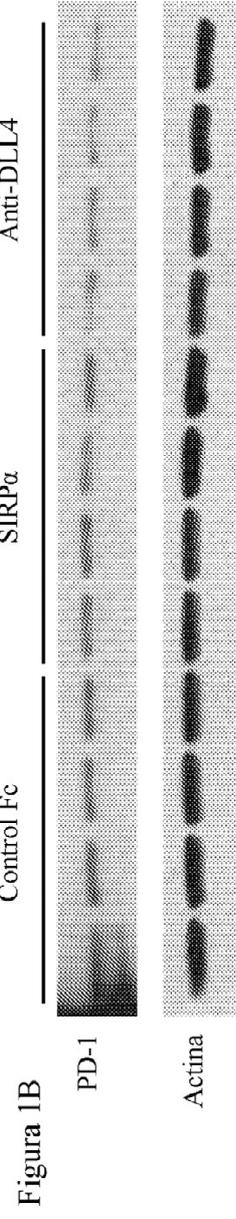
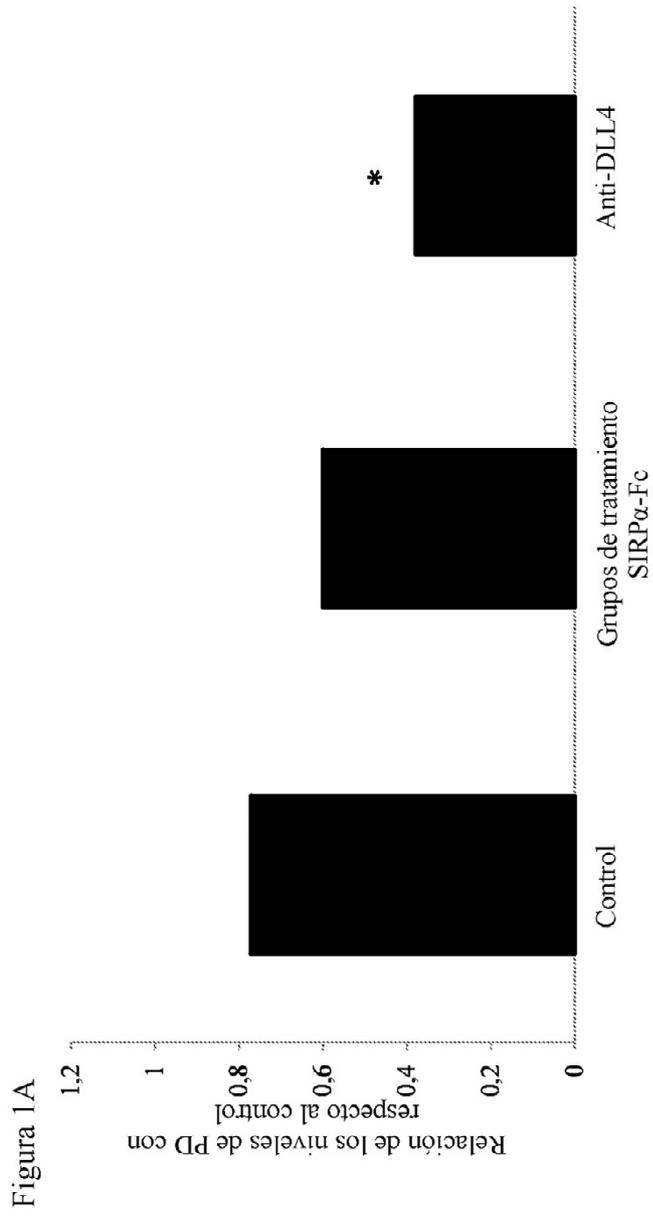


Figura 2B

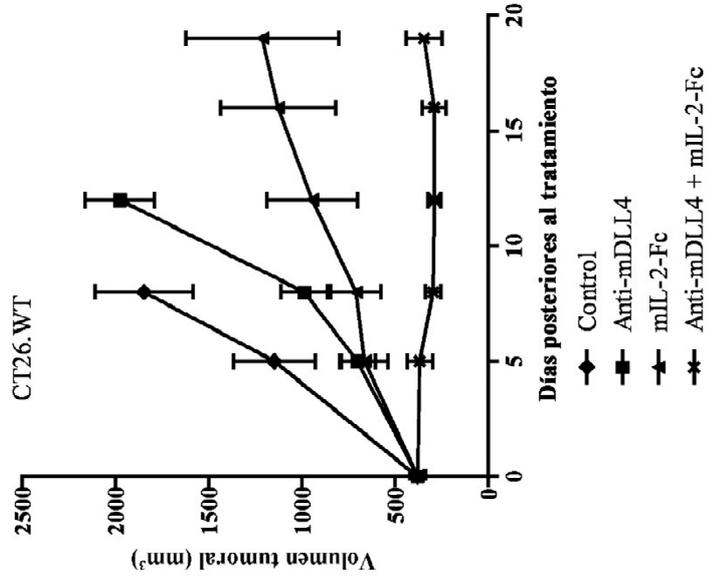


Figura 2A

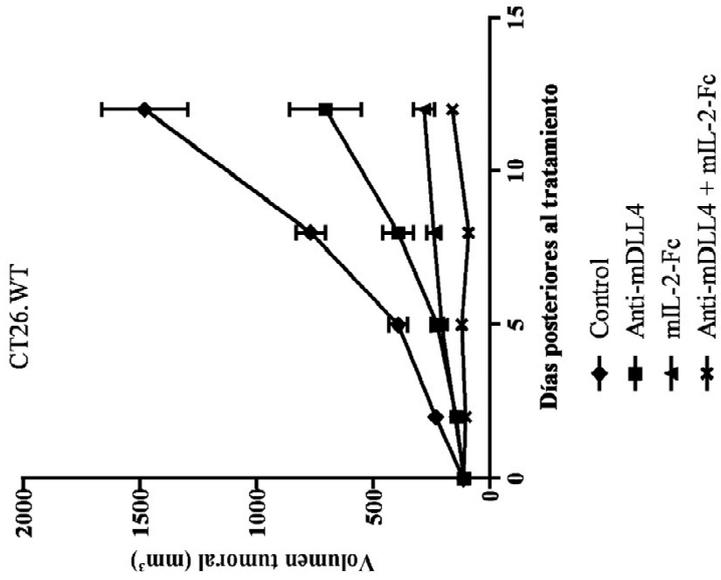


Figura 2C

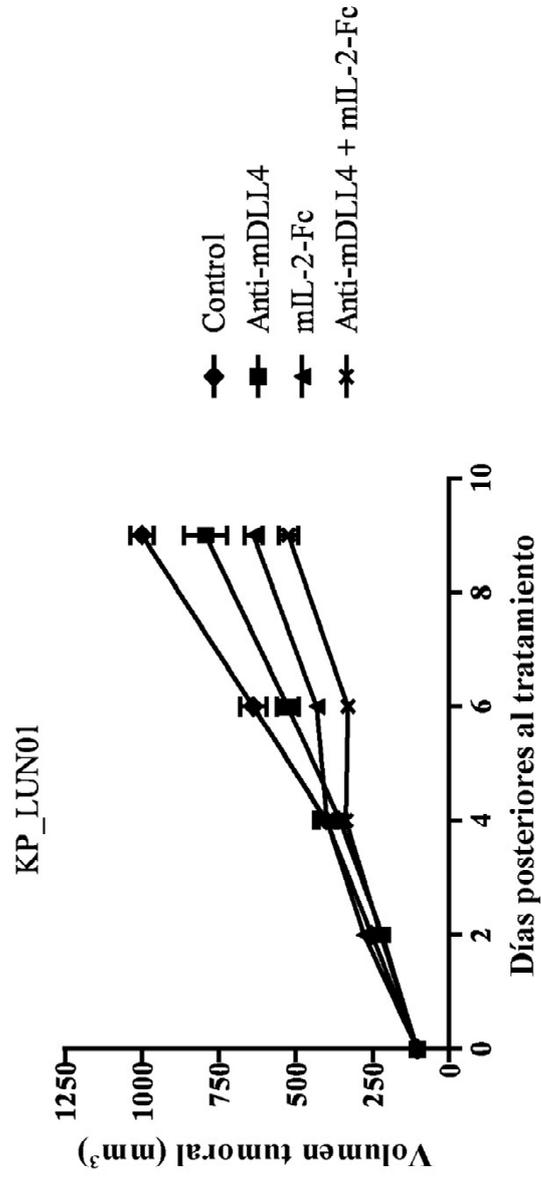


Figura 3B

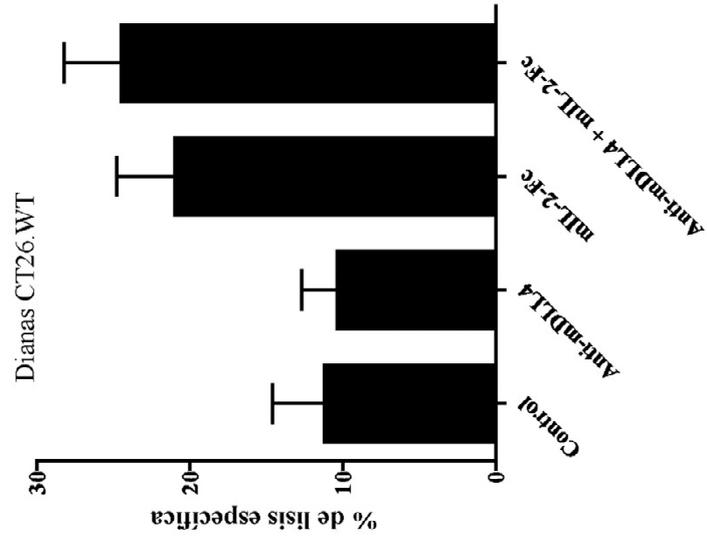


Figura 3A

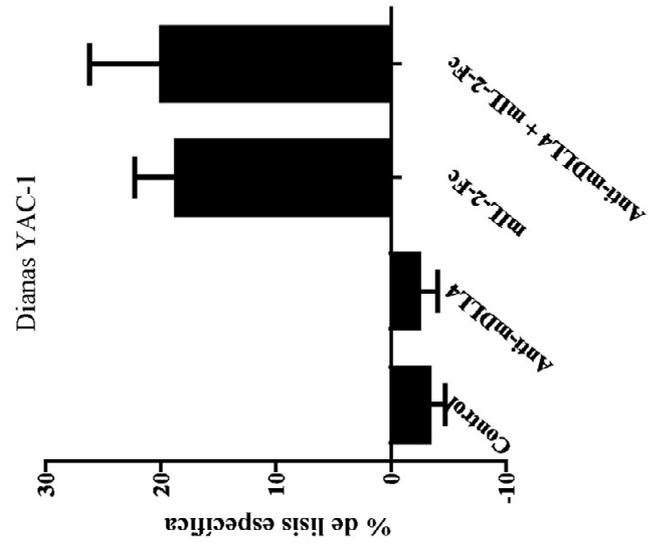


Figura 3C

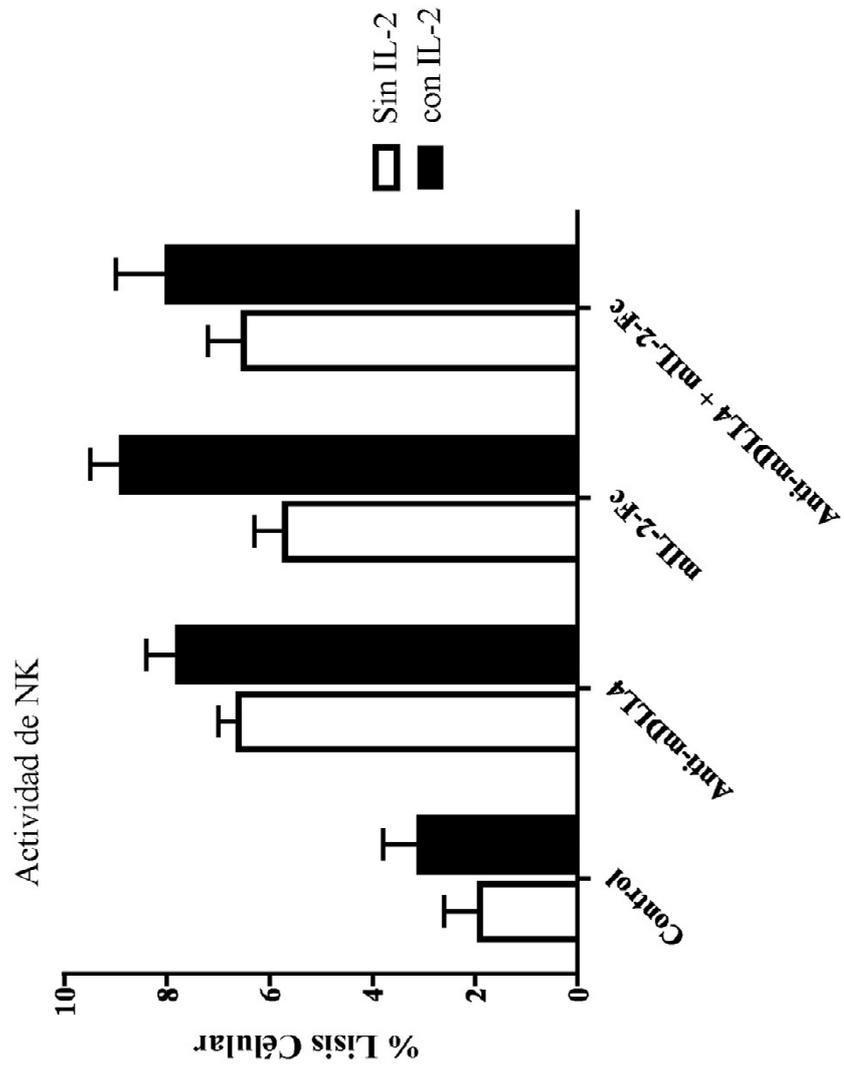


Figura 4B

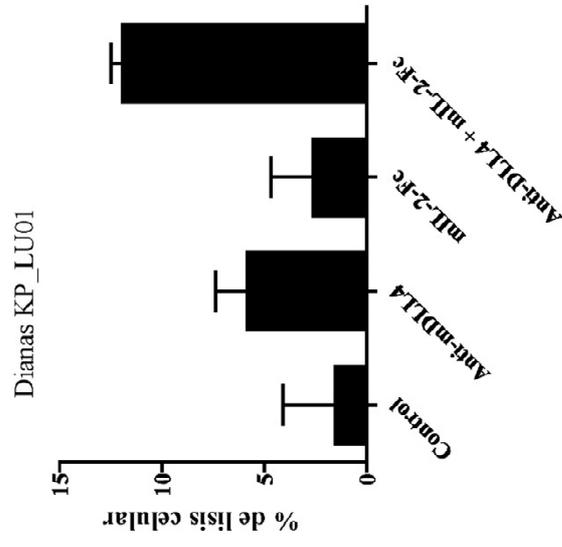


Figura 4A

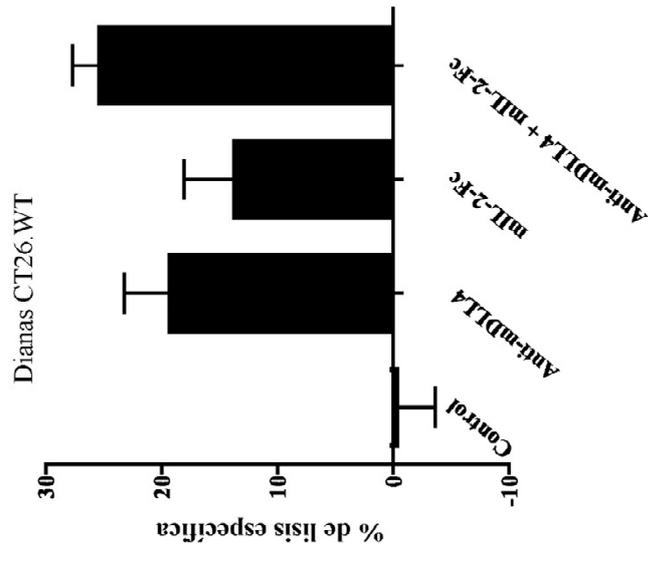


Figura 5

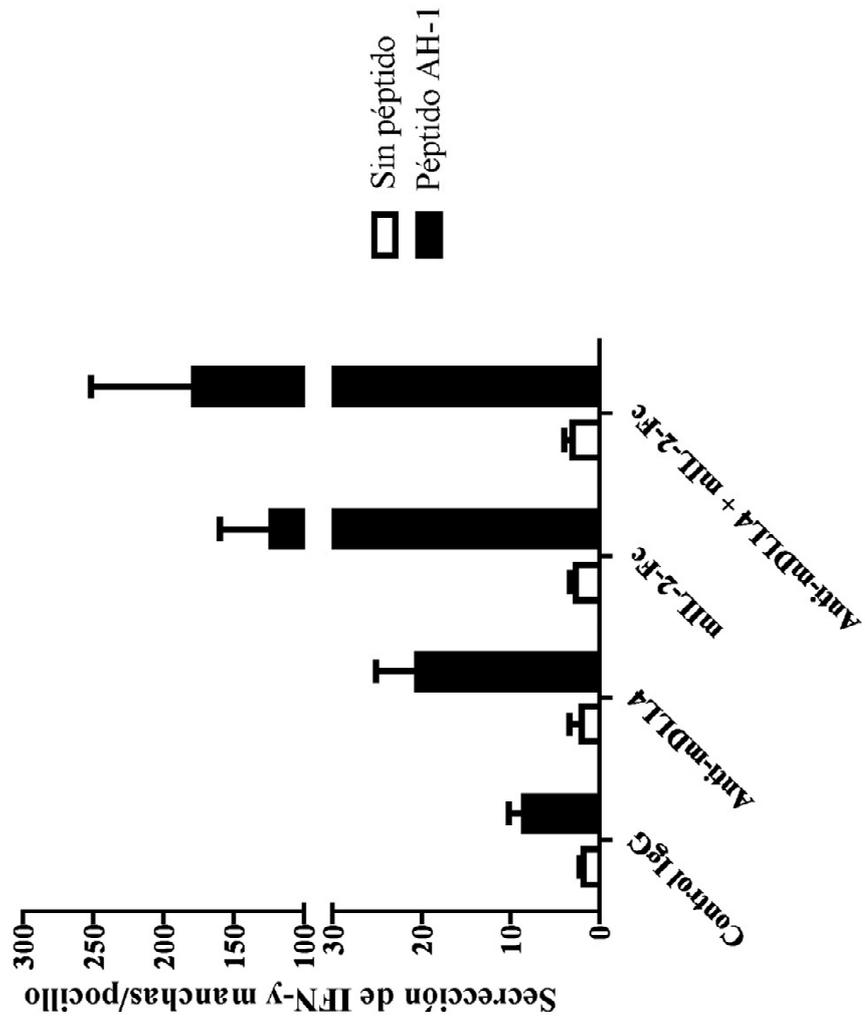
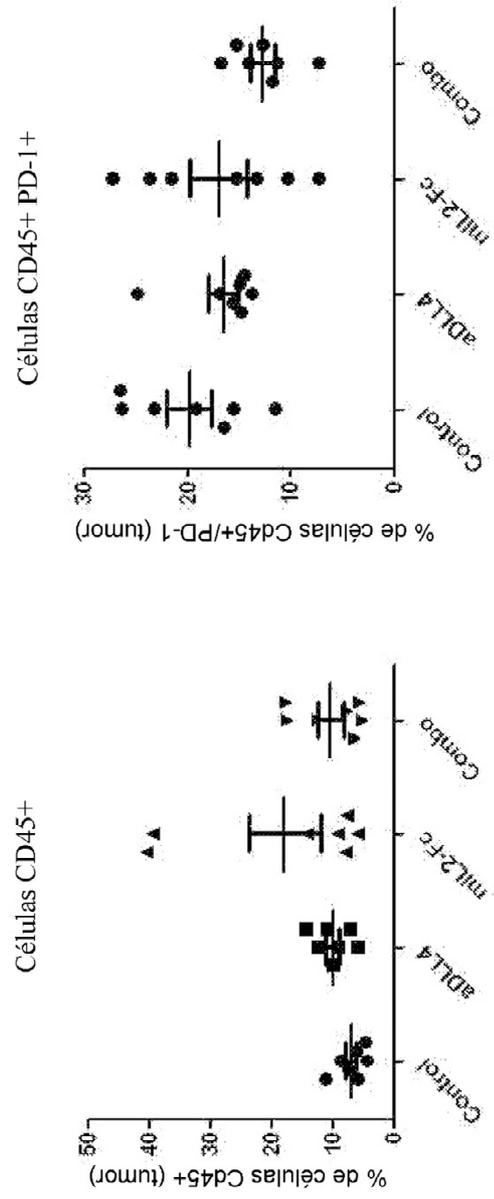


Figura 6



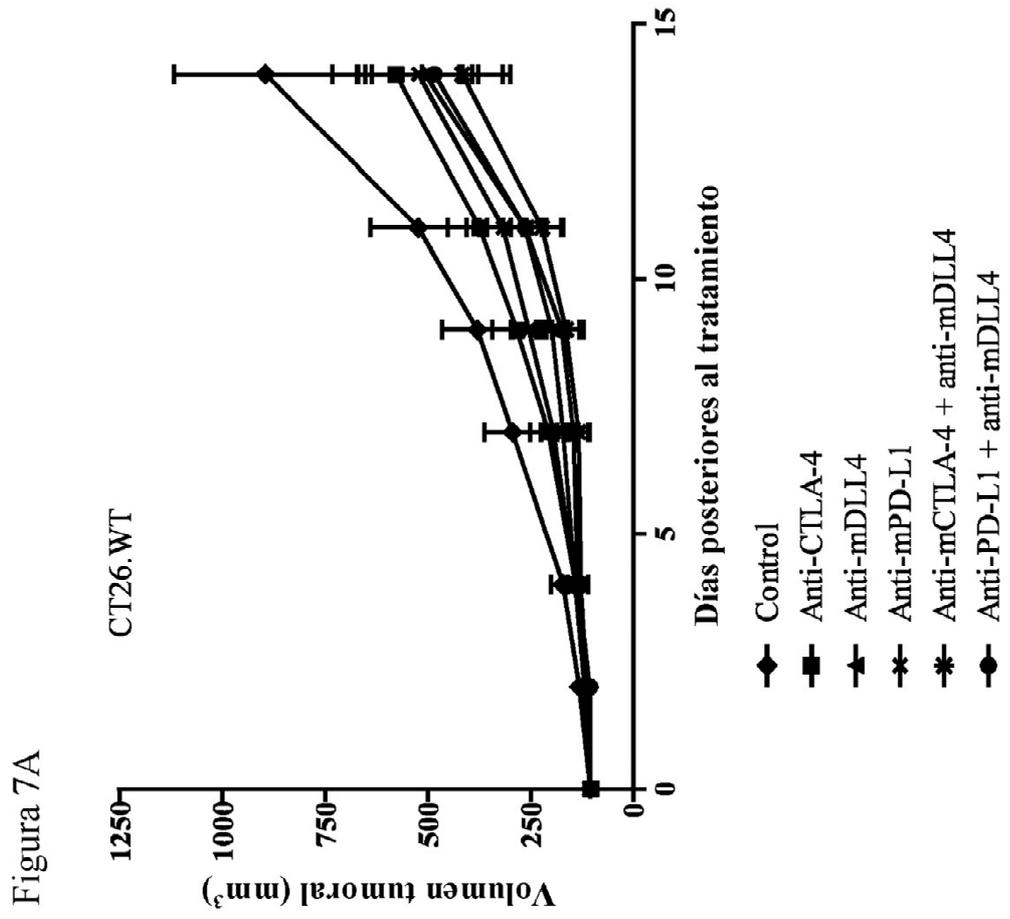


Figura 7B

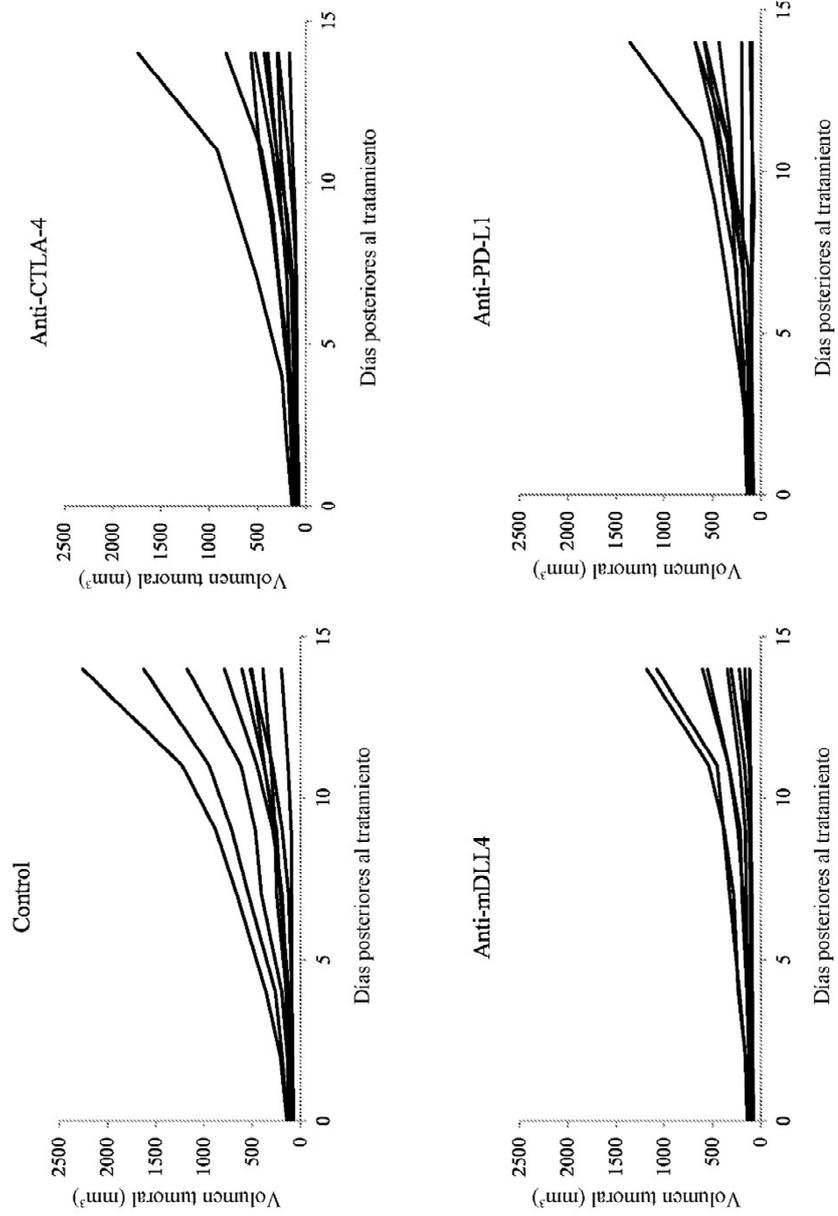


Figura 7C

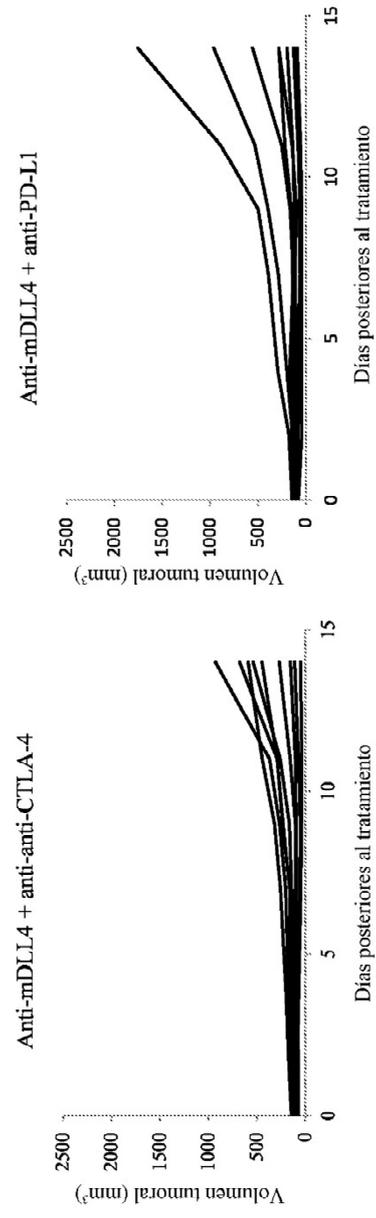


Figura 8A

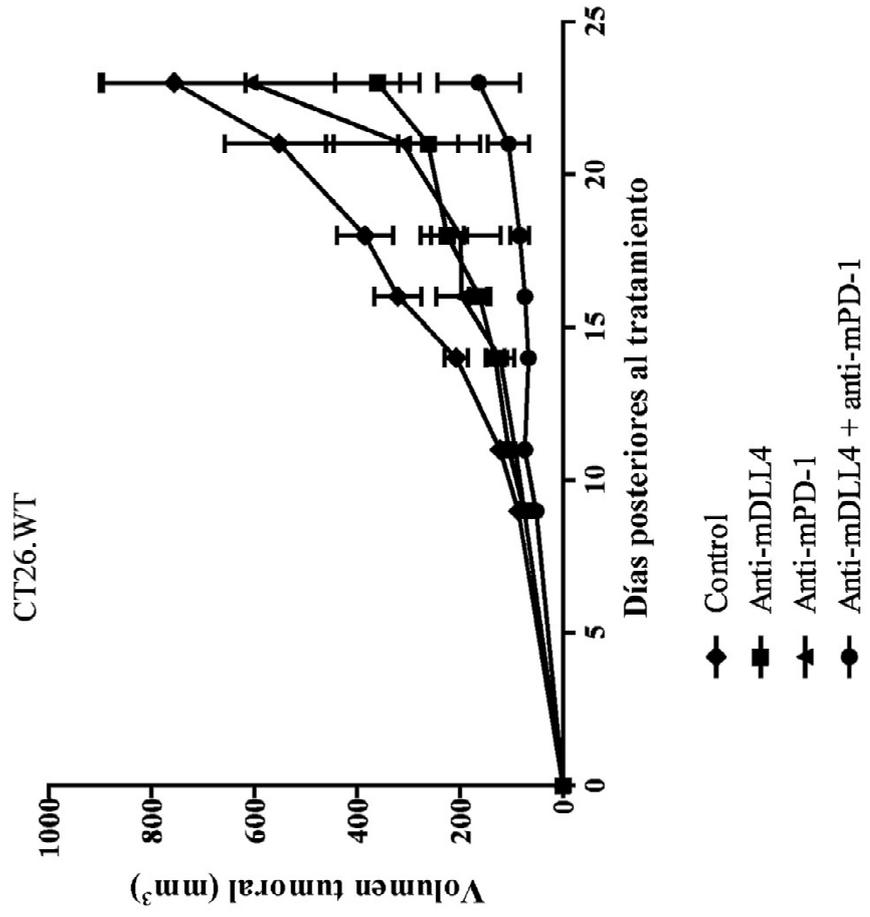


Figura 8B

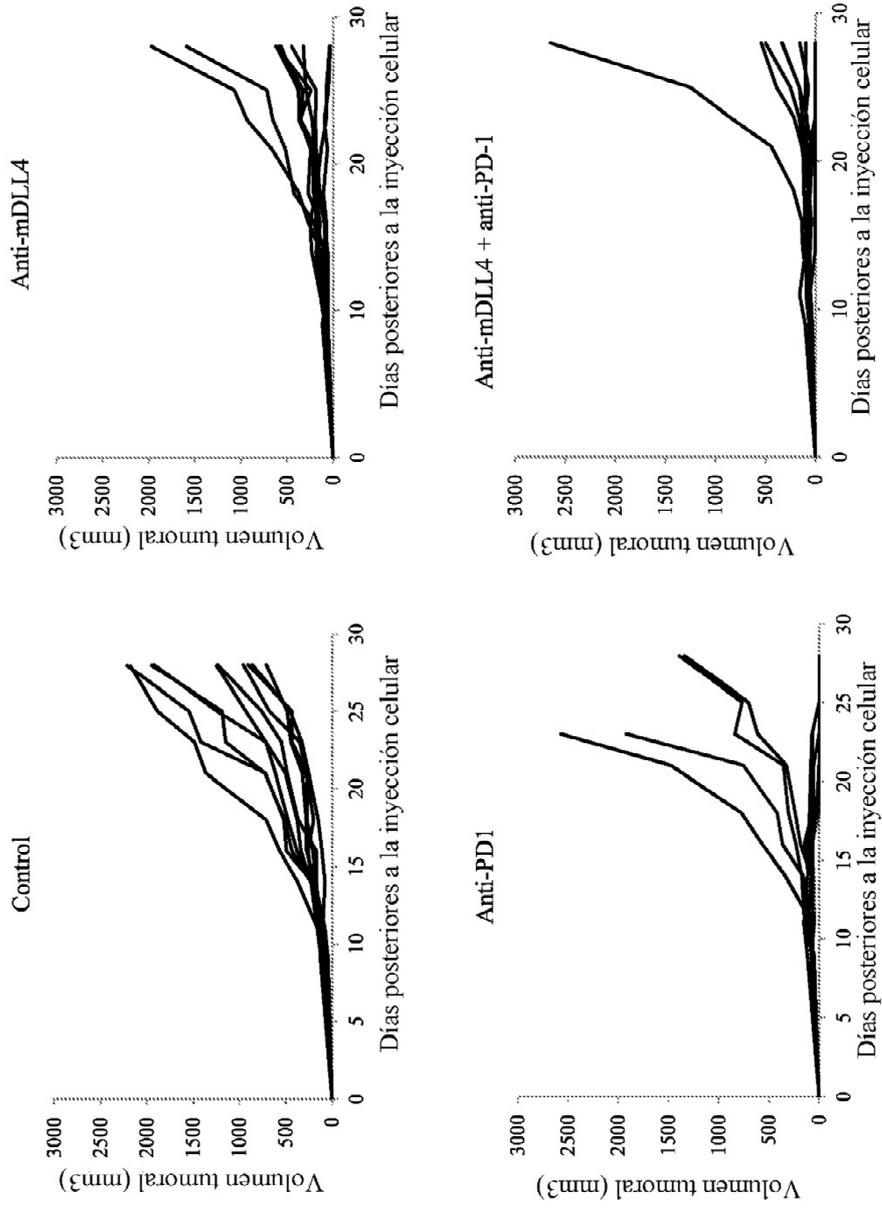


Figura 9

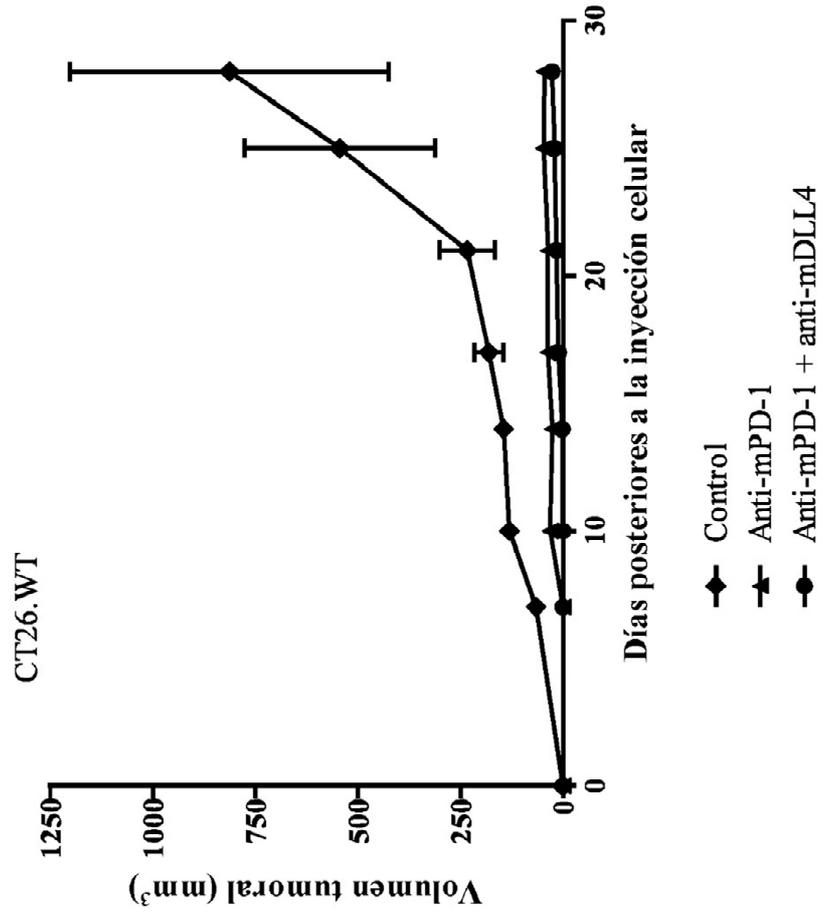


Figura 10B

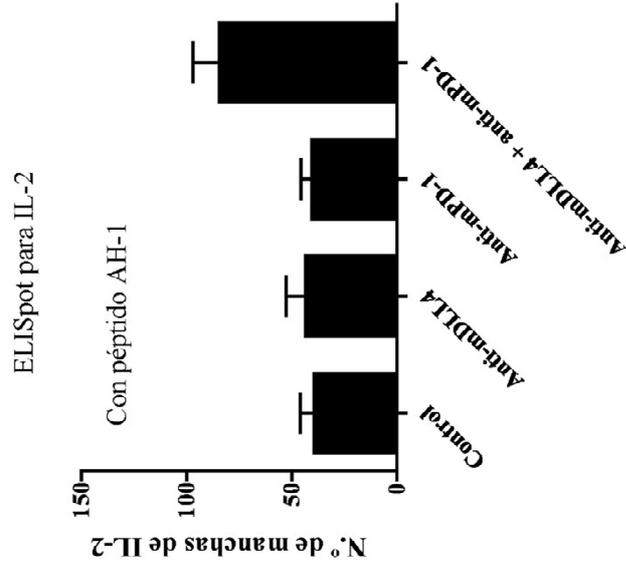
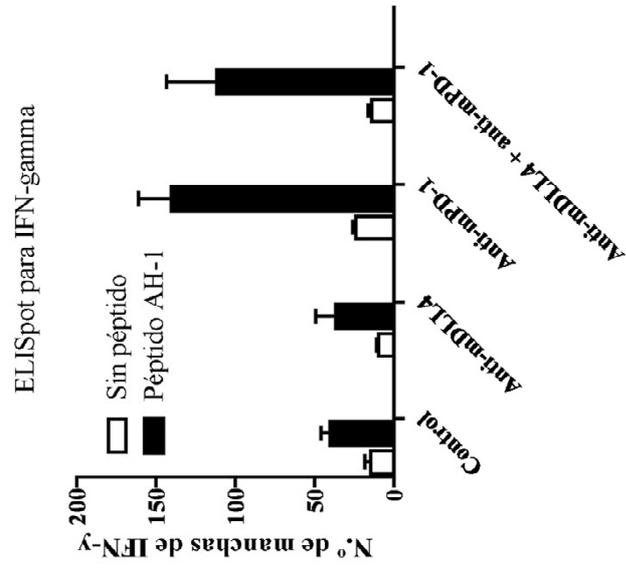


Figura 10A



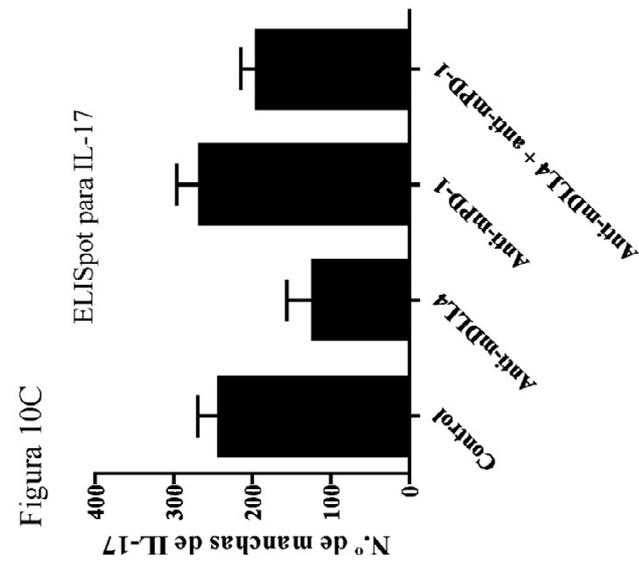
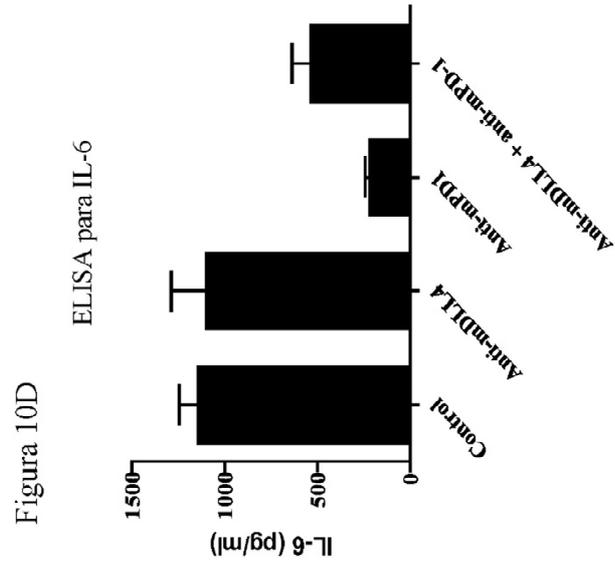
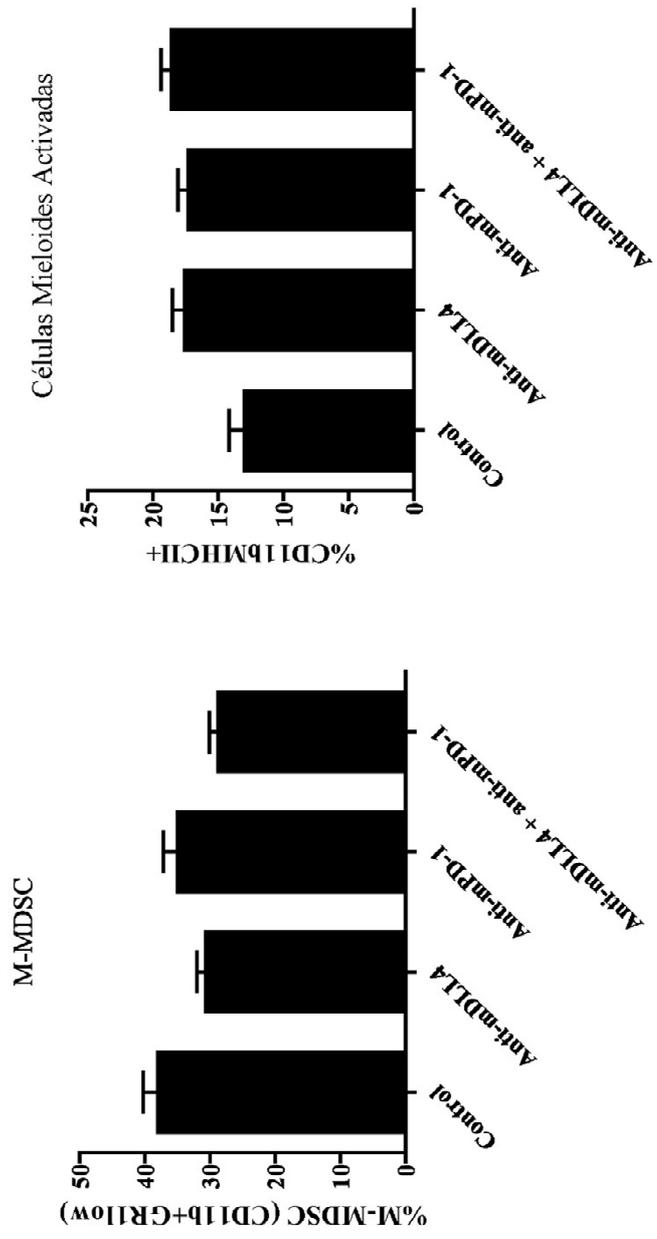


Figura 11



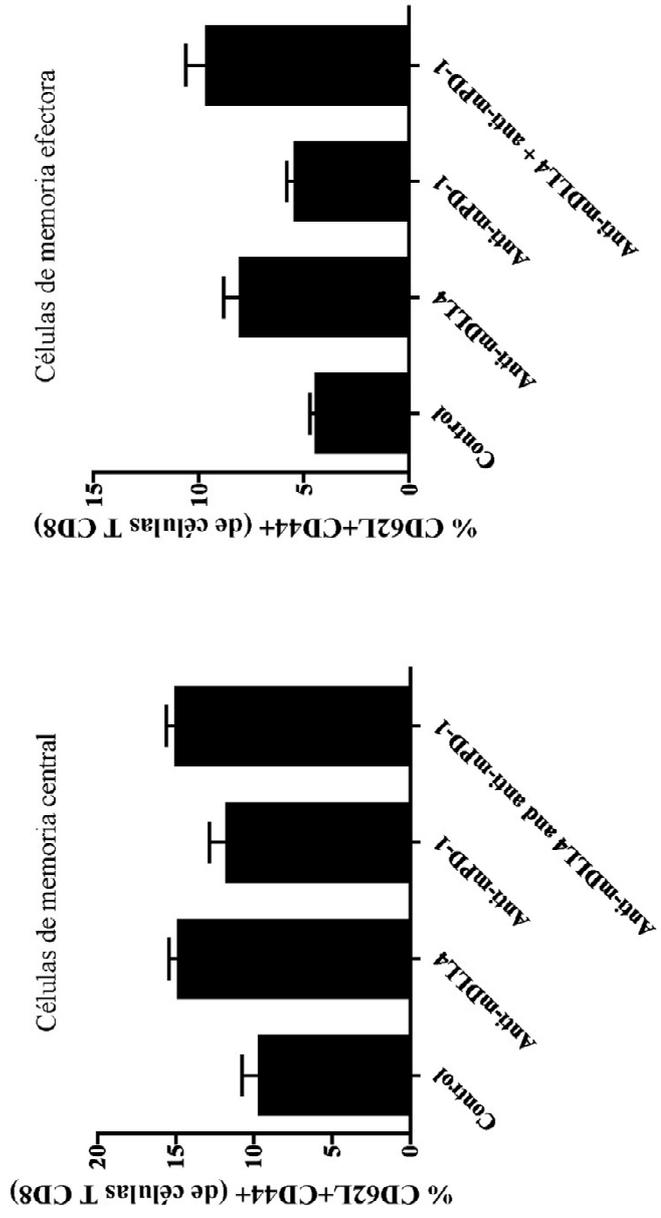


Figura 12

Figura 13

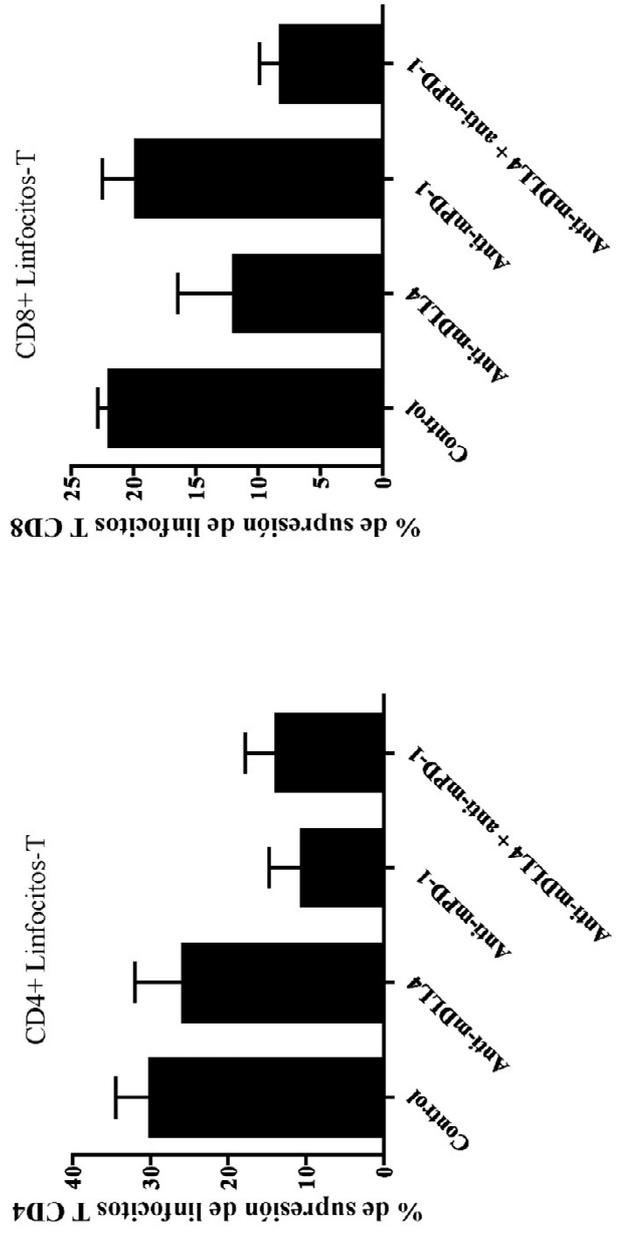


Figura 14

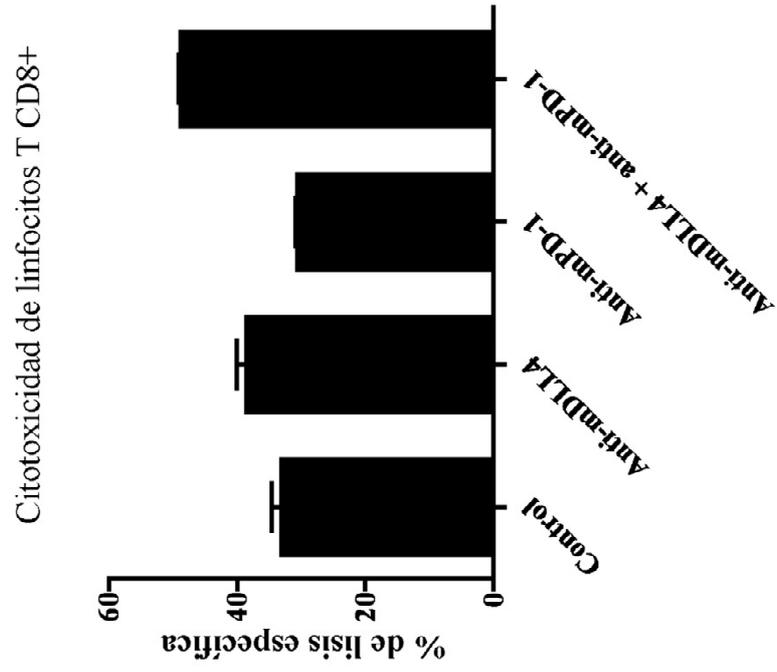


Figura 15B

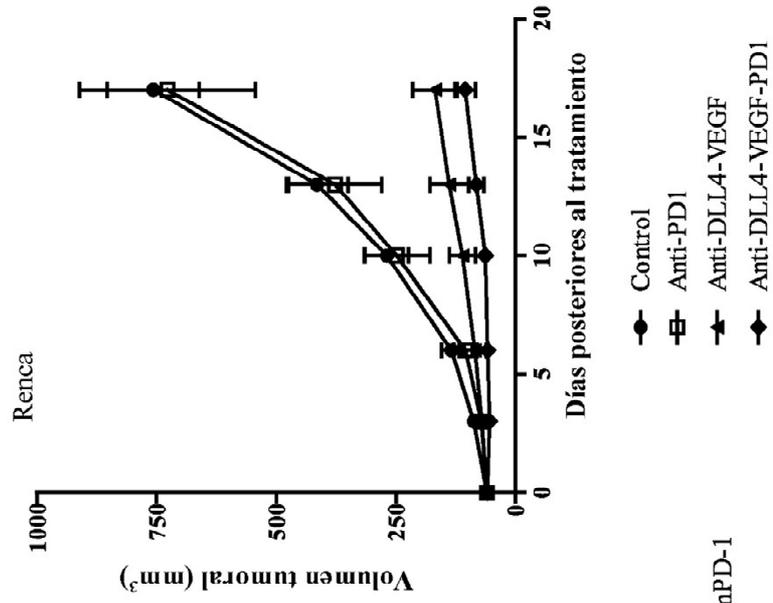


Figura 15A

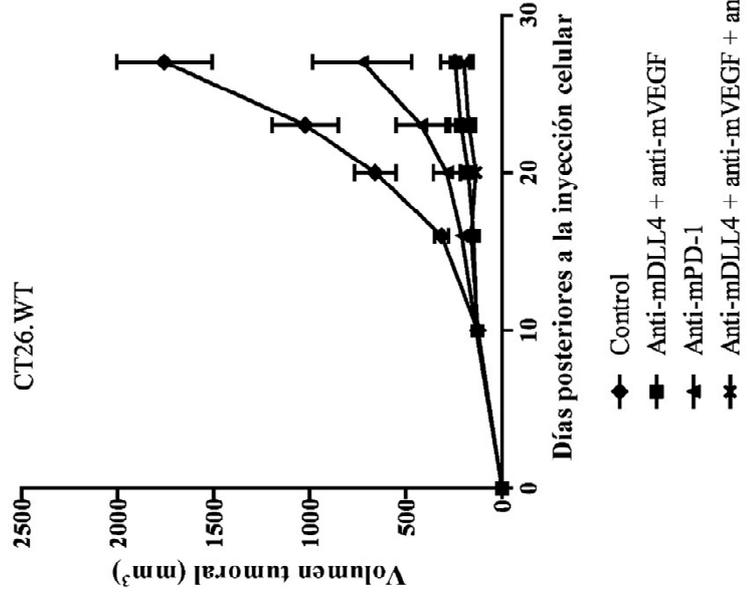


Figura 16

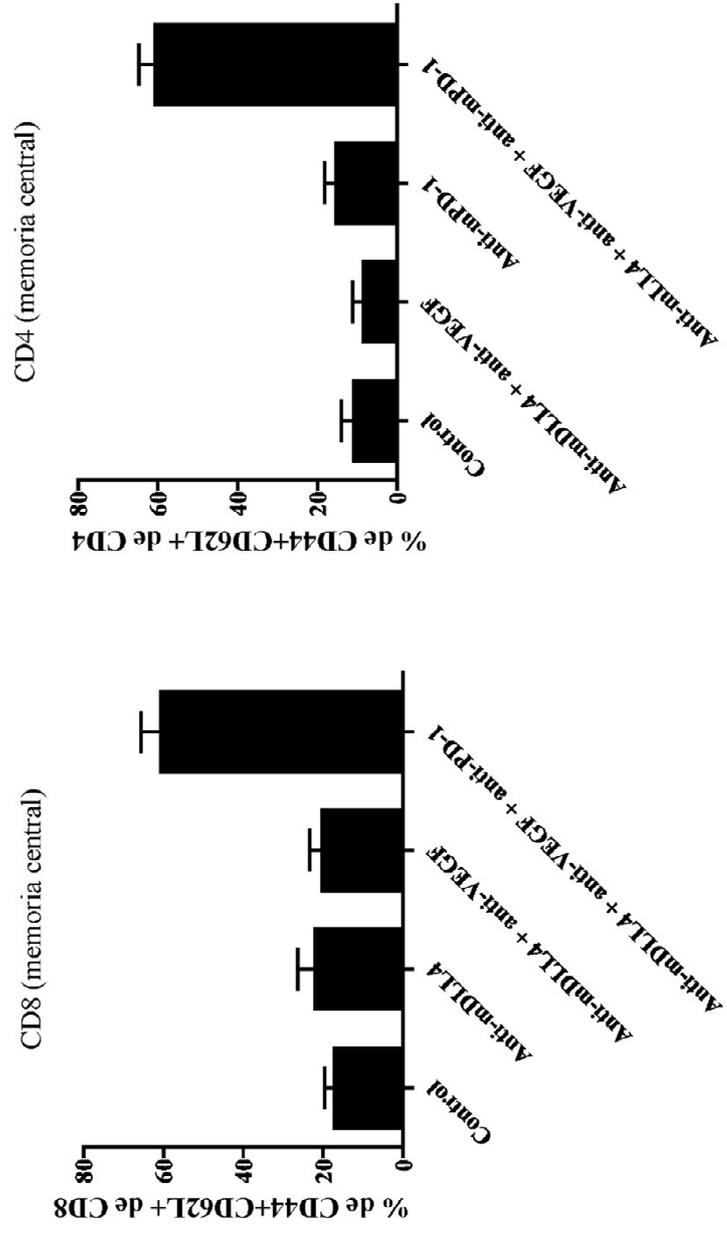


Figura 17A

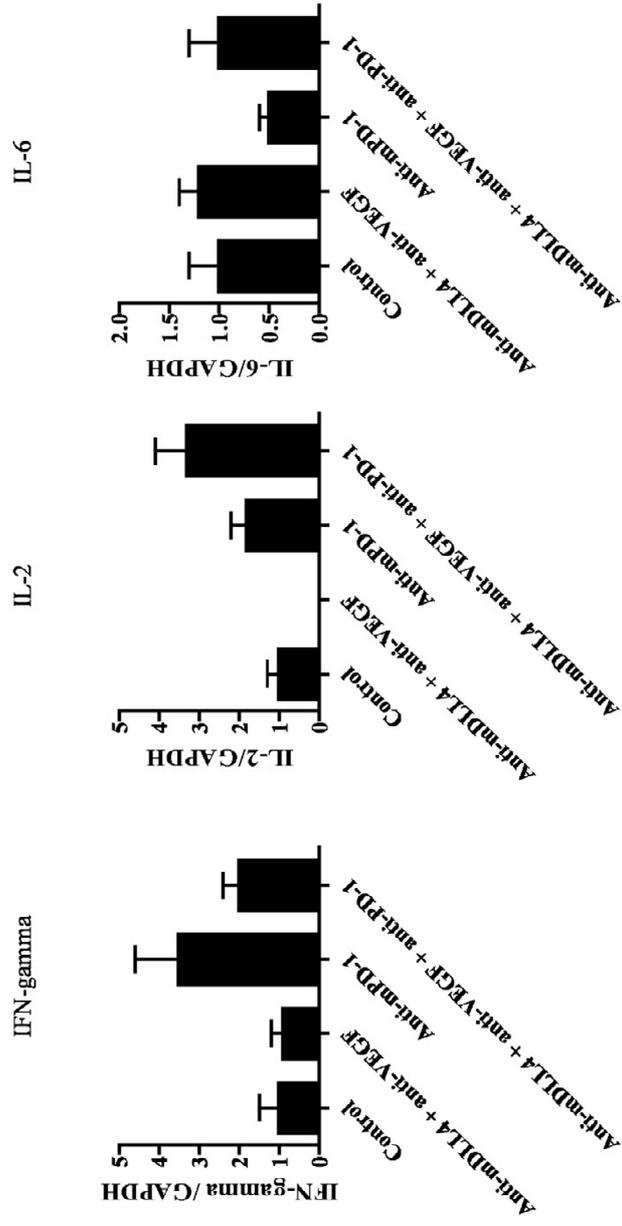


Figura 17B

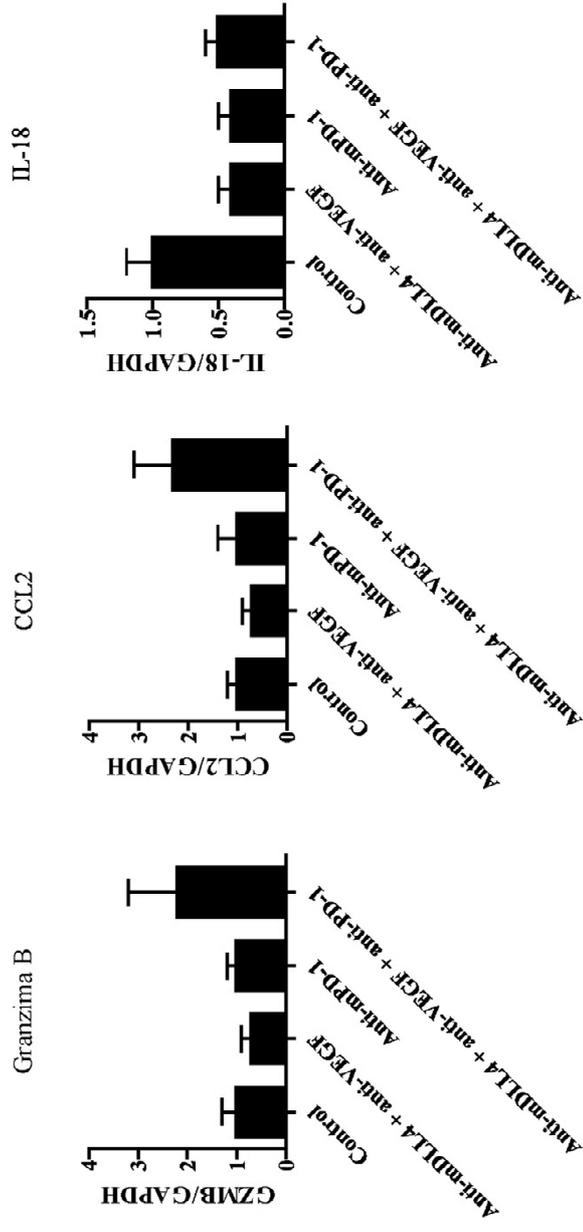


Figura 18

