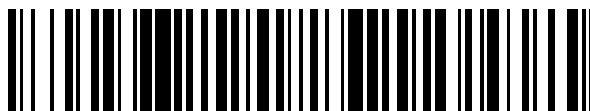


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 066**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2014 PCT/US2014/018743**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14149477**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2014 E 14768797 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2970493**

54 Título: **Métodos para la obtención de dosis terapéuticamente eficaces de agentes anti-CD47**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361800102 P**

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

**22.10.2019**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND  
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)  
Office of the General Counsel Building 170, Third  
Floor, Main Quad P.O. Box 20386  
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**WILLINGHAM, STEPHEN;  
HOWARD, MAUREEN;  
LIU, JIE;  
MAJETI, RAVINDRA;  
PROHASKA, SUSAN SWEENEY;  
VOLKMER, ANNE K.;  
VOLKMER, JENS-PETER y  
WEISSMAN, IRVING L.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 728 066 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para la obtención de dosis terapéuticamente eficaces de agentes anti-CD47

## 5 ANTECEDENTES

[0001] El cambio de células comienza con la inducción de un programa apoptótico u otros cambios celulares que los marcan para su eliminación, y el reconocimiento posterior de marcadores por fagocitos, incluyendo macrófagos, células dendríticas y similares. Este proceso requiere una eliminación específica y selectiva de células no deseadas. A diferencia de las células sanas, las células no deseadas/envejecidas/colorantes muestran marcadores o ligandos llamados señales de "come-me", Es decir, "alterado", que a su vez pueden ser reconocidos por los receptores en los fagocitos. Las células sanas pueden mostrar señales de "no comerme" que inhiben activamente la fagocitosis; estas señales están reguladas a la baja en las células moribundas, están presentes en una conformación alterada o son reemplazadas por la regulación hacia arriba de las señales "come-me" o pro-fagocíticas. La proteína de la superficie celular CD47 en células sanas y su compromiso con un receptor de fagocitos, SIRP $\alpha$ , constituye una señal clave de "no comerme" que puede desactivar el engullimiento mediado por múltiples modalidades, como el aclaramiento de células apoptóticas y la fagocitosis mediada por FcR. El bloqueo del compromiso mediado por CD47 de SIRP $\alpha$  en un fagocito, o la pérdida de la expresión de CD47 en ratones knockout, puede causar la eliminación de células vivas y eritrocitos no envejecidos. El bloqueo de SIRP $\alpha$  también permite el engullimiento de objetivos que normalmente no son fagocitados, para aquellas células en las que también están presentes las señales pre-fagocíticas.

[0002] El CD47 es una glucoproteína transmembrana de expresión amplia con un solo dominio similar a Ig y cinco regiones que se extienden sobre la membrana, que funciona como un ligando celular para SIRP $\alpha$  con unión mediada a través del dominio V2 terminal del terminal NH2 de SIRP $\alpha$ . SIRP $\alpha$  se expresa principalmente en células mieloides, incluidos macrófagos, granulocitos, células dendríticas mieloides (DC), mastocitos y sus precursores, incluidas las células madre hematopoyéticas. Los determinantes estructurales en SIRP $\alpha$  que median la unión a CD47 son discutidos por Lee et al. (2007) J. Immunol. 179: 7741-7750; Hatherley et al. (2007) JBC 282: 14567-75; y el papel de la dimerización de SIRP $\alpha$  cis en la unión a CD47 se discute por Lee et al. (2010) JBC 285: 37953-63. De acuerdo con el papel de CD47 para inhibir la fagocitosis de las células normales, existe evidencia de que está regulada al alza de manera transitoria en las células madre hematopoyéticas (HSC) y los progenitores justo antes y durante su fase migratoria, y que el nivel de CD47 en estas células determina la probabilidad de que sean engullidos in vivo.

[0003] El documento US 2012/282174 describe una terapia sinérgica anti-CD47 para cánceres hematológicos. Willingham et al. (2012) PNAS 109 (17): 6662-6667 describe que la interacción CD47-SIRP $\alpha$  es una diana terapéutica para tumores sólidos humanos. Oldenborg et al. (2004) Leukemia and Lymphoma 45 (7): 1319-1327 describe el papel de CD47 en las células eritroides y en la autoinmunidad. Szenajch et al. (2010) Biochimica et Biophysica Acta 1806(1): 82-95 describe el papel de la eritropoyetina y su receptor. El documento WO 2013/109752 describe reactivos de SIRP $\alpha$  de alta afinidad.

[0004] La muerte celular programada (PCD) y la eliminación de las células fagocíticas son formas comunes de que un organismo responde a fin de eliminar células dañadas, precancerosas, o infectadas. Por lo tanto, las células que sobreviven a esta respuesta del organismo (p. ej., células cancerosas, células con infección crónica, etc.) han ideado formas de evadir la PCD y la eliminación de células fagocíticas. El CD47, la señal de "no comerme", está regulado de manera constitutiva en una amplia variedad de células enfermas, células cancerosas y células infectadas, lo que permite que estas células evadan la fagocitosis. Los agentes anti-CD47 que bloquean la interacción entre CD47 en una célula (por ejemplo, una célula cancerosa, una célula infectada, etc.) y SIRP $\alpha$  en otra célula (por ejemplo, una célula fagocítica) contrarrestan el aumento de la expresión de CD47 y facilitan la fagocitosis de la célula cancerosa y/o de la célula infectada. Por lo tanto, los agentes anti-CD47 se pueden usar para tratar y/o proteger contra una amplia variedad de afecciones/trastornos.

[0005] Sin embargo, una alta dosis inicial de un agente anti-CD47 puede causar una pérdida dependiente de la dosis de los glóbulos rojos (GR) en ratones y modelos de primates no humanos (NHP). La gravedad de esta anemia puede impedir el uso de dosis más altas que se requieren para alcanzar concentraciones séricas sostenidas asociadas con la eficacia terapéutica. La presente invención se refiere a métodos mediante los cuales se mitiga la toxicidad de eritrocitos de los agentes anti-CD47, lo que permite el tratamiento con cantidades terapéuticamente eficaces de agentes anti-CD47.

## SUMARIO DE LA INVENCION

[0006] La invención proporciona un agente anti-CD47 que puede conducir a una pérdida de eritrocitos y la anemia cuando se administra a una dosis terapéutica, para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un sujeto, comprendiendo el método:

(a) administrar como agente de imprimación el agente anti-CD47 al sujeto en una dosis sub-terapéutica que prepare al sujeto para la administración de una dosis terapéuticamente eficaz del agente anti-CD47, en donde la dosis sub-terapéutica reduce significativamente la toxicidad debida a la pérdida de eritrocitos; y

(b) administrar una dosis terapéuticamente eficaz del agente anti-CD47 al sujeto,

en donde el agente anti-CD47 reduce la unión de CD47 a SIRP $\alpha$  y se selecciona entre: un anticuerpo anti-CD47, un polipéptido SIRP $\alpha$  soluble fusionado a una región Fc de inmunoglobulina y un polipéptido SIRP $\alpha$  de alta afinidad fusionado a una región Fc de inmunoglobulina;

en donde la etapa (b) se realiza en un rango de 3 días a 21 días después de comenzar la etapa (a).

**[0007]** La invención proporciona además un kit que comprende: un agente anti-CD47 para el uso de la invención.

**[0008]** Se describen métodos para tratar a un individuo con una dosis terapéutica de agente anti-CD47 mediante la administración de un agente de imprimación antes de administrar una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47 al individuo. En algunas realizaciones, los métodos encuentran uso en la optimización de terapias dirigidas a modular la fagocitosis mediada por CD47. En algunas de tales realizaciones, el individuo está siendo tratado con una dosis de agente anti-CD47 para el cáncer. En los métodos del sujeto, se administra una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47 desde aproximadamente 3 días hasta aproximadamente 21 días después de administrar un agente de imprimación.

**[0009]** En algunas realizaciones de la invención, se administran dos o más agentes de cebadores. Los agentes de imprimación adecuados incluyen un agente estimulante de la eritropoyesis (ESA) y una dosis de cebado de un agente anti-CD47.

**[0010]** Un agente anti-CD47 para el uso de la invención interfiere con la unión entre CD47 presente en una célula diana, incluyendo sin limitación una célula de cáncer, a SIR  $\alpha$  presente en una célula fagocítica. Generalmente ambas células están presentes en el individuo que está siendo tratado. Dichos métodos, en presencia de una señal pro-fagocítica, pueden aumentar la fagocitosis de la célula diana. Los métodos del sujeto se pueden usar para tratar a un sujeto para cualquier enfermedad susceptible de bloqueo de la señalización SIRP $\alpha$  mediada por CD47. Los agentes anti-CD47 adecuados incluyen polipéptidos SIRP $\alpha$  solubles que se fusionan con una región Fc de inmunoglobulina; anticuerpos anti-CD47, y similares, donde el término anticuerpos abarca fragmentos de anticuerpos y variantes de los mismos, como se conoce en la técnica.

**[0011]** Las dosis terapéuticas de agentes anti-CD47 como se describió anteriormente puede conducir a una pérdida de eritrocitos (RBC) y anemia. Los métodos abordan este problema, y sorprendentemente muestran que un agente de imprimación, como se usa en este documento, reduce significativamente la toxicidad debido a la pérdida de eritrocitos. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que el agente cebador aumenta la producción de reticulocitos (RBC inmaduros), que pueden ser más resistentes a la fagocitosis mediada por CD47 y, por lo tanto, son menos susceptibles a la pérdida durante la administración posterior del agente anti-CD47.

**[0012]** Ciertas realizaciones de la invención incluyen, opcionalmente, un paso de determinar la capacidad de respuesta de un individuo a la administración del agente de imprimación. Por ejemplo, se puede usar un recuento de reticulocitos, o una disminución de la hemoglobina, para determinar si la administración del agente cebador aumentó la producción de reticulocitos. Se puede realizar un recuento de reticulocitos antes y después de la administración del agente de imprimación, lo que permite un período de tiempo entre recuentos que es eficaz para un aumento de los reticulocitos. Alternativamente, se puede usar cualquier método adecuado para determinar la eritropoyesis aumentada.

**[0013]** Después de la administración del agente de cebado, y permitiendo un período de tiempo eficaz para un aumento en la producción de reticulocito, se administra una dosis terapéutica de un agente anti-CD47. La dosis terapéutica se puede administrar de diferentes maneras. En algunas realizaciones, se administran dos o más dosis terapéuticamente eficaces después de que se administra un agente de imprimación. En algunas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47 se administra como dos o más dosis de concentración creciente, en otras las dosis son equivalentes.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0014]**

**La Fig. 1A-B** presenta el porcentaje de cambio en el hematocrito (HCT) y el porcentaje de cambio de hemoglobina después de que se administró una inyección IP de 250  $\mu$ g de MIAP410 (isotipo IgG1) o MIAP470 (isotipo IgG2a) a ratones de tipo salvaje.

**La Fig. 2** presenta el cambio porcentual en la hemoglobina después de una inyección de 250  $\mu$ g IP de MIAP410 (isotipo IgG1) o MIAP470 (isotipo IgG2a) que se administró a ratones CD47<sup>-/-</sup>.

**Fig. 3A-B** presenta el porcentaje de cambio en el hematocrito (HCT) y el cambio por ciento de hemoglobina después de inyecciones ip de 250  $\mu$ g de IgG de ratón de control, MIAP410, o MIAP740 se administraron a ratones de tipo salvaje cada 3 días.

**La Fig. 4** representa una alineación de secuencia entre CD47 humano y macaco en el dominio extracelular similar a Ig. CD47ECD humano (SEQ ID NO: 4); Cyno (macaco) CD47ECD (SEQ ID NO: 5).

**La Fig. 5** demuestra que Hu5F9-G4 reconoce CD47 humano y cynomolgus, pero no CD47 de ratón. El ELISA se realizó mediante el recubrimiento de un anticuerpo específico anti-Fc de ratón, seguido de la adición de proteínas de fusión CD47-mFc humanas y de ratón. Se usó una proteína de fusión Fc (mFc) de ratón irrelevante como control negativo. Entonces se añadió Hu5F9-G4. El anticuerpo unido se detectó utilizando un anticuerpo Kappa anti-humano conjugado con HRP.

**La Fig. 6** presenta un resumen de las constantes de unión medidas para la unión de Hu5F9-G4. Los estudios de unión a SPR se realizaron en un sistema BioRad ProteOn XPR36 utilizando un chip sensor GLM. Los datos de unión se recogieron a 25°C. Los datos de respuesta se ajustaron globalmente utilizando un modelo de interacción 1:1. El número entre paréntesis representa el error estándar en el último dígito informado. **(A)** Unión a CD47 humano. **(B)** Unión a cynomolgus CD47.

**La Fig. 7** presenta datos de estudios toxicocinéticos de primates no humanos Hu5F9-G4. A cynomolgus NHP se les administró Hu5F9-G4 en dosis únicas a los niveles indicados.

**(A)** La anemia se desarrolló de manera dependiente de la dosis, pero se resolvió espontáneamente. La barra sombreada indica el rango de hemoglobina que indica la necesidad de transfusión en humanos.

**(B)** El análisis farmacocinético (PK) mediante la medición de los niveles séricos indicó una vida media corta con niveles terapéuticos alcanzados en 10 y 30 mg/kg, pero no en las otras dosis.

**La Fig. 8** presenta datos de un estudio toxicocinético de escalada de dosis de Hu5F9-G4 de primates no humanos. Se administró Hu5F9-G4 a un NHP de Cynomolgus que no recibió tratamiento previo o tratamiento previo con una dosis única de EPO en un estudio de aumento de dosis con las dosis y los puntos temporales indicados. **(A)** La hemoglobina se midió en serie para controlar la anemia. **(B)** El suero se examinó para determinar el nivel de Hu5F9-G4 mediante ELISA para determinar la farmacocinética (PK). En el panel **(A)**, la barra sombreada indica el rango de hemoglobina en los seres humanos que tiende a desencadenar una transfusión. En el panel **(B)**, la barra sombreada indica el rango de suero Hu5F9-G4 asociado con una potente eficacia en estudios de xenoinjerto.

**La Fig. 9** presenta datos de un estudio toxicocinético de dosis y mantenimiento de primate Hu5F9-G4 no humano. Cynomolgus NHP recibió una dosis de carga (LD) (es decir, una dosis de cebado) el día 1 de 1 mg/kg o 3 mg/kg y luego dosis de mantenimiento (MD) de 10 o 30 mg/kg en los puntos de tiempo de dosis indicada. Se usaron 2 NHPs (línea continua y línea discontinua) en cada grupo experimental. **(A)** La hemoglobina se midió en serie para controlar la anemia. **(B)** El suero se examinó para determinar el nivel de Hu5F9-G4 mediante ELISA para determinar la farmacocinética. En el panel **(A)**, la barra sombreada indica el rango de hemoglobina en humanos que podría desencadenar una transfusión. En el panel **(B)**, la barra sombreada indica el rango de suero Hu5F9-G4 asociado con una potente eficacia contra la AML humana primaria en estudios de xenoinjerto (es decir, el rango de niveles séricos terapéuticamente efectivos).

**La Fig. 10** presenta datos de recuento de reticulocitos que demuestran el nivel de reticulocitosis asociada con varias dosis de un agente anti-CD47 (anticuerpo hu5F9-G4 en este caso).

**La Fig. 11** demuestra que Hu5F9-G4 inhibe el crecimiento del tumor y la metástasis. **A)** Hu5F9-G4 elimina completamente el cáncer de vejiga en los ensayos de xenotrasplantes. **B)** Hu5F9-G4 previene la metástasis del cáncer de próstata humano in vivo.

**La Fig. 12** demuestra que Hu5F9-G4 elimina las metástasis establecidas. **A-B)** Hu5F9-G4 elimina las células metastásicas del cáncer de mama en los pulmones **(A)** y el cerebro **(B)**. **C)** Hu5F9-G4 inhibe el recrecimiento de tumores de mama resecaados. **D)** Concentraciones séricas de hu5F9-G4 asociadas con eficacia terapéutica. Por lo tanto, los anticuerpos humanizados (por ejemplo, hu5F9-G4), tienen las mismas propiedades generales relacionadas con el tratamiento de la enfermedad (por ejemplo, cáncer o infección crónica) que los anticuerpos no humanizados y los métodos en cuestión serán efectivos cuando se use un anticuerpo humanizado (por ejemplo, anticuerpo anti-CD47) para tratar el cáncer y/o para tratar una infección crónica.

**La Fig. 13** muestra el diseño del estudio descrito en el Ejemplo 4.

**La Fig. 14** muestra los datos del nivel de hemoglobina para todas las cohortes durante la duración del estudio descrito en el Ejemplo 4 (ver también la Fig. 13).

**La Fig. 15** representa el perfil farmacocinético de Hu5F9-G4 (anticuerpo anti-CD47 humanizado) en todas las cohortes del estudio descrito en el Ejemplo 4 (ver también Fig. 13).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0015]** La presente invención se refiere a métodos de tratamiento de un sujeto con una dosis terapéutica de agente anti-CD47 mediante la administración de primero el agente anti-CD47 como un agente de imprimación.

**[0016]** Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese rango también se describe específicamente. Cada rango menor entre cualquier valor declarado o valor intermedio en un rango establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese rango establecido se incluye dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el rango, y cada rango donde cualquiera de los dos límites incluidos o ambos están incluidos en los rangos más pequeños también se incluye dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, los rangos

que excluyen cualquiera o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

**[0017]** Cualquier método reivindicado se puede llevar a cabo en el orden de eventos recitadas o en cualquier otro orden que es lógicamente posible.

**[0018]** Hay que señalar que, como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de dichas células y la referencia a "el péptido" incluye una referencia a uno o más péptidos y equivalentes de los mismos, por ejemplo, polipéptidos, conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

#### Definiciones

**[0019]** *Agente anti-CD47*. Como se usa en este documento, el término "agente anti-CD47" se refiere a cualquier agente que reduce la unión de CD47 (por ejemplo, en una célula diana) a SIRP $\alpha$  (por ejemplo, en una célula fagocítica). En el contexto de la invención, el agente anti-CD47 se selecciona de: un anticuerpo anti-CD47, un polipéptido SIRP $\alpha$  soluble fusionado con una región Fc de inmunoglobulina y un polipéptido SIRP $\alpha$  de alta afinidad fusionado con una región Fc de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 adecuado (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47) se une específicamente a CD47 para reducir la unión de CD47 a SIRP $\alpha$ . La eficacia de un agente anti-CD47 adecuado puede evaluarse analizando el agente (descrito más adelante). En un ensayo ejemplar, las células diana se incuban en presencia o ausencia del agente candidato. Un agente para el uso de la invención regulará la fagocitosis al menos en un 10% (por ejemplo, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 100%, al menos el 120%, al menos el 140%, al menos el 160%, al menos el 180%, o al menos el 200% en comparación con la fagocitosis en ausencia del agente. De manera similar, un ensayo *in vitro* para determinar los niveles de fosforilación de tirosina de SIRP $\alpha$  mostrará una disminución de la fosforilación en al menos un 5% (por ejemplo, al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o 100% en comparación con la fosforilación observada en ausencia del agente candidato.

**[0020]** En algunas realizaciones, el agente anti-CD47 no activa CD47 tras la unión. Cuando se activa el CD47, puede ocurrir un proceso similar a la apoptosis (es decir, muerte celular programada) (Manna y Frazier, *Cancer Research*, 64, 1026-1036, 1 de febrero de 2004). Por lo tanto, en algunas realizaciones, el agente anti-CD47 no induce directamente la muerte celular de una célula que expresa CD47.

**[0021]** Algunos agentes patógenos (por ejemplo, virus de la viruela, virus del mixoma, virus de la viruela, virus de la viruela porcina, virus de la viruela caprina, virus de la viruela ovina, etc.) expresan un CD47 análogo (es decir, un CD47 gráfico) (por ejemplo, la proteína M128L) que actúa como un factor de virulencia para permitir la infección (Cameron et al., *Virology*, 2005 Jun 20; 337 (1): 55-67), y algunos patógenos inducen la expresión de CD47 endógeno en la célula huésped. Las células infectadas con un patógeno que expresa un análogo de CD47 pueden, por lo tanto, expresar el análogo de CD47 proporcionado por el patógeno, ya sea exclusivamente o en combinación con CD47 endógeno. Este mecanismo permite al patógeno aumentar la expresión de CD47 (a través de la expresión del análogo de CD47) en la célula infectada con o sin aumentar el nivel de CD47 endógeno. En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 (por ejemplo, anticuerpo anti-CD47) puede reducir la unión de un análogo de CD47 (es decir, un imitador de CD47) a SIRP $\alpha$ . En algunos casos, un agente anti-CD47 adecuado (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47) puede unirse a un análogo de CD47 (es decir, un imitador de CD47) para reducir la unión del análogo de CD47 a SIRP $\alpha$ . Se puede usar un agente anti-CD47 en cualquiera de los métodos proporcionados en este documento cuando el patógeno es un patógeno que proporciona un análogo de CD47. En otras palabras, el término "CD47", como se usa en el presente documento, abarca CD47 así como los análogos de CD47 (es decir, los imitadores de CD47).

**[0022]** *Reactivo SIRP $\alpha$* . Un reactivo SIRP $\alpha$  comprende la porción de SIRP $\alpha$  que es suficiente para unirse a CD47 a una afinidad reconocible, que normalmente se encuentra entre la secuencia de señal y el dominio transmembrana, o un fragmento del mismo que retiene la actividad de unión. Un reactivo SIRP $\alpha$  adecuado reduce (p. ej., bloquea, evita, etc.) la interacción entre las proteínas nativas SIRP $\alpha$  y CD47. El reactivo SIRP $\alpha$  generalmente comprenderá al menos el dominio d1 de SIRP $\alpha$ . Un reactivo SIRP $\alpha$  puede ser una proteína de fusión, p. ej., fusionado en marco con un segundo polipéptido. El segundo polipéptido puede ser capaz de aumentar el tamaño de la proteína de fusión, p. ej., por lo que la proteína de fusión no se eliminará de la circulación rápidamente. Por ejemplo, el segundo polipéptido puede ser parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina. La región Fc ayuda en la fagocitosis al proporcionar una señal "cómeme", que mejora el bloqueo de la señal "no me coma" proporcionada por el reactivo SIRP $\alpha$  de alta afinidad. Alternativamente, el segundo polipéptido puede ser cualquier polipéptido adecuado que sea sustancialmente similar a Fc, p. ej., que proporciona mayor tamaño, dominios de multimerización y/o unión o interacción adicional con moléculas de Ig. En el contexto de la invención, el reactivo SIRP $\alpha$  es un polipéptido SIRP $\alpha$  soluble fusionado con una inmunoglobulina o un polipéptido SIRP $\alpha$  de alta afinidad fusionado con una inmunoglobulina.

**[0023]** El término "reactivo  $\alpha$  alta SIRP $\alpha$  afinidad" incluye polipéptidos derivados de SIRP $\alpha$  y análogos de los mismos. Los reactivos SIRP $\alpha$  de alta afinidad se describen en la publicación de patente internacional WO 2013/109752. Los reactivos de SIRP $\alpha$  de alta afinidad son variantes de la proteína SIRP $\alpha$  nativa. Un reactivo de SIRP $\alpha$  de alta afinidad es soluble, donde el polipéptido carece del dominio transmembrana de SIRP $\alpha$  y comprende al menos un cambio de aminoácido con respecto a la secuencia SIRP $\alpha$  de tipo salvaje, y en donde el cambio de aminoácidos aumenta la afinidad del polipéptido SIRP $\alpha$  de unión a CD47, por ejemplo, disminuyendo la velocidad de desconexión en al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o más.

**[0024]** Un reactivo de alta afinidad SIRP $\alpha$  comprende la porción de SIRP $\alpha$  que es suficiente para unir CD47 con una afinidad reconocible, *p. ej.*, alta afinidad, que normalmente se encuentra entre la secuencia de señal y el dominio transmembrana, o un fragmento de la misma que retiene la actividad de unión. El reactivo SIRP $\alpha$  de alta afinidad generalmente comprenderá al menos el dominio d1 de SIRP $\alpha$  con residuos de aminoácidos modificados para aumentar la afinidad. Una variante de SIRP $\alpha$  puede ser una proteína de fusión, *p. ej.*, fusionado en marco con un segundo polipéptido. El segundo polipéptido puede ser capaz de aumentar el tamaño de la proteína de fusión, *p. ej.*, por lo que la proteína de fusión no se eliminará de la circulación rápidamente. Por ejemplo, el segundo polipéptido puede ser parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina. La región Fc ayuda en la fagocitosis al proporcionar una señal "cómeme", que mejora el bloqueo de la señal "no me coma" proporcionada por el reactivo SIRP $\alpha$  de alta afinidad. Alternativamente, el segundo polipéptido puede ser cualquier polipéptido adecuado que sea sustancialmente similar a Fc, *p. ej.*, que proporciona mayor tamaño, dominios de multimerización y/o unión o interacción adicional con moléculas de Ig. Los cambios de aminoácidos que proporcionan mayor afinidad se localizan en el dominio d1, y por lo tanto los reactivos SIRP $\alpha$  de alta afinidad comprenden un dominio d1 de SIRP $\alpha$  humano, con al menos un cambio de aminoácido en relación con la secuencia de tipo salvaje dentro del dominio d1. Tal reactivo SIRP $\alpha$  de alta afinidad comprende opcionalmente secuencias de aminoácidos adicionales, por ejemplo secuencias de anticuerpos Fc; porciones de la proteína SIRP $\alpha$  humana de tipo salvaje distintas del dominio d1, que incluyen sin limitación los residuos 150 a 374 de la proteína nativa o fragmentos de la misma, usualmente fragmentos contiguos con el dominio d1; y similares. Los reactivos de SIRP $\alpha$  de alta afinidad pueden ser monoméricos o multiméricos, es decir, dímero, trímero, tetrámero, *etc.* En el contexto de la invención, el reactivo de SIRP $\alpha$  es un polipéptido de SIRP $\alpha$  soluble fusionado a una inmunoglobulina o un polipéptido de SIRP $\alpha$  de alta afinidad fusionado a un inmunoglobulina.

**[0025]** Los anticuerpos anti-CD47. En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 es un anticuerpo que se une específicamente a CD47 (es decir, un anticuerpo anti-CD47) y reduce la interacción entre CD47 en una célula (por ejemplo, una célula infectada) y SIRP $\alpha$  en otra célula (por ejemplo, una célula fagocítica). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD47 adecuado no activa CD47 después de la unión. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos adecuados incluyen los clones B6H12, 5F9, 8B6 y C3 (por ejemplo, como se describe en la publicación de patente internacional WO 2011/143624). Los anticuerpos anti-CD47 adecuados incluyen versiones totalmente humanas, humanizadas o quiméricas de dichos anticuerpos. Los anticuerpos humanizados (por ejemplo, hu5F9-G4) son especialmente útiles para aplicaciones in vivo en humanos debido a su baja antigenicidad. De manera similar, los anticuerpos caninizados, felinizados, *etc.* son especialmente útiles para aplicaciones en perros, gatos y otras especies respectivamente. Los anticuerpos de interés incluyen anticuerpos humanizados, o anticuerpos caninizados, felinizados, equinizados, bovinizados, porcinizados, *etc.*, y variantes de los mismos.

**[0026]** En una realización ejemplar, el dominio extracelular CD47 que carece del péptido señal tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 (124 aminoácidos). Como se describe en el presente documento, los péptidos señal no se exponen en la superficie celular de una proteína secretada o transmembrana debido a que el péptido señal se escinde durante la translocación de la proteína o el péptido señal permanece anclado en la membrana celular externa (a este péptido también se le llama ancla de señal). Se cree que la secuencia peptídica señal de CD47 se escinde del polipéptido CD47 precursor in vivo.

**[0027]** Los términos "tratamiento", "tratar", "tratado" y similares se usan en este documento para referirse en general a la obtención de un efecto farmacológico deseado y/o fisiológico. El efecto puede ser profiláctico para prevenir completa o parcialmente una enfermedad o uno de sus síntomas y/o puede ser terapéutico en términos de una estabilización o cura parcial o completa para una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. El término "tratamiento" abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad y/o los síntomas aparezcan en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o síntoma pero aún no se ha diagnosticado que lo tenga; (b) inhibir la enfermedad y/o los síntomas, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar los síntomas de la enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad y/o los síntomas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos ya infligidos (por ejemplo, aquellos con cáncer), así como aquellos en los que se desea prevención (por ejemplo, aquellos con mayor susceptibilidad al cáncer, aquellos con sospecha de cáncer, *etc.*)

**[0028]** Una célula diana puede ser una célula que es "infligida", donde el término "infligido" se utiliza aquí para referirse a un sujeto con los síntomas, de una enfermedad, o una enfermedad que puede ser tratada con un agente anti-CD47. Un sujeto "infligido" puede tener cáncer, *etc.*, "Células infligidas" pueden ser aquellas células que causan los síntomas, la enfermedad o la enfermedad. Como ejemplos no limitativos, las células infligidas de un paciente infligido pueden ser células cancerosas, y similares. Una indicación de que una enfermedad o enfermedad puede

tratarse con un agente anti-CD47 es que las células involucradas (es decir, las células infligidas, por ejemplo, las células cancerosas, etc.) expresan un nivel mayor de CD47 en comparación con las células normales del mismo tipo de célula.

5 **[0029]** Un tratamiento terapéutico es uno en el que el sujeto es infligido antes de la administración y un tratamiento profiláctico es uno en el que el sujeto no se inflige antes de la administración. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una mayor probabilidad de ser infligido o se sospecha que ha sido infligido antes del tratamiento. En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto tiene una mayor probabilidad de ser infligido.

10 **[0030]** Los ejemplos de síntomas, enfermedades y/o enfermedades que pueden tratarse con un agente anti-CD47 incluyen, entre otros, cáncer e infección (por ejemplo, infección crónica). Como se usa en este documento, "cáncer" incluye cualquier forma de cáncer (por ejemplo, leucemia; leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia linfoblástica aguda (LLA); metástasis; enfermedad residual mínima; cánceres de tumores sólidos, por ejemplo, mama, vejiga, colon, ovario glioblastoma, leiomiomasarcoma y carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello; etc.). Cualquier cáncer, en el que las células cancerosas muestren una mayor expresión de CD47 en comparación con las células no cancerosas, es un cáncer adecuado para ser tratado por los métodos y composiciones del sujeto.

15 **[0031]** Tal como se utiliza aquí, el término "infección" se refiere a cualquier estado en al menos una célula de un organismo (es decir, un sujeto) está infectado por un agente infeccioso (por ejemplo, un sujeto tiene una infección de patógeno intracelular, por ejemplo, una infección crónica por patógenos intracelulares). Como se usa en este documento, el término "agente infeccioso" se refiere a una entidad biológica extraña (es decir, un patógeno) que induce una mayor expresión de CD47 en al menos una célula del organismo infectado. Por ejemplo, los agentes infecciosos incluyen, pero no están limitados a bacterias, virus, protozoos y hongos. Los patógenos intracelulares son de particular interés. Las enfermedades infecciosas son trastornos causados por agentes infecciosos. Algunos agentes infecciosos no causan síntomas o enfermedades reconocibles bajo ciertas condiciones, pero tienen el potencial de causar síntomas o enfermedades bajo condiciones cambiadas. Los métodos del sujeto se pueden usar en el tratamiento de infecciones crónicas por patógenos, por ejemplo, que incluyen pero no se limitan a infecciones virales, *p. ej.* retrovirus, lentivirus, virus de la hepatitis, virus del herpes, virus de la viruela, virus del papiloma humano, *etc.*; infecciones bacterianas intracelulares, por ejemplo, *Mycobacterium*, *Chlamydomphila*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Legionella*, *Francisella*, *Listeria*, *Coxiella*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Yersinia sp.*, *Helicobacter pylori*, *etc.*; y patógenos de protozoos intracelulares, por ejemplo, *Plasmodium sp.*, *Trypanosoma sp.*, *Giardia sp.*, *Toxoplasma sp.*, *Leishmania sp.*, *etc.*

20 **[0032]** Como se usa en este documento, una "célula diana" es una célula que expresa CD47 en la superficie, donde enmascaramiento o de otra manera alterar el fenotipo CD47 positiva (por ejemplo, mediante la administración de un agente anti-CD47) da como resultado el aumento de la fagocitosis. Normalmente, una célula diana es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana.

25 **[0033]** Los términos "receptor", "individual", "sujeto", "anfitrión", y "paciente", se utilizan indistintamente en este documento y se refieren a cualquier sujeto mamífero para quien se desea el diagnóstico, tratamiento o terapia, particularmente seres humanos. "Mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos los humanos, los animales domésticos y de granja, y animales zoológicos, de deportes o mascotas, como perros, caballos, gatos, vacas, ovejas, cabras, cerdos, etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.

30 **[0034]** Una "dosis terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéutica" es una cantidad suficiente para efectuar resultados clínicos deseados (es decir, conseguir la eficacia terapéutica). Se puede administrar una dosis terapéuticamente eficaz en una o más administraciones. Para los fines de esta invención, una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47 es una cantidad que es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, prevenir, retardar o retrasar la progresión del estado de la enfermedad (por ejemplo, cáncer) al aumentar la fagocitosis. de una célula diana. Por lo tanto, una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47 reduce la unión de CD47 en una célula diana, a SIRP $\alpha$  en una célula fagocítica, a una dosis efectiva para aumentar la fagocitosis de la célula diana.

35 **[0035]** En algunas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz conduce a niveles séricos sostenidos de agente anti-CD47 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47) de por ejemplo, aproximadamente 50 ug/ml sobre 40 ug/ml o más (o más, aproximadamente 60 ug/ml o más, aproximadamente 75 ug/ml o más, aproximadamente 100 ug/ml o más, aproximadamente 125 ug/ml o más, o aproximadamente 150 ug/ml o más). En algunas realizaciones, una dosis terapéuticamente efectiva conduce a niveles séricos sostenidos de agente anti-CD47 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47) que varía de aproximadamente 40 ug/ml a aproximadamente 300 ug/ml (por ejemplo, de aproximadamente 40 ug/ml a aproximadamente 250 ug/ml, desde aproximadamente 40 ug/ml a aproximadamente 200 ug/ml, desde aproximadamente 40 ug/ml a aproximadamente 150 ug/ml, desde aproximadamente 40 ug/ml a aproximadamente 100 ug/ml, desde aproximadamente 50 ug/ml a aproximadamente 300 ug/ml, desde aproximadamente 50 ug/ml a aproximadamente 250 ug/ml, desde aproximadamente 50 ug/ml a aproximadamente 200 ug/ml, desde aproximadamente 50 ug/ml a aproximadamente 150 ug/ml, desde aproximadamente 75 ug/ml to aproximadamente 300 ug/ml de aproximadamente 75 ug/ml a aproximadamente 250 ug/ml, de aproximadamente 75 ug/ml a aproximadamente 200 ug/ml, de aproximadamente 75 ug/ml a aproximadamente 150 ug/ml, de

aproximadamente 100 ug/ml a aproximadamente 300 ug/ml, de aproximadamente 100 ug/ml a aproximadamente 250 ug/ml, o de aproximadamente 100 ug/ml a aproximadamente 200 ug/ml). En algunas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz para tratar tumores sólidos conduce a niveles séricos sostenidos de agente anti-CD47 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47) de aproximadamente 100 ug/ml o más (por ejemplo, niveles séricos sostenidos que varían de aproximadamente 100 ug/ml a aproximadamente 200 ug/ml). En algunas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz para tratar tumores no sólidos (p. ej., leucemia mieloide aguda (LMA)) conduce a niveles séricos sostenidos de agente anti-CD47 (p. ej., Un anticuerpo anti-CD47) de aproximadamente 50 µg/ml o más (por ejemplo, niveles séricos sostenidos de 75 µg/ml o más; o niveles séricos sostenidos que varían de aproximadamente 50 ug/ml a aproximadamente 150 ug/ml).

**[0036]** Por consiguiente, una única dosis terapéuticamente eficaz o una serie de dosis terapéuticamente eficaces podrían lograr y mantener un nivel en suero de agente anti-CD47. Una dosis terapéuticamente efectiva de un agente anti-CD47 puede depender del agente específico utilizado, pero generalmente es de aproximadamente 8 mg/kg de peso corporal o más (por ejemplo, aproximadamente 8 mg/kg o más, aproximadamente 10 mg/kg o más, aproximadamente 15 mg/kg o más, aproximadamente 20 mg/kg o más, aproximadamente 25 mg/kg o más, aproximadamente 30 mg/kg o más, aproximadamente 35 mg/kg o más, o aproximadamente 40 mg/kg o más), o de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg (por ejemplo, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 35 mg/kg, o de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg). La dosis requerida para alcanzar y/o mantener un nivel sérico particular es proporcional a la cantidad de tiempo entre dosis e inversamente proporcional al número de dosis administradas. Por lo tanto, a medida que aumenta la frecuencia de dosificación, la dosis requerida disminuye. La optimización de las estrategias de dosificación será fácilmente entendida y practicada por un experto en la técnica.

**[0037]** Una dosis sub-terapéutica es una dosis (es decir, una cantidad) que no es suficiente para efectuar los resultados clínicos deseados. Por ejemplo, una dosis sub-terapéutica de un agente anti-CD47 es una cantidad que no es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, prevenir, retardar o retrasar la progresión del estado de la enfermedad (por ejemplo, cáncer, infección, inflamación, etc.). En el contexto de la invención, se utiliza una dosis sub-terapéutica de un agente anti-CD47 como agente de imprimación (que se describe con más detalle a continuación). Si bien el uso de una dosis sub-terapéutica de un agente anti-CD47 como agente de imprimación logra un resultado deseado (por ejemplo, el sujeto está "preparado" para recibir una dosis terapéuticamente efectiva), la dosis no se considera una "dosis terapéutica" porque la dosis sub-terapéutica no aumenta efectivamente la fagocitosis de una célula diana y no es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, prevenir, retardar o retrasar la progresión del estado de la enfermedad. Una dosis sub-terapéutica de un agente anti-CD47 puede depender del agente específico utilizado, pero generalmente es inferior a aproximadamente 10 mg/kg.

**[0038]** Una "dosis de mantenimiento" es una dosis destinada a ser una dosis terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, en experimentos para determinar la dosis terapéuticamente efectiva, se pueden administrar múltiples dosis de mantenimiento diferentes a diferentes sujetos. Como tal, algunas de las dosis de mantenimiento pueden ser dosis terapéuticamente eficaces y otras pueden ser dosis sub-terapéuticas.

**[0039]** *Agente de imprimación.* Como se usa en el presente documento, el término "agente cebador" se refiere a un agente que prepara a un sujeto para una futura administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47. Los inventores han descubierto que cuando se administra una dosis terapéuticamente efectiva de un agente anti-CD47 a un sujeto sin administrar primero un agente de imprimación, la alta dosis requerida puede causar una pérdida de eritrocitos (glóbulos rojos, RBC) dependiente de la dosis (por ejemplo, como se muestra a continuación en modelos de ratones y primates no humanos (NHP)). Un experto en la técnica entenderá fácilmente cómo medir la pérdida de glóbulos rojos. Por ejemplo, la pérdida de glóbulos rojos se puede monitorizar, por ejemplo, midiendo el porcentaje de cambio en el hematocrito a lo largo del tiempo y/o midiendo la hemoglobina (por ejemplo, porcentaje de tiempo extra, g/dL, etc.) tiempo extra (Figura 1 - Figura 3 y Figura 7 - Figura 9). La gravedad de la anemia causada por la pérdida de glóbulos rojos (letal en algunos casos) puede, por lo tanto, excluir el uso de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47. Sin embargo, al administrar un agente de imprimación antes de administrar una dosis terapéuticamente efectiva de un agente anti-CD47, el sujeto no experimenta efectos adversos más allá de una anemia leve temporal que puede ocurrir después de la administración del agente de imprimación. Por lo tanto, la administración de un agente de imprimación sirve para cebar a un sujeto para una futura administración de una dosis terapéuticamente eficaz de anti-CD47.

**[0040]** Los métodos del sujeto que usan un agente de imprimación son particularmente relevantes cuando se tratan primates porque los primates son sensibles al recuento de RBC y son propensos a desarrollar anemia. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el sujeto es un primate (por ejemplo, humanos, prosimios, simios, lémures, loroides, tarsos, monos, simios, monos capuchinos, monos aulladores, monos ardilla, babuinos, macacos, gibones, grandes simios y similares).

**[0041]** Un agente de imprimación aumenta el número de glóbulos rojos en un sujeto y por lo tanto contrarresta la pérdida de glóbulos rojos causados por la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de agente anti-CD47. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la divulgación, un agente de imprimación es un agente estimulante de la eritropoyesis (ESA). Los ESA son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a eritropoyetina (EPO),



derivados de EPO y compuestos estimulantes de EPO. Los ejemplos adecuados incluyen, entre otros, EPO alfa, EPO beta, EPO delta, EPO omega, EPO zeta, Darbepoetin alfa (Aranesp), Epoetin alfa (Procrit), Epocept (Lupine pharma), Nanokine (Nanogen Pharmaceutical Bechnology, Vietnam), Epopit (Intas pharma), Epogen (Amgen), Epogin, Eprex, (Janssen-Cilag), NeoRecormon (Hoffmann-La Roche), Recormon, Metoxi polietilenglicol-epoetina beta (Mircera) (Roche), Dynepo, Epomax, Silapo (Stada), Retacrit (Hospira), Epocept (Lupin Pharmaceuticals), EPOTrust (Panacea Biotec Ltd.), Erypro Safe (Biocon Ltd.), Repoitin (Serum Institute of India Limited), Vintor (Emcure Pharmaceuticals), Epopit (Intas pharma), Erykine (Intas Biopharmaceutica), Wepox (Wockhardt Biotech), Espogen (LG life sciences), ReliPoietin (Reliance Life Sciences), Shanpoietin (Shantha Biotechnics Ltd.), Zyrop Cadila (Healthcare Ltd.), EPIAO (rHuEPO), y (Shenyang Sunshine Pharmaceutical Co., LTD. China). La dosis de ESA que debe administrarse depende de la naturaleza del agente que se usa, y también depende de numerosos factores específicos del sujeto (por ejemplo, edad, peso, etc.). Los métodos para determinar una dosis apropiada de un ESA son conocidos en la técnica. En algunas realizaciones de la divulgación, el ESA se administra a una dosis de acuerdo con las sugerencias del fabricante y en algunos casos puede ser tan bajo como aproximadamente 50 unidades/kg, aproximadamente 100 unidades/kg o aproximadamente 150 unidades/kg de peso corporal o tan alto como unas 17.000 unidades/kg de peso corporal.

**[0042]** En el contexto de la invención, el agente de imprimación comprende una dosis sub-terapéutica de un agente anti-CD47. Los inventores han descubierto que la administración de un sub-terapéutico de un agente anti-CD47 como agente de imprimación prepara al sujeto de manera efectiva para una futura administración de una dosis terapéuticamente efectiva de agente anti-CD47, previniendo la anemia severa asociada con la dosis terapéuticamente efectiva.

**[0043]** Por consiguiente, el término "dosis de cebado" o como se usa en el presente documento se refiere a una dosis de un agente de cebado (por ejemplo, un agente anti-CD47) que prepara a un sujeto para la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de agente anti-CD47 tal que La dosis terapéuticamente efectiva no produce una pérdida severa de glóbulos rojos (hematocrito reducido o hemoglobina reducida). La dosis de cebado apropiada específica de un agente anti-CD47 puede variar dependiendo de la naturaleza del agente utilizado y de numerosos factores específicos del sujeto (por ejemplo, edad, peso, etc.). Los ejemplos de dosis de cebado adecuadas de un agente anti-CD47 incluyen, pero no están necesariamente limitados a un rango de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 7,5 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 7,5 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 7,5 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 7,5 mg/kg, o aproximadamente 10 mg/kg). En algunas realizaciones, el agente de imprimación comprende una combinación de un ESA y una dosis de cebado de un agente anti-CD47.

**[0044]** Una "dosis de carga" es una dosis destinada a ser una dosis de cebado. Por ejemplo, en experimentos para determinar una dosis de cebado efectiva, se pueden administrar múltiples dosis de carga diferentes a diferentes sujetos. Como tal, algunas de las dosis de carga pueden ser dosis de cebado y otras pueden no ser dosis de cebado.

**[0045]** Los términos "unión específica", "se une específicamente", y similares, se refieren a unión preferencial no covalente o covalente a una molécula pariente a otras moléculas o restos en una mezcla de solución o de reacción (por ejemplo, un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido o epítopo particular en relación con otros polipéptidos disponibles, o unión de un polipéptido SIRPα). En algunas realizaciones, la afinidad de una molécula por otra molécula a la que se une específicamente se caracteriza por una  $K_D$  (constante de disociación) de  $10^{-5}$  M o menos (por ejemplo,  $10^{-6}$  M o menos,  $10^{-7}$  M o menos,  $10^{-8}$  M o menos,  $10^{-9}$  M o menos,  $10^{-10}$  M o menos,  $10^{-11}$  M o menos,  $10^{-12}$  M o menos,  $10^{-13}$  M o menos,  $10^{-14}$  M o menos,  $10^{-15}$  M o menos, o  $10^{-16}$  M o menos). "Afinidad" se refiere a la fuerza de la unión, el aumento de la afinidad de unión se correlaciona con una  $K_D$  inferior.

**[0046]** El término "miembro de unión específica", como se usa aquí se refiere a un miembro de un par de unión específica (es decir, dos moléculas, por lo general dos moléculas diferentes, donde una de las moléculas, por ejemplo, un miembro de unión específica primero, a través de los medios no covalentes se unen específicamente a la otra molécula, por ejemplo, un segundo miembro de unión específico). Los miembros de unión específica adecuados incluyen agentes que se unen específicamente a CD47 y bloquean la interacción entre CD47 y SIRPα.

**[0047]** Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos también se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos naturales y polímero de aminoácidos no natural.

**[0048]** Los términos "células fagocíticas" y "fagocitos" se usan indistintamente en este documento para referirse a una célula que es capaz de fagocitosis. Hay tres categorías principales de fagocitos: macrófagos, células mononucleares (histicitos y monocitos); leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) y células dendríticas.

5 **[0049]** El término "muestra" con respecto a un paciente engloba sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejidos sólidos, tales como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas o aisladas de los mismos y la progenie de las mismas. La definición también incluye muestras que se han manipulado de alguna manera después de su adquisición, normal o por ejemplo el tratamiento con reactivos; lavado; o enriquecimiento para ciertas poblaciones de células, como las células cancerosas. La definición también incluye  
10 muestras que se han enriquecido para tipos particulares de moléculas, *p. ej.*, los ácidos nucleicos, polipéptidos, *etc.*

**[0050]** El término "muestra biológica" abarca una muestra clínica, y también incluye tejido obtenido por la resección quirúrgica, el tejido obtenido por biopsia, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, muestras de tejido, órganos, médula ósea, sangre, plasma, suero y similares. Una "muestra biológica" incluye una muestra que  
15 comprende células diana o células de control normal o se sospecha que comprende dichas células o fluidos biológicos derivados de ellos (por ejemplo, células cancerosas, *etc.*), *p. ej.*, una muestra que comprende los polinucleótidos y/o polipéptidos que se obtienen a partir de tales células (*p. ej.*, un lisado celular o de otro extracto de células que comprenden polinucleótidos y/o polipéptidos). Una muestra biológica que comprende una célula  
20 inflingida de un paciente también puede incluir células no inflingidas.

**[0051]** El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos  
25 multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad deseada biológica. "Anticuerpos" (Abs) e "inmunoglobulinas" (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos exhiben especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos de este último tipo se producen, por ejemplo, en niveles  
bajos por el sistema linfático y en niveles elevados por mielomas.

30 **[0052]** El "fragmento de anticuerpo" y todas sus variantes gramaticales, como se usan en este documento, se definen como una porción de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión al antígeno o la región variable del anticuerpo intacto, en donde la porción está libre de los dominios de cadena pesada constante (es decir, CH2, CH3 y CH4, según el isotipo del anticuerpo) de la región Fc del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que  
35 sea un polipéptido que tenga una estructura primaria que consiste en una secuencia ininterrumpida de residuos de aminoácidos contiguos (referido aquí como un "fragmento de anticuerpo de cadena única" o "polipéptido de cadena única"), incluyendo sin limitación (1) moléculas Fv (scFv) de cadena única (2) polipéptidos de cadena simple que contienen un solo dominio variable de cadena ligera, o un fragmento del mismo que contiene las tres CDR del dominio variable de cadena ligera, sin un resto de cadena pesada asociado (3) polipéptidos de cadena única que  
40 contienen solo una región variable de cadena pesada, o un fragmento de la misma que contiene las tres CDR de la región variable de cadena pesada, sin un resto de cadena ligera asociado y (4) nanocuerpos que comprenden dominios de Ig individuales de especies no humanas u otros módulos de unión de dominio único específicos; y estructuras multiespecíficas o multivalentes formadas a partir de fragmentos de anticuerpos. En un fragmento de anticuerpo que comprende una o más cadenas pesadas, la cadena o cadenas pesadas pueden contener cualquier  
45 secuencia de dominio constante (por ejemplo, CH1 en el isotipo IgG) que se encuentra en una región no Fc de un anticuerpo intacto, y/o puede contener cualquier bisagra secuencia de región encontrada en un anticuerpo intacto, y/o puede contener una secuencia de cremallera de leucina fusionada o situada en la secuencia de la región bisagra o la secuencia de dominio constante de la(s) cadena(s) pesada(s).

50 **[0053]** Como se usa en esta invención, el término "epítipo" significa cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se une el paratopo de un anticuerpo. Los determinantes epitípicos generalmente consisten en grupos de moléculas químicamente activas en la superficie, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y por lo general tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

## 55 Metodos

**[0054]** Se describen métodos para tratar un sujeto con una dosis terapéutica de agente anti-CD47. Los métodos del sujeto incluyen una etapa de administrar un agente de imprimación al sujeto, seguido de una etapa de administrar  
60 una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47 al sujeto.

**[0055]** La etapa de administrar una dosis terapéuticamente eficaz se realiza en un intervalo de aproximadamente 3 días a aproximadamente 21 días (por ejemplo, aproximadamente 3 días a aproximadamente 17 días, aproximadamente 3 días a aproximadamente 14 días, aproximadamente 3 días a aproximadamente 12 días, de 4 días a 12 días, de 5 días a 12 días, de 5 días a 11 días, de 5 días a 10 días, de 5 días a 9 días, de 6 días a 8 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días,  
65

aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, o aproximadamente 12 días) después de comenzar la administración de un agente de imprimación. Este período de tiempo es, por ejemplo, suficiente para proporcionar una mayor producción de reticulocitos por parte del individuo.

**[0056]** En algunas realizaciones, dos o más agentes de imprimación se administran antes de la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47. En tales casos, los agentes de imprimación pueden ser el mismo agente o pueden ser agentes diferentes. El primer agente de imprimación puede administrarse en la misma dosis o en una dosis diferente al agente de imprimación administrado posteriormente. En algunas realizaciones, dos o más agentes cebadores se administran simultáneamente y/o la administración de dos o agentes cebadores se superponen en el tiempo, donde la administración de uno puede comenzar o terminar antes o después de otro agente de imprimación.

**[0057]** La administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47 se puede lograr en un número de maneras diferentes. En algunos casos, se administran dos o más dosis terapéuticamente eficaces después de administrar un agente de cebado. La administración adecuada de una dosis terapéuticamente eficaz puede implicar la administración de una dosis única, o puede implicar la administración de dosis diarias, semi-semanales, semanales, una vez cada dos semanas, una vez al mes, anualmente, etc. En algunos casos, una dosis terapéuticamente eficaz se administra como dos o más dosis de concentración creciente (es decir, dosis crecientes), donde (i) todas las dosis son dosis terapéuticas, o donde (ii) se administra una dosis sub-terapéutica (o dos o más dosis sub-terapéuticas) inicialmente se administra y las dosis terapéuticas se logran mediante dicha escalada. Como un ejemplo no limitativo para ilustrar la concentración en aumento (es decir, dosis crecientes), se puede administrar semanalmente una dosis terapéuticamente efectiva, comenzando con una dosis sub terapéutica (por ejemplo, una dosis de 5 mg/kg), y cada dosis subsiguiente puede aumentarse en un incremento particular (por ejemplo, en 5 mg/kg), o en incrementos variables, hasta que se alcance una dosis terapéutica (por ejemplo, 30 mg/kg), momento en el cual la administración puede cesar o continuar (por ejemplo, dosis terapéuticas continuas). Por ejemplo, dosis de 30 mg/kg). Como otro ejemplo no limitativo para ilustrar la concentración en aumento (es decir, dosis crecientes), se puede administrar semanalmente una dosis terapéuticamente efectiva, comenzando con una dosis terapéutica (por ejemplo, una dosis de 10 mg/kg), y cada dosis subsiguiente puede aumentarse por un incremento particular (por ejemplo, por 10 mg/kg), o por incrementos variables, hasta que se alcance una dosis terapéutica (por ejemplo, 30 mg/kg, 100 mg/ml, etc.), en cuyo punto la administración puede cesar o puede continuar (p. ej., dosis terapéuticas continuas, p. ej., dosis de 30 mg/kg, 100 mg/ml, etc.). En algunas realizaciones, la administración de una dosis terapéuticamente eficaz puede ser una infusión continua y la dosis puede alterarse (por ejemplo, escalarse) con el tiempo.

**[0058]** La dosis y la frecuencia pueden variar dependiendo de la vida media del agente anti-CD47 en el paciente. Un experto en la técnica entenderá que tales directrices se ajustarán para el peso molecular del agente activo, p. ej. en el uso de fragmentos de anticuerpos, en el uso de conjugados de anticuerpos, en el uso de reactivos SIRP $\alpha$ , etc. La dosis también puede variar para la administración localizada, por ejemplo, intranasal, inhalación, etc., o para la administración sistémica, por ejemplo, i.m., i.p., i.v., y similares.

**[0059]** *Administración eficaz de agente de imprimación.* En algunas realizaciones, se realiza una etapa para determinar si la administración del agente de imprimación fue efectiva antes de la etapa de administrar una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47 al sujeto. Si la administración del agente de imprimación no fue efectiva, entonces puede ser conveniente comenzar nuevamente y administrar nuevamente un agente de imprimación. En tal caso, se puede usar una dosis diferente y/o un agente de cebador diferente, o se puede usar la misma dosis y el mismo agente de cebador. Si la administración del agente de imprimación fue efectiva (es decir, el recuento de reticulocitos indica que la administración fue efectiva, como se describe a continuación con más detalle), entonces se puede administrar una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47.

**[0060]** Debido a que una dosis de cebado de un agente de cebado puede aumentar el número de glóbulos rojos en un sujeto (lo que ocurre después de administrar agentes de cebado de ESA, así como después de administrar dosis de cebado de agentes anti-CD47), la evaluación de las células sanguíneas recientemente producidas (es decir, los reticulocitos) pueden servir como una herramienta de evaluación para determinar si la administración del agente cebador fue efectiva.

**[0061]** Los métodos para evaluar los reticulocitos incluyen medir el número absoluto o relativo de reticulocitos en una muestra de sangre (por ejemplo, se puede realizar un recuento de reticulocitos en una muestra de sangre de un sujeto antes y después de la administración de un agente de imprimación). Los expertos en la técnica conocen los métodos para evaluar y/o contar los reticulocitos y se puede usar cualquier método conveniente. Un ejemplo de un método adecuado incluye, pero no se limita a contar el número de reticulocitos en una muestra en base a una evaluación morfológica. Los reticulocitos exhiben una red similar a una malla que se hace visible con tinciones particulares, por ejemplo, nuevo azul de metileno (NMB). Los reticulocitos aparecen ligeramente más azules que otros glóbulos rojos cuando se observan con la tinción normal de Romanowsky. Los reticulocitos también son un poco más grandes, que pueden detectarse como un MCV alto (volumen corpuscular medio) con un hemograma completo.

**[0062]** Otro ejemplo de un método adecuado para evaluar los reticulocitos incluye, pero no está limitado a contar el número de reticulocitos en base a la expresión de un marcador de glóbulos rojos jóvenes/inmaduros (por ejemplo, la expresión CD71 ha aumentado en los eritrocitos jóvenes relativos a los glóbulos rojos más antiguos y CD71 pueden servir como un marcador para identificar reticulocitos.

**[0063]** Otro ejemplo de un método adecuado para evaluar los reticulocitos incluye, pero no está limitado a contar el número de reticulocitos en una muestra basada en la medición de la cantidad de fluorescencia exhibida por las células después de poner en contacto las muestras con un colorante fluorescente (por ejemplo, naranja de tiazol, polimetina, etc.) que marca el ácido nucleico (ARN y ADN) y, por lo tanto, es un colorante de ácido nucleico no selectivo. Por ejemplo, un colorante de ácido nucleico no selectivo puede teñir el ARN residual de los reticulocitos, mientras que un colorante selectivo de ADN (por ejemplo, DRAQ5), que se puede utilizar junto con un colorante de ácido nucleico no selectivo (por ejemplo, naranja de tiazol) no tiñe los reticulocitos porque los reticulocitos no tienen ADN (los reticulocitos son, por lo tanto, negativos a DRAQ5). Un nivel comparativamente medio de fluorescencia distingue a los reticulocitos de los RBC maduros (que no tienen ni ARN ni ADN, y por lo tanto muy poca fluorescencia) y de los linfocitos (que tienen una gran cantidad de ADN, a diferencia de los reticulocitos). Por lo tanto, los recuentos de reticulocitos no se pueden realizar de manera automatizada (por ejemplo, mediante la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)).

**[0064]** Otro ejemplo de un método adecuado para determinar si la administración del agente de imprimación fue eficaz incluye medir el nivel de EPO en la sangre. Si bien los ESA se pueden usar para estimular directamente la producción de EPO, las dosis de cebado de agentes anti-CD47 también causan aumentos en los niveles de EPO. Como tal, la etapa de determinar si la administración del agente de imprimación fue efectiva puede comprender medir el nivel de EPO en la sangre (por ejemplo, antes y después de la administración de un agente de imprimación).

**[0065]** Otro ejemplo de un método adecuado para determinar si la administración del agente de imprimación era eficaz incluye la hemoglobina de medición. Los expertos en la técnica conocen los métodos para medir la hemoglobina y se puede usar cualquier método conveniente. La hemoglobina generalmente se mide como parte del hemograma completo (CBC) de una muestra de sangre. Los métodos de prueba de hemoglobina de laboratorio requieren una muestra de sangre (arterial, venosa o capilar) y un análisis en un analizador de hematología y un oxímetro de CO. Además, se pueden usar métodos de prueba de hemoglobina no invasivos (por ejemplo, CO-oximetría de pulso). Como un ejemplo no limitativo de la medición de la hemoglobina, los glóbulos rojos se descomponen para que la hemoglobina se disuelva. La hemoglobina libre se expone a un químico que contiene cianuro, que se une fuertemente con la molécula de hemoglobina para formar cianmetemoglobina. Al exponer a la muestra una longitud de onda de luz específica (por ejemplo, 540 nm), se puede determinar la cantidad de hemoglobina.

**[0066]** La determinación de si la administración de un agente de imprimación fue efectiva (por ejemplo, a través de un recuento de reticulocitos) se puede realizar en un rango de aproximadamente 3 días a aproximadamente 12 días (por ejemplo, de aproximadamente 4 días a aproximadamente 11 días, aproximadamente 5 días a aproximadamente 10 días, aproximadamente 6 días a aproximadamente 10 días, aproximadamente 7 días a aproximadamente 9 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, o aproximadamente 12 días) después de comenzar el paso (a).

**[0067]** Cuando se realiza un recuento de reticulocitos, un recuento de aproximadamente  $400 \times 10^9$  reticulocitos / L o más indica que la administración del agente de imprimación era eficaz. Los recuentos de reticulocitos a menudo se expresan como un porcentaje de glóbulos rojos que son reticulocitos y un recuento normal para un adulto sano varía de 0,5% a 2%. Cuando los recuentos de reticulocitos se expresan de esta manera, un valor de alrededor del 4% o más (por ejemplo, 4,5% o más, 5% o más, 5,5% o más, o 6% o más) indica que la administración del agente iniciador fue eficaz. En algunos casos, se puede calcular un aumento en el número de reticulocitos y un aumento de 2 veces o más (por ejemplo, 3 veces o más, 3,5 veces o más, 4 veces o más, 4,5 veces o más, o 5 veces o más) indica que la administración del agente de imprimación fue efectiva. Cuando se realiza una medición de hemoglobina, una disminución absoluta de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 g/dL o una disminución relativa de aproximadamente 12% o más (por ejemplo, aproximadamente 15% o más, 17,5% o más, 20% o más, 25% o más, o 30% o más), o una disminución relativa que varía de aproximadamente 12% a aproximadamente 30% (por ejemplo, aproximadamente 15% a aproximadamente 30%, aproximadamente 15% a aproximadamente 25%, o aproximadamente 20% a aproximadamente 30%) indica que la administración del agente de imprimación fue efectiva.

**[0068]** En algunas realizaciones, un sujeto se monitoriza en busca de signos clínicos de la enfermedad (por ejemplo, cáncer o infección) tras la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47.

#### Kits

**[0069]** También se proporcionan kits para uso en los métodos. Los kits del sujeto incluyen un agente de imprimación

y un agente anti-CD47. En algunas realizaciones, un kit comprende dos o más agentes de imprimación. En algunas realizaciones, un kit comprende dos o más agentes anti-CD47. En algunas realizaciones, se proporciona un agente de imprimación en una forma de dosificación (por ejemplo, una forma de dosificación de cebado). En algunas realizaciones, se proporciona un agente de cebado en dos o más formas de dosificación diferentes (por ejemplo, dos o más formas de dosificación de cebado diferentes). En algunas realizaciones, se proporciona un agente anti-CD47 en una forma de dosificación (por ejemplo, una forma de dosificación terapéuticamente eficaz). En algunas realizaciones, se proporciona un agente anti-CD47 en dos o más formas de dosificación diferentes (por ejemplo, dos o más formas de dosificación diferentes terapéuticamente eficaces). En el contexto de un kit, se puede proporcionar un agente de imprimación y/o un agente anti-CD47 en forma líquida o vendida en cualquier empaque conveniente (por ejemplo, paquete de barra, paquete de dosis, etc.).

**[0070]** Además de los componentes anteriores, los kits sujeto pueden incluir además (en ciertas realizaciones) instrucciones para la práctica de los presentes métodos. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits del sujeto en una variedad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, una pieza o trozos de papel en los que se imprime la información, en el empaque del kit, en un prospecto, y similares. Otra forma más de estas instrucciones es un medio legible por computadora, por ejemplo, un disquete, un disco compacto (CD), una unidad flash, y similares, en los que se ha grabado la información. Otra forma de estas instrucciones que puede estar presente es una dirección de sitio web que se puede utilizar a través de Internet para acceder a la información en un sitio eliminado.

**[0071]** *Utilidades.* Los métodos y kits en cuestión se pueden usar para tratar cualquier lesión en la que las células diana (p. ej., células cancerosas) muestren un aumento de la expresión de CD47 en relación con las células normales del mismo tipo. El agente anti-CD47 que se administra inhibe la interacción entre SIRP $\alpha$  (por ejemplo, en un fagocito) y CD47 en una célula diana (por ejemplo, en una célula cancerosa), lo que aumenta la fagocitosis *in vivo* de la célula diana. Los métodos del sujeto incluyen administrar a un sujeto que necesita tratamiento una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47, que incluye, sin limitación, combinaciones del reactivo con otro medicamento (por ejemplo, un medicamento contra el cáncer, un medicamento contra la infección, etc.).

**[0072]** El tratamiento se puede combinar con otros agentes activos. Las clases de antibióticos incluyen penicilinas, p. ej. penicilina G, penicilina V, meticilina, oxacilina, carbenicilina, nafcilina, ampicilina, etc.; penicilinas en combinación con inhibidores de la  $\beta$ -lactamasa, cefalosporinas, por ejemplo, cefaclor, cefazolina, cefuroxima, moxalactama, etc.; carbapenems; monobactamas; aminoglucósidos; tetraciclinas; macrólidos; lincomicinas; polimixinas; sulfonamidas; quinolonas; cloramfenico; metronidazol; espectinomocina; trimetoprima; vancomicina; etc. Las citoquinas también se pueden incluir, por ejemplo, interferón g, factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , interleuquina 12, etc. Los agentes antivirales, por ejemplo aciclovir, ganciclovir, etc., también pueden ser usados en el tratamiento.

**[0073]** En el contexto de la invención, la imposición es cáncer. Como se señaló anteriormente, cualquier cáncer en el que una célula cancerosa exprese un mayor nivel de CD47 en relación con una célula no cancerosa del mismo tipo puede tratarse con los métodos en cuestión.

**[0074]** El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se refiere a una variedad de condiciones causadas por el crecimiento anormal, incontrolado de células. Las células capaces de causar cáncer, denominadas "células cancerosas", poseen propiedades características como la proliferación no controlada, la inmortalidad, el potencial metastático, el rápido crecimiento y la tasa de proliferación y/o ciertas características morfológicas típicas. Un cáncer puede detectarse de varias formas, incluida, entre otras, la detección de la presencia de un tumor o tumores (por ejemplo, por medios clínicos o radiológicos), examinando las células dentro de un tumor o de otra muestra biológica (por ejemplo, a partir de una biopsia de tejido), midiendo los marcadores sanguíneos indicativos de cáncer y detectando un genotipo indicativo de un cáncer. Sin embargo, un resultado negativo en uno o más de los métodos de detección anteriores no necesariamente indica la ausencia de cáncer, por ejemplo, un paciente que ha mostrado una respuesta completa a un tratamiento contra el cáncer aún puede tener un cáncer, como lo demuestra una recaída posterior.

**[0075]** El término "cáncer" como se usa en este documento incluye carcinomas, (por ejemplo, carcinoma in situ, carcinoma invasivo, carcinoma metastático) y las condiciones pre-malignas, Es decir, cambios neomórficos independientes de su origen histológico. El término "cáncer" no se limita a ninguna etapa, grado, característica histomorfológica, invasividad, agresividad o malignidad de un tejido afectado o agregación de células. En particular, se incluyen cáncer en etapa 0, cáncer en etapa I, cáncer en etapa II, cáncer en etapa III, cáncer en etapa IV, cáncer en grado I, cáncer en grado II, cáncer en grado III, cáncer maligno y carcinomas primarios.

**[0076]** Los cánceres y células de cáncer que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, cánceres hematológicos, incluyendo leucemia, linfoma y mieloma, y cánceres sólidos, incluyendo, por ejemplo, tumores del cerebro (glioblastomas, meduloblastoma, astrocitoma, oligodendroglioma, ependimomas), carcinomas, por ejemplo, carcinoma de pulmón, hígado, tiroides, hueso, suprarrenal, bazo, riñón, ganglio linfático, intestino delgado, páncreas, colon, estómago, mama, endometrio, próstata, testículo, ovario, piel, cabeza y cuello y esófago.

**[0077]** En una realización, el cáncer es un cáncer hematológico. En una realización, el cáncer hematológico es una leucemia. En otra realización, el cáncer hematológico es un mieloma. En una realización, el cáncer hematológico es un linfoma.

5 **[0078]** En una realización, la leucemia se selecciona de leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL) y la leucemia mielógena crónica (CML). En una realización, la leucemia es AML. En una realización, la leucemia es ALL. En una realización, la leucemia es CLL. En una realización adicional, la leucemia es CML. En una realización, la célula cancerosa es una célula leucémica, por ejemplo, pero sin limitarse a, una célula AML, una célula ALL, una célula CLL o una célula CML.

10 **[0079]** Cánceres adecuados que responden a tratamiento con un agente anti-CD47 incluyen, sin limitación la leucemia; leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia linfoblástica aguda (LLA); metástasis; enfermedad residual mínima; cánceres de tumores sólidos, por ejemplo, cáncer de mama, vejiga, colon, ovario, glioblastoma, leiomyosarcoma y células escamosas de cabeza y cuello; Para ver ejemplos, ver: (i) Willingham et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 2012 Abr 24; 109 (17): 6662-7: "The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP $\alpha$ ) interaction is a therapeutic target for human solid tumors"; (ii) Edris y otros, Proc Natl Acad Sci, EE.UU., 2012, 24 de abril; 109 (17): 6656-61: "Antibody therapy targeting the CD47 protein is effective in a model of aggressive metastatic leiomyosarcoma"; y (iii) solicitud de patente estadounidense 20110014119.

20 **[0080]** *Composiciones farmacéuticas.* Los agentes anti-CD47 y/o agentes de imprimación adecuados se pueden proporcionar en composiciones farmacéuticas adecuadas para uso terapéutico, *p. ej.* para el tratamiento humano. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen una o más entidades terapéuticas de la presente invención o sus sales, ésteres o solvatos farmacéuticamente aceptables. En algunas otras realizaciones, el uso de un agente o de imprimación agente anti-CD47 incluye el uso en combinación con otro agente terapéutico (*p. ej.*, otro agente anti-infección o otro agente anti-cáncer). Las formulaciones terapéuticas que comprenden uno o más agentes anti-CD47 y/o agentes de imprimación de la invención se preparan para el almacenamiento mezclando el agente anti-CD47 o el agente de imprimación que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical 16<sup>a</sup> edición de Sciences, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. El agente anti-CD47 o la composición del agente de imprimación se formulará, dosificará y administrará de manera consistente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos por los médicos.

35 **[0081]** El agente anti-CD47 o agente de imprimación se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo tópica, oral, parenteral, intrapulmonar e intranasal. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa (bolus o goteo lento), intraarterial, intraperitoneal, intratecal o subcutánea.

40 **[0082]** El agente anti-CD47 o el agente de imprimación no necesita ser, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes que potencian la actividad, o que aumentan de otra manera el efecto terapéutico. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosis y con vías de administración como se usa aquí anteriormente o aproximadamente del 1 al 99% de las dosis empleadas hasta ahora.

45 **[0083]** Un agente anti-CD47 o el agente de imprimación se administran a menudo como una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico activo y otro excipiente farmacéuticamente aceptable. La forma preferida depende del modo de administración previsto y la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos comúnmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para administración en animales o humanos. El diluyente se selecciona para no afectar la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina tamponada con fosfato fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

55 **[0084]** En todavía algunas otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como látex funcionalizado Sepharose™, agarosa, celulosa, y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lipídicos (como gotas de aceite o liposomas).

60 **[0085]** Un vehículo puede llevar los agentes de una diversidad de maneras, incluyendo la unión covalente ya sea directamente o mediante un grupo enlazador, y asociaciones no covalentes. Los portadores de enlace covalente adecuados incluyen proteínas tales como albúminas, péptidos y polisacáridos tales como aminodextrano, cada uno de los cuales tiene múltiples sitios para la unión de restos. Un portador también puede portar un agente anti-CD47 o un agente de cebado por asociaciones no covalentes, tales como enlaces no covalentes o por encapsulación. La

naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Los expertos en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para unirse a agentes anti-CD47 y/o agentes de imprimación, o podrán determinarlos, utilizando la experimentación rutinaria.

5 **[0086]** Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (como el cloruro de octadecidimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenol, butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y pentanol; ; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como la albúmina sérica, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal, como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o surfactantes no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones que se utilizarán para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

20 **[0087]** Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por coacervación técnica o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo) microcápsula, respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en la 16ª edición de Remington's Pharmaceutical Sciences, Osol, A. Ed. (1980).

25 **[0088]** Los portadores y enlazadores específicos para agentes radionúclidos incluyen moléculas pequeñas radiohalogenadas y compuestos quelantes. Se puede formar un quelato de radionúclido a partir de compuestos quelantes que incluyen aquellos que contienen átomos de nitrógeno y azufre como los átomos donadores para unir el metal, u óxido de metal, radionúclido.

30 **[0089]** Los restos radiográficos para uso como restos de formación de imágenes incluyen compuestos y quelatos con átomos relativamente grandes, tales como oro, iridio, tecnecio, bario, talio, yodo y sus isótopos. Se prefiere que en los métodos de la divulgación se utilicen restos de imágenes radiográficas menos tóxicas, tales como yodo o isótopos de yodo. Dichos restos pueden conjugarse con el agente anti-CD47 o agente de imprimación a través de un enlazador químico o portador de quelación aceptable. Los restos emisores de positrones incluyen <sup>18</sup>F, que puede conjugarse fácilmente mediante una reacción de fluoración con el agente anti-CD47 o el agente cebador.

35 **[0090]** Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida o copolímero para un efecto adyuvante mejorado, como se discutió anteriormente. Langer, Science 249: 1527, 1990 y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. Los agentes de esta invención pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o preparación de implante que puede formularse de tal manera que para permitir una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas generalmente están formuladas como estériles, sustancialmente isotónicas y en total cumplimiento con todas las regulaciones de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos.

40 **[0091]** La toxicidad de los agentes anti-CD47 y/o agentes de imprimación puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la LD<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población) o LD<sub>100</sub> (la dosis letal para el 100% de la población). La relación de dosis entre efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden utilizar para optimizar aún más un intervalo de dosificación terapéutica y/o un intervalo de dosificación de cebado para uso en seres humanos. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual en vista de la condición del paciente.

#### EXPERIMENTAL

50 **[0092]** Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos ordinarios en la técnica una exposición y descripción completa de cómo realizar y usar la presente invención, y no se pretende limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni pretenden representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión está en o cerca de la atmósfera.

EjemplosEjemplo

1

5

**Inyección única de anticuerpos anti-CD47 en ratones de tipo silvestre**

[0093] Se administró una inyección IP de 250 µg de MIAP410 (isotipo IgG1) o MIAP470 (isotipo IgG2a) a ratones de tipo silvestre. Esta dosis de anticuerpo es aproximadamente equivalente a una dosis de 10 mg/kg. La sangre se extrajo del plexo retro-orbital y el análisis de CBC se realizó en el analizador de hematología HemaTrue 1,3 y 6 días después de la inyección del anticuerpo. El porcentaje de cambio en los valores de hematocrito (HCT) y RBC se muestra en la **Figura 1**. Todos los ratones tratados con mAb anti-CD47 desarrollaron anemia, cuyo nadir ocurrió aproximadamente 3 días después de la inyección. El MIAP470 causó una anemia más significativa, que probablemente se deba a los efectos mediados por el FcR diferencial causados por los isotipos IgG1 e IgG2a.

15

**Inyección única de anticuerpos anti-CD47 en ratones CD47<sup>-/-</sup>**

[0094] Los ratones CD47<sup>-/-</sup> fueron adquiridos de Jackson Laboratory y se inyectaron IP con 250 µg de IgG de ratón de control, MIAP410, o MIAP470. La sangre se recogió y se analizó 72 horas después de la inyección de mAb. No se observó anemia en ninguno de los ratones CD47<sup>-/-</sup> inyectados. El porcentaje de cambio en la hemoglobina se muestra en la **Figura 2**. Esto demuestra que la anemia observada en ratones de tipo silvestre fue un resultado directo de los anticuerpos anti-CD47 que se unen a CD47.

20

**Inyecciones múltiples de anticuerpos anti-CD47 en ratones de tipo silvestre**

25

[0095] A los ratones WT se les administró una inyección IP de 250 µg de IgG de ratón de control, MIAP410 o MIAP470 cada 3 días (representada por una línea vertical discontinua en la **Figura 3**). La toxicidad de los eritrocitos se controló mediante análisis de CBC antes de cada inyección. Se produjo una disminución aguda de la HCT en la primera inyección de anticuerpos (día 0). La segunda inyección (en el día 3) no produjo una caída adicional en el hematocrito. Los ratones parecieron volverse resistentes a las inyecciones posteriores y finalmente regresaron a un rango similar al de los ratones tratados con IgG de control. El descubrimiento de que la administración repetida de anticuerpos anti-CD47 no exacerba la anemia inicial es la base de los experimentos posteriores en primates no humanos.

30

Ejemplo 2

35

**Verificación de la estrategia de dosificación en primates no humanos (NHPs)**

[0096] El anticuerpo anti-CD47 Hu5F9-G4 (y su 5F9 padre) se une a CD47 humano, pero no se une a CD47 de ratón. Para identificar una especie de toxicología apropiada, la secuencia del primate no humano (NHP) CD47 de macaco (*cynomolgus*) se alineó con el CD47 humano y se determinó que las dos secuencias contienen solo 3 diferencias de aminoácidos en el dominio extracelular (**Figura 4**). Los 3 aminoácidos no conservados se encuentran fuera de la región de interacción con SIRP-alfa, como lo determinaron las estructuras cristalinas de rayos X publicadas.

40

[0097] Una proteína de fusión CD47-Fc *cynomolgus* NHP se generó y se determinó que Hu5F9-G4 de hecho se une a *cynomolgus* NHP CD47 (**Figura 5**). Las mediciones de afinidad de la resonancia de plasmón superficial (SPR) se realizaron adicionalmente utilizando Biacore. Los resultados muestran que Hu5F9-G4 se une a *cynomolgus* CD47 con una afinidad comparable a la de CD47 humano (**Figura 6**).

45

[0098] Además, citometría de flujo e inmunofluorescencia, respectivamente, se usaron para mostrar que el anticuerpo Hu5F9-G4 se une a *cynomolgus* leucocitos NHP y tejidos normales en una distribución similar a los leucocitos y tejidos humanos. En conjunto, estos estudios demostraron que el mono *cynomolgus* es una especie relevante para estudios de seguridad y toxicología.

50

**Los anticuerpos anti-CD47 causan anemia dependiente de la dosis en los NHP (dosis única)**

55

[0099] Una serie de estudios NHP se realizaron utilizando anticuerpos Hu5F9-G4 purificados producidos por Lonza utilizando su sistema de expresión de propiedad de la sintetasa de glutamina (GS). Hu5F9-G4 se administró como una dosis única a 0,1, 0,3, 1, 3, 10 o 30 mg/kg y se monitorizaron los parámetros de patología clínica, incluidos recuentos sanguíneos completos y paneles metabólicos. Se observó una anemia dependiente de la dosis, asociada con reticulocitosis y esferocitosis, sin disfunción hepática o renal (**Figura 7**). No se detectó hemoglobina plasmática libre, lo que indica la ausencia de hemólisis intravascular. El monitoreo de la farmacocinética a través de la medición de los niveles séricos indicó que hay un gran sumidero de antígenos que resulta en una vida media corta (**Figura 7**). Con dosis únicas, solo 10 y 30 mg/kg pudieron alcanzar transitoriamente niveles séricos en el rango asociado con la eficacia en estudios de xenoinjerto. Por lo tanto, la dosificación adecuada puede lograr y mantener niveles de agentes anti-CD47 terapéuticamente eficaces al tiempo que minimiza la anemia.

60

65



### Las concentraciones crecientes de anticuerpos anti-CD47 no exacerban la anemia

[0100] Se especuló que la administración previa de la eritropoyetina (EPO) podría mitigar la anemia estimulando la producción de glóbulos rojos jóvenes. A partir de estas consideraciones, realizamos un estudio de escalado de dosis por separado en el NHP basado en la hipótesis de que las dosis bajas iniciales mitigarán la pérdida de RBC envejecido y estimularán la producción de RBC jóvenes menos susceptibles, lo que facilitará la tolerancia de dosis mayores posteriores (**Figura 8**). Se incluyeron dos animales en este estudio y se administraron dosis a intervalos de una semana: uno con pre-tratamiento con EPO (3, 10, 30, 100 y 300 mg/kg) y otro sin pre-tratamiento (1, 3, 10, 30, y 100 mg/kg). En ambos casos, el NHP exhibió una anemia leve con dosificación inicial que no empeoró con las administraciones repetidas. De hecho, la hemoglobina solo alcanzó el umbral superior para la transfusión en humanos, incluso sin tratamiento previo de EPO. Los animales toleraron bien todas las dosis, incluidos 100 y 300 mg/kg, sin alteraciones sanguíneas o metabólicas adicionales. Al final del estudio, ambos animales fueron sometidos a eutanasia, y el análisis de necropsia e histopatología no reveló anomalías.

[0101] A partir de este estudio de escalada de dosis, se determinó la farmacocinética de Hu5F9-G4 en NHP. Consistente con la presencia de un gran sumidero de antígenos de CD47 expresado por tejidos normales, las bajas dosis iniciales de Hu5F9-G4 se eliminaron rápidamente del suero con una vida media de 24 horas (**Figura 9**). En contraste, las dosis más altas de Hu5F9-G4 produjeron niveles séricos sostenidos que indican la saturación del sumidero de antígeno. El animal a una dosis de 300 mg/kg tuvo un nivel máximo de 5 mg/ml con un nivel sostenido de más de 1 mg/ml durante casi 2 semanas.

### La dosis de carga única de anticuerpos anti-CD47 permite dosis de mantenimiento más altas

[0102] Estos estudios demostraron que Hu5F9-G4 se puede administrar a NHP en dosis capaces de alcanzar niveles séricos terapéuticos prolongados sin efectos tóxicos importantes. Para modelar posibles estrategias de dosificación clínica, hemos realizado otro estudio de NHP utilizando un enfoque de dosificación de carga y mantenimiento. En este estudio, Hu5F9-G4 se administra con una dosis de carga capaz de estimular la anemia leve y la reticulocitosis sin toxicidad de grado 3. Nuestros datos de dosis única (ver arriba), nos llevaron a seleccionar 1 o 3 mg/kg en el día 1 como la dosis de carga. Una semana después, se administra una dosis de mantenimiento de 10 o 30 mg/kg, y se continúa semanalmente durante 3 dosis. Ambas dosis de carga mitigan la gravedad de la anemia, incluso con las dosis de mantenimiento de 30 mg/kg, y no se desarrolla toxicidad de grado 3. Los datos de PK después de la primera dosis de mantenimiento indican que los animales han alcanzado niveles terapéuticos. Este estudio sugiere que una estrategia de carga y mantenimiento mitiga la anemia (prevención de la toxicidad de grado 3) al tiempo que alcanza niveles de fármacos potencialmente terapéuticos. **La Figura 10** presenta datos de recuento de reticulocitos que demuestran el nivel de reticulocitosis asociada con varias dosis de un agente anti-CD47 (anticuerpo hu5F9-G4 en este caso).

#### Ejemplo 3

### Eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-CD47 en ensayos de xenotrasplantes.

[0103] Anteriormente informamos evidencia preclínica de que un anticuerpo monoclonal anti-CD47 bloqueante (clon B6H12, IgG1 de ratón) fue efectivo para inhibir el crecimiento y la metástasis de tumores sólidos, incluyendo la mama, vejiga, colon, ovario, glioblastoma, leiomiomas y cabeza y carcinoma de células escamosas del cuello (PMID: 22451913, 22451919). Los anticuerpos monoclonales anti-CD47 también causaron una inhibición similar del crecimiento del tumor hematológico (PMID: 21177380, 20813259, 19632179, 19632178). Ahora hemos confirmado que los anticuerpos humanizados (p. ej., el anticuerpo anti-CD47 humanizado utilizado en los estudios anteriores, hu5F9-G4) también son altamente efectivos para inhibir el crecimiento de tumores sólidos y eliminar metástasis (**Figura 11**).

[0104] Para investigar la eficacia de hu5F9-G4 en tumores sólidos, una línea celular de cáncer de vejiga humana (639V) se transplantó simultáneamente en ratones inmunodeficientes. Los ratones portadores de tumores se trataron con PBS o hu5F9-G4. Debido a la carga tumoral, todos los ratones tratados con PBS se sometieron a eutanasia después de 4 semanas de tratamiento. Por el contrario, no se observó crecimiento tumoral en la cohorte tratada con hu5F9-G4 (**Figura 11**). Luego, estos ratones se monitorizaron durante 4 semanas adicionales (sin más tratamiento con hu5F9-G4). No se observó crecimiento tumoral en ratones que habían sido tratados con hu5F9-G4, lo que indica que los tumores se habían eliminado completamente (**Figura 11A**).

[0105] Para evaluar el efecto de hu5F9-G4 sobre la formación de metástasis tumorales, injertamos por vía subcutánea una muestra de tumor de próstata metastático humano en ratones inmunodeficientes. Tras el injerto tumoral, iniciamos el tratamiento con PBS o hu5F9-G4. Después de 6 semanas de tratamiento, se observó una disminución significativa en el número y tamaño de las metástasis de los ganglios linfáticos (**Figura 11B**). Estos resultados indican que hu5F9-G4 puede inhibir o eliminar metástasis tumorales.

[0106] Para demostrar el potencial de hu5F9-G4 para eliminar las metástasis establecidas, injertamos células de

cáncer de mama humanas primarias en la almohadilla de grasa mamaria de ratón. Después de confirmar la presencia de metástasis tumorales en los pulmones, se reseco el tumor primario y se inició el tratamiento con PBS o hu5F9-G4. Después de 4 semanas, se observó una inhibición significativa del crecimiento de la metástasis pulmonar en ratones tratados con hu5F9-G4 (**Figura 12A**). Además, se observó una eliminación completa de las metástasis tumorales en el cerebro (**Figura 12B**). Hu5F9-G4 también inhibió el recrecimiento del tumor primario reseco, lo que indica que hu5F9-G4 también es eficaz en el tratamiento de la enfermedad residual mínima (**Figura 12C**).

[0107] Las concentraciones séricas de hu5F9-G4 se controlaron durante todo el experimento. Las concentraciones de Hu5F9-G4 entre 100-200 µg/ml se asociaron con eficacia terapéutica (**Figura 12AD**). Estos datos demuestran que los anticuerpos humanizados (p. ej., Hu5F9-G4) tienen las mismas propiedades generales relacionadas con el tratamiento de la enfermedad (p. ej., cáncer o infección crónica) que los anticuerpos no humanizados y que los métodos en cuestión serán eficaces cuando se utilicen un anticuerpo humanizado para tratar el cáncer y/o para tratar una infección crónica.

#### Ejemplo 4

[0108] En experimentos toxicológicos anteriores en monos cynomolgus, una sola inyección de nuestro anticuerpo monoclonal anti-CD47 humanizado (Hu5F9-G4) produjeron niveles inaceptables de anemia (Hb > 7 g/dl) cuando se dosifica en o por encima de 10 mg/kg. Las dosis de Hu5F9-G4 menores de 10 mg/kg son insuficientes para producir niveles séricos asociados con la eficacia terapéutica en nuestros modelos preclínicos (100-200 µg/ml). Este nuevo estudio determinó si una "dosis de cebado" única de 5 mg/kg era suficiente para proteger a los monos cynomolgus de las "dosis de mantenimiento" posteriores a niveles que de otra manera serían tóxicos (y probablemente letales) (véase diseño del estudio: **Figura 13**).

[0109] A pesar de la anemia relacionada con la administración de Hu5F9-G4, no se observó evidencia de toxicidad en los signos clínicos en ningún animal y, por lo tanto, la estrategia de dosificación de cebado/mantenimiento permite que Hu5F9-G4 sea clínicamente bien tolerado, incluso en dosis tan alto como 300 mg/kg (**Figura 14**). Creemos que la administración de Hu5F9-G4 acelera el proceso de eliminación de los RBC envejecidos al sustituir la pérdida gradual de CD47 con el bloqueo inmediato de CD47 en los RBC que envejecen. La pérdida prematura del envejecimiento de los glóbulos rojos se compensa con la consiguiente reticulocitosis (que se observó en todos los estudios) y, con el tiempo, la anemia inicial se resuelve a medida que los glóbulos rojos envejecidos se reemplazan con células más jóvenes y, como resultado, la distribución por edades de la reserva de glóbulos rojos se desplaza a las células más jóvenes. Las concentraciones séricas en los Grupos 2-4 (**Figura 13, Figura 14, Figura 15**) estaban muy por encima del nivel mínimo de 100-200 µg/ml asociado con la eficacia terapéutica.

[0110] **Figura 13. Diseño del estudio.** Los animales (nº de machos y hembras en la columna de la extrema derecha) se dividieron en 5 grupos, uno de los cuales no recibió anticuerpo anti-CD47. Todos los animales en los Grupos 2-5 recibieron una dosis de cebado (5 mg/kg) y los Grupos 2-5 recibieron las dosis de mantenimiento indicadas a partir de entonces.

[0111] **Figura 14. Niveles de hemoglobina en todas las cohortes durante la duración del estudio.** La línea discontinua horizontal representa una dosis de toxicidad limitante en este estudio (Hb < 7). Cada punto en este gráfico representa un animal individual. No hay diferencia estadística en los niveles de Hb en los diferentes niveles de dosis de mantenimiento. La dosis de cebado (5 mg/kg) protege contra las dosis posteriores, sin importar cuán altas sean.

[0112] **Figura 15. Perfil farmacocinético de Hu5F9-G4 en todas las cohortes.** Los grupos 3-4 alcanzan concentraciones séricas de Hu5F9-G4 muy por encima de las concentraciones mínimas asociadas con la eficacia (rango diana).

#### Ejemplo 5

[0113] Se realizaron estudios en monos rhesus y/o cynomolgus, los cuales se consideran especies de animales farmacéuticamente relevantes (el CD47 de los monos rhesus comparte una homología de secuencia del 100% con el CD47 de los monos cinomolágicos).

[0114] Todos los estudios se realizaron de conformidad con los reglamentos de buenas prácticas de laboratorio (GLP) de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (21 CFR Parte 58). El desarrollo de Hu5F9-G4 también siguió los documentos aplicables de la ICH, el Comité de Propietarios y la guía de la FDA.

#### Ensayo de hemólisis in vitro de Hu5F9-G4 (anticuerpo anti-CD47 humanizado)

[0115] Debido a que CD47 se expresa en glóbulos rojos y funciona en la eliminación del envejecimiento de los glóbulos rojos, este estudio se realizó para evaluar si Hu5F9-G4 causó hemólisis intravascular directa de glóbulos rojos humanos o de monos (rhesus y cynomolgus), utilizando la hemoglobina libre como una lectura. Hu5F9-G4 no

causó hemólisis de glóbulos rojos humanos ni de mono (rhesus o cynomolgus).

#### **Producción de citocinas en PBMC humanas estimuladas con Hu5F9-G4 in vitro**

5 **[0116]** El objetivo de este estudio fue evaluar la inducción potencial de liberación de citocinas por Hu5F9-G4 en  
 células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). En este estudio in vitro, los PMBC cultivados  
 recolectados de tres donantes separados se incubaron con Hu5F9-G4 (20 µg/ml unido a la placa) o un anticuerpo  
 10 IgG4 humano no específico (control negativo) o anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 (control positivo). Se evaluaron  
 cincuenta citocinas diferentes, incluidas muchas citocinas proinflamatorias asociadas con la tormenta de  
 15 citocinas (p. ej., TNF-α, IL-1, IL-4, IL-6) mediante el análisis de múltiplex de Luminex. De las diferentes citocinas  
 evaluadas, Hu5F9-G4 no indujo la liberación de citocinas en PBMC humanas. Además, no se observaron signos  
 clínicos de síndrome de liberación de citocinas en ninguno de los estudios con monos. El tratamiento de las PBMC  
 humanas con Hu5F9-G4 dio lugar a una reducción de los niveles de IL1-RA, MIP1b/CCL4, IL-8 y ENA-78/CXCL5 en  
 comparación con las PBMC tratadas con el anticuerpo IgG4 no específico o anticuerpos CD3/CD28. Si bien la  
 relación entre CD47 y estas cuatro citocinas no está clara, no se observó evidencia de ningún efecto relacionado  
 con el tratamiento que pudiera asociarse directamente con una reducción de los niveles de citocinas en los  
 estudios con monos.

#### **Estudio de dosis única de Hu5F9-G4 y B6H12-G4 administrado mediante infusión intravenosa de 1 hora o 20 inyección subcutánea en monos Cynomolgus**

**[0117]** El propósito de este estudio fue evaluar la toxicidad potencial y la toxicocinética de Hu5F9-G4 se administra  
 como una dosis única por una infusión IV de 1 hora a monos cynomolgus macho. En este estudio, se administró  
 Hu5F9-G4 a una dosis de 10 mg/kg a un solo mono macho el día 1. Se evaluó el mono en busca de cambios en los  
 25 signos clínicos, el consumo de alimentos, el peso corporal y los parámetros de patología clínica (hematología,  
 coagulación, hematología, química clínica). Se recolectaron muestras para el análisis toxicocinético a lo largo de la  
 duración del estudio; el animal fue devuelto a la colonia de animales de la instalación de prueba el día 14.

**[0118]** Se observaron cambios relacionados con el tratamiento en los parámetros hematológicos e incluyeron  
 30 disminuciones leves a moderadas en el recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, recuentos  
 marcadamente aumentados de reticulocitos y ancho de distribución de glóbulos rojos, y aumentos transitorios en  
 glóbulos blancos, linfocitos, y los recuentos de monocitos. También se observaron cambios en los parámetros de  
 química clínica que se consideraron probablemente relacionados con Hu5F9-G4, que incluían aumentos transitorios  
 35 en la deshidrogenasa de lactato, bilirrubina, AST y ALT. Los cambios en los parámetros hematológicos y de química  
 clínica volvieron parcial o totalmente a los niveles de referencia el día 14.

**[0119]** En resumen, una administración única de Hu5F9-G4 a 10 mg/kg fue bien tolerada, con resultados  
 relacionados con el tratamiento limitados a cambios transitorios en los parámetros hematológicos y de química  
 40 clínica.

#### **Estudio a través de la administración de infusión intravenosa a mono Rhesus**

**[0120]** Este estudio se realizó para evaluar los efectos potenciales de Hu5F9-G4 en parámetros de hematología y  
 45 química clínica cuando se administra a los monos rhesus en la misma instalación de prueba donde se llevaron a  
 cabo los estudios en monos cynomolgus (Charles River Laboratories Reno, NV). En este estudio, se administró  
 Hu5F9-G4 como una dosis única a monos rhesus hembras (N = 2) a través de una infusión IV de 1 hora a 3 mg/kg.  
 Los animales se evaluaron durante 14 días y luego se devolvieron a la colonia de animales de la instalación.

**[0121]** La administración de Hu5F9-G4 fue bien tolerada, y no se observaron cambios considerados directamente  
 50 relacionados con Hu5F9-G4 en los signos clínicos, el peso corporal o el consumo de alimentos. Se observaron  
 heces acuosas en ambos animales en los días 7, 8 y 14, que probablemente se relacionaron con procedimientos  
 relacionados con el estudio en lugar de un efecto directo de Hu5F9-G4. Además, las heces acuosas no se  
 informaron en ningún otro estudio de monos. Se observaron cambios relacionados con el tratamiento en ambos  
 animales en los parámetros hematológicos, que incluyen disminuciones en los niveles de glóbulos rojos y  
 55 hemoglobina; sin embargo, estas disminuciones se recuperaron el día 14 y no fueron graves con nadirs de 9,4 y 9,1  
 g/dL (Tabla 1). La hemoglobina plasmática libre no se detectó en ninguno de los animales en ningún momento.  
 También se observó un aumento en la bilirrubina total en cada animal, pero en consonancia con los cambios  
 hematológicos, mostró una tendencia continua de reversibilidad hasta el final del estudio.

**[0122]** En resumen, Hu5F9-G4 fue bien tolerado en monos rhesus, y los cambios relacionados con el tratamiento  
 60 observados en este estudio fueron consistentes con los hallazgos observados en los estudios de monos cynomolgus  
 realizados en Charles River Laboratories (Reno, NV).

65

Tabla 1. Cambios en los parámetros de patología clínica en monos rhesus

Animal nº	Día de estudio	RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	HGB (g/dL)	Bilirrubina total (mg/dL)
700	Pre estudio	6,12	13,8	0,18
	1 (8 h después de la dosis)	5,14	11,7	1,30
	1 (24 h después de la dosis)	4,9	11,3	1,69
	2	4,36	10,0	0,98
	3	4,18	9,8	0,56
	5	4,04	9,4	0,34
	7	4,11	9,9	0,49
	10	4,25	10,8	0,43
	14	4,62	11,4	0,32
	701	Pre estudio	5,47	12,7
1 (8 h después de la dosis)		4,85	11,5	1,89
1 (24 h después de la dosis)		4,65	10,8	0,77
2		4,21	9,9	0,44
3		4,02	9,8	0,34
5		4,01	9,6	0,33
7		3,89 *	9,1	0,41
10		4,15	10,4	0,41
14		4,9	12,7	0,23

#### Estudio farmacocinético y de tolerabilidad de Hu5F9-G4 administrado a monos Rhesus

[0123] El propósito inicial de este estudio fue evaluar la farmacocinética y los efectos potenciales de Hu5F9-G4 administrados como una infusión IV de 1 hora o por administración intratecal en monos rhesus implantados con un depósito intratecal. Sin embargo, debido a la severa anemia observada en el primer mono administrado Hu5F9-G4 a través de una infusión IV de 1 hora, se abandonaron los componentes restantes del estudio, incluida la fase de administración intratecal. En este estudio, a un mono rhesus macho se le administró Hu5F9-G4 a través de una infusión IV de 1 hora como una dosis de cebado de 3 mg/kg en el día 0, seguido de una dosis de mantenimiento de 1 mg/kg administrada en los días 15 y 22 (la dosis en el diseño del estudio inicial fue de 30 mg/kg administrada en los días 8, 15, 22 y 29).

[0124] Se observó una reducción sustancial en los recuentos de RBC y la hemoglobina dentro de las 24 horas después de la administración de la dosis de 3 mg/kg de cebado (Tabla 2). Debido a la anemia observada en este animal, no se administró la primera dosis de mantenimiento programada en el Día 8. El recuento de glóbulos rojos y los niveles de hemoglobina mostraron una tendencia a la recuperación, y para el día 14, los conteos de glóbulos rojos y los niveles de hemoglobina volvieron a 4,31 M/μl y 10,8 g/dL, respectivamente. Por lo tanto, la dosis se reanudó el día 14; sin embargo, la dosis de mantenimiento se redujo a 1 mg/kg (en lugar de 30 mg/kg). En el día 16, los recuentos de glóbulos rojos y la hemoglobina comenzaron a disminuir nuevamente; sin embargo, en el día 17, tanto los recuentos de glóbulos rojos como la hemoglobina comenzaron a recuperarse. Luego, al animal se le administró una segunda dosis de mantenimiento el día 21 (sin embargo, no se recopilaron datos adicionales de patología clínica después del día 21). Además, aunque se observó una reducción en las plaquetas dos días después de la administración de la primera dosis de mantenimiento (el día 14), las plaquetas regresaron a los niveles previos al estudio el día 21; no está claro en este momento si la reducción en las plaquetas observada en este animal se relacionó directamente con Hu5F9-G4 ya que este cambio no se observó en ningún otro estudio de monos, incluido el estudio de monos rhesus de dosis única.

Tabla 2

Cambios en los parámetros de hematología en un mono Rhesus administrado Hu5F9-G4			
Día de estudio	RBC (M/ $\mu$ l)	HGB (g/dL)	Plaquetas (K/ $\mu$ l)
Pre estudio	5,09	12,2	548
0 (8 h después de la dosis)	3,73	7,8	380
1	3,86	8,0	411
2	3,42	7,2	416
3	3,27	7,0	517
6	3,31	7,8	661
9	3,56	9,1	632
13	3,94	8,9	373
14 (pre-dosis)	4,31	10,8	374
15	3,87	8,3	146
16	3,95	8,2	130
17	4,19	8,5	197
20	4,01	8,7	494
21 (pre-dosis)	4,37	9,1	622

#### Un estudio de dosis única y un estudio de dosis repetidas de Hu5F9-G4 y un estudio de dosis única de FD6-IgG2 administrado por infusión intravenosa de 1 hora a monos Cynomolgus

[0125] La anemia observada en un estudio de dosis única anterior puede estar relacionada con la acción farmacológica de Hu5F9-G4 como resultado de la unión de CD47 expresada en los glóbulos rojos. A medida que los RBC envejecen, pierden gradualmente la expresión de CD47, pierden los ácidos siálicos de las glucoproteínas y los glicolípidos, y reorganizan los fosfolípidos de membrana de una manera que presumiblemente acumula señales pro-fagocíticas, lo que lleva a su eliminación por fagocitosis (Danon, 1988). Nuestra hipótesis es que la administración de Hu5F9-G4 acelera el proceso de eliminación de RBC de envejecimiento al sustituir la pérdida gradual de CD47 con el bloqueo inmediato de CD47 en los RBC de envejecimiento. La pérdida prematura del envejecimiento de los glóbulos rojos se compensa con la consiguiente reticulocitosis, y la anemia inicial se resuelve a medida que los glóbulos rojos envejecidos se reemplazan con los glóbulos rojos más jóvenes y la distribución por edades del grupo de glóbulos rojos se traslada a células más jóvenes. En base a estas consideraciones, este estudio se realizó para evaluar si i) las dosis bajas iniciales de Hu5F9-G4 podrían causar una pérdida limitada de los RBC de edad que, sin embargo, es suficiente para inducir una reticulocitosis y, por lo tanto, estimular la producción de RBC jóvenes menos susceptibles y proteger el animal de anemia grave; y ii) el tratamiento previo con eritropoyetina (EPO; un agente estimulante de la eritropoyesis que estimula la producción de glóbulos rojos) puede inducir la producción de glóbulos rojos jóvenes menos susceptibles, compensando así el aclaramiento de los glóbulos rojos envejecidos tras la administración de Hu5F9-G4, se evaluó otro candidato de anticuerpo (FD6-IgG2) en este estudio, pero no se analizará en este IND. En este estudio, a los monos cinomolgus machos se les administró Hu5F9-G4 en una infusión IV de 1 hora como una dosis única de 1 mg/kg o una vez a la semana a 3 mg/kg durante 4 semanas (días 1, 8, 15, 22). Un mono administrado una vez a la semana con dosis de Hu5F9-G4 se trató previamente con eritropoyetina (EPO) mediante inyección IV (17,000 U/kg) en el día 5 para evaluar si el tratamiento previo con EPO reduciría la anemia relacionada con Hu5F9-G4 observada previamente. Además, a un mono que se administró una vez a la semana dosis de Hu5F9-G4 también se administró Dexametasona mediante inyección IV (0,5 mg/kg) y Benadrilo mediante inyección intramuscular (IM) (5 mg/kg) en los días 1, 2, 5, 8, 9, 12, 15, 16, 19, 22, 23 y 26 (Dexametasona y Benadrilo se administraron al mismo tiempo) para evaluar si la administración de Dexametasona y Benadrilo reduciría la anemia relacionada con Hu5F9-G4, el diseño del estudio se presenta en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Dosis únicas y repetidas de Hu5F9-G4 administradas a monos Cynomolgus

Grupo <sup>A</sup>	Hu5F9-G4 (mg/kg)	Días de dosis Hu5F9-G4	Dosis de Dexametasona/Benadrilo Días B	Dosis de EPO Días C
1	1	1	-	-
2	3	1, 8, 15, 22	1, 2, 5, 8, 9, 12, 15, 16, 19, 22, 23, 26,	
3	3	1, 8, 15, 22	-	-5
4	3	1,8, 15, 22	-	-

<sup>A</sup>Grupo 1 fue lanzado a la colonia de animales en el Día 31; Grupos 2 y 4 terminaron el día 31 y el grupo 3 terminó el día 29  
<sup>B</sup>Dexametasona (inyección IV; 0,5 mg/kg) y Benadrilo (inyección IM; 5 mg/kg) se administraron al mismo tiempo los días 1, 8, 15, 22 60 minutos antes de Hu5F9-G4  
<sup>C</sup>EPO se administró IV a 17,000 U/kg

[0126] Parámetros de seguridad estándar (por ejemplo, observaciones clínicas, pesos corporales, la patología clínica, etc.) se incorporaron en el estudio, y debido a CD47 se expresa en el cerebro (añadir referencia), se realizaron exámenes neurológicos veterinarios. La sangre se recolectó en puntos de tiempo en todo el estudio para toxicocinética. Los animales de los grupos 2 y 3 terminaron el día 31, y el mono del grupo 4 terminó el día 29 (el mono del grupo 1 fue devuelto a la colonia de animales de la instalación de prueba).

[0127] No hubo muertes no programadas se produjeron y no hay cambios relacionados con el tratamiento se observaron en los signos clínicos, peso corporal, consumo de alimentos, exámenes neurológicos veterinarios, los parámetros de coagulación o de análisis de orina, peso de los órganos, o macroscópica o exámenes microscópicos.

[0128] Cambios relacionados con Hu5F9-G4 se limitan a cambios en la hematología y los parámetros de química clínica. Los cambios en el animal de dosis única (Grupo 1) incluyeron una disminución de la masa de glóbulos rojos (recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y niveles de hematocrito) y el volumen corpuscular medio (VCM), y un aumento de la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) y el ancho de distribución de glóbulos rojos. (RDW); estos cambios se observaron en el Día 2. Este animal también tuvo una respuesta de reticulocitos robusta, y los cambios en la morfología de los eritrocitos observados en las evaluaciones de frotis de sangre incluyeron esferocitos, anisocitosis y policromasia de mínimos a leves. Los cambios relacionados con el tratamiento en monos a los que se administró Hu5F9-G4 una vez por semana incluyeron disminuciones en la masa de RBC y MCV y aumentos en MCHC. Estos cambios se notaron el Día 3 y fueron menos pronunciados en el animal tratado previamente con EPO en comparación con los otros monos a los que se administró Hu5F9-G4 solo o con Dexametasona/Benadrilo. Los cambios en la masa de RBC se recuperaron parcialmente el día 27 (5 días después de la última dosis del día 22) y se asociaron con una respuesta de reticulocitos robusta correspondiente. Al igual que en el mono de dosis única, los cambios en la morfología de los glóbulos rojos incluyeron esferocitos, anisocitosis y policromasia de mínimos a moderados. No se detectaron aumentos significativos en la hemoglobina plasmática libre en los monos tratados con Hu5F9-G4 de dosis única o repetida.

[0129] Los cambios en los parámetros de química clínica considerados relacionados con la administración Hu5F9-G4 incluido el aumento de la deshidrogenasa de lactato, aminotransferasa de aspartato (dosis única animal), bilirrubina total (mínima), y la disminución de la haptoglobina (repetición de la dosis tratada Hu5F9-G4 solo y dexametasona/sólo monos Benadrilo). Estos cambios en los parámetros de química clínica mostraron evidencia de recuperación completa o parcial al final del estudio.

[0130] En resumen, la administración de Hu5F9-G4 como una dosis única a 1 mg/kg o una vez a la semana durante 4 semanas a una dosis de 3 mg/kg (solo o con tratamiento previo con EPO o en combinación con la administración de Dexametasona/Benadrilo) fue bien tolerado en monos cynomolgus machos, y los efectos relacionados con el tratamiento se limitaron a cambios en la hematología (incluida la morfología de los GR) y los parámetros de química clínica. Al final del estudio, se observó una recuperación parcial o completa en los cambios en los parámetros de química clínica y de masa de RBC.

**Repita el estudio de dosis de monómero Hu5F9-G4 o FD6, y el estudio de dosis única de FD6-IgG4 administrado por infusión intravenosa a monos Cynomolgus Xx**

[0131] El propósito de este estudio fue evaluar la toxicidad potencial y la toxicocinética de Hu5F9-G4 tras administración a monos cynomolgus hembra a través de una infusión IV de 1 hora en dosis crecientes durante un período de 5 semanas (FD6-IgG2 fue otro anticuerpo candidato evaluado en este estudio). En este estudio, a un mono se le administró EPO (17.000 U/kg) en el día 5, seguido de dosis crecientes de Hu5F9-G4 hasta 300 mg/kg una vez por semana en los días 1, 8, 15, 24 y 31; al otro mono se le administraron dosis crecientes de Hu5F9-G4 (sin tratamiento previo con EPO) hasta 100 mg/kg una vez por semana en los días 1, 8, 15, 24 y 31; se incorporaron parámetros de seguridad estándar en este estudio y ambos animales fueron terminados en el día 43 (13 días después de la última dosis de Hu5F9-G4). El diseño del estudio se presenta en la **Tabla 4**,

**Tabla 4. Dosis crecientes de Hu5F9-G4 administradas a monos Cynomolgus**

Grupo	Nº de monos hembra	Dosis Hu5F9-G4 (mg/kg)	Días de dosis
1 (pre-tratamiento EPO) (17.000 U/mg administrado en el día 5)		3	1
		10	8
		30	15
		100	24
		300	31
2 (No EPO)		1	1
		3	8
		10	15
		30	24
		100	31

**[0132]** Ambos animales sobrevivieron hasta el final programado del estudio, y no se observaron cambios relacionados con el tratamiento en los signos clínicos, el peso corporal, el consumo de alimentos, los parámetros de coagulación y análisis de orina, los parámetros de química clínica indicativos del efecto renal, hepático o cardíaco, Pesos de órganos, o exámenes macroscópicos o microscópicos. Los hallazgos relacionados con el tratamiento se limitaron a cambios en los parámetros hematológicos y de química clínica. De acuerdo con estudios anteriores, los cambios hematológicos incluyeron una disminución de la masa de RBC (recuento de RBC, hemoglobina, hematocrito) y un aumento de los recuentos de reticulocitos. Otros cambios incluyeron aumentos en MCHC y RDW y disminuciones en MCV también se observaron. Las disminuciones en el recuento de glóbulos rojos y la hemoglobina volvieron a valores cercanos al estudio para ambos animales al final del estudio (**Tabla 5**). Se observó un recuento de reticulocitos robusto en ambos animales a partir del Día 3, que regresó a valores cercanos al estudio en ambos animales para el Día 43.

**Tabla 5. Cambios en los parámetros de hematología**

Grupo/Nº de animal	Día	RBC (10 <sup>6</sup> /µl)	HGB (g/dL)	RETIC (10 <sup>5</sup> /µl)
1/1501 (Pre-tratamiento EPO)	Pre-estudio	5,48	13,0	0,66
	3	4,39	10,7	6,8
	5	4,43	10,7	5,32
	13	4,28	10,8	3,0
	20	4,25	10,8	3,61
	30	4,64	11,6	2,32
	43	4,98	12,3	1,54
2/2501 (No EPO)	Pre-estudio	5,3	12,1	0,53
	3	4,19	9,6	3,27
	5	4,47	10,3	5,86
	13	4,6	11,5	5,93
	20	4,76	11,4	4,43
	30	4,76	12,7	2,77
	43	5,74	13,2	0,80

**[0133]** Los cambios en la morfología de RBC fueron consistentes con estudios anteriores y se incluyen microcitos mínimos a marcados, anisocitosis, policromasia, y esferocitosis. Como se esperaba (basado en la acción farmacológica de la EPO), estos cambios fueron más pronunciados en el Animal N° 2501 (sin pretratamiento de la EPO) en comparación con el Animal N° 1501, Los cambios en la morfología de RBC mostraron una recuperación parcial o completa para el Día 37 (**Tabla 6**).

Tabla 6. Morfologías de glóbulos rojos

Group/Nº de animal	Día de estudio	Morfología y Severidad RBC			
		Anisocitosis	Microcitos	Policromasia	Esferocitos
1/1501 (Pre-tratamiento EPO)	3	1+	-	2+	2+
	5	1+	-	2+	1+
2/2501 (No EPO)	3	1+	-	1+	3+
	5	1+	-	2+	1+
	10	1+	3+	2+	4+
	13	3+	2+	1+	2+
	17	1+	-	2+	1+
	20	3+	2+	1+	-
	37	1+	-	-	-

1+ = mínimo; 2+ = suave; 3+ = moderado; 4+ = marcado; - = no aplicable

**[0134]** Se observaron además, el aumento de recuentos de linfocitos, y monocitos tanto en animales, que eran más altos alrededor del día 20 y variaron desde 2,58 hasta 3,7 veces por encima de los valores antes del estudio para los linfocitos como 4,4 a 6,13 veces por encima de los valores antes del estudio para los recuentos de monocitos. Los cambios en la química clínica incluyeron la disminución de la haptoglobina observada en ambos animales, que volvió a los niveles de estudio al final del estudio. También se observó un aumento de bilirrubina en el día 13 para el Animal N° 2501 (sin pretratamiento con EPO).

**[0135]** La toxicocinética confirmó la exposición a Hu5F9-G4 en ambos animales, y las concentraciones circulantes de Hu5F9-G4 generalmente aumentaron a medida que aumentaba la dosis. La administración de Hu5F9-G4 en dosis de hasta 100 mg/kg resultó en una vida media de 14 horas.

**[0136]** En resumen, la administración de dosis crecientes de Hu5F9-G4 administradas por infusión intravenosa de 1 hora una vez a la semana en dosis de hasta 100 mg/kg (sin pretratamiento de EPO) o 300 mg/kg (pretratamiento de EPO) fue en general bien tolerada por los monos cynomolgus. Los cambios relacionados con el tratamiento se limitaron a la hematología (incluida la morfología de los eritrocitos) y los parámetros de química clínica, que fueron parcial o completamente reversibles al final del estudio.

#### Un estudio de dosis única o escalada de Hu5F9-G4 administrado por infusión intravenosa de 1 hora a monos cynomolgus hembra

**[0137]** En base al estudio anterior, la administración inicial de Hu5F9-G4 a dosis más bajas permite la administración posterior de dosis más altas que son toleradas en monos cynomolgus. El propósito de este estudio fue evaluar la toxicidad potencial y toxicocinética de Hu5F9-G4 cuando se administra como una dosis de cebado a un nivel de dosis bajo seguido de múltiples dosis de mantenimiento a niveles de dosis más altos. Además, este estudio se diseñó para modelar el posible esquema de dosificación clínica mediante un régimen de dosificación de cebado/mantenimiento. En este estudio, a monos cynomolgus hembra se les administró solución salina tamponada con fosfato (PBS) o dosis crecientes de Hu5F9-G4 (con un rango de 0,1 a 30 mg/kg) en una infusión IV de 1 hora como una única dosis de cebado el día 1 (Grupos A y H). A los animales en los Grupos B - F se les administró PBS o Hu5F9-G4 como una dosis de cebado en el Día 1, seguido de múltiples dosis de mantenimiento de PBS o varias dosis de Hu5F9-G4. A un animal del Grupo D (10501) y del Grupo F (12501) se le administró un segundo ciclo de dosis de cebado/mantenimiento que comenzó en el Día 68 (dosis de cebado de 3 mg/kg) seguido de dosis de mantenimiento dos veces por semana (30 mg/kg) para 2 semanas en los días 75, 78, 82 y 85, mientras que la primera dosis de cebado en el día 1 para el Animal N° 10501 fue de 1 mg/kg, la segunda dosis de cebado en el día 68 se incrementó a 3 mg/kg para evaluar si este aumento en la dosis de cebado se toleraría (la dosis de cebado en los días 1 y 68 para el Animal N° 12501 fue de 3 mg/kg). En lugar de tener un programa de dosis de cebado/mantenimiento, al animal del Grupo G se le administró Hu5F9-G4 una vez por semana a 10 mg/kg en los Días 1, 8, 15 y 22 (debido a la baja masa de RBC, la dosis del Día 15 no fue administrado). El diseño del estudio se presenta en la **Tabla 7**.



Tabla 7. Administración de Hu5F9-G4 como cronograma de dosis de cebado/mantenimiento para monos *Cynomolgus*

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Nº de animal	Grupo	Nº de animales	Material de prueba	Día(s) de dosis <sup>A</sup>	Nivel de dosis (mg/kg)
1501	A	1	PBS	1	0
2501	A	1	Hu5F9-G4	1	0,1
3501	A	1	Hu5F9-G4	1	0,3
4501	A	1	Hu5F9-G4	1	1
5501	A	1	Hu5F9-G4	1	3
6501	A	1	Hu5F9-G4	1	10
7501	A	1	Hu5F9-G4	1	30
8501	B	1	PBS	1	0
				8	
				15	
				22	
				29	
				36	
				43	
				68	
				75	
				78	
82					
85					
9501 9502	C	2	Hu5F9-G4	1	1
				8	10
				15	
				22	10
				29	10
				36	10
43	10				
10501 <sup>D</sup> 10502	D	2	Hu5F9-G4	1	1
				8	30
				15	
				22	
				29	30
				36	30
				43	30
				68 <sup>B</sup>	3
				75 <sup>B</sup>	30
				78 <sup>B</sup>	30
82 <sup>B</sup>	30				
85 <sup>B</sup>	30				

(Continuado)

	Nº de animal	Grupo	Nº de animales	Material de prueba	Día(s) de dosis <sup>A</sup>	Nivel de dosis (mg/kg)
5	11501 11502	E	2	Hu5F9-G4	1	3
10					8	10
					15	
					22	
					29	10
					36	10
	43	10				
15	12501 D 12502	F	2	Hu5F9-G4	1	3
20					8	30
					15	
					22	
					29	30
					36	30
					43	30
					68 <sup>B</sup>	3
					75 <sup>B</sup>	30
					78 <sup>B</sup>	30
82 <sup>B</sup>	30					
25	85 <sup>B</sup>	30				
30	13501	G	1	Hu5F9-G4	1	10
					8	
					15 <sup>C</sup>	
					22	
	14401	H	1	Hu5F9-G4	1	30

A Dosis de cebado administrada el día 1; Dosis de mantenimiento administradas en todos los días posteriores.  
 B Dosificación en los Días 68 (dosis de cebado) seguida de dosis de mantenimiento en los Días 75, 78, 82 y 85 aplicables a solo 1 animal de este grupo (Animal 10501 en el Grupo D y Animal 12501 en el Grupo F).  
 C El animal tuvo una dosis de vacaciones en este día debido a la baja masa de RBC  
 D Los animales números 10501 y 12501 se terminaron en el día 120 y se sometieron a una autopsia completa; todos los demás animales fueron devueltos a la colonia de animales de la instalación en el día 120.

[0138] Todos los animales se evaluaron para detectar cambios en los signos clínicos, el consumo de alimentos, el peso corporal, los parámetros de patología clínica (hematología, coagulación, química clínica, análisis de orina). Se recogieron muestras de sangre a lo largo del estudio para evaluar la toxicidad y la evaluación de las respuestas de la ADA. Debido al nivel de disminución de la masa de RBC, se produjo una dosis de vacaciones el día 15 para el animal en el Grupo G (13501; dosis de cebado/mantenimiento de 10 mg/kg); a este animal se le administró la última dosis programada en el Día 22. Los animales se devolvieron a la colonia del Centro de Pruebas en el Día 120, excepto para los Animales N<sup>os</sup> 10501 (Grupo D) y 12501 (Grupo F) que se sacrificaron en el Día 120, y se sometieron a un examen completo de necropsia; También se realizaron pesajes de órganos y examen microscópico de tejidos.

[0139] No ocurrieron muertes programadas, y la administración general de Hu5F9-G4 fue clínicamente bien tolerada. Los hallazgos considerados relacionados con Hu5F9-G4 se limitaron a cambios en los parámetros hematológicos y de química clínica.

Grupos de dosis única (A y H): Parámetros de hematología

[0140] Cambios de hematología se observaron en los animales administrados con una dosis única de Hu5F9-G4 (Grupos A y H). Se observaron disminuciones variables en la masa de glóbulos rojos en animales en el Grupo A (dosis de cebado escaladas administradas que oscilan entre 0,1 y 30 mg/kg) durante los días 3 a 14 en grupos de dosis  $\geq 0,3$  mg/kg (no se observaron cambios para 0,1 mg/kg). Las disminuciones en la masa de RBC oscilaron hasta 0,73 veces por debajo de los niveles de estudio para 0,3 mg/kg, 0,63 veces por debajo de 1 y 10 mg/kg, y 0,53 veces por debajo del estudio para 30 mg/kg (Tabla 8). Curiosamente, la masa de glóbulos rojos para el animal en el Grupo H disminuyó solo ligeramente por debajo de los niveles de estudio, a pesar de que a este animal se le

administró la dosis más alta de cebado (30 mg/kg). Sin embargo, estas disminuciones mostraron una tendencia continua a la recuperación hasta el último punto de tiempo evaluado para los Grupos A y H. El recuento de ululocitocitos aumentó para todos los animales (incluido el control), lo que indica una eritropoyesis sensible. Además, se observaron aumentos en MCHC ( $\geq 0,3$  mg/kg) y RDW ( $\geq 0,1$  mg/kg), con aumentos hasta 1,2 veces superiores a los valores de preestudio para MCHC y 2 veces superiores a los valores de preestudio para RDW. También se observaron disminuciones en el VCM a dosis  $\geq 0,3$  mg/kg, que oscilaron hasta 0,91 veces por debajo de los valores de estudio. No se detectó hemoglobina plasmática libre en ningún animal. Los recuentos de linfocitos aumentaron en dosis  $\geq 0,3$  mg/kg, con valores que oscilaron entre 1,19 y 1,86 veces por encima de los valores de estudio; los aumentos en los linfocitos se correspondieron con los recuentos de glóbulos blancos, que se extendieron hasta 2,5 veces por encima del estudio previo. Los cambios en las morfologías de los eritrocitos se evaluaron en los días 6 y 10, y se anotaron en dosis  $\geq 0,1$  mg/kg; estos cambios aumentaron en gravedad con dosis más altas (0,3 a 30 mg/kg) e incluyeron macrocitos, microcitos, anisocitosis, policromasia y esferocitosis de mínimos a marcados.

**Tabla 8, Cambios en los parámetros hematológicos para animales administrados con una dosis de cebado única de Hu5F9-G4 (Grupos A y H)**

Animal N° (dosis de Hu5F9-G4)	Día de estudio	RBC ( $10^6/\mu\text{l}$ )	HGB (g/dL)
Grupo A			
1501 (control)	Pre estudio	5,87	13,5
	3	5,46	12,6
	6	5,20	12,0
	14	5,63	13,0
	42	5,55	13,1
2501 (0,1 mg/kg)	Pre estudio	5,62	13,9
	3	5,07	12,5
	6	4,67	11,6
	14	5,27	13,1
	42	5,82	14,4
3501 (0,3 mg/kg)	Pre estudio	5,58	12,8
	3	4,92	11,2
	6	4,44	10,4
	14	5,20	12,1
	42	5,88	13,5
4501 (1 mg/kg)	Pre estudio	5,31	13,8
	3	3,75	9,7
	6	3,65	9,6
	14	4,39	11,5
	42	5,51	14,3
5501 (3 mg/kg)	Pre estudio	5,64	13,0
	3	4,68	11,0
	6	4,05	9,9
	14	4,44	11,6
	42	5,56	13,8
6501 (10 mg/kg)	Pre estudio	6,24	14,2
	3	5,01	11,2
	6	4,14	9,7
	14	5,24	12,1
	42	6,25	14,4
7501 (30 mg/kg)	Pre estudio	5,22	12,5
	3	4,69	11,2
	6	3,02	7,3
	14	3,98	9,9
	42	5,37	12,8
Grupo h			

(Continuado)

14501 (30 mg/kg)	Pre estudio	5,99	13,9
	3	4,9	11,2
	6	4,76	11,3
	14	4,87	11,8
	42	5,77	14,0

Grupos de cebado/mantenimiento (B - F) y una vez semanal (Grupo G): Parámetros de hematología

[0141] Los cambios hematológicos observados en animales a los que se administró una dosis de cebado en el día 1 seguido de dosis de mantenimiento repetidas de Hu5F9-G4 (Grupos B - F) y HuF59-G4 una vez por semana (Grupo G) fueron consistentes con los observados en animales de dosis única (Grupos A y H). Se observaron disminuciones variables en la masa de glóbulos rojos (recuentos de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito) en los grupos que recibieron dosis de cebado  $\geq 1$  mg/kg y dosis de mantenimiento  $\geq 10$  mg/kg (**Tablas 9-10**). Estas disminuciones en la masa de RBC tendieron a ser mayores en puntos de tiempo anteriores (Días 5, 8 12). Además, las disminuciones en la masa de RBC fueron mayores para el animal que se administró 10 mg/kg una vez por semana (Animal N° 13501; Grupo G) en comparación con los otros animales que recibieron el programa de dosis de cebado/mantenimiento. Curiosamente, mientras que los niveles de hemoglobina para el Animal N° 10501 (Grupo D) disminuyeron después de la primera dosis de cebado de 1 mg/kg en el Día 1, los niveles de hemoglobina no disminuyeron después de la segunda dosis de cebado más alta en el Día 68 o después del segundo ciclo de dosis de mantenimiento en los días 75, 78, 82 y 85 (**Tablas 9-10**). Además, el nivel de hemoglobina para el otro animal (N° 12501; Grupo F) administró un segundo ciclo de cebado/mantenimiento se mantuvo en los niveles de estudio durante el segundo ciclo. Estos datos indican que la anemia producida por dosis de cebado por debajo de 10 mg/kg es menos grave en comparación con dosis de cebado  $\geq 10$  mg/kg, y las dosis de cebado más bajas permiten una dosis de mantenimiento continuo de Hu5F9-G4 que es tolerada por los monos cynomolgus. Además, estos datos muestran que el programa de dosificación de cebado/mantenimiento no produce una anemia tan grave como la observada con el programa de dosis semanal (Grupo G). Para todos los grupos de cebado/mantenimiento, hubo una tendencia a la recuperación en la masa de RBC hasta el final del estudio. El animal 13501 (Grupo G, 10 mg/kg una vez por semana) tuvo un descanso de dosis en el Día 15 debido a la baja masa de RBC (el nivel de hemoglobina fue de 6,5 g/dL en el Día 12). Sin embargo, los niveles de hemoglobina comenzaron a recuperarse el día 19 y, por lo tanto, se reanudaron las dosis para este animal, al que se le administró la última dosis el día 22 (**Tablas 9-10**). Los niveles de hemoglobina para el Animal N° 13501 mantuvieron constantemente una tendencia hacia la recuperación, y en el último punto de tiempo (Día 71), volvieron a niveles ligeramente por encima del nivel de estudio. Los recuentos de reticulocitos aumentaron en todos los grupos (B-F, incluido el grupo de control), lo que indica una eritropoyesis sensible. El MCHC y el RDW aumentaron de forma variable en dosis de cebado/mantenimiento  $\geq 1/10$  mg/kg con valores que van hasta 1,21 veces por encima del estudio previo para MCHC y 2,41 veces por encima del estudio previo para RDW. También se observaron disminuciones variables (hasta 0,90 veces por encima del estudio previo) en MCV. Similarmente a los cambios en la masa de RBC, los cambios observados en MCHC, RDW y MCV fueron más pronunciados en el Animal N° 13501 (Grupo G) administrado 10 mg/kg una vez por semana en comparación con los otros animales que recibieron el programa de dosis de cebado/mantenimiento. Cambios en MCHC, RDW y MCV mostraron una tendencia continua de recuperación hacia o cerca de los niveles de estudio, lo que indica que estos cambios fueron reversibles. Es importante destacar que la hemoglobina plasmática libre no se observó en ningún animal. También se observaron cambios en la morfología de los eritrocitos (de acuerdo con los cambios en los parámetros hematológicos), e incluyeron anisocitosis, macrocitos, microcitos (no observados en la dosis de cebado/mantenimiento de 3/30 mg/kg), policromasia y esferocitos. En general, la incidencia y la gravedad de estos cambios no se produjeron de manera dependiente de la dosis, y en función de los puntos temporales evaluados, mostraron una tendencia a una recuperación parcial o completa al final del estudio. Los recuentos de linfocitos también aumentaron en las dosis de cebado/mantenimiento  $\geq 1/10$  mg/kg, que oscilaron entre 1,25 y 2,01 veces por encima de los valores de estudio y, en consonancia con otros parámetros, en general mostraron una tendencia de recuperación.

**Tabla 9. Cambios en los parámetros de hematología para animales administrados/administración de dosis de mantenimiento (grupos B - F)**

	N° animal cebado/mantenimiento)	(dosis de	Día estudio	de	RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	HGB (g/dL)	RETIC (10 <sup>9</sup> /L)
5	Grupo B						
	8501 (control)		Pre estudio		6,01	14,1	102,2
10			5		5,31	12,7	98,7
			12		5,55	13,1	169,0
			22		5,35	12,6	228,8
			43		5,54	13,0	181,5
15			64		5,65	13,5	155,1
	Grupo C						
	9502 (1/10 mg/kg)		Pre estudio		5,73	13,3	51,8
			5		4,08	9,8	337,7
20			12		3,18	8,4	438,2
			22		3,88	10,5	602,9
			43		5,05	12,3	92,6
			64		5,40	13,0	54,8
	Grupo D						
25	10501 (1 y 3/30 mg/kg)		Pre estudio		5,53	13,5	42,2
			5		3,91	9,9	239,0
			12		3,18	8,8	479,1
			22		4,11	11,5	395,5
30			42		4,39	11,7	317,4
			64		4,86	12,8	143,3
			68		5,03	13,2	158,9
			78		4,61	12,2	290,7
35			88		4,37	12,0	362,8
			106		4,62	12,1	336,5
	10502 (1/30 mg/kg)		Pre estudio		5,95	13,6	44,1
40			5		4,44	10,0	195,2
			12		4,09	9,3	246,3
			22		3,86	9,7	683,2
			42		5,12	11,9	169,8
			64		5,60	13,0	122,5
45	Grupo E						
	11501 (1/10 mg/kg)		Pre estudio		5,36	12,0	50,9
			5		3,80	8,5	171,9
			12		3,84	8,8	381,8
50			22		4,69	10,8	314,5
			42		5,17	11,2	115,3
			64		5,37	11,9	56,2
	11502 (1/10 mg/kg)		Pre estudio		5,85	14,2	94,4
55			5		4,42	10,8	234,0
			12		4,21	10,7	812,8
			22		4,77	11,8	497,6
			42		5,02	11,8	157,7
60			64		5,84	14,2	127,3

65

(Continuado)

N° animal (dosis de cebado/mantenimiento)	Día de estudio	RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	HGB (g/dL)	RETIC (10 <sup>9</sup> /L)
Grupo F				
12501 (3 y 3/30 mg/kg)	Pre estudio	5,54	13,0	61,9
	5	4,46	10,7	202,6
	12	4,32	10,8	330,0
	22	4,97	11,6	212,3
	42	4,72	11,5	151,5
	64	5,33	12,8	135,0
	68	5,75	13,5	112,0
	78	5,30	12,9	134,3
	88	5,03	12,3	164,1
	106	5,40	13,1	174,1
12502 (3/30 mg/kg)	Pre estudio	5,26	12,6	62,9
	5	4,09	10,0	181,3
	12	4,07	10,1	222,2
	22	4,53	11,1	275,7
	42	4,75	11,2	196,2
	64	5,04	12,6	115,0

**Tabla 10. Cambios en los parámetros hematológicos para el Animal N° 13501 (Grupo G) administrados 10 mg/kg Hu5F9- G4 una vez por semana**

Grupo/Animal N°	Día de estudio	RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	HGB (g/dL)	RETIC (10 <sup>9</sup> /L)
Grupo G/13501 A	Pre estudio			
	5	3,70	8,6	217,6
	12	2,73	6,5	196,3
	19	3,63	9,1	312,7
	22	4,19	10,3	230,1
	40	5,48	13,1	101,3
	50	5,37	12,8	82,1
	71	6,01	13,8	75,8

A Un descanso de vacaciones ocurrió el día 15

50 Grupos de dosis única (A y H): parámetros de química clínica

65 [0142] En los animales de dosis única (Grupos A y H), aumento de la bilirrubina total se observó a dosis  $\geq 1$  mg/kg, con los incrementos que ocurre en el Día 6 y osciló entre 1,56 a 3,29 veces por encima de los valores antes del estudio; los aumentos en la bilirrubina total no ocurrieron de manera dependiente de la dosis y mostraron una tendencia a la recuperación. Se notó un aumento en ALT y AST en un solo animal administrado 30 mg/kg (Animal 14501; Grupo H) en el día 6, pero estos aumentos mostraron una tendencia a la recuperación en el último punto de tiempo. La haptoglobina disminuyó a dosis  $\geq 0,1$  mg/kg, sin embargo, la haptoglobina estaba por debajo de los niveles de detección en 3 a 4 puntos de tiempo para todos los animales, incluido el estudio previo para dos animales tratados con Hu5F9-G4 y un animal control con PBS en el día 42, Por lo tanto, la disminución en la haptoglobina se consideró que tenían una relación incierta con la administración de dosis únicas de Hu5F9-G4 en este estudio.

Grupos de cebado/mantenimiento (B - F) y una vez semanal (Grupo G): parámetros de química clínica

65 [0143] De forma similar a los grupos de dosis única, la bilirrubina total aumentó en todos los grupos a los que se administró el programa de dosis de cebado/mantenimiento; Sin embargo, los niveles en la bilirrubina total se mantuvieron por debajo de 1 mg/dL a lo largo del estudio (Tabla 11). Los aumentos en la bilirrubina total mostraron

una tendencia a recuperarse al final del estudio. Los niveles de haptoglobina disminuyeron en todos los grupos, lo que mostró una tendencia a recuperarse al final del estudio (**Tabla 11**). Se produjeron cambios esporádicos en ALT, AST y LDH en un par de animales en algunos momentos durante el curso del estudio; sin embargo, estos cambios, estuvieron dentro de los límites normales (según la base de datos histórica del Centro de Pruebas), ocurrieron solo 1 o 2 días durante el período de estudio y fueron de naturaleza transitoria.

**Tabla 11. Cebado/mantenimiento (grupos B - F) y dosificación semanal (grupo G): parámetros de química clínica**

Grupo/Animal N° (dosis)	Día de estudio	Bili total (mg/dL)	HAPTO (g/L)
Grupo b			
8501 (control)	Pre estudio	0,23	0,48
	5	0,31	0,46
	12	0,23	0,92
	26	0,22	0,70
	40	0,21	0,66
	78	0,13	0,61
Grupo C			
9502 (1/10 mg/kg)	Pre estudio	0,17	0,30
	5	0,28	0,15
	12	0,72	0,15
	26	0,20	0,15
	57	0,18	0,34
Grupo D			
10501 (1 y 3/30 mg/kg)	Pre estudio	0,28	0,40
	5	0,25	0,15
	12	0,53	0,15
	26	0,35	0,15
	47	0,32	0,15
	68	0,21	0,15
	106	0,38	0,15
10502 (1/30 mg/kg)	Pre estudio	0,22	0,95
	5	0,22	0,94
	12	0,34	0,15
	26	0,21	0,15
	57	0,16	0,41
	5	0,22	0,94
Grupo E			
11501 (1/10 mg/kg)	Pre estudio	0,23	0,36
	5	0,28	0,34
	26	0,22	0,55
	40	0,17	0,69
	57	0,22	0,41
11502 (1/10 mg/kg)	Pre estudio	0,12	0,61
	5	0,18	0,15
	12	0,33	0,15
	26	0,20	0,44
	40	0,13	1,81
	57	0,12	0,60

	Grupo/Animal N° (dosis)	Día estudio	deBili (mg/dL)	total HAPTO (g/L)
5	Grupo F			
	12501 (3 y 3/30 mg/kg)	Pre estudio	0,39	0,35
		5	0,38	0,30
10		12	0,52	0,15
		26	0,27	0,15
		47	0,25	0,33
		68	0,25	0,15
15		106	0,34	0,15
	12502 (3/30 mg/kg)	Pre estudio	0,20	0,32
		5	0,39	0,31
20		12	0,54	0,34
		26	0,37	0,15
		40	0,29	0,34
	Grupo F			
25		57	0,25	0,15
	Grupo G			
	13501 (10 mg/kg una vez a la semana)	Pre estudio	0,15	0,90
30		5	0,56	0,15
		26	0,19	0,61
		40	0,12	0,73
		71	0,12	0,79

35

[0144] Los animales N<sup>os</sup> 10501 (Grupo D) y 12501 (Grupo F) se sacrificaron el día 120 y se sometieron a un examen completo de necropsia; también se realizaron pesajes de órganos y examen microscópico de tejidos. Si bien se observó un foco único y mínimo de degeneración de la materia blanca caracterizada por la degeneración axonal con fagocitos e infiltrados de células mononucleares dentro de la médula oblonga del Animal N° 10501, se desconoce si este hallazgo fue incidental o relacionado con Hu5F9-G4 debido a la naturaleza mínima del hallazgo y el pequeño número (2) de animales sometidos a examen microscópico. Es importante destacar que este hallazgo no se observó en el estudio de toxicología de 8 semanas del GLP pivotal, lo que indica que este hallazgo probablemente fue de naturaleza incidental.

45

[0145] La toxicocinética mostró que no se obtuvieron concentraciones medibles de Hu5F9-G4 para los grupos a los que se administró una dosis única de Hu5F9-G4 a dosis  $\leq 0,3$  mg/kg. La  $C_{max}$  y el  $AUC_{0-t}$  generalmente aumentaron a medida que aumentaba la dosis, y los aumentos en la  $C_{max}$  parecían ser mayores que la dosis proporcional para dosis  $\geq 1$  mg/kg. Los aumentos en el  $AUC_{0-t}$  tampoco fueron proporcionales con la dosis. La  $T_{1/2}$  para los niveles de dosis de 10 y 30 mg/kg fue de 10,7 a 46,5 horas, respectivamente, y sugiere que  $T_{1/2}$  puede aumentar con un aumento en la dosis.

50

[0146] Para los grupos administrados con dosis repetidas, después de una dosis de cebado de 1 o 3 mg/kg (en el día 1 o 68) y la administración repetida de 10 o 30 mg/kg, la  $C_{max}$  media aumentó del día 1 al día 8; este aumento en la  $C_{max}$  fue mayor que la dosis proporcional desde el día 1 hasta el día 8. Después de una dosis de cebado de 1 (día 1) o 3 (día 68) mg/kg y una dosis de mantenimiento de 30 mg/kg, la media de  $C_{max}$  aumentó de Día 1 a Día 8; este aumento en la  $C_{max}$  fue mayor que la dosis proporcional desde el Día 1 hasta el Día 8. La vida media varió de 10,8 a 173 horas. Algunos animales tenían concentraciones séricas de Hu5F9-G4 inferiores a las esperadas, lo que sugiere la presencia de ADA.

60

[0147] En resumen, la administración de Hu5F9-G4 como una dosis de cebado única de hasta 30 mg/kg o como una dosis de cebado/mantenimiento de hasta 3/30 mg/kg para hasta 2 esquemas de dosis de cebado/mantenimiento fue clínicamente tolerada adecuadamente en monos cynomolgus. Si bien una vez por semana la administración de Hu5F9-G4 a 10 mg/kg fue clínicamente bien tolerada, fue necesaria una dosis de vacaciones en el Día 15 debido a la baja masa de RBC; sin embargo, el nivel de hemoglobina mostró una tendencia de recuperación en el Día 19 y, por lo tanto, la dosis se reanudó para este animal. Los cambios relacionados con el tratamiento se limitaron a

65



alteraciones en la hematología (incluida la morfología de los eritrocitos) y los parámetros de química clínica. Las disminuciones en la masa de RBC fueron consistentes con estudios previos, y las disminuciones en el recuento de RBC y la hemoglobina probablemente se asocian con la acción farmacológica postulada de Hu5F9-G4 al unirse a CD47 en los RBC envejecidos y acelerar su eliminación. Se cree que esta depuración de los RBC envejecidos da como resultado la anemia inicial y la reticulocitosis compensadora observada en los puntos de tiempo iniciales para reemplazar los RBC envejecidos con los RBC más jóvenes. Todos los cambios relacionados con el tratamiento en los parámetros hematológicos y de química clínica mostraron tendencias para la recuperación parcial o completa al final del estudio, lo que indica que estos efectos de Hu5F9-G4 son reversibles. Es importante destacar que los datos demuestran que la anemia inducida por el programa de dosis de cebado/mantenimiento no es tan grave como con una dosis semanal, y se toleran mejor las dosis de cebado  $\leq 10$  mg/kg. Como tal, en los estudios posteriores se utilizó el programa de cebado/dosis, con una dosis de cebado  $\leq 10$  mg/kg.

#### Farmacocinética de Hu5F9-G4 después de la administración de infusión intravenosa a monos Cynomolgus

[0148] El propósito de este estudio fue evaluar la toxicidad potencial y la toxicocinética de Hu5F9-G4 al administrarse de una infusión IV de 1 hora como un programa de dosis de cebado/mantenimiento a niveles de dosis no evaluadas en estudios anteriores. En este estudio, se administró Hu5F9-G4 a monos cynomolgus machos como una dosis de cebado a 5 mg/kg en el día 1, seguido de dosis de mantenimiento dos veces por semana a 150 mg/kg en los días 8, 11, 15, 18, 22 y 25. El diseño del estudio se presenta en la **Tabla 12**.

**Tabla 12. Dosificación de cebado/mantenimiento de Hu5F9-G4 en monos Cynomolgus**

Grupo	Nº monos machos	Dosis de cebado Hu5F9-G4 (mg/kg)	Dosis de día de preparación de dosis	Dosis de mantenimiento Hu5F9-G4 (mg/kg)	Días de dosis Dosis de mantenimiento
1	2	5	1	150	8, 11, 15, 18, 22, 25

[0149] Los animales se evaluaron para cambios en los signos clínicos, peso corporal, hematología, coagulación, y los parámetros de química clínica (recogidos hasta el día 77); también se recolectaron muestras de sangre para evaluar la ocupación del receptor mediante citometría de flujo, sin embargo, los datos no se presentan en este IND. Se recogieron muestras a lo largo del estudio hasta el día 149 para la toxicocinética y la evaluación de las respuestas de ADA. Ambos animales fueron devueltos a la colonia de animales de la instalación de prueba al final del estudio.

[0150] Ambos animales sobrevivieron hasta el final programado del estudio, y no se observó evidencia de efectos relacionados con el tratamiento en los signos clínicos, el consumo de alimentos o el peso corporal. Se observaron hallazgos relacionados con el tratamiento en ambos animales e incluyeron cambios en los parámetros hematológicos y de química clínica. De acuerdo con estudios previos, se observó una leve anemia en ambos animales en el Día 5 (4 días después de la dosis de 5 mg/kg de cebado). Se observó una reducción significativa en el recuento de RBC en ambos animales a partir del Día 8 (Animal 1036) y el Día 11 (Animal 1037). En el día 18, se observó una tendencia para que los glóbulos rojos volvieran a los niveles normales en el Animal 1036; sin embargo, el Animal 1037 continuó mostrando reducciones significativas en el conteo de RBC (**Tabla 13**). La reducción en el recuento de glóbulos rojos coincidió con un aumento significativo de los reticulocitos para ambos animales (**Tabla 13**). Al igual que en el recuento de glóbulos rojos, se observó una tendencia para los reticulocitos que regresan a los niveles normales para el Animal 1036; sin embargo, los reticulocitos continuaron aumentando para el Animal 1037. Además, los niveles de hemoglobina se redujeron significativamente en el Animal 1037 (a partir del Día 15). Los niveles de hemoglobina para el Animal 1036 también disminuyeron, sin embargo, la disminución observada en este animal no fue tan significativa como el Animal 1037, y se mantuvo por encima de 10,0 g/dL durante el estudio, excepto en el Día 11, donde la hemoglobina cayó ligeramente por debajo de 10,0 g/dL (**Tabla 13**). No se observó hemoglobina plasmática libre en ninguno de los animales. La dosificación se detuvo el día 15 para Animal 1037 debido a la anemia grave. La dosis no se reanudó para que este animal evaluara si la anemia se recuperaría; por lo tanto, el Animal N° 1037 no se administró en los Días 18, 22 y 25. Dado que los niveles de hemoglobina para el Animal 1036 se mantuvieron por encima de 10,0 g/dL en la mayoría del estudio, la dosis continuó según lo previsto. A pesar de la anemia, no se observaron signos clínicos indicativos de toxicidad en ninguno de los animales. Además, no se observaron cambios importantes en otros parámetros de patología clínica, incluidos recuentos de glóbulos blancos, plaquetas o niveles de creatinina. Ambos animales fueron examinados por un veterinario del personal en el día 22 con especial atención a la palpación del bazo; La palpación del bazo no reveló anomalías en ninguno de los animales.

Tabla 13. Cambios en los parámetros de hematología

Animal N°	Día de estudio	RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	HGB (g/dL)	RETIC (10 <sup>9</sup> /L)
1036	Pre estudio	5,87	13,8	75,4
	5	4,24	10,4	234,6
	8	3,92 *	10,0	984,3
	11	3,75 *	9,8	847,7
	15	3,94 *	10,3	557,5
	18	4,3	10,8	542,1
	22	4,45	11,6	414,5
	25	4,51	11,5	329,4
	29	4,59	11,7	374,2
	48	5,07	12,9	236,1
1037	Pre estudio	6,47	14,3	51,4
	5	4,85	11,1	232
	8	4,13	10,0	937,1
	11	3,24 *	8,0	612,9
	15	2,23 *	5,5 *	670,3
	18	1,86 *	4,7 *	749,7
	22	1,95 *	5,1 *	1076
	25	2,02 *	5,7 *	1043
	29	2,32 *	6,6 *	1085
	48	4,71	11,9	1106
77	6,31	14,9	505,7	

\* Valor sustancialmente fuera del rango normal para este parámetro en el mono cynomolgus basado en la base de datos histórica del Centro de Pruebas

[0151] Los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina en Animal 1037 permanecieron significativamente reducidos y reticulocitos permanecieron significativamente elevados (en comparación con antes del estudio) hasta el día 29. Sin embargo, por el día 48, los RBC, hemoglobina y reticulocitos comenzaron a recuperarse, y por el día 77, estos parámetros volvieron a los niveles de estudio. Además, los cambios en estos parámetros hematológicos observados en el Animal 1036 comenzaron a recuperarse el Día 22 y volvieron a los niveles de estudio el Día 77. Por lo tanto, mientras que el Animal 1037 parecía ser más sensible a la anemia asociada con la administración de Hu5F9-G4, La finalización de la dosis (en el día 15) muestra que, con el tiempo, la anemia es reversible. Los cambios en la morfología de los eritrocitos también se observaron en ambos animales, y, de acuerdo con los estudios anteriores, incluyeron anisocitosis, microcitos, policromasia y esferocitos de mínimos a marcados.

[0152] La toxicocinética mostró que las concentraciones séricas de Hu5F9-G4 fueron similares entre los dos animales desde el Día 1 hasta las 4 horas posteriores a la dosis el Día 15 (el descanso de dosis para el Animal 1037 comenzó el Día 15). La  $T_{1/2}$  para ambos monos varió de 173 a 212 horas.

[0153] En resumen, los efectos relacionados con el tratamiento en este estudio fueron consistentes con los estudios previos e incluyeron cambios en los parámetros hematológicos y de química clínica. Todos estos cambios relacionados con el tratamiento, incluida la anemia grave observada en el Animal 1037, fueron reversibles y volvieron a los rangos normales al final del estudio. Además, a pesar de la anemia observada, no se observaron signos clínicos de toxicidad en ninguno de los animales.

#### Estudio de toxicidad de 8 semanas de Hu5F9-G4 por infusión intravenosa en monos Cynomolgus con un período de recuperación de 8 semanas

[0154] El propósito de este estudio GLP fue evaluar la toxicidad potencial y la toxicocinética de Hu5F9-G4 cuando se administra a los monos cynomolgus como una dosis de cebado seguida de dosis de mantenimiento de repetición. Debido a la anemia grave con la dosis de cebado/mantenimiento de 5/150 mg/kg observada en el Animal N° 1037 en el estudio anterior, la dosis de cebado y mantenimiento más alta utilizada en este estudio fue de 5/100 mg/kg para proporcionar un Margen de seguridad para las dosis propuestas en el estudio clínico. El vehículo o Hu5F9-G4 (5 mg/kg) se administró a través de una infusión intravenosa de 1 hora como una dosis de cebado a 5 mg/kg en el día 1, seguido de dosis de mantenimiento del vehículo o Hu5F9-G4 en dosis de 5, 10, 50, o 100 mg/kg administrados dos veces por semana durante 7 semanas consecutivas (días 8, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36, 39, 43, 46, 50 y 53). Se utilizó el mismo nivel de dosis (5 mg/kg) para las dosis de cebado y mantenimiento para el Grupo 5, Los animales de recuperación se incluyeron en el vehículo y los grupos de dosis altas para evaluar la reversibilidad de cualquier efecto relacionado con el tratamiento. El diseño del estudio se presenta en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Estudio de toxicología de 8 semanas en monos *Cynomolgus*

Grupo	Dosis <sup>A</sup> (mg/kg)		Nº Hombres/Mujeres	Nº Hombres/Mujeres
	Cebado	Mantenimiento		
1	0 (vehículo)	0 (vehículo)	3/3	2/2
2	5	10	3/3	-
3	5	50	3/3	2/2
4	5	100	3/3	2/2
5	5	5	2/2	

<sup>A</sup> La dosis de cebado se administró el día 1, y la dosis de mantenimiento se administró dos veces por semana los días 8, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36, 39, 43, 46, 50 y 53.

[0155] Los parámetros farmacológicos de seguridad se incorporaron en este estudio y se incluyeron la evaluación de la función respiratoria (frecuencia respiratoria visual, la función cardiovascular (ECG), y cambios en los signos clínicos (por ejemplo, actividad, comportamiento) indicativos de un efecto sobre la función del sistema nervioso central. Se recogieron muestras de sangre a lo largo del estudio para determinar la toxicidad y la evaluación de las respuestas de ADA, así como para evaluar la ocupación del receptor de CD47. A lo largo de la duración del estudio, se evaluaron muestras de patología clínica para evaluar parámetros específicos (p. ej., hemoglobina, RBC, reticulocitos) basados en datos de estudios anteriores. Se observó anemia grave en dos animales (Animal N° 3002; Grupo 3, dosis de cebado/mantenimiento 5/50 mg/kg; Animal N° 4504; Grupo 4, dosis de cebado/mantenimiento 5/100 mg/kg), y estos animales se colocaron en descansos de dosis para evaluar la recuperación de la anemia y cómo respondieron los animales una vez que se reanudó la dosificación. El Animal N° 3002 tenía vacaciones de dosis para dosis de mantenimiento 6 - 9 (días 25, 29, 32 y 36), y la dosis se reanudó el día 39 (dosis de mantenimiento 10). El Animal N° 4504 se colocó en descansos de dosis el día 25 (dosis 6) y continuó en descansos de dosis hasta el final del período de dosis. Los animales del estudio principal se terminaron en el día 57 y los animales de recuperación se terminaron el día 109. La parte en vida del estudio está completa, y todos los datos de los animales del estudio principal, incluida la histopatología, están disponibles. Los datos de los animales de recuperación se presentarán cuando estén disponibles.

[0156] Ninguna muerte no programada tuvo lugar en este estudio, y la administración de Hu5F9-G4 fue clínicamente bien tolerada. No se observaron efectos relacionados con el tratamiento en los signos clínicos, los pesos corporales, los exámenes físicos y oftalmológicos, la temperatura corporal, los ECG, la respiración o la frecuencia cardíaca, los parámetros de coagulación o análisis de orina, los pesos de los órganos o los exámenes macroscópicos y microscópicos.

[0157] De acuerdo con los estudios piloto anteriores, se observaron cambios relacionados con el tratamiento en todos los grupos tratados con Hu5F9-G4 en los parámetros hematológicos e incluyeron leve disminución de la masa de glóbulos rojos (incluyendo recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito), que eran más pronunciados después de la dosis de cebado en el día 1; estos cambios en los parámetros hematológicos mostraron una tendencia continua a recuperarse al final de la fase de dosificación (consulte la **Tabla 15** para conocer los cambios en los niveles de hemoglobina). Si bien se observó una disminución en el recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito en todos los grupos tratados con Hu5F9-G4, estos cambios no se produjeron de una manera clara dependiente de la dosis. Se observaron aumentos en los reticulocitos en todos los grupos tratados con Hu5F9-G4, lo que indica una respuesta eritropoyética robusta asociada con las disminuciones en la masa de RBC. De acuerdo con los estudios anteriores, la disminución de la masa de glóbulos rojos se asoció con disminuciones en el MCV y la haptoglobina, y aumentos en MCHC, reticulocitos y RDW. No se observó hemoglobina plasmática libre en ningún grupo de dosis. También se observaron aumentos mínimos a leves en los linfocitos, pero estos aumentos fueron transitorios y esporádicos por naturaleza y no se produjeron de una manera dependiente de la dosis. Se observó un aumento mínimo o leve en las plaquetas en el Día 8 (que fue estadísticamente significativo en comparación con el control para la mayoría de los grupos), pero comenzó a regresar a los valores de control en la mayoría de los grupos para el Día 11. Este aumento en las plaquetas se consideró una trombopoyesis reactiva y la respuesta fisiológica a la eritropoyesis acelerada, que fue evidente por aumentos concomitantes en los reticulocitos. Todos estos cambios relacionados con el tratamiento en los parámetros hematológicos fueron parcial o completamente reversibles al final de la fase de dosificación.

**Tabla 15. Cambios en los niveles de hemoglobina**

Animal N°	Día de estudio	HGB (g/dL)
Grupo 1 (control de vehículo)		
1001	Pre estudio	13,3
	3	12,3
	8	13,8
	11	12,0
	15	12,5
	25	12,5
	39	13,2
	57	12,4
1002	Pre estudio	13,8
	3	12,8
	8	13,6
	11	12,5
	15	12,9
	25	12,6
	39	13,1
	57	12,6
1003	Pre estudio	13,8
	3	13,1
	8	13,5
	11	12,7
	15	13,0
	25	13,4
	39	13,2
	57	13,0
1104	Pre estudio	14,6
	3	14,8
	8	14,9
	11	13,7
	15	13,8
	25	14,1
	39	13,8
	57	12,4
	74	13,8
	109	14,7

ES 2 728 066 T3

(Continuado)

Animal No.	Día de estudio	HGB (g/dL)
Grupo 1 (control de vehículo)		
1005	Pre estudio	14,8
	3	13,0
	8	13,9
	11	11,9
	15	12,4
	25	13,0
	39	13,1
	57	12,0
	74	12,6
	109	13,6
1501	Pre estudio	12,9
	3	11,7
	8	12,3
	11	11,4
	15	11,6
	25	11,9
	39	11,9
	57	11,5
1502	Pre estudio	13,0
	3	11,9
	8	12,5
	11	11,7
	15	11,8
	25	12,4
	39	12,2
1603	Pre estudio	13,7
	3	12,3
	8	12,7
	11	11,2
	15	12,4
	25	12,3
	39	11,5
	57	10,6

55

60

65

ES 2 728 066 T3

(Continuado)

Animal Nº	Día de estudio	HGB (g/dL)
Grupo 1 (control de vehículo)		
1504	Pre estudio	15,1
	3	13,5
	8	13,8
	11	13,0
	15	12,9
	25	12,6
	39	13,1
	57	12,7
	74	13,1
	109	13,8
1505	Pre estudio	13,6
	3	12,5
	8	13,3
	11	13,1
	15	12,6
	25	12,8
	39	12,9
	57	9,9
	74	12,6
	109	13,1
Grupo 2 (5/10 mg/kg)		
2001	Pre estudio	14,1
	3	12,6
	8	12,5
	11	11,4
	15	12,4
	25	12,6
	39	12,7
	57	12,0
2002	Pre estudio	15,9
	3	12,1
	8	11,8
	11	10,8
	15	11,6
	25	13,5
	39	13,8
	57	12,6

ES 2 728 066 T3

(Continuado)

Grupo 2 (5/10 mg/kg)			
5	2003	Pre estudio	14,1
		3	11,5
		8	11,2
		11	9,8
10		15	10,1
		25	11,9
		39	12,7
		57	11,6
15	2501	Pre estudio	13,7
		3	11,3
		8	10,7
		11	8,8
20		15	8,9
		25	11,4
		39	13,0
		57	11,7
25	2502	Pre estudio	13,0
		3	10,4
		8	10,2
		11	9,1
30		15	10,1
		25	10,5
		39	11,4
		57	9,9
35	2503	Pre estudio	14,3
		3	12,0
		8	12,1
		11	9,9
40		15	10,0
		25	11,5
		39	13,0
		57	12,1

45

50

55

60

65

ES 2 728 066 T3

(Continuado)

Grupo 3 (5/50 mg/kg)			
5	3001	Pre estudio	14,9
		3	12,8
		8	12,1
		11	11,2
10		15	11,7
		25	13,2
		39	14,1
		57	13,2
15	3003	Pre estudio	13,9
		3	10,8
		8	11,3
		11	10,1
20		15	10,0
		25	12,4
		39	13,4
		57	12,0
25	3104	Pre estudio	14,6
		3	13,0
		8	13,7
		11	12,3
30		15	11,8
		25	12,7
		39	13,4
		57	12,3
		74	13,0
35		109	13,8
40	3005	Pre estudio	14,6
		3	12,1
		8	13,0
		11	11,9
		15	12,1
		25	13,3
45		39	13,6
		57	12,5
		74	13,1
		109	12,5

50

55

60

65



(Continuado)

Grupo 3 (5/50 mg/kg)			
5	3601	Pre estudio	15,0
		3	11,4
		8	12,0
		11	10,2
10		15	10,9
		25	11,6
		39	11,8
		57	10,4
15		74	12,0
	109	14,1	
	3602	Pre estudio	13,2
		3	10,9
20		8	10,3
		11	8,7
		15	8,8
		25	11,2
25		39	12,2
		50	8,1
		57	7,0
		67	8,8
30		74	10,9
		109	13,4
	3503	Pre estudio	13,0
		3	10,4
35		8	10,1
		11	9,0
		15	8,5
		25	10,2
40		39	11,0
	57	10,1	
	3504	Pre estudio	12,8
		3	10,9
45		8	11,9
		11	10,5
		15	10,6
		25	10,7
50		39	10,8
	57	11,0	

55

60

65

ES 2 728 066 T3

(Continuado)

Grupo 3 (5/50 mg/kg)			
5	3505	Pre estudio	13,4
		3	11,0
		8	11,1
		11	10,2
10		15	10,8
		25	11,1
		39	12,0
		57	11,4
Grupo 4 (5/100 mg/kg)			
15	4001	Pre estudio	13,5
		3	10,5
		8	9,8
20		11	8,9
		15	9,3
		25	10,0
		39	12,1
		57	11,5
25	4102	Pre estudio	13,5
		3	10,7
		8	9,5
30		11	9,2
		15	10,0
		25	11,4
		39	11,3
		57	11,4
35	4103	Pre estudio	14,8
		3	11,3
		8	10,4
40		11	9,5
		15	10,2
		25	12,0
		39	13,5
45		57	12,4

50

55

60

65

ES 2 728 066 T3

(Continuado)

Grupo 4 (5/100 mg/kg)			
5	4004	Pre estudio	13,8
		3	10,9
		8	10,0
		11	9,1
10		15	9,8
		25	12,4
		39	12,8
		57	11,9
15		74	12,4
		109	12,5
	4005	Pre estudio	14,2
		3	11,6
		8	11,4
20		11	9,6
		15	8,8
		25	11,1
25		39	12,4
		57	11,1
		74	12,2
		109	12,7
	4501	Pre estudio	13,0
30		3	9,7
		8	10,4
		11	8,4
35		15	8,4
		25	8,8
		39	10,4
	57	10,4	
	4502	Pre estudio	13,5
40		3	11,7
		8	11,8
		11	9,7
45		15	11,0
		25	11,9
		39	12,9
	57	12,3	

50

55

60

65



(Continuado)

Grupo 5 (5/5 mg/kg)			
5  10  15	5501	Pre estudio	13,9
		3	10,7
		8	10,7
		11	9,8
		15	10,1
		25	11,7
		39	13,6
		57	12,0
20  25	5502	Pre estudio	14,0
		3	11,4
		8	10,9
		11	10,6
		15	10,9
		25	12,4
		39	12,9
		57	12,0

[0158] Mientras que la hemoglobina disminuyó en todos los animales tratados con Hu5F9-G4 después de la administración de la dosis de cebado en el Día 1, la disminución en la hemoglobina fue generalmente más pronunciada después de la administración de la primera dosis de mantenimiento en el Día 8 (ver niveles de hemoglobina de Día 11 en la **Tabla 16**). La magnitud de la disminución de la hemoglobina varió según los animales, y la incidencia de animales con un nivel de hemoglobina  $\leq 10,0$  g/dL en el día 11 fue del 67%, 30%, 90% y 50% para los Grupos 2 (2/10 mg./kg), 3 (5/50 mg/kg), 4 (5/100 mg/kg) y 5 (5/5 mg/kg), respectivamente. Si bien la anemia (en el día 11) no ocurrió de manera clara y dependiente de la dosis entre los grupos 2, 3 o 5, el grupo 4 tuvo el mayor número de animales que tenían un nivel de hemoglobina  $\leq 10,0$  g/dL. En general, se observó una tendencia continua en la recuperación de la hemoglobina en todos los animales, comenzando alrededor de los días 15 a 32 y continuando hasta el final del estudio. Sin embargo, se observó una excepción cerca del final del estudio, donde el Animal N° 3602 tuvo otra reducción sustancial de la hemoglobina después de la administración de la 11ª dosis de mantenimiento, día 46 (la hemoglobina disminuyó tan bajo como 7,0 g/dL en los días 55 y 57; **Tabla 16**). El nivel de hemoglobina para el Animal N° 3602, sin embargo, comenzó a recuperarse en el Día 60 (7 días después de la última dosis de mantenimiento), y volvió a los niveles de estudio (13,4 g/dL) al final del estudio en el Día 109. Debido a la anemia severa observada, dos animales (Animal N° 3002; Grupo 3, dosis de cebado/mantenimiento 5/50 mg/kg; Animal N° 4504; Grupo 4, dosis de cebado/mantenimiento 5/100 mg/kg) fueron colocados en el descanso de dosis para evaluar la recuperación de la anemia y cómo responden los animales una vez que se reanuda la dosificación. El Animal N° 3002 mostró anemia más grave (tan solo 5,7 g/dL en los días 15 y 18) y tuvo descansos vacíos para dosis de mantenimiento 6 - 9 (días 25, 29, 32 y 36); la dosificación se reanudó el día 39 (dosis de mantenimiento 10). El animal N° 4504 se colocó en el día de descanso de dosis el día 25 (dosis 6) y continuó el día de descanso de dosis hasta el final del período de dosis (consulte la **Tabla 16** para ver los cambios en los niveles de hemoglobina). Los cambios en el recuento de glóbulos rojos, la hemoglobina y los reticulocitos observados en el Animal N° 3002 comenzaron a recuperarse el Día 36 y continuaron recuperándose hasta el final del estudio el Día 57. Del mismo modo, los cambios hematológicos en el Animal N° 4504 comenzaron a recuperarse, y mostró una tendencia continua a la recuperación hasta el final del estudio (día 109; este animal estaba en el grupo de recuperación). Por lo tanto, aunque parece que un número bajo de animales puede ser especialmente sensible a la anemia producida por Hu5F9-G4, la anemia es transitoria y los niveles de hemoglobina se recuperan con el tiempo.

55

60

65

Tabla 16. Parámetros de hematología para animales colocados en dosis bajas

Grupo/Animal N°	Día de estudio	HGB (g/dL)
3/3002 A	Pre estudio	14,4
	3	10,8
	8	9,6
	11	6,9
	15	* 5,7
	18	* 5,7
	25	* 5,9
	36	12,2
	46	10,3
	57	11,0
4/4504 B	Pre estudio	13,7
	3	11,2
	8	11,7
	11	9,6
	15	7,3
	18	* 6,9
	25	7,1
	36	7,2
	46	8,4
	57	11,0
	74	12,9
	109	13,0

<sup>A</sup> Se colocó un Animal N° 3002 en descansos de dosis el Día 25 y se reanudó la dosificación el Día 39; animal principal del estudio y finalizado en el día 57

<sup>B</sup> El animal 4504 se colocó en descansos de dosis el día 25 y se mantuvo en la dosis de descansos hasta el final del estudio; animal de recuperación y finalizado el día 109,

\* Significativamente por debajo del rango normal para monos cynomolgus basado en la base de datos histórica de la Instalación de Pruebas

[0159] Los cambios en la morfología de las células sanguíneas fueron consistentes con estudios previos y se consideraron asociados con la destrucción/eliminación acelerada de los glóbulos rojos y el aumento de la eritropoyesis. Estos cambios variaron de mínimos a marcados en la naturaleza e incluyeron anisocitosis, esferocitos (microcitos), policromasia, así como también excentrocitos y fragmentos de eritrocitos atípicos compatibles con lesiones/depuración de eritrocitos. La variabilidad en el rango de tamaño de los glóbulos rojos se debió a la mezcla de esferocitos más pequeños y policromatófilos más grandes (reticulocitos). También se observó un aumento transitorio en el número de eritrocitos nucleados en la circulación de varios animales tratados con Hu5F9-G4. Los cambios en la morfología de los glóbulos rojos mostraron tendencias continuas de recuperación hasta el final del estudio. Los cambios en las evaluaciones de frotis de médula ósea fueron mínimos a moderados y se limitaron a cambios morfológicos en el linaje eritroide (displasia), que consistían en células ocasionales con formas nucleares anormales, núcleos múltiples, ampollas nucleares y/o asincronía de maduración nuclear a citoplasma (núcleo anormal a la maduración del citoplasma). Se consideró que los cambios adicionales estaban relacionados con la respuesta eritropoyética acelerada asociada con Hu5F9-G4, que incluía leves disminuciones en la relación M:E media en los animales del Grupo 3 y Grupo 4 (solo hembras) junto con un cambio apropiado de mínimo a leve a precursores eritroides más inmaduros asociados a eritropoyesis acelerada.

[0160] De acuerdo con estudios anteriores, cambios relacionados con el tratamiento en los parámetros hematológicos (es decir, disminución de RBC y la hemoglobina, aumento de reticulocitos) se asociaron con aumento de la bilirrubina total y disminuciones en la haptoglobina. Otros cambios en los parámetros de química clínica se observaron solo en el grupo de dosis alta (5/100 mg/kg) e incluyeron una ligera disminución de la albúmina (dos animales hembras), un ligero aumento de globulina y una disminución correspondiente de la albúmina: relación globulina. Todos los cambios relacionados con el tratamiento en los parámetros de química clínica fueron parcial o completamente reversibles al final de la fase de dosificación.

[0161] La toxicocinética de Día 8 mostraron que después de una dosis de cebado de 5 mg/kg el día 1, y una dosis inicial de mantenimiento a los 5, 10, 50 o 100 mg/kg el día 8, los incrementos en  $C_{max}$  eran proporcionales a la dosis a partir de 10 a 100 mg/kg, pero mayor que la dosis proporcional de 5 a 100 mg/kg. Mientras que los aumentos en el  $AUC_{0-72}$  tendieron hacia una dosis proporcional entre 50 y 100 mg/kg, los cambios en el  $AUC_{0-72}$  fueron mayores que la dosis proporcional de 5 a 100 o de 10 a 100 mg/kg. La media de  $T_{1/2}$  pareció aumentar al aumentar la dosis y varió de 6 horas a 5 mg/kg a 52 horas a 100 mg/kg. No hubo diferencias obvias de género en la exposición. La

toxicocinética del día 25 mostró que después de una dosis dos veces por semana a 5, 10, 50 o 100 mg/kg durante 3 semanas, los aumentos en la exposición ( $C_{max}$ ,  $AUC_{0-72}$ ) fueron mayores que la dosis proporcional de 5 a 100 mg/kg pero la dosis proporcional de 10 a 100 mg/kg. Además, la exposición tuvo una tendencia menor en las hembras en comparación con los monos machos. La  $T_{1/2}$  aparente fue más corta a 5 mg/kg en relación con las dosis más altas. En algunos animales,  $T_{1/2}$  fue similar entre el Día 25 y el Día 8, y en otros animales,  $T_{1/2}$  pareció ser más largo en el Día 25; la media  $T_{1/2}$  varió de 6,3 horas (5 mg/kg) a 66 horas (50 mg/kg). La toxicocinética del día 53 después de dosificación semanal a 5, 10, 50 o 100 mg/kg durante 7 semanas, mostró aumentos en la exposición ( $C_{max}$ ,  $AUC_{0-72}$ ) fue mayor que la dosis proporcional de 5 a 100 mg/kg, pero proporcional a la dosis de 10 a 100 mg/kg.

**[0162]** La concentración vs. perfiles de tiempo en el día 53 con relación al día 25 o el día 8 sugirió que las concentraciones circulantes de Hu5F9-G4 continuaron aumentando con la administración repetida. Con la excepción de la dosis de 5 mg/kg (que parece haber sido afectada por ADA), la exposición media y mediana ( $C_{max}$ ,  $AUC_{0-72}$ ) en el Día 53, dentro de cada grupo de dosis, fue generalmente más alta que la del día 25 o el día 8, lo que sugiere una mayor acumulación de Hu5F9-G4 con dosificación semanal continuada. Si bien el desarrollo de ADA parece tener un impacto en la exposición, este impacto se observó principalmente en la dosis de mantenimiento de 5 mg/kg, y en general, la exposición se mantuvo a lo largo del estudio en dosis de dosis de mantenimiento de  $\geq 10$  mg/kg.

**[0163]** En resumen, los hallazgos relacionados con el tratamiento fueron consistentes con los estudios previos e incluyeron cambios en los parámetros hematológicos y de química clínica y citología de la médula ósea. Los cambios en los parámetros hematológicos incluyeron disminuciones en el recuento de glóbulos rojos y la hemoglobina combinada con reticulocitosis. Es importante destacar que la hemoglobina plasmática libre no se detectó en ningún animal durante todo el estudio. Si bien la anemia relacionada con Hu5F9-G4 no ocurrió de manera clara y dependiente de la dosis entre los Grupos 2, 3 o 5, el número de animales con un nivel de hemoglobina  $\leq 10,0$  g/dL fue mayor en el Grupo 5, que se administró la dosis de mantenimiento más alta (100 mg/kg). Si bien los niveles de hemoglobina en general mostraron una tendencia en la recuperación en todos los animales a partir de los días 15 a 32 y continuaron hasta el final del estudio, se observó una disminución sustancial de la hemoglobina en un animal (Grupo 3) cerca del final del estudio siguiente. La administración de la 11<sup>a</sup> dosis de mantenimiento en el día 46, la hemoglobina para este animal, sin embargo, volvió a niveles de pre-estudio por el final del estudio (día 109). Dos animales (uno en cada uno de los Grupos 3 y 4) se colocaron en vacaciones de dosis debido a la severa anemia observada en cada animal. Es importante destacar que, a pesar de la severa anemia observada en estos animales, no se observaron signos clínicos de toxicidad y el nivel de hemoglobina en cada animal mostró una tendencia continua a la recuperación hasta el final del estudio. Los cambios en la morfología de los glóbulos rojos fueron consistentes con la destrucción/eliminación acelerada de los glóbulos rojos y el aumento de la eritropoyesis y consistieron en fragmentos de eritrocitos atípicos, anisocitosis, esferocitos (microcitos) y policromasia. Los cambios en los parámetros hematológicos se asociaron con un aumento de la bilirrubina total y una disminución de la haptoglobina. Otros cambios relacionados con el tratamiento en los parámetros de química clínica se observaron solo en el grupo de dosis alta e incluyeron una ligera disminución de la albúmina, un ligero aumento de la globulina y la correspondiente proporción de albúmina: globulina (A:G). Todos estos cambios relacionados con el tratamiento fueron parcial o completamente reversibles en todos los grupos tratados con Hu5F9-G4 al final del estudio. Los cambios en la citología de la médula ósea se limitaron a cambios morfológicos en el linaje eritroide que consisten en células ocasionales con formas nucleares anormales, núcleos múltiples, ampollas nucleares y/o asincronía de maduración nuclear a citoplasma.

**[0164]** En general, la administración de Hu5F9-G4 a través de una infusión IV de 1 hora como una dosis de cebado de 5 mg/kg en la semana 1 (Día 1), seguido de dos veces la dosis de mantenimiento semanal durante 7 semanas consecutivas en dosis de hasta 100 mg/kg fue clínicamente bien tolerada en monos cynomolgus. A pesar de la anemia relacionada con el tratamiento, incluidos los animales con descansos de dosis, no se observaron signos de toxicidad clínica. Los cambios observados en este estudio fueron consistentes con estudios previos, y se consideraron relacionados con la acción farmacológica de Hu5F9-G4 para acelerar el proceso de eliminación de RBC de envejecimiento a través de la unión a CD47 expresada en RBC. Por lo tanto, según la totalidad de los datos, se consideró que la dosis más alta y no tóxica (HTNSTD) para este estudio era la dosis de cebado/mantenimiento de 5/100 mg/kg, la dosis más alta evaluada.

### Genotoxicidad

**[0165]** La gama y el tipo de estudios de genotoxicidad realizados rutinariamente para pequeños productos de drogas de moléculas generalmente no son aplicables a los productos derivados de la biotecnología [ICH S6(R1)]. No se espera que un anticuerpo monoclonal, como el Hu5F9-G4, interactúe directamente con el ADN u otro material cromosómico. Por lo tanto, los estudios de mutagenicidad se consideran inapropiados y no están planificados.

### Carcinogenicidad

**[0166]** No se han realizado estudios de carcinogenicidad con Hu5F9-G4. En base al mecanismo de acción de Hu5F9-G4, no se espera que sea carcinogénico. Además, Hu5F9-G4 no es un factor de crecimiento ni un inmunosupresor. Por lo tanto, dada la población de pacientes prevista y la falta de preocupación mecánica, no se han planificado estudios de carcinogenicidad.

### Toxicidad reproductiva y del desarrollo

5 [0167] Los estudios de toxicidad reproductiva y del desarrollo no se han realizado con Hu5F9-G4, Si bien no se  
realizará un estudio de fertilidad formal e independiente; no se observaron efectos relacionados con el tratamiento  
en el examen microscópico de los órganos reproductores masculinos y femeninos en el estudio de toxicidad de 8  
semanas. Dado que se desconocen los posibles efectos teratogénicos de Hu5F9-G4, si los hubiera, en animales de  
laboratorio, no se debe administrar Hu5F9-G4 a mujeres embarazadas. Para evitar el embarazo, se tomarán las  
10 precauciones adecuadas para los pacientes masculinos y femeninos en edad fértil inscritos en el estudio clínico de  
Fase 1 propuesto (por ejemplo, las mujeres deben demostrar una prueba de embarazo negativa, los pacientes  
deben consentir en tomar las precauciones anticonceptivas adecuadas, etc.)

### Tolerancia local

15 [0168] No se han realizado estudios de tolerancia local independientes; sin embargo, de acuerdo con ICH S6(R1), la  
evaluación de la tolerancia local de Hu5F9-G4 (observaciones clínicas, examen macro y microscópico de muestras  
de tejido del sitio de inyección) se realizó como parte de los estudios de toxicidad a dosis repetidas.

### Discusiones y conclusiones

20 [0169] Una amplia serie de estudios toxicológicos se llevó a cabo en apoyo de la administración de Hu5F9-G4 en el  
ensayo clínico propuesto. Estos estudios incluyeron un estudio de hemólisis in vitro, estudios de dosis únicas y  
múltiples en monos rhesus y cynomolgus, y un estudio de reactividad cruzada de tejidos en un panel de tejidos  
humanos.

25 [0170] El hallazgo importante y consistente relacionado con el tratamiento en todos los estudios con monos fue la  
anemia (como se refleja en la disminución del recuento de glóbulos rojos y hemoglobina). La anemia generalmente  
se desarrolló después de la administración de la primera dosis (o la dosis de cebado en los estudios de programa de  
dosis de cebado/mantenimiento), y se asoció con cambios indicativos del aclaramiento acelerado de los eritrocitos y  
eritropoyesis sensible, incluida la reticulocitosis y alteraciones en las morfologías de RBC tales como anisocitosis,  
30 policromasia y esferocitosis. Es importante destacar que la hemoglobina plasmática libre no se observó en todos los  
estudios. Los cambios en los parámetros hematológicos asociados con Hu5F9-G4 se asociaron generalmente con  
cambios en la haptoglobina y la bilirrubina total; la haptoglobina a menudo, pero no siempre se redujo, y  
generalmente se observaron aumentos en la bilirrubina total; sin embargo, los cambios en la haptoglobina y en la  
35 bilirrubina total no ocurrieron de manera dependiente de la dosis. En todos los estudios, los cambios en los  
parámetros hematológicos y de química clínica asociados con Hu5F9-G4 mostraron tendencias de recuperación  
durante el estudio y fueron parcial o completamente reversibles al final del estudio. Los cambios en la citología de la  
médula ósea (realizados en el estudio GLP de 8 semanas; PR013) se consideraron asociados con eritropoyesis  
acelerada e incluyeron cambios morfológicos en el linaje eritroide, disminuyeron en la relación M:E media, y un  
40 cambio apropiado a precursores eritroides más inmaduros asociados a eritropoyesis acelerada.

[0171] Según el papel conocido de CD47 en el aclaramiento normal de los glóbulos rojos envejecidos y los datos  
combinados obtenidos en los estudios con monos, los cambios primarios relacionados con el tratamiento (es decir,  
la anemia) se consideran relacionados con la acción farmacológica de Enlace Hu5F9-G4 a CD47 expresado en  
45 RBC. Creemos que la administración de Hu5F9-G4 acelera el proceso de eliminación de los RBC envejecidos al  
sustituir la pérdida gradual de CD47 con el bloqueo inmediato de CD47 en los RBC que envejecen. La pérdida  
prematura del envejecimiento de los glóbulos rojos se compensa con la consiguiente reticulocitosis (que se observó  
en todos los estudios) y, con el tiempo, la anemia inicial se resuelve a medida que los glóbulos rojos envejecidos se  
reemplazan con células más jóvenes y, como resultado, la distribución por edades de los glóbulos rojos. La reserva  
50 se desplaza a las células más jóvenes.

[0172] A pesar de la anemia relacionada con la administración de Hu5F9-G4, no se observó evidencia de toxicidad  
en los signos clínicos en cualquier animal, y por lo tanto, Hu5F9-G4 fue clínicamente bien tolerado, incluso en dosis  
tan altas como 300 mg/kg. Si bien la administración de Hu5F9-G4 dio lugar a una anemia transitoria, no se  
55 observaron signos clínicos de toxicidad y el Hu5F9-G4 fue clínicamente bien tolerado por los monos, incluso en  
dosis tan altas como 300 mg/kg. Los estudios de toxicología, sin embargo, revelaron que un pequeño número de  
animales son particularmente sensibles a la anemia asociada a Hu5F9-G4, Si bien en este momento se desconoce  
por qué estos monos son más sensibles a la anemia producida por Hu5F9-G4, la anemia es transitoria y mostró una  
tendencia constante a recuperarse al finalizar la dosis. Dado que ciertos pacientes pueden ser más sensibles que  
60 otros, los cambios en hematología se monitorearán rigurosamente en el estudio clínico propuesto, y se tomarán las  
medidas adecuadas para cualquier paciente que desarrolle anemia por debajo de los niveles preespecificados.

[0173] La anemia relacionada con Hu5F9-G4 fue parcial o completamente reversible a través de todos los estudios  
con monos, y resuelto para los animales que fueron colocados en descansos de dosis, incluyendo aquellos animales  
donde se había reanudado la dosificación. El HNSTD para el estudio de toxicología de 8 semanas fue la dosis de  
65 cebado/mantenimiento de 5/100 mg/kg (la dosis más alta probada). Según los datos de toxicocinética, se pronostica



que la dosis de 5 mg/kg de cebado utilizada en el estudio de toxicología de 8 semanas proporcionará un margen de seguridad (basado en el AUC) que oscila entre 28 y 194 veces por encima de la dosis de cebado inicial propuesta de 0,1 mg/kg en el ensayo clínico previsto. La dosis de mantenimiento dos veces por semana de 100 mg/kg proporciona un margen de seguridad previsto (basado en el AUC) que varía de 766 a 803 veces por encima de la dosis de mantenimiento inicial de 0,1 mg/kg planificada para el estudio clínico propuesto.

[0174] En resumen, sobre la base de los resultados de los estudios de toxicología, el programa de evaluación de la seguridad no clínica compatible con la administración de Hu5F9-G4 (por ejemplo, como una infusión IV) para el ensayo clínico propuesto.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0175]

<110> Willingham, Stephen Howard, Maureen Liu, Jie Prohaska, Susie Volkmer, Anne K Volkmer, Jens Peter Weissman, Irving L

<120> Métodos para lograr dosis terapéuticamente efectivas de agentes anti-CD47

<130> STAN-1010WO

<150> US 61/800.102

<151> 2013-03-15

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn  
1 5 10 15

Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn  
20 25 30

Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr  
35 40 45

Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser  
50 55 60

Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys  
85 90 95

Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys  
100 105 110

Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn  
115 120

ES 2 728 066 T3

<210> 2  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de polipéptido sintética

<400> 2

10

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly  
 1 5 10 15

15

Ser Ala

<210> 3  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 3

25

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly  
 1 5 10 15

30

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe  
 20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala  
 35 40 45

35

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp  
 50 55 60

40

Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp  
 65 70 75 80

Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala  
 85 90 95

45

Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr  
 100 105 110

50

Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu  
 115 120 125

Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn  
 130 135 140

55

<210> 4  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

60

<400> 4

65

ES 2 728 066 T3

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

30 <210> 5  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Macaca mulatta  
 35 <400> 5

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

## REVINDICACIONES

1. Un agente anti-CD47 que puede conducir a una pérdida de eritrocitos y anemia cuando se administra a una dosis terapéutica, para uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo el método:

- (a) administrar como agente de imprimación el agente anti-CD47 al sujeto en una dosis sub-terapéutica que prepare al sujeto para la administración de una dosis terapéuticamente eficaz del agente anti-CD47, en donde la dosis sub-terapéutica reduce significativamente la toxicidad debida a la pérdida de eritrocitos; y  
(b) administrar una dosis terapéuticamente eficaz del agente anti-CD47 al sujeto,

en donde el agente anti-CD47 reduce la unión de CD47 a SIRP $\alpha$  y se selecciona de: un anticuerpo anti-CD47, un polipéptido SIRP $\alpha$  soluble fusionado a una región Fc de inmunoglobulina y un polipéptido SIRP $\alpha$  de alta afinidad fusionado a una región Fc de inmunoglobulina; en el que el polipéptido SIRP $\alpha$  de alta afinidad es soluble, carece del dominio transmembrana de SIRP $\alpha$  y comprende al menos un cambio de aminoácido con respecto a la secuencia de SIRP $\alpha$  de tipo salvaje, en el que el cambio de aminoácido aumenta la afinidad de la unión del polipéptido SIRP $\alpha$  a CD47; en donde la etapa (b) se realiza en un rango de 3 días a 21 días después de comenzar la etapa (a).

2. El agente anti-CD47 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (b) se realiza en un intervalo de 6 días a 8 días después de comenzar la etapa (a).

3. El agente anti-CD47 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el método comprende además después de la etapa (a) y antes de la etapa (b): una etapa para determinar si la administración del agente de imprimación fue efectiva, cuya etapa opcionalmente comprende realizar un recuento de reticulocitos.

4. El agente anti-CD47 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la etapa (b) comprende administrar el agente anti-CD47 en dos o más dosis de concentración creciente hasta que se administra una dosis terapéuticamente eficaz.

5. El agente anti-CD47 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la etapa (b) comprende administrar dos o más dosis terapéuticamente eficaces.

6. El agente anti-CD47 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el sujeto es un ser humano.

7. El agente anti-CD47 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el agente anti-CD47 es un anticuerpo anti-CD47.

8. El agente anti-CD47 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el agente anti-CD47 es un polipéptido SIRP $\alpha$  soluble fusionado a una región Fc de inmunoglobulina o un polipéptido SIRP $\alpha$  de alta afinidad fusionado a una región Fc de inmunoglobulina.

9. El agente anti-CD47 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el uso del agente anti-CD47 incluye el uso en combinación con otro agente terapéutico.

10. El agente CD-CD para la reivindicación 9, en el que el agente terapéutico es otro agente cancerígeno.

11. Un kit que comprende un agente anti-CD47 de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en un método como se establece en cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

FIGURA 1

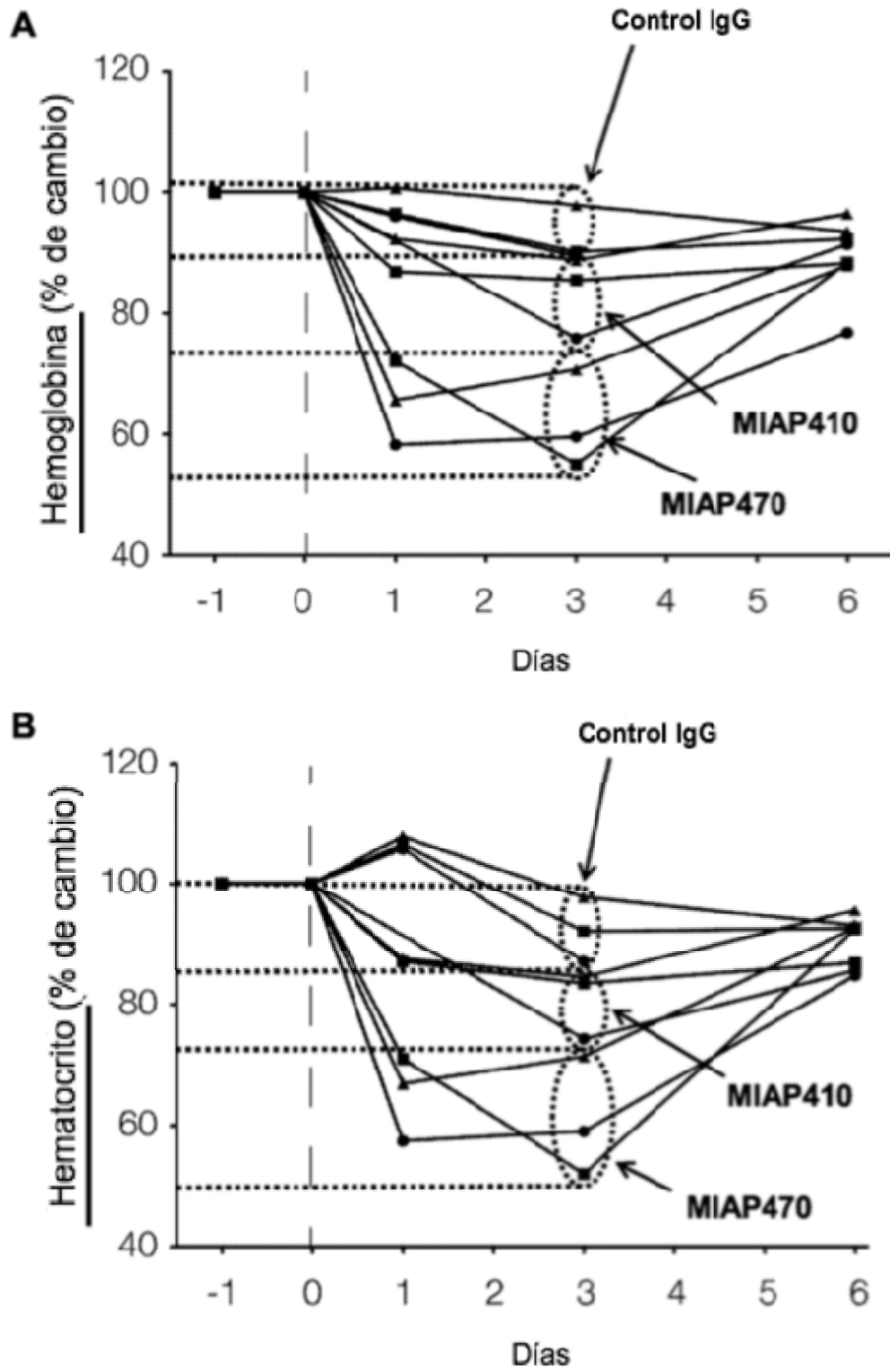


FIGURA 2

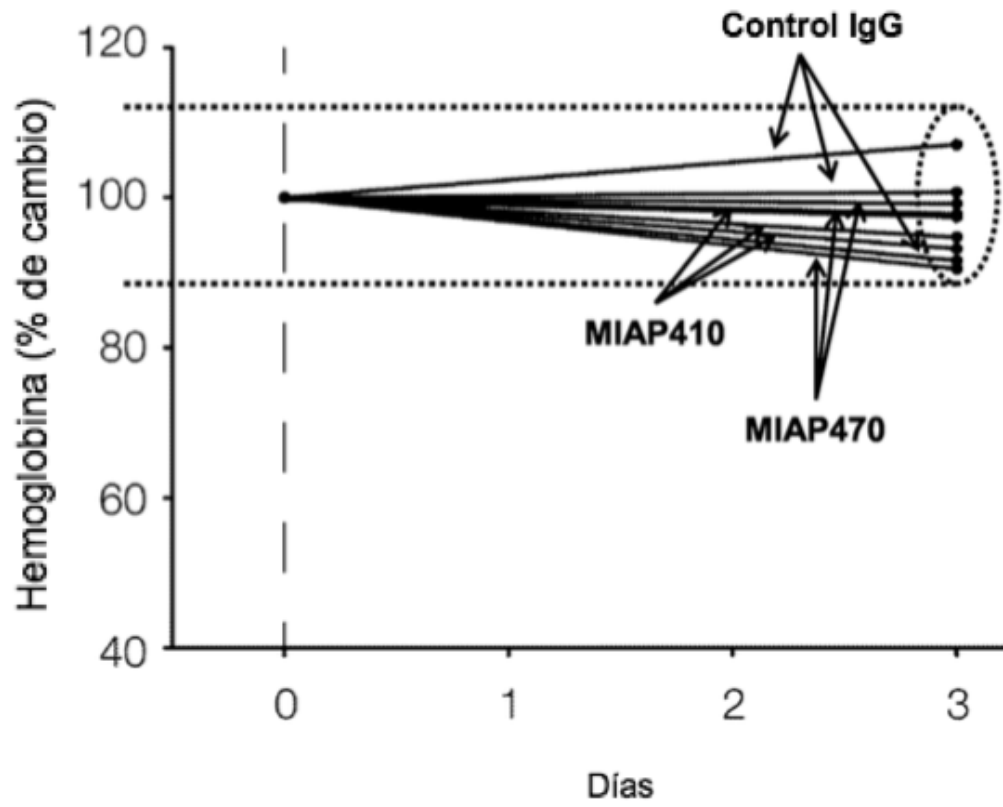


FIGURA 3

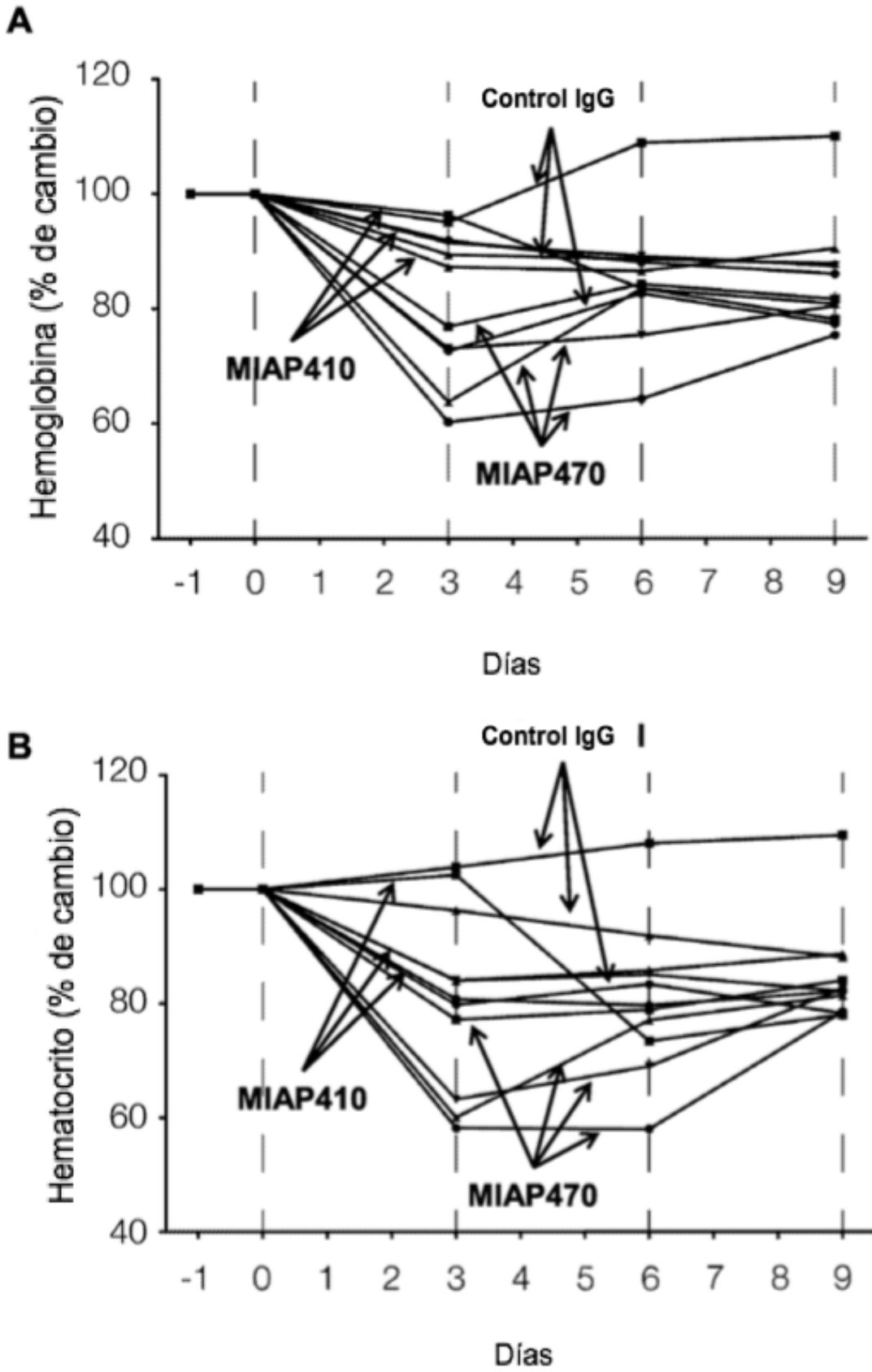
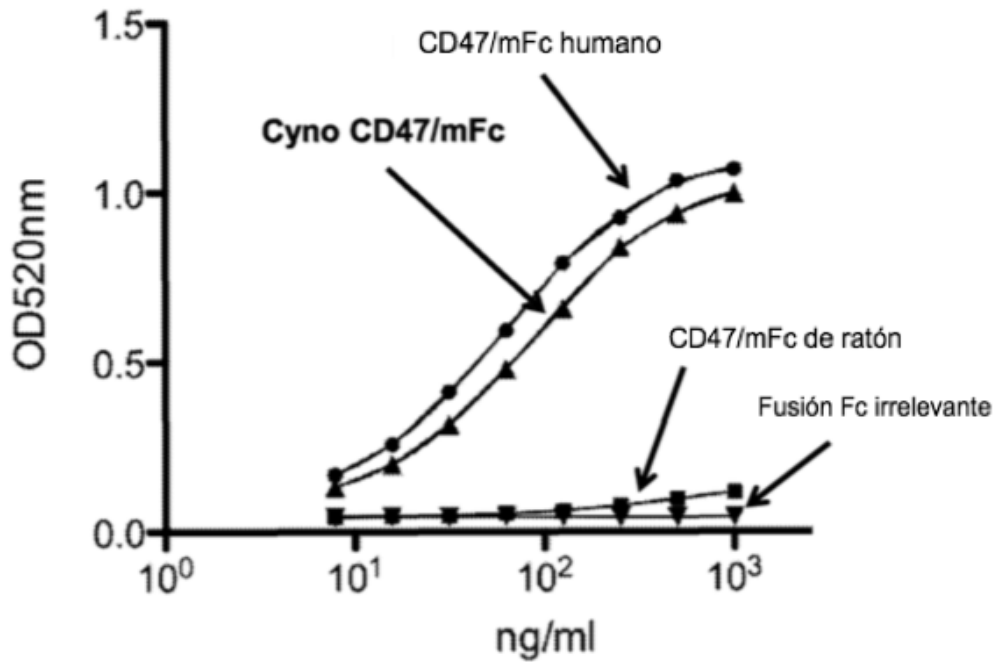


FIGURA 4

Humano	CD47ECD	10	20	30	40	50	60
		QLLFNKTKSVEFFTCNCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKKWKFGRDIYTFDGLNKSSTVP					
		::					
Cyno	CD47ECD	10	20	30	40	50	60
		QLLFNKTKSVEFFTCNCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKKWKFGRDIYTFDGLNKSSTAP					
Humano	CD47ECD	70	80	90	100	110	120
		TDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEELKYRVVSWFS					
		.....					
Cyno	CD47ECD	70	80	90	100	110	120
		ANFSSAKIEVSQLLKGDASLKMMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEELKYRVVSWFS					
Humano	CD47ECD						
		PNEN					
		::::					
Cyno	CD47ECD						
		PNEN					



**FIGURA 5**



**FIGURA 6**

<b>A</b>	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	KD (pM)
Ensayo 1	5.13E5	7.34E-6	14.3
Ensayo 2	4.94E5	1.00E-6	2.02
Media	5.0(1)E5	4(4)E-6	8(8)

<b>B</b>	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	KD (pM)
Ensayo 1	2.27E5	2.75E-6	12.1
Ensayo 2	2.76E5	2.00E-6	7.239
Media	2.5(3)E5	2.4(5)E-6	10(3)

FIGURA 7

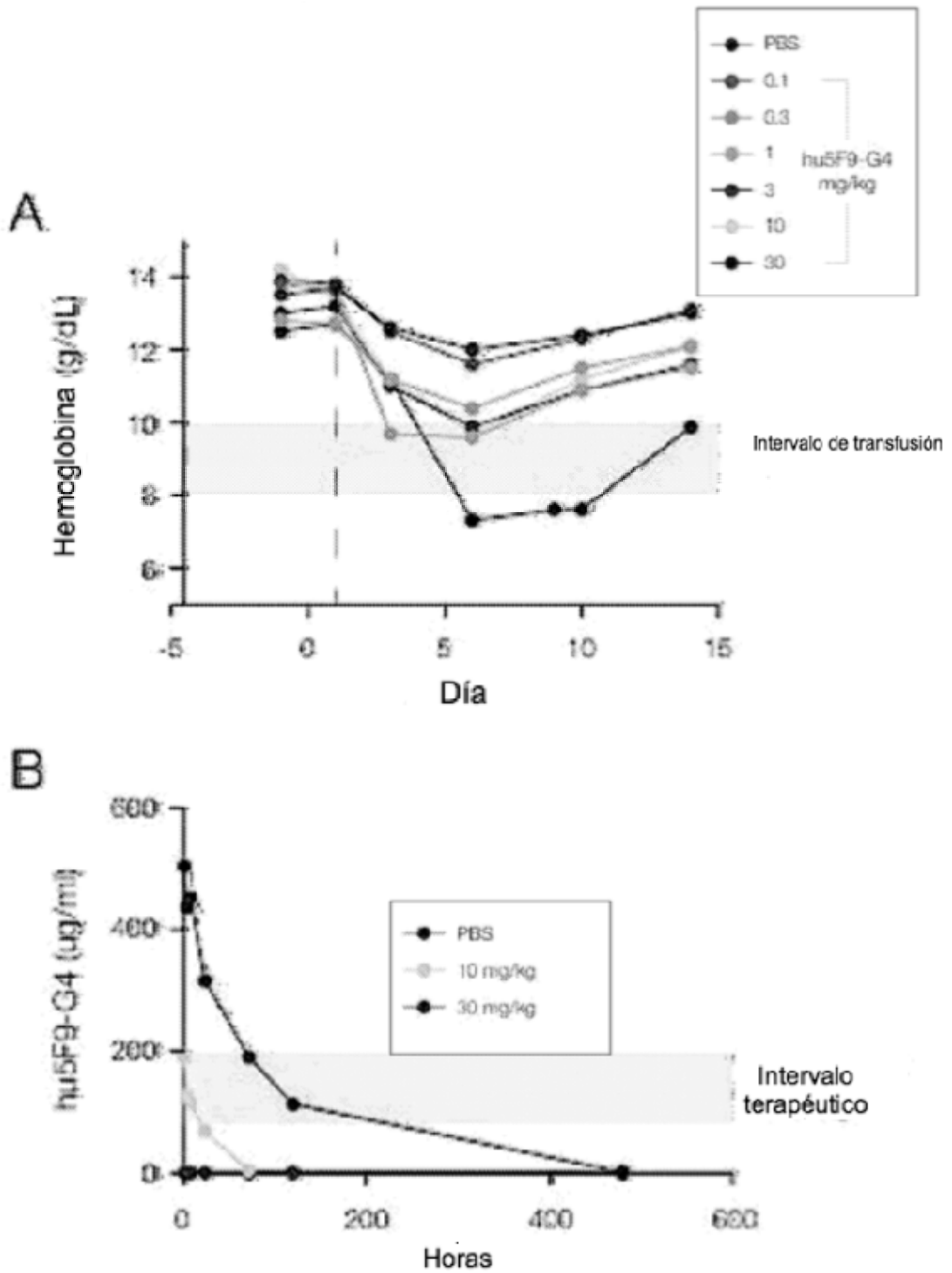
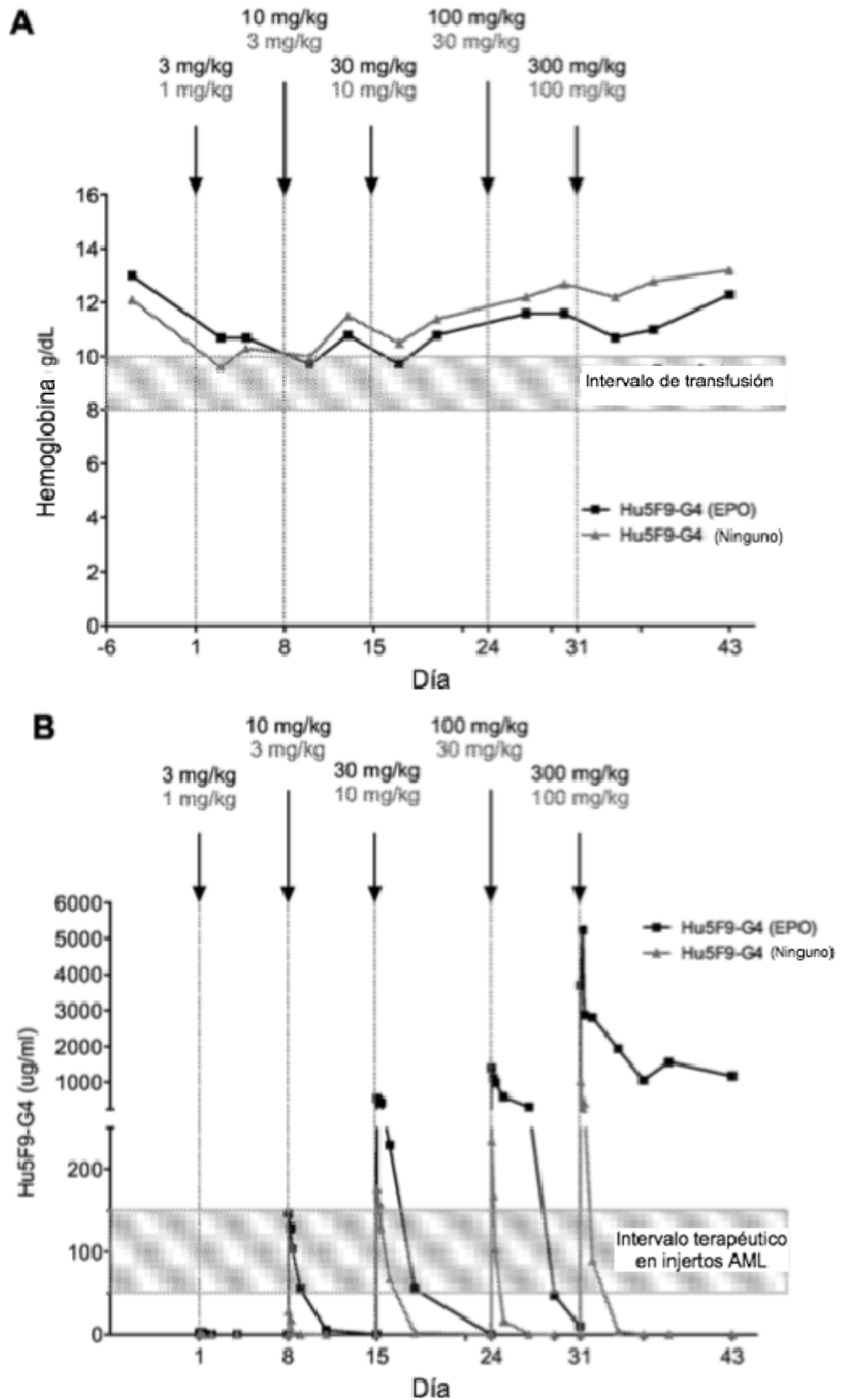


FIGURA 8



**FIGURA 9**

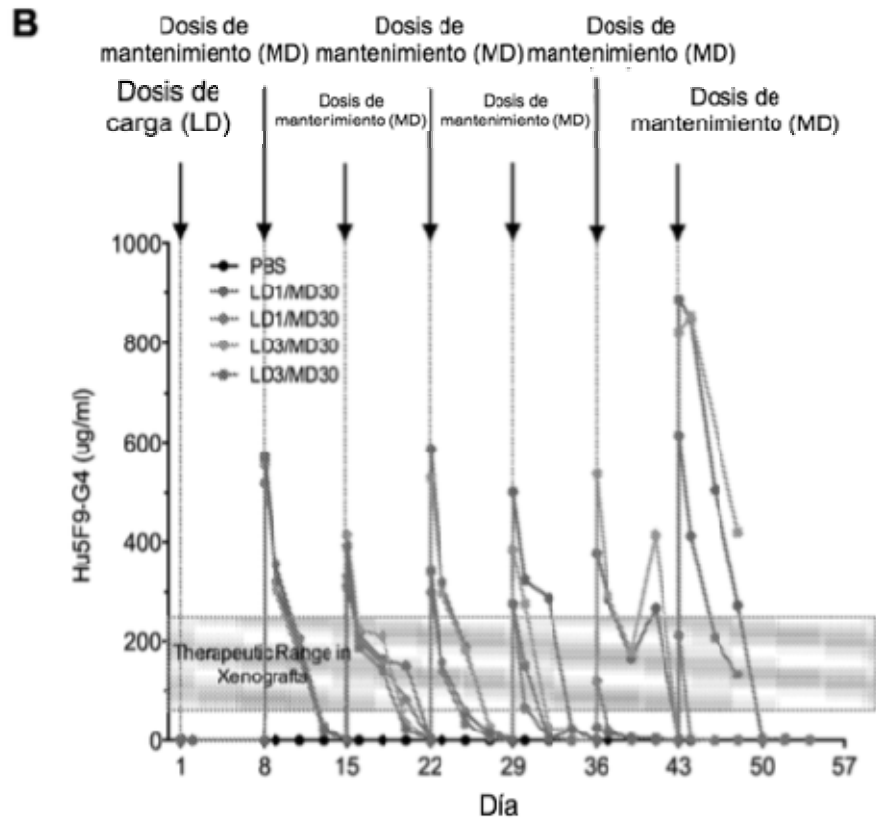
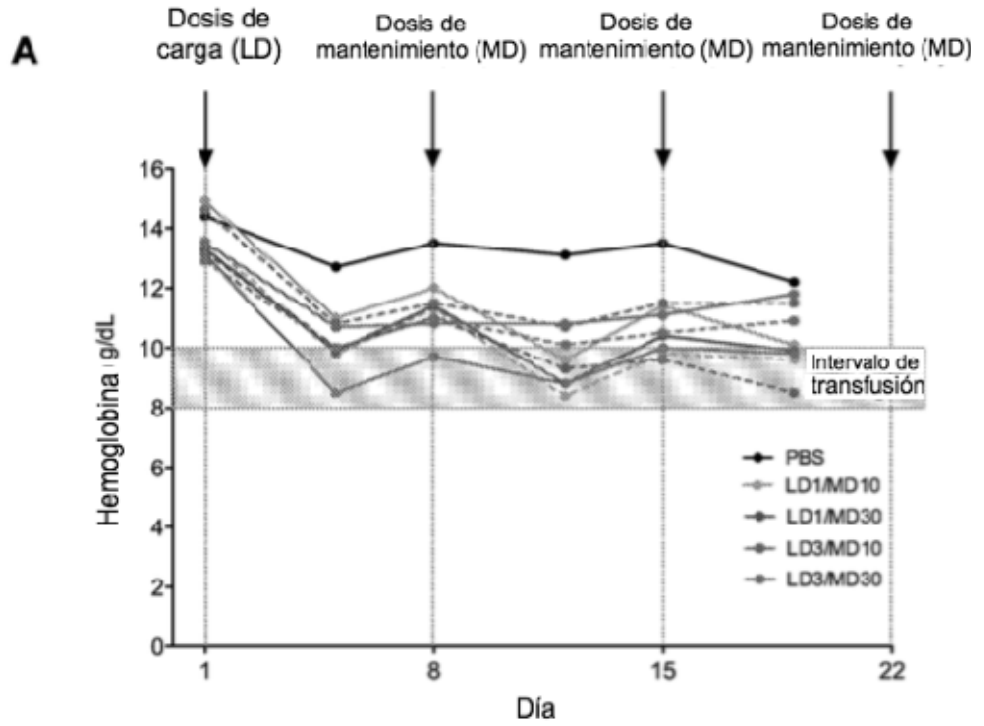


FIGURA 10

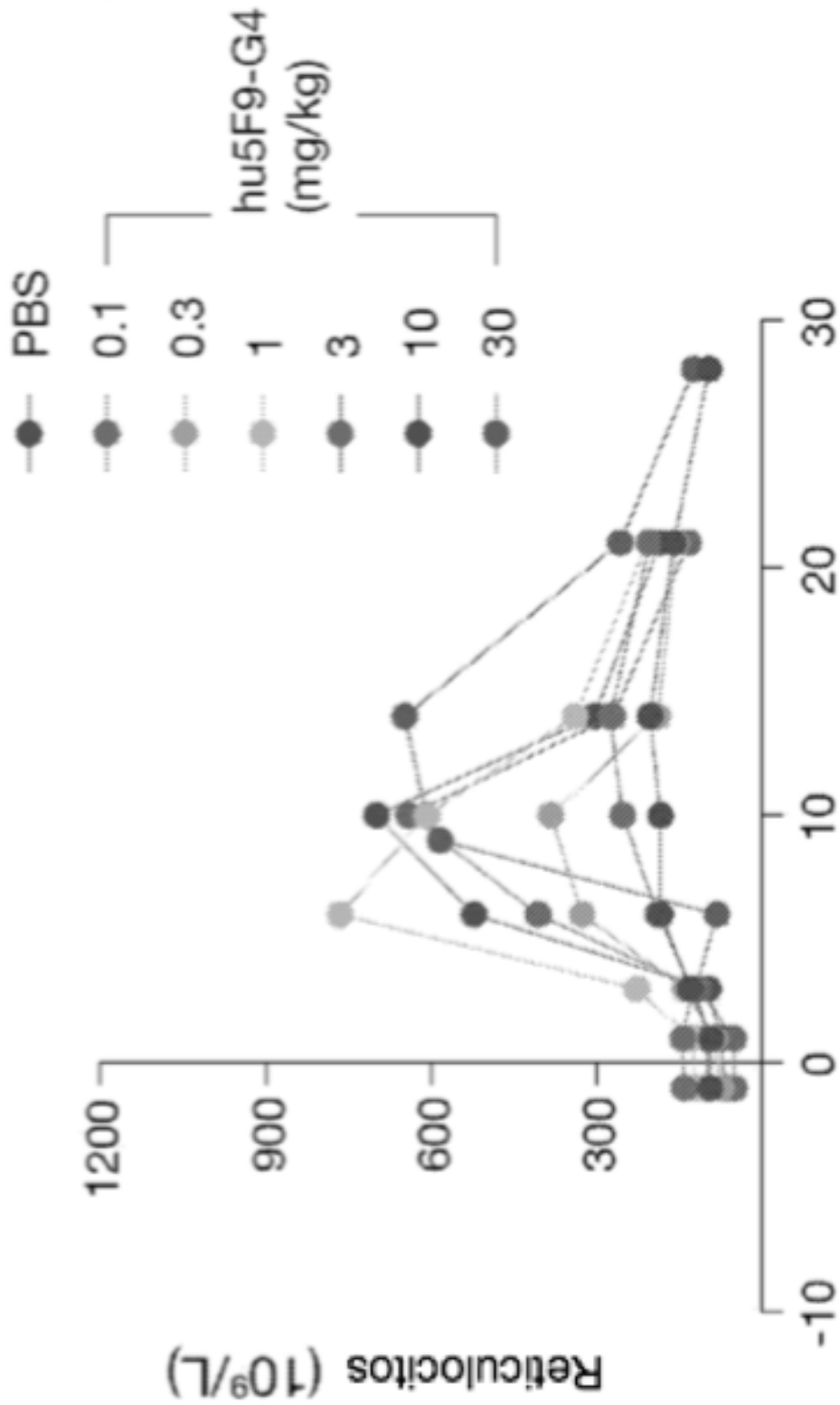


FIGURA 11

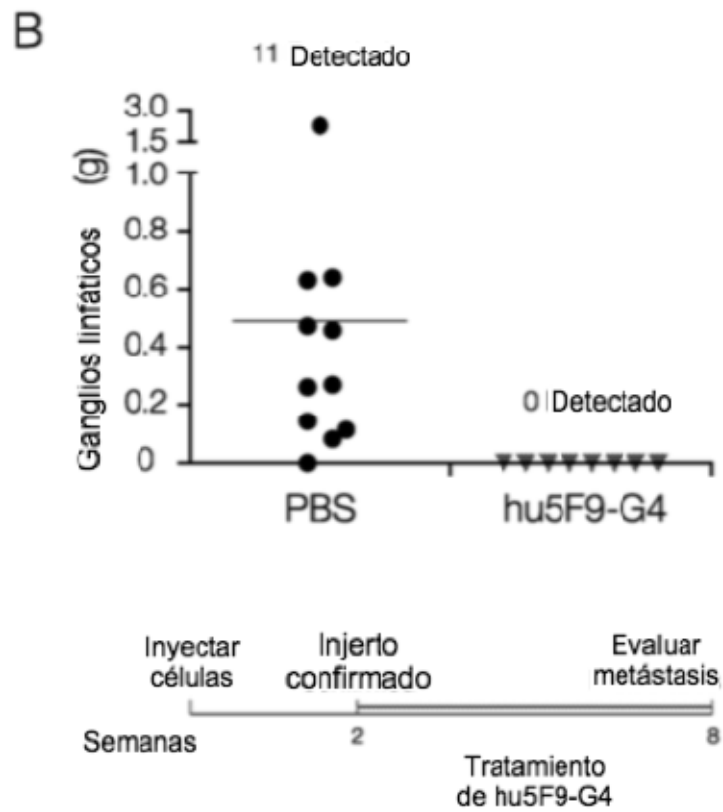
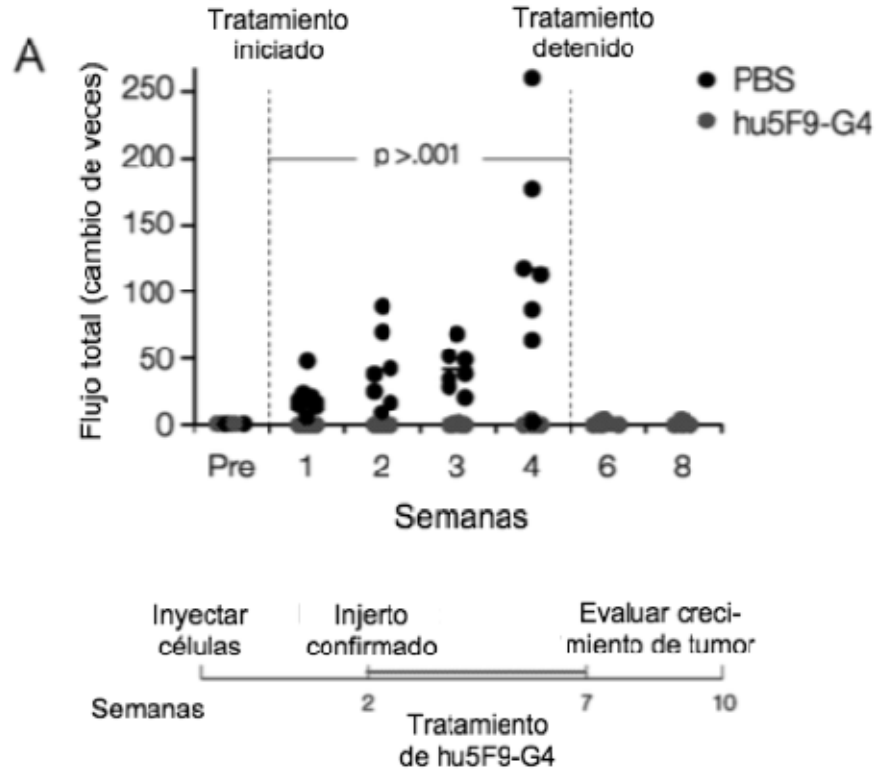


FIGURA 12

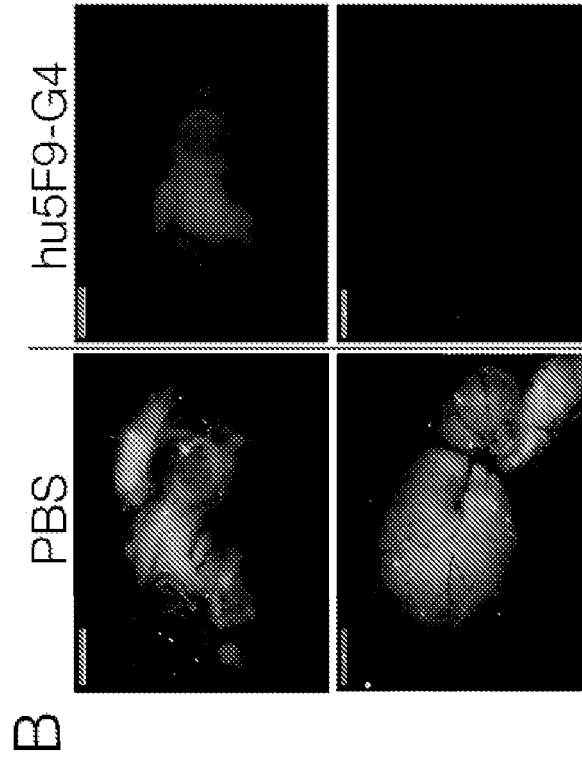
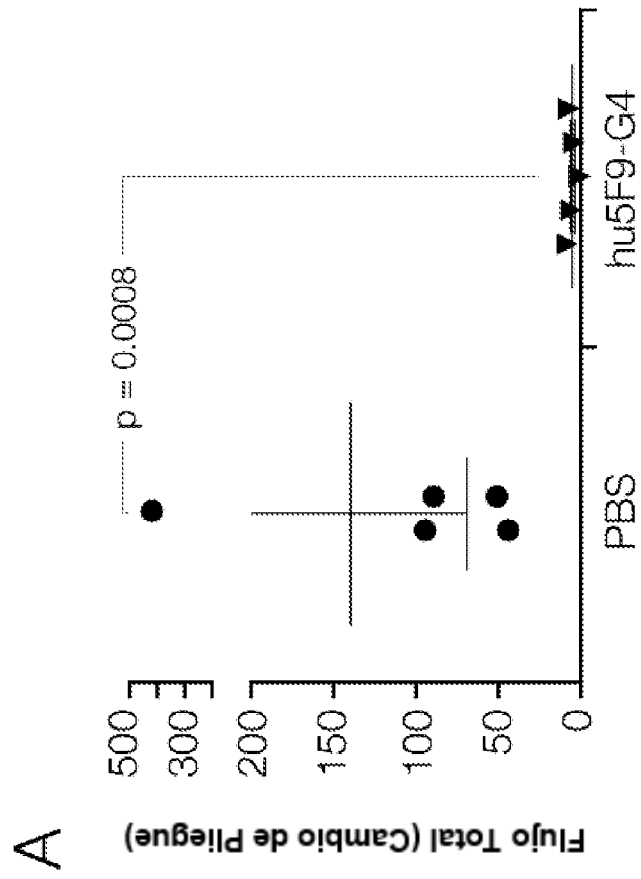
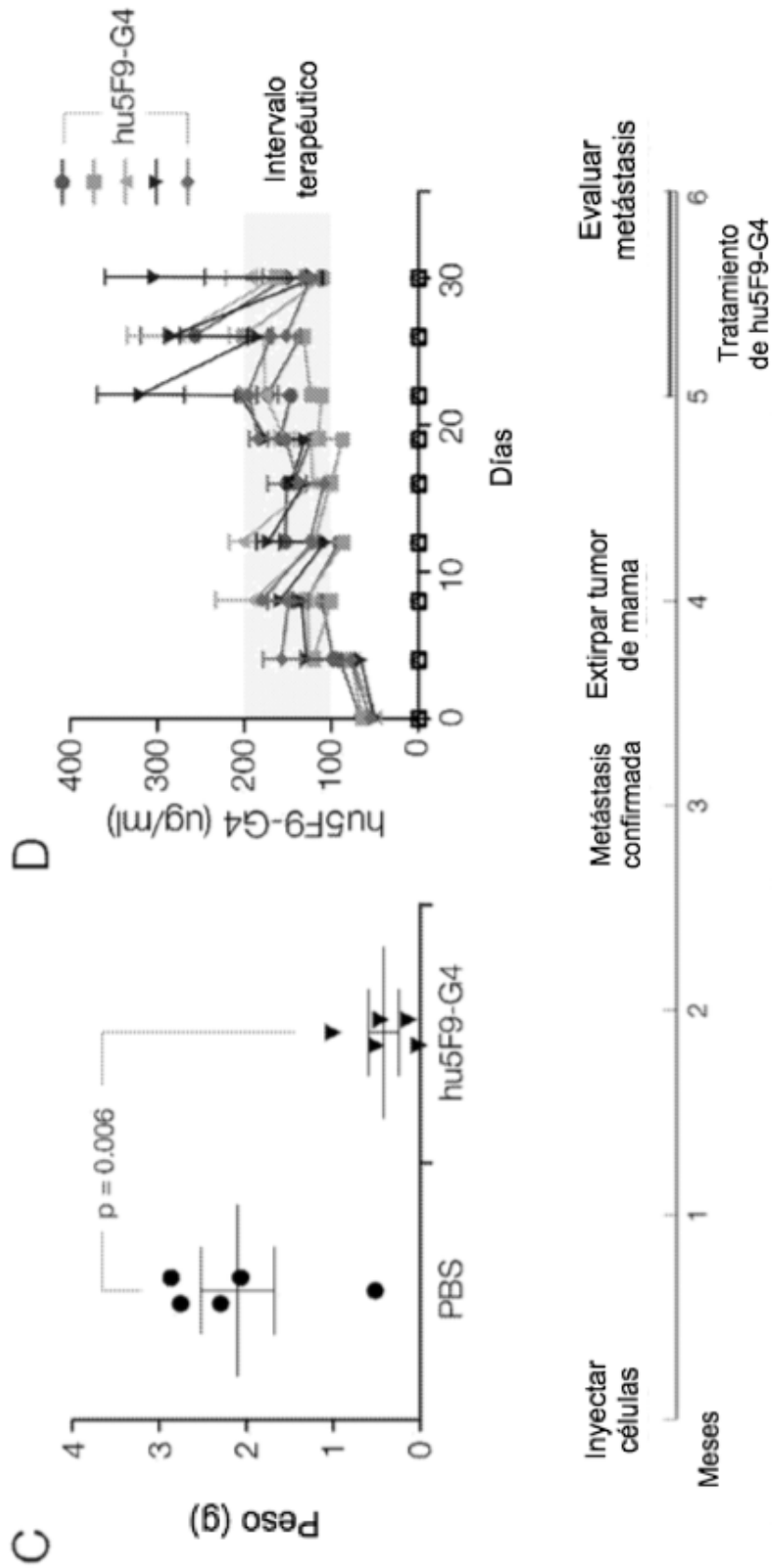


FIGURA 12





**FIGURA 13****DISEÑO DE ESTUDIO**

<b>Grupo</b>	<b>Dosis de imprimación</b>	<b>Dosis de mantenimiento</b>	<b>Numero (Machos/Hembras)</b>
1	0 (Vehículo)	0 (Vehículo)	5/5
2	5 mg/kg	10 mg/kg	3/3
3	5 mg/kg	50 mg/kg	5/5
4	5 mg/kg	100 mg/kg	5/5
5	5 mg/kg	5 mg/kg	2/2

**A** La dosis de cebado se administró el día 1.

**B** La dosis de mantenimiento se administró dos veces semanalmente en días 8, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36, 39, 43, 46 y 53.

**C** La "Dosis de Mantenimiento" final se administró el día 53, pero los animales se controlaron hasta el día 95

FIGURA 14

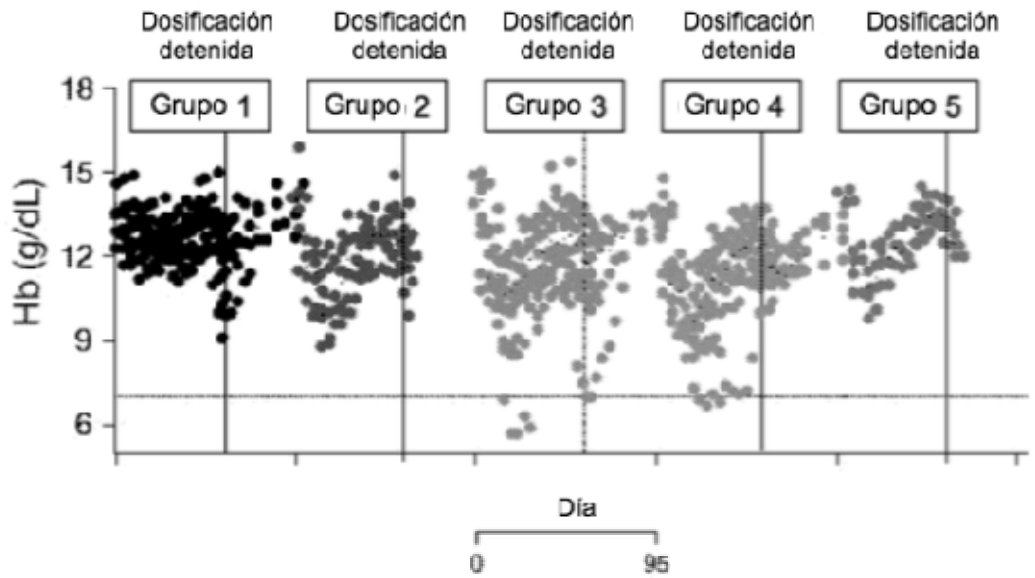


FIGURA 15

