

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 668**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2015 PCT/US2015/010650**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15105995**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2015 E 15735468 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3092006**

54 Título: **Terapia dirigida para el cáncer de pulmón de células pequeñas**

30 Prioridad:

08.01.2014 US 201461925143 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.10.2019

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:

**WEISKOPF, KIPP, ANDREW;
SAGE, JULIEN y
WEISSMAN, IRVING, L.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 728 668 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia dirigida para el cáncer de pulmón de células pequeñas

5 ANTECEDENTES

10 [0001] Las terapias dirigidas, tales como anticuerpos y ligandos específicos han demostrado ser eficaces en la lucha contra el cáncer, especialmente en casos en los que falla la terapia convencional. Aún más alentador es que los anticuerpos contra el cáncer generalmente operan en un mecanismo distinto al de la quimioterapia tradicional o la radioterapia, por lo que a menudo se pueden combinar con terapias tradicionales para generar un efecto aditivo o sinérgico.

15 [0002] Los anticuerpos pueden lograr su efecto terapéutico a través de diversos mecanismos. Pueden tener efectos directos en la producción de apoptosis o muerte celular programada. Pueden bloquear los receptores del factor de crecimiento, lo que efectivamente detiene la proliferación de células tumorales. En las células que expresan anticuerpos monoclonales, pueden provocar la formación de anticuerpos anti-idiotipo. Los efectos indirectos incluyen el reclutamiento de células que tienen citotoxicidad, como los monocitos y los macrófagos. Este tipo de muerte celular mediada por anticuerpos se denomina citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). Los anticuerpos monoclonales también se unen al complemento, lo que lleva a una toxicidad celular directa, conocida como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

20 [0003] El CD47 es una valiosa diana para la terapia anticancerosa debido a su función como inhibidor de la fagocitosis de macrófagos, así como a su amplia expresión en una variedad de neoplasias humanas. Al unirse a la proteína α reguladora de la señal (SIRP α), un receptor expresado en la superficie de los macrófagos, el CD47 es capaz de transducir señales inhibitorias que previenen la fagocitosis. El bloqueo de la interacción entre CD47 y SIRP α con anticuerpos no solo estimula a los macrófagos para engullir células cancerosas in vitro, sino que también ejerce efectos anticancerígenos robustos in vivo. Otros agentes bloqueadores de CD47 incluyen los antagonistas de CD47 de "próxima generación" que se unen y bloquean el CD47 humano con una afinidad extraordinariamente alta.

25 [0004] Al deshabilitar las señales inhibitorias transducidas por SIRP α , variantes SIRP α de alta afinidad pueden reducir el umbral para la activación de macrófagos y promover una respuesta fagocítica impulsada por anticuerpos específicos de tumores. El grado en que el bloqueo de CD47 aumenta la actividad anticancerígena de un determinado anticuerpo terapéutico probablemente depende de múltiples factores, incluidos los niveles de expresión de antígenos en la superficie de las células malignas, el isotipo de su cadena pesada y la orientación asumida por el anticuerpo sobre la unión al antígeno, que afecta su capacidad para comprometer los receptores Fc en los efectores inmunes. Los monómeros de SIRP α de alta afinidad representan, por lo tanto, una alternativa rápida, segura y efectiva a varios otros enfoques, incluidas las estrategias de conjugación de drogas/toxinas, que se han realizado en esta dirección.

30 [0005] Edris et al. (2012) PNAS USA 109 (17): 6656-661 informa que la terapia con anticuerpos dirigida a la proteína CD47 es efectiva en un modelo de leiomioma metastásico agresivo. Wang et al. (2013) Molecular Therapy 21 (10): 1919-1929 informa que la administración intravenosa de CD47 dirigido a ARNsi inhibe eficazmente el crecimiento de tumores de melanoma. Maxhimer et al. (2009) Science Translational Medicine 1 (3): 3ra7 describe la radioprotección en el tejido normal y el retraso del crecimiento del tumor por el bloqueo de la señalización de CD47. El documento EP2111869 describe composiciones y métodos para mejorar el sistema inmunológico.

35 [0006] La identificación de objetivos eficaces y las combinaciones de terapias dirigidas siguen siendo de gran interés. La presente invención aborda esta necesidad.

50 SUMARIO DE LA INVENCION

[0007] La invención proporciona un agente dirigido que selectivamente bloquea CD47 que se unen a SIRP α para su uso en el tratamiento de cáncer de pulmón de células pequeñas en un paciente, al administrar:

55 (i) el agente seleccionado que bloquea selectivamente la unión de CD47 a SIRP α en combinación con
(ii) un anticuerpo que se une específicamente a uno o más antígenos de la superficie celular en células de cáncer de pulmón,
en donde el agente que bloquea selectivamente el enlace CD47 a SIRP α es:

60 (a) un anticuerpo que se une específicamente a CD47,
(b) un anticuerpo que se une específicamente a SIRP α , o
(c) un polipéptido SIRP α soluble,

65 y en donde el uno o más antígenos de la superficie celular en células de cáncer de pulmón se seleccionan de entre EpCAM, CD24, CD166, CD56, CD326, CD298, CD29, CD63, CD9, CD164, CD99, CD46, CD59, CD57 y CD165.

[0008] La invención proporciona además un anticuerpo que se une específicamente a uno o más antígenos de la superficie celular en células de cáncer de pulmón, para su uso en el tratamiento de cáncer de pulmón de células pequeñas en un paciente, mediante la administración de:

- 5 (i) el anticuerpo que se une específicamente a uno o más antígenos de la superficie celular en células de cáncer de pulmón en combinación con
 (ii) un agente dirigido que bloquea selectivamente la unión de CD47 a SIRP α ,
 en donde el agente que bloquea selectivamente el enlace CD47 a SIRP α es:
- 10 (a) un anticuerpo que se une específicamente a CD47,
 (b) un anticuerpo que se une específicamente a SIRP α , o
 (c) un polipéptido SIRP α soluble,

15 y en donde el uno o más antígenos de la superficie celular en células de cáncer de pulmón se seleccionan de entre EpCAM, CD24, CD166, CD56, CD326, CD298, CD29, CD63, CD9, CD164, CD99, CD46, CD59, CD57 y CD165.

[0009] Se describen aquí métodos y composiciones para el tratamiento de cáncer de pulmón con una terapia diana. El cáncer de pulmón es el cáncer de pulmón de células pequeñas. La terapia se dirige a uno o más antígenos de la superficie celular, incluidos CD24, CD166, CD56, CD326, CD298, CD29, CD63, CD9, CD164, CD99, CD46, CD59, CD57, CD165, EpCAM, *etc.* La terapia dirigida comprende administrar a un individuo que padece cáncer de pulmón una dosis terapéutica de un anticuerpo que se une específicamente a un marcador de superficie celular seleccionado de CD24, CD166, CD56, CD326, CD298, CD29, CD63, CD9, CD164, CD99, CD46, CD59, CD57, CD165 y EpCAM.

25 **[0010]** La terapia dirigida se combina con un agente de bloqueo CD47. Las células cancerosas evaden la vigilancia de macrófagos mediante la regulación positiva de la expresión de CD47. La administración de agentes que enmascaran la proteína CD47, por ejemplo, los anticuerpos que se unen a CD47 o SIRP α y previenen la interacción entre CD47 y SIRP α , se administran a un paciente, lo que aumenta la eliminación de las células cancerosas a través de la fagocitosis. El agente que bloquea CD47 se combina con anticuerpos monoclonales dirigidos contra uno o más marcadores de células de cáncer de pulmón, cuyas composiciones pueden ser sinérgicas para mejorar la fagocitosis y la eliminación de las células de cáncer en comparación con el uso de agentes individuales.

30 **[0011]** Combinaciones de reactivos específicos de interés para la terapia incluyen anti-CD47 y anti-CD56; anti-CD47 y anti-CD44, anti-CD47 y anti-CD99, anti-CD47 y anti-EpCam. En algunas de tales realizaciones, el reactivo anti-CD47 es un polipéptido SIRP α de alta afinidad, que se puede proporcionar en forma de un monómero o multímero, por ejemplo, como una proteína de fusión con un polipéptido Fc de IgG.

35 **[0012]** En otras realizaciones, la terapia prevé un anticuerpo multiespecífico que se dirige a CD47 y un segundo marcador de células cancerosas, incluyendo anticuerpos multiespecíficos que se dirigen a CD47 y CD56; CD47 y CD44, CD47 y Ep-Cam, *etc.* También se proporcionan composiciones de dichos anticuerpos multiespecíficos, donde el anticuerpo multiespecífico es deseablemente humano o humanizado; y puede modificarse para prolongar la vida media de la sangre, por ejemplo, por pegilación, *etc.*

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 **[0013]**

50 Figura 1: Las terapias de bloqueo de CD47 estimulan la fagocitosis macrófaga del cáncer de pulmón de células pequeñas. Los monocitos humanos de donantes de sangre anónimos se purificaron mediante clasificación magnética activada de células (MACS) mediante la selección de CD14+. Los monocitos se cultivaron en presencia de suero humano A-B al 10% durante una semana, momento en el cual los cambios morfológicos característicos de la diferenciación de macrófagos. Los macrófagos se cultivaron conjuntamente con células de cáncer de pulmón de células pequeñas humanas primarias (muestra de CPCP "H29") marcadas con un tinte fluorescente verde. Las células se trataron con un control de vehículo (salina tamponada con fosfato, PBS), anticuerpo anti-CD56 (clon MEM-188) o anticuerpo anti-CD47 humanizado (clon 5F9-G4). La fagocitosis se evaluó mediante citometría de flujo de alto rendimiento como el porcentaje de macrófagos que habían engullido células CPCP fluorescentes verdes. El tratamiento con anticuerpo anti-CD47 fue capaz de inducir niveles elevados de fagocitosis como agente único.

55 Figura 2: el bloqueo de CD47 produce una respuesta terapéutica contra células de cáncer de pulmón de células pequeñas in vivo utilizando modelos de xenotrasplantes de ratón. Se insertaron células de cáncer de pulmón de células pequeñas primarias (muestra H29) en ratones NSG inmunodeficientes. Después de aproximadamente tres semanas de crecimiento, los ratones se distribuyeron al azar en dos cohortes de tratamiento. La primera cohorte se trató con un control de vehículo (solución salina tamponada con fosfato, PBS; rojo) y la segunda cohorte se trató con inyecciones diarias de 250 μ g de anticuerpos anti-CD47 (clon 5F9-G4, azul). El crecimiento del tumor se monitorizó con el tiempo. Cada punto representa un tumor que crece en un ratón individual. Las barras negras representan el volumen tumoral medio. Mediciones del volumen del tumor izquierdo a lo largo de

todo el curso de estudio. Mediciones del volumen del tumor derecho en el día 89 de estudio. Observe la escala logarítmica.

Figura 3: Nuevas dianas terapéuticas altamente expresadas en la superficie de células de cáncer de pulmón de células pequeñas. Se sometieron células de cáncer de pulmón de células pequeñas humanas primarias (muestra H29) a inmunofenotipificación de citometría de flujo completa usando un ensayo LEGENDScreen (Biolegend). Los antígenos de superficie se clasificaron según su intensidad de fluorescencia media geométrica (Geo. MFI). Estos antígenos son dianas terapéuticas para anticuerpos en combinación con agentes bloqueadores de CD47.

Figura 4: La capacidad de los anticuerpos dirigidos por CPCP para inducir la fagocitosis de macrófagos puede mejorarse mediante la combinación con terapias de bloqueo de CD47. Dos líneas celulares humanas de cáncer de pulmón de células pequeñas (H82 y H69) se marcaron con un colorante verde fluorescente y luego se cultivaron conjuntamente con macrófagos de ratones NSG primarios en presencia de los anticuerpos indicados en combinación con el control del vehículo (solución de salina de tampón fosfato, PBS; gris) o con variante de alta afinidad SIR-Palfa, monómero CV1 (negro). La fagocitosis se evaluó mediante citometría de flujo de alto rendimiento como el porcentaje de macrófagos que habían engullido células de CPCP fluorescentes verdes. Los reactivos anti-CD47 5F9-G4 y CV1-G4 no se probaron en combinación con el monómero CV1 debido a la competencia directa. Figura 5, El bloqueo de CD47 induce la fagocitosis de macrófagos de células de CPCP in vitro. A expresión de CD47 en la superficie de un panel de líneas celulares de CPCP humano según se evaluó mediante citometría de flujo. La línea de puntos negros representa células NCI-H82 sin teñir. B Expresión de CD47 en la superficie de la muestra de CPCP humana primaria H29. C Diagrama que representa ensayos de fagocitosis in vitro utilizando macrófagos humanos y células tumorales fluorescentes. D Representaciones representativas de citometría de flujo de ensayos de fagocitosis realizados con macrófagos humanos y células de CPCP marcadas con calceína AM. E Imágenes representativas de poblaciones celulares después de la clasificación de células activadas por fluorescencia. La población doble positiva clasificada contenía macrófagos con células tumorales envueltas. La barra de escala representa 20 μm . F Resumen de los ensayos de fagocitosis utilizando macrófagos humanos y células CPCP marcadas con calceína AM analizadas mediante citometría de flujo. Las células CPCP se trataron con control de vehículo (PBS) o anticuerpos anti-CD47 (clon Hu5F9-G4). El porcentaje de macrófagos AM + de calceína se normalizó a la respuesta máxima por cada donante de macrófagos. G Fagocitosis de células primarias H29 CPCP por macrófagos humanos después del tratamiento con control de vehículo (PBS) o anticuerpos anti-CD47 (clon Hu5F9-G4). Los ensayos de fagocitosis de FG se realizaron con macrófagos derivados de cuatro donantes de sangre independientes. Los datos representan la media \pm DE. ns, no significativo; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$ para las comparaciones indicadas mediante análisis de varianza de dos vías con corrección de Sidak (F) o prueba t de dos colas (G).

Figura 6. Los anticuerpos bloqueadores de CD47 inhiben el crecimiento de tumores de CPCP humanos in vivo. A Crecimiento de células NCI-H82 en el tejido subcutáneo de ratones NSG. Los ratones se asignaron al azar en grupos tratados con control de vehículo (PBS) o anticuerpos anti-CD47 (clon Hu5F9-G4). El crecimiento se evaluó mediante mediciones del volumen tumoral. Se trataron de siete a ocho ratones por cohorte, y cada punto representa el volumen del tumor de los animales independientes. B Crecimiento de tumores de xenoinjerto H29 derivados de GFP-luciferasa + en el tejido subcutáneo de ratones NSG según se evaluó mediante imágenes de bioluminiscencia. Los ratones se asignaron al azar en grupos tratados con control de vehículo (PBS) o anticuerpos anti-CD47 (clon Hu5F9-G4). C Imágenes de bioluminiscencia representativa de tumores H29 en el día 85 post-injerto. D Crecimiento de tumores H29 según se evaluó mediante mediciones del volumen tumoral. E Supervivencia de ratones portadores de xenoinjerto H29 derivados de pacientes que fueron tratados con las terapias indicadas. $P = 0,0004$ por prueba de Mantel-Cox. Las flechas negras AE indican el inicio del tratamiento. Los puntos indican medidas de animales independientes, las barras indican valores medianos. Las cohortes consistían en un mínimo de 7-8 ratones. Las mediciones en cada punto de tiempo se clasifican para mayor claridad. ns, no significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ para las comparaciones indicadas por la prueba de Mann-Whitney.

Figura 7. MCP-3 es un biomarcador de suero que predice la respuesta a las terapias de bloqueo de CD47. A Ratones no tratados NSG (sin tumor) o ratones NSG portadores de células subcutáneas NCI-H82 se inyectaron con una dosis única de anticuerpos anti-CD47 (clon Hu5F9-G4). Se recogieron muestras de suero antes del tratamiento o 24 horas después del tratamiento. Los niveles de MCP-3 se midieron mediante la matriz multiplex Luminex. B Los niveles de MCP-3 en ratones portadores de xenoinjerto H29 derivados de pacientes se evaluaron como en A. Los puntos representan mediciones de ratones individuales, las barras representan la media de \pm DE. Se evaluaron cinco ratones por condición. ns = no significativo; **** $P < 0,0001$ por análisis de dos vías de variación con la corrección de Sidak.

Figura 8. El examen exhaustivo de anticuerpos basado en FACS identifica dianas terapéuticas nuevas y establecidas en el CPCP. La expresión del antígeno en la superficie de cuatro líneas celulares de CPCP y la muestra primaria del paciente H29 se evaluó utilizando los Kits de detección de células humanas LEGENDScreen (BioLegend), una colección de 332 anticuerpos dirigidos a los antígenos de la superficie celular. La unión del anticuerpo se detectó mediante análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Un histograma que representa la intensidad de la fluorescencia media geométrica (MFI) de todos los anticuerpos seleccionados para la unión a la superficie de CPCP. Los datos representan valores medianos para cada anticuerpo en las cinco muestras de CPCP. Los datos se ajustaron a la distribución gaussiana (curva negra), y los antígenos negativos (gris) se definieron por la mediana de MFI menos de dos desviaciones estándar por encima de la media. Antígenos bajos (rojo) definidos como MFI a menos de un orden de magnitud por encima del umbral negativo. Los antígenos altos (azul) se definen como un orden de magnitud mayor que el

umbral negativo. B Lista clasificada de los 39 antígenos identificados como 'altos' según la IMF mediana en las cinco muestras de CPCP.

Figura 9. Las variantes de SIRP α de alta afinidad mejoran la fagocitosis de macrófagos de CPCP en respuesta a los anticuerpos de unión al tumor. Fagocitosis de células NCI-H82 (A) y células NCI-H524 (B) en respuesta a los anticuerpos de unión al tumor solos (rojo) o en combinación con el monómero CV1 variante de SIRP α de alta afinidad (azul). Los puntos representan medidas de donantes individuales, las barras representan valores medianos. Se ensayaron tres clones de anticuerpos anti-CD56 (NCAM), así como anticuerpos contra CD24, CD29, CD99 y CD47 (clon Hu5F9-G4). C Fagocitosis de células CPCP NCI-H82 en respuesta a concentraciones variables del lorvotuzumab del anticuerpo anti-CD56 solo (rojo) o en combinación con el monómero CV1 variante de SIRP α de alta afinidad (azul). Los datos representan la media \pm DE. Los ensayos de fagocitosis AC se realizaron con macrófagos humanos derivados de un mínimo de cuatro donantes de sangre independientes. Las mediciones se normalizaron a la respuesta máxima por cada macrófago donante. ns, no significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ para las comparaciones indicadas mediante análisis de varianza de dos vías con corrección de Sidak.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

[0014] Se describen aquí métodos y composiciones para el tratamiento de cáncer de pulmón con un agente terapéutico, por ejemplo un anticuerpo, dirigido a un marcador de cáncer de pulmón, por ejemplo, dirigido a uno o más antígenos de la superficie celular, incluyendo CD24, CD166, CD56, CD326, CD298, CD29, CD63, CD9, CD164, CD99, CD46, CD59, CD57, CD165, EpCAM, etc. Se describe una combinación, por ejemplo, una combinación sinérgica, de agentes, en la que un agente es un anti-agente bloqueante CD47, y el segundo agente se dirige a un marcador de cáncer de pulmón, por ejemplo, CD24, CD166, CD56, CD326, CD298, CD29, CD63, CD9, CD164, CD99, CD46, CD59, CD57, CD165, EpCAM, etc.

[0015] 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 el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o que interviene en ese rango establecido, se engloba dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse de manera independiente en los rangos más pequeños y también están incluidos 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.

[0016] Los métodos citados en este documento pueden llevarse a cabo en cualquier orden de los eventos recitados que sea lógicamente posible, así como el orden de eventos recitado.

[0017] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

[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. Además, se señala que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de dicha terminología exclusiva como "solamente", "solo" y similares en relación con la recitación de elementos de la reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

[0019] Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a ser anterior a dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que deben ser confirmadas independientemente.

DEFINICIONES

[0020] Combinación sinérgica. Las combinaciones sinérgicas pueden proporcionar un efecto terapéutico que es comparable con la efectividad de una monoterapia, es decir, los componentes individuales de la combinación, al tiempo que reduce los efectos secundarios adversos, por ejemplo, daños a tejidos no específicos, estado inmunológico, y otros indicios clínicos. Las combinaciones alternativamente sinérgicas pueden proporcionar una eficacia mejorada en comparación con la efectividad de una monoterapia, es decir, los componentes individuales de la combinación, cuyo efecto puede medirse por el número total de células tumorales; tiempo de recaída; y otros indicios de salud del paciente.

[0021] Las combinaciones sinérgicas descritas en el presente documento combinan un agente que está dirigido a inhibir o bloquear la función CD47; y un agente que está dirigido a inhibir o bloquear un segundo marcador celular de cáncer de pulmón, generalmente un marcador de superficie celular. La combinación puede proporcionarse con una combinación de agentes, por ejemplo, dos proteínas distintas, cada una de las cuales es específica para un

marcador diferente; o puede proporcionarse como un agente multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo, que combina la especificidad para dos o más marcadores diferentes.

5 **[0022]** *Terapia de combinación:* Como se usa aquí, el término "terapia de combinación" se refiere a aquellas situaciones en las que un sujeto se expone simultáneamente a dos o más regímenes terapéuticos (por ejemplo, dos o más agentes terapéuticos). En algunas realizaciones, dos o más agentes pueden administrarse simultáneamente; en algunas realizaciones, tales agentes pueden administrarse secuencialmente; en algunas realizaciones, tales agentes se administran en regímenes de dosificación superpuestos.

10 **[0023]** *Forma de dosificación:* Como se usa en este documento, el término "forma de dosificación" se refiere a una unidad físicamente discreta de un agente activo (por ejemplo, un agente terapéutico o de diagnóstico) para administración a un sujeto. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de agente activo. En algunas realizaciones, dicha cantidad es una cantidad de dosis unitaria (o una fracción completa de la misma) apropiada para la administración de acuerdo con un régimen de dosificación que se ha determinado que se correlaciona con un resultado deseado o beneficioso cuando se administra a una población relevante (es decir, con un régimen de dosificación terapéutica). Aquellos expertos en la técnica aprecian que la cantidad total de una composición terapéutica o agente administrado a un sujeto en particular está determinada por uno o más médicos a cargo y puede implicar la administración de múltiples formas de dosificación.

20 **[0024]** *Régimen de dosificación:* Como se usa aquí, el término "régimen de dosificación" se refiere a un conjunto de dosis unitarias (típicamente más de uno) que se administran de forma individual a un sujeto, típicamente separados por periodos de tiempo. En algunas realizaciones, un agente terapéutico dado tiene un régimen de dosificación recomendado, que puede implicar una o más dosis. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis, cada una de las cuales está separada una de otra por un período de tiempo de la misma longitud; en algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis y al menos dos periodos de tiempo diferentes que separan las dosis individuales. En algunas realizaciones, todas las dosis dentro de un régimen de dosificación son de la misma dosis unitaria. En algunas realizaciones, diferentes dosis dentro de un régimen de dosificación son de diferentes cantidades. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una primera dosis en una cantidad de la primera dosis, seguida por una o más dosis adicionales en una cantidad de la segunda dosis diferente de la cantidad de la primera dosis. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una primera dosis en una primera dosis, seguida de una o más dosis adicionales en una segunda dosis igual a la de la primera dosis. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación se correlaciona con un resultado deseado o beneficioso cuando se administra a través de una población relevante (es decir, es un régimen de dosificación terapéutica).

35 **[0025]** Los polipéptidos de CD47. Las tres variantes de transcripción del CD 47 humano (variante 1, NM 001777; variante 2, NM 198793; y variante 3, NM 001025079) codifican tres isoformas del polipéptido CD47. La isoforma 1 de CD47 (NP 001768), la más larga de las tres isoformas, tiene una longitud de 323 aminoácidos. La isoforma 2 de CD47 (NP 942088) tiene una longitud de 305 aminoácidos. La isoforma 3 de CD47 tiene una longitud de 312 aminoácidos. Las tres isoformas son idénticas en secuencia en los primeros 303 aminoácidos. Los aminoácidos 1-8 comprenden la secuencia de señal, los aminoácidos 9-142 comprenden el dominio similar a la inmunoglobulina CD47, que es el fragmento soluble, y los aminoácidos 143-300 son el dominio transmembrana.

45 **[0026]** Un "derivado funcional" de un polipéptido de secuencia nativa es un compuesto que tiene una propiedad biológica cualitativa en común con un polipéptido de secuencia nativa. Los "derivados funcionales" incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de una secuencia nativa y derivados de un polipéptido de secuencia nativa y sus fragmentos, siempre que tengan una actividad biológica en común con un polipéptido de secuencia nativa correspondiente. El término "derivativo" abarca tanto las variantes de secuencia de aminoácidos del polipéptido como sus modificaciones covalentes. Los derivados y la fusión de CD47 soluble encuentran uso como moléculas miméticas de CD47.

50 **[0027]** Los primeros 142 aminoácidos del polipéptido CD47 comprenden la región extracelular de CD47 (SEQ ID NO: 1). Las tres isoformas tienen una secuencia de aminoácidos idéntica en la región extracelular y, por lo tanto, se puede usar cualquiera de las isoformas para generar CD47 soluble. "CD47 soluble" es una proteína CD47 que carece del dominio de transmembrana. El CD47 soluble se secreta fuera de la célula que lo expresa en lugar de ubicarse en la superficie de la célula.

60 **[0028]** Los ensayos *in vitro* para la actividad biológica CD47 incluyen, por ejemplo, la inhibición de la fagocitosis de las células de porcino por los macrófagos humanos, la unión al receptor SIRP α , fosforilación de tirosina de SIRP α , etc. Un ensayo ejemplar para CD47 de actividad biológica en contacto con una composición de macrófagos humanos en presencia de un agente candidato. Las células se incuban con el agente candidato durante aproximadamente 30 minutos y se lisan. El lisado celular se mezcla con anticuerpos anti-SIRP α humanos para inmunoprecipitar SIRP α . Las proteínas precipitadas se resuelven mediante SDS PAGE, luego se transfieren a nitrocelulosa y se analizan con anticuerpos específicos para la fosfotirosina. Un agente candidato útil como un mimético de CD47 aumenta la fosforilación de tirosina SIRP α en al menos un 10%, o hasta un 20%, o un 50%, un 70% o un 80% o hasta aproximadamente un 90% en comparación con el nivel de fosfato. Se observó forilación en

ausencia de agente candidato. Otro ensayo ejemplar para la actividad biológica de CD47 mide la fagocitosis de células hematopoyéticas por macrófagos humanos. Un agente candidato útil como una métrica de CD47 da como resultado la regulación negativa de la fagocitosis en al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80% o más a aproximadamente el 90% en comparación con el nivel de fagocitosis observado en ausencia de agente candidato.

[0029] Por "manipulación de la fagocitosis" se entiende una regulación al alza o una regulación a la baja en la fagocitosis en al menos aproximadamente el 10%, o hasta el 20%, o el 50%, o el 70% o el 80% o hasta aproximadamente el 90%. En comparación con el nivel de fagocitosis observado en ausencia de intervención. Así en el contexto de la disminución de la fagocitosis de las células hematopoyéticas circulantes, particularmente en un contexto de trasplante, la manipulación de la fagocitosis significa una disminución de la regulación de la fagocitosis en al menos aproximadamente el 10%, o hasta el 20%, o el 50%, o el 70% o el 80% o hasta aproximadamente el 90% en comparación con el nivel de fagocitosis observado en ausencia de intervención.

[0030] *Agente anti-CD47.* Como se usa en el presente documento, el término "agente anti-CD47" se refiere a cualquier agente que reduce el enlace de CD47 (por ejemplo, en una célula diana) a SIRP α (por ejemplo, en una célula fagocítica). Los ejemplos no limitantes de reactivos anti-CD47 adecuados incluyen reactivos SIRP α , incluyendo, sin limitación, polipéptidos SIRP α de alta afinidad, anticuerpos anti-SIRP α , polipéptidos CD47 solubles y anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-CD47. Un agente anti-CD47 adecuado (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47, un reactivo SIRP α , etc.) puede unirse específicamente a CD47 para reducir el enlace de CD47 a SIRP α . Un agente anti-CD47 adecuado (por ejemplo, un anticuerpo anti-SIRP α , un polipéptido CD47 soluble, etc.) puede unirse específicamente a SIRP α para reducir la unión de CD47 a SIRP α . Un agente anti-CD47 adecuado que se une a SIRP α no activa SIRP α (por ejemplo, en la célula fagocítica que expresa SIRP α).

[0031] La eficacia de un agente anti-CD47 adecuado puede evaluarse ensayando el agente (descrito más adelante). En un ensayo ejemplar, las células diana se incuban en presencia o ausencia del agente candidato. Un agente para uso en 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 un 80%, al menos un 90%, al menos un 100%, al menos un 120%, al menos un 140%, al menos un 160%, al menos un 180% o al menos un 200% en comparación con la fagocitosis en ausencia de el agente. De manera similar, un ensayo *in vitro* para determinar los niveles de fosforilación de tirosina de SIRP α 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 un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o 100%) en comparación con la fosforilación observada en ausencia del agente candidato.

[0032] 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 por apoptosis.

[0033] *Reactivo SIRP α .* Un reactivo SIRP α comprende la porción de SIRP α que es suficiente para unirse a CD47 en 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 de SIRP α adecuado reduce (p. ej., bloquea, evita, etc.) la interacción entre las proteínas nativas SIRP α y CD47. El reactivo SIRP α generalmente comprenderá al menos el dominio d1 de SIRP α . En algunas realizaciones, un reactivo SIRP α es una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada en marco con un segundo polipéptido. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es capaz de aumentar el tamaño de la proteína de fusión, por ejemplo, para que la proteína de fusión no se elimine de la circulación rápidamente. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina. La región Fc ayuda en la fagocitosis al proporcionar una señal de "comerme", que mejora el bloqueo de la señal de "no me comas" proporcionada por el reactivo de alta afinidad SIRP α . En otras realizaciones, el segundo polipéptido es cualquier polipéptido adecuado que sea sustancialmente similar a Fc, por ejemplo, que proporciona un mayor tamaño, dominios de multimerización y/o unión o interacción adicional con moléculas de Ig.

[0034] En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 sujeto es un "reactivo SIRP α de alta afinidad", que incluye polipéptidos derivados de SIRP α y análogos de los mismos. Los reactivos SIRP α de alta afinidad se describen en la publicación de patente internacional WO 2013/109752. Los reactivos de SIRP α de alta afinidad son variantes de la proteína SIRP α nativa. En algunas realizaciones, un reactivo SIRP α de alta afinidad es soluble, donde el polipéptido carece del dominio transmembranoso SIRP α y comprende al menos un cambio de aminoácido en relación con la secuencia SIRP α de tipo silvestre, y en donde el cambio de aminoácido aumenta la afinidad de la unión del polipéptido SIRP α 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.

[0035] Un reactivo SIRP α de alta afinidad comprende la porción de SIRP α que es suficiente para unir CD47 con una afinidad reconocible, por ejemplo, de alta afinidad, que normalmente se encuentra entre la secuencia señal y el dominio transmembrana, o un fragmento del mismo que retiene la actividad de unión. El reactivo SIRP α de alta

afinidad usualmente compondrá al menos el dominio d1 de SIRP α con residuos de aminoácidos modificados para aumentar la afinidad.

[0036] Un reactivo SIRP α puede ser utilizado como un "monómero", en el que se utiliza el dominio de unión de SIRP α , pero donde se proporciona el dominio de unión como una proteína monomérica soluble. En otras realizaciones, una variante de SIRP α para uso en la presente invención es una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada en marco con un segundo polipéptido, particularmente cuando el segundo polipéptido proporciona multimerización. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina. La región Fc ayuda en la fagocitosis al proporcionar una señal de "comerme", que aumenta el bloqueo de la señal de "no me comas" proporcionada por el reactivo SIRP α de alta afinidad. En otras realizaciones, el segundo polipéptido es cualquier polipéptido adecuado que sea sustancialmente similar a Fc, por ejemplo, que proporcione un mayor tamaño, dominios de multimerización y/o unión o interacción adicional con moléculas de Ig.

[0037] Los cambios de aminoácidos que proporcionan afinidad aumentada están localizados en el dominio D1, y por lo tanto reactivos de SIRP α de alta afinidad comprenden un dominio D1 de SIRP α humanos, con al menos un cambio de aminoácido relativo a la secuencia de tipo salvaje dentro del dominio d1. Tal reactivo SIRP α de alta afinidad comprende opcionalmente secuencias de aminoácidos adicionales, por ejemplo secuencias de anticuerpos Fc; porciones de la proteína SIRP α de tipo silvestre distinta del dominio d1, incluidos sin limitación los residuos 150 a 374 de la proteína nativa o fragmentos de la misma, generalmente fragmentos contiguos con el dominio d1; y similares. Los reactivos SIRP α de alta afinidad pueden ser monoméricos o multiméricos, es decir, dímero, trímero, tetramero, etc.

[0038] *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 α en otra célula (por ejemplo, una célula fagocítica). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD47 adecuado no activa CD47 al unirse, por ejemplo, un anticuerpo que no induce apoptosis al unirse. 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 seres 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.

[0039] *Los anticuerpos anti-Sirpa*. En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 es un anticuerpo que se une específicamente a SIRP α (es decir, un anticuerpo anti-SIRP α) y reduce la interacción entre CD47 en una célula (por ejemplo, una célula infectada) y SIRP α en otra célula (por ejemplo, una célula fagocítica). Los anticuerpos anti-SIRP α adecuados pueden unirse a SIRP α sin activar o estimular la señalización a través de SIRP α porque la activación de SIRP α inhibiría la fagocitosis. En cambio, los anticuerpos anti-SIRP α adecuados facilitan la fagocitosis preferencial de células inflingidas sobre células normales. Aquellas células que expresan niveles más altos de CD47 (p. ej., células infectadas) en relación con otras células (células no infectadas) serán preferentemente fagocitadas. Por lo tanto, un anticuerpo anti-SIRP α adecuado se une específicamente a SIRP α (sin activar/estimular suficientemente una respuesta de señalización para inhibir la fagocitosis) y bloquea una interacción entre SIRP α y CD47. Los anticuerpos anti-SIRP α adecuados incluyen versiones totalmente humanas, humanizadas o quiméricas de dichos anticuerpos. Los anticuerpos humanizados 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 caninizados, felinizados, equinizados, bovinizados, porcinizados, etc., y sus variantes.

[0040] El término "anticuerpo" o "resto de anticuerpo" debe incluir cualquier estructura molecular que contiene cadena de polipéptido con una forma específica que se adapte a y reconozca un epítipo, donde una o más interacciones de unión no covalente estabilizan el complejo entre la estructura molecular y el epítipo. Los anticuerpos utilizados en la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales, aunque se prefieren los anticuerpos monoclonales porque pueden reproducirse por cultivo celular o recombinantemente, y pueden modificarse para reducir su antigenicidad.

[0041] Los anticuerpos policlonales se pueden levantar por un protocolo estándar mediante la inyección de un animal de producción con una composición antigénica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antipsis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, Cuando se utiliza una proteína completa, o una sección más grande de la proteína, los anticuerpos pueden generarse inmunizando al animal de producción con la proteína y un adyuvante adecuado (p. ej., Freund's, Freund's emulsiones de aceite en agua completas, etc.). Cuando se utiliza un péptido más pequeño, es ventajoso conjugar el péptido con una molécula más grande para hacer un conjugado inmunoestimulante. Las proteínas conjugadas utilizadas comúnmente que están disponibles comercialmente para tal uso incluyen albúmina de suero bovino (BSA) y hemocianina de lapa californiana (KLH). Para aumentar los anticuerpos contra epítipos particulares, se pueden utilizar péptidos derivados de la secuencia completa.

Alternativamente, para generar anticuerpos contra porciones peptídicas relativamente cortas de la proteína diana, se puede provocar una respuesta inmune superior si el polipéptido se une a una proteína transportadora, como la ovoalbúmina, BSA o KLH. Alternativamente, para los anticuerpos monoclonales, los híbridos pueden formarse aislando las células inmunes estimuladas, como las del bazo del animal inoculado. Estas células luego se fusionan con células inmortalizadas, como las células de mieloma o células transformadas, que son capaces de replicarse indefinidamente en cultivos celulares, produciendo así una línea celular inmortal, secretora de inmunoglobulina. Además, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden producirse por ingeniería genética. Se prefieren los anticuerpos humanos humanizados, quiméricos o xenogénicos, que producen menos de una respuesta inmune cuando se administran a seres humanos, para su uso en la presente invención.

[0042] Además de las inmunoglobulinas enteras (o sus homólogos recombinantes), los fragmentos de inmunoglobulina que comprenden el sitio de unión de epítipo (por ejemplo, Fab', F(ab')₂, u otros fragmentos) son útiles como restos de anticuerpo en la presente invención. Dichos fragmentos de anticuerpos pueden generarse a partir de inmunoglobulinas completas mediante ricina, pepsina, papaína u otra escisión de proteasas. Las "inmunoglobulinas" o "fragmentos" pueden diseñarse utilizando técnicas de inmunoglobulina recombinante. Por ejemplo, las inmunoglobulinas "Fv" para uso en la presente invención pueden producirse uniendo una región de cadena ligera variable a una región de cadena pesada variable a través de un enlazador peptídico (por ejemplo, poliglicina u otra secuencia que no forma una hélice alfa o motivo de hoja beta).

[0043] Los anticuerpos incluyen anticuerpos libres y fragmentos de unión a antígeno derivadas de los mismos, y conjugados, por ejemplo, anticuerpos pegilados, droga, radioisótopo, o conjugados de toxina, y similares. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra un epítipo específico, o una combinación de epítopos, permitirán el direccionamiento y/o el agotamiento de las poblaciones celulares que expresan el marcador. Varias técnicas pueden utilizar anticuerpos monoclonales para detectar poblaciones celulares que expresan el marcador o los marcadores, e incluye la separación magnética mediante el uso de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, "paneo" con anticuerpo unido a una matriz sólida (es decir, placa) y citometría de flujo (Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5,985,660 y Morrison et al. Cell, 96: 737-49 (1999)). Estas técnicas permiten la detección de poblaciones particulares de células; en inmunohistoquímica de muestras de biopsia; en la detección de la presencia de marcadores eliminados por las células cancerosas en la sangre y otros fluidos biológicos, y similares.

[0044] Las versiones humanizadas de tales anticuerpos también se contemplan para uso en esta invención. Los anticuerpos humanizados son especialmente útiles para aplicaciones in vivo en humanos debido a su baja antigenicidad.

[0045] La frase "anticuerpo multiespecífico o biespecífico" se refiere a un anticuerpo sintético o recombinante que reconoce más de una proteína. Los anticuerpos biespecíficos dirigidos contra una combinación de epítopos, permitirán el direccionamiento y/o el agotamiento de las poblaciones celulares que expresan la combinación de epítopos. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen aquellos que se dirigen a una combinación de CD47 y un marcador de células cancerosas CPCP. La generación de anticuerpos biespecíficos se describe en la literatura. Las especificidades de orden superior, por ejemplo, los anticuerpos triespecíficos, están descritas por Holliger y Hudson (2005) Nature Biotechnology 23: 1126-1136.

[0046] La eficacia de un inhibidor de CD47 se puede evaluar por ensayar la actividad de CD47. Se utilizan los ensayos mencionados anteriormente o sus versiones modificadas. En un ensayo ejemplar, las CPCP se incuban con macrófagos derivados de la médula ósea, en presencia o ausencia del agente candidato. Un inhibidor de la superficie celular CD47 regulará la fagocitosis al menos aproximadamente en un 10%, o hasta un 20%, o un 50%, un 70% o un 80% o un 90% en comparación con la fagocitosis en ausencia del agente candidato. De manera similar, un ensayo *in vitro* para determinar los niveles de fosforilación de tirosina de SIRP α mostrará una disminución de la fosforilación en al menos aproximadamente el 10%, o hasta el 20%, o el 50%, o el 70% o el 80% o hasta aproximadamente el 90% en comparación con la fosforilación observada en ausencia del agente candidato.

[0047] En una realización de la invención, el agente, o una composición farmacéutica que comprende el agente, se proporciona en una cantidad eficaz para inhibir de forma detectable la unión de CD47 al receptor SIRP α presente en la superficie de las células fagocíticas. La cantidad efectiva se determina mediante una rutina de prueba empírica en la técnica. La cantidad efectiva puede variar según la cantidad de células que se trasplantan, el sitio de trasplante y los factores específicos del receptor del trasplante.

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

[0049] El término "muestra biológica" abarca una variedad de tipos de muestras obtenidas de un organismo y pueden usarse en un ensayo de diagnóstico o monitoreo. El término abarca muestras de sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido, como una muestra de biopsia o cultivos de tejido o células derivadas del mismo y su progenie. El término abarca muestras que se han manipulado de alguna manera después de su adquisición, como con el tratamiento con reactivos, la solubilización o el enriquecimiento de ciertos

componentes. El término abarca una muestra clínica, y también incluye células en cultivo celular, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluidos biológicos y muestras de tejidos.

5 **[0050]** Los términos "tratamiento", "tratado", "tratar" y similares se usan aquí para referirse generalmente a la obtención de un efecto farmacológico y/o efecto fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma 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 "tratamiento", como se usa en este documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, por ejemplo, ratón, rata, conejo, cerdo, primate, incluyendo humanos y otros simios, particularmente un humano, e incluye: (a) prevenir que ocurra la enfermedad o síntoma en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o síntoma, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir el síntoma de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar el síntoma de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o el síntoma.

15 **[0051]** Los términos "receptor", "individual", "sujeto", "huesped", y "paciente", utilizados aquí de forma intercambiable y se refieren a cualquier sujeto mamífero para quien se desea el diagnóstico, tratamiento o terapia, particularmente seres humanos.

20 **[0052]** Una "célula huésped", como se usa aquí, se refiere a un microorganismo o una célula o línea celular eucariota cultivada como una entidad unicelular que puede ser, o ha sido, usada como receptor de un vector recombinante u otros polinucleótidos de transferencia, e incluyen la progenie de la célula original que ha sido transfecteda. Se entiende que la progenie de una sola célula puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en el complemento de ADN genómico o total como el progenitor original, debido a una mutación natural, accidental o deliberada.

25 **[0053]** Los términos "cáncer", "neoplasma", "tumor", y "carcinoma", se utilizan indistintamente en este documento para referirse a células que exhiben un crecimiento relativamente autónomo, de forma que exhiben un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control de la proliferación celular. En general, las células de interés para la detección o tratamiento en la presente solicitud incluyen células precancerosas (por ejemplo, benignas, malignas, premetastásicas, metastásicas y no metaestáticas. La detección de células cancerosas es de particular interés. El término "normal", como se usa en el contexto de "célula normal", se refiere a una célula de un fenotipo no transformado o que muestra una morfología de una célula no transformada del tipo de tejido que se examina. "Fenotipo cancerígeno" generalmente se refiere a cualquiera de una variedad de fenómenos biológicos que son característicos de una célula cancerosa, cuyos fenómenos pueden variar según el tipo de cáncer. El fenotipo canceroso se identifica generalmente por anomalías en, por ejemplo, el crecimiento o la proliferación celular (por ejemplo, el crecimiento o la proliferación descontrolados), la regulación del ciclo celular, la movilidad celular, la interacción célula-célula o la metástasis, etc.

35 **[0054]** "Diana terapéutica" se refiere a un gen o producto génico que, tras la modulación de su actividad (por ejemplo, mediante la modulación de la expresión, la actividad biológica y similares), puede proporcionar la modulación del fenotipo canceroso. Tal como se usa en todo, "modulación" se refiere a un aumento o una disminución en el fenómeno indicado (por ejemplo, la modulación de una actividad biológica se refiere a un aumento en una actividad biológica o una disminución en una actividad biológica).

45 CÁNCER DE PULMÓN

[0055] El carcinoma de pulmón es la principal causa de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo. Alrededor del 85% de los casos están relacionados con fumar cigarrillos. Los síntomas pueden incluir tos, malestar o dolor en el pecho, pérdida de peso y, menos frecuentemente, hemoptisis; sin embargo, muchos pacientes presentan enfermedad metastásica sin ningún síntoma clínico. El diagnóstico generalmente se realiza mediante una radiografía de tórax o una TC y se confirma con una biopsia. Dependiendo de la etapa de la enfermedad, el tratamiento incluye cirugía, quimioterapia, radioterapia o una combinación. Durante las últimas décadas, el pronóstico para un paciente con cáncer de pulmón ha sido malo, especialmente para los pacientes con enfermedad en etapa IV (metastásica).

55 **[0056]** Las células epiteliales respiratorias requieren la exposición a agentes que promueven el cáncer y la acumulación de múltiples mutaciones genéticas prolongadas antes de convertirse en neoplásica (un efecto llamado carcinogénesis de campo). En algunos pacientes con cáncer de pulmón, mutaciones secundarias o adicionales en genes que estimulan el crecimiento celular (K-ras, MYC), causan anomalías en la señalización del receptor del factor de crecimiento (EGFR, HER2/neu) e inhiben la apoptosis, lo que contribuye a la proliferación de células anormales. Además, las mutaciones que inhiben los genes supresores de tumores (p53, APC) pueden provocar cáncer. Otras mutaciones que pueden ser responsables incluyen la translocación de EML-4-ALK y las mutaciones en ROS-1, BRAF y PI3KCA. Genes como estos que son principalmente responsables del cáncer de pulmón se llaman mutaciones conductoras. Aunque las mutaciones del conductor pueden causar o contribuir al cáncer de pulmón entre los fumadores, estas mutaciones son particularmente propensas a ser una causa de cáncer de pulmón entre los no fumadores.

[0057] La radiografía de tórax es a menudo la prueba de imagen inicial. Puede mostrar anomalías claramente definidas, como una masa única o masas multifocales o un nódulo pulmonar solitario, un hilum agrandado, mediastino ensanchado, estrechamiento traqueo-bronquial, atelectasia, infiltrados parenquimales no resueltos, lesiones cavitativas o inexplicables. Engrosamiento pleural o derrame. Estos hallazgos son sugerentes pero no diagnósticos de cáncer de pulmón y requieren seguimiento con tomografías computarizadas o tomografías computarizadas combinadas PET-TAC y confirmación citopatológica.

[0058] La TC muestra muchos patrones anatómicos característicos y apariencias que pueden sugerir fuertemente el diagnóstico. La TC también puede guiar la biopsia con aguja gruesa de las lesiones accesibles y es útil para la estadificación. Si es muy probable que una lesión encontrada en una radiografía simple sea cáncer de pulmón, se puede realizar una PET-TC. Este estudio combina imágenes anatómicas de TC con imágenes funcionales de PET. Las imágenes PET pueden ayudar a diferenciar procesos inflamatorios y malignos.

[0059] El CPCP tiene 2 etapas: limitada y extensa. La enfermedad por CPCP en etapa limitada es un cáncer confinado a un hemitórax (incluidos los ganglios linfáticos ipsilaterales) que puede abarcarse dentro de un puerto de radioterapia tolerable, a menos que haya un derrame pleural o pericárdico. La enfermedad en etapa extensa es el cáncer fuera de un hemitórax o la presencia de células malignas detectadas en derrames pleurales o pericárdicos. Menos de un tercio de los pacientes con CPCP presentarán enfermedad en etapa limitada; el resto de los pacientes a menudo tienen metástasis distantes extensas. El pronóstico general para CPCP es pobre. El tiempo medio de supervivencia para el CPCP en estadio limitado es de 20 meses, con una tasa de supervivencia de 5 años del 20%. A los pacientes con CPCP en estadio extenso les va especialmente mal, con una tasa de supervivencia de 5 años <1%.

[0060] El CPCNP tiene 4 etapas, I a IV (usando el sistema TNM). La estadificación TNM se basa en el tamaño del tumor, la ubicación del tumor y los ganglios linfáticos y la presencia o ausencia de metástasis a distancia. La tasa de supervivencia a los 5 años de los pacientes con CPCNP varía según la etapa, de 60 a 70% para los pacientes con enfermedad en etapa I a <1% para los pacientes con enfermedad en etapa IV.

[0061] El tratamiento convencional varía según el tipo de célula y la etapa de la enfermedad. Muchos factores del paciente no relacionados con el tumor afectan la elección del tratamiento. La mala reserva cardiopulmonar, la desnutrición, la fragilidad o el bajo rendimiento físico, las comorbilidades, como las citopenias y las enfermedades psiquiátricas o cognitivas, pueden llevar a una decisión de tratamiento paliativo con respecto al tratamiento curativo o de ningún tratamiento, incluso a pesar de una cura con tratamiento agresivo. Técnicamente podría ser posible.

[0062] El CPCP de cualquier etapa generalmente responde inicialmente al tratamiento, pero las respuestas suelen ser de corta duración. La quimioterapia, con o sin radioterapia, se administra según la etapa de la enfermedad. En muchos pacientes, la quimioterapia prolonga la supervivencia y mejora la calidad de vida lo suficiente como para justificar su uso. La cirugía generalmente no desempeña ningún papel en el tratamiento de la CPCP, aunque puede ser curativa en el paciente poco frecuente que tiene un tumor focal pequeño sin diseminación (como un nódulo pulmonar solitario) que se sometió a resección quirúrgica antes de que el tumor se identificara como CPCP. Los regímenes de quimioterapia de etopósido y un compuesto de platino (ya sea cisplatino o carboplatino) se usan comúnmente, al igual que otros fármacos, como el irinotecán, topotecán, alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina, vinorelbina), agentes alquilantes (ciclofosfamida, ifosfamida), doxorubicina, taxanos (docetaxel, paclitaxel) y gemcitabina. Cuando la enfermedad se limita a un hemitórax, la radioterapia mejora aún más los resultados clínicos; tal respuesta a la radioterapia fue la base para la definición de enfermedad en etapa limitada. El uso de la radiación craneal para prevenir metástasis cerebrales también se recomienda en ciertos casos; las micrometástasis son comunes en el CPCP y la quimioterapia tiene menos capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica.

[0063] En la enfermedad en estadio extenso, el tratamiento se basa en la quimioterapia en lugar de terapia de radiación, aunque la terapia de radiación se utiliza a menudo como tratamiento paliativo de metástasis a hueso o cerebro. En pacientes con una excelente respuesta a la quimioterapia, la irradiación cerebral profiláctica se usa a veces como en el CPCP en estadio limitado para prevenir el crecimiento del CPCP en el cerebro.

[0064] El tratamiento para el CPCNP típicamente implica la evaluación de la elegibilidad para la cirugía seguida de la elección de la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia o una combinación de modalidades según sea apropiado, según el tipo de tumor y el estadio.

Tratamiento del cancer

[0065] En la presente memoria se describen métodos para reducir el crecimiento de células de cáncer de pulmón a través de la introducción de una dosis eficaz de un agente terapéutico dirigido dirigida a un marcador de superficie celular de cáncer de pulmón, incluyendo, sin limitación CD24, CD166, CD56, CD326, CD298, CD29, CD63, CD9, CD164, CD99, CD46, CD59, CD57, CD165, EpCAM, etc. El marcador puede ser uno de CD56, CD44, CD99 y EpCam. El agente terapéutico dirigido puede combinarse con un agente bloqueante de CD47, por ejemplo, monómero o multímero SIRPα soluble, un anticuerpo anti-CD47, una molécula pequeña, etc. Según la invención, el

cáncer es CPCP. Al bloquear la actividad de CD47, se evita la regulación por disminución de la fagocitosis que se encuentra con ciertas células tumorales.

5 **[0066]** La "reducción del crecimiento de células cancerosas" incluye, pero no se limita a, reducir la proliferación de células cancerosas y reducir la incidencia de una célula no cancerosa que se está convirtiendo en una célula cancerosa. Si se ha conseguido una reducción en el crecimiento celular del cáncer se puede determinar fácilmente usando cualquier ensayo conocido, incluyendo, pero no limitado a, [³H]-timidina; contando el número de células durante un periodo de tiempo; detectar y/o medir un marcador asociado con CPCP, etc.

10 **[0067]** Si una sustancia o una cantidad específica de la sustancia, es eficaz en el tratamiento de cáncer puede ser evaluado utilizando cualquiera de una variedad de ensayos de diagnóstico conocidos para el cáncer, incluyendo, pero no limitado a la biopsia, estudios radiográficos de contraste, exploración CAT, y detección de un marcador tumoral asociado con cáncer en la sangre de la persona. La sustancia se puede administrar sistémicamente o localmente, generalmente sistémicamente.

15 **[0068]** Un agente, por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico que reduce el crecimiento de células cancerosas, puede dirigirse a una célula de cáncer mediante conjugación a un anticuerpo específico CD47. Por lo tanto, aquí se describe un método para administrar un medicamento a una célula cancerosa, que comprende administrar un complejo de medicamento-anticuerpo a un sujeto, en el que el anticuerpo es específico para un polipéptido asociado al cáncer, y el fármaco es uno que reduce el crecimiento de células cancerosas, una variedad de las cuales se conocen en la técnica. La orientación se puede lograr mediante el acoplamiento (p. ej., enlazando, directamente o por medio de una molécula enlazadora, de forma covalente o no covalente, para formar un complejo fármaco-anticuerpo) un fármaco a un anticuerpo específico para un polipéptido asociado al cáncer. Los métodos de acoplamiento de un fármaco a un anticuerpo son bien conocidos en la técnica y no necesitan ser explicados en este documento.

20 **[0069]** Un anticuerpo bi-específico se puede utilizar. Por ejemplo, se pueden usar un anticuerpo biespecífico en el que un dominio de unión a antígeno está dirigido contra CD47 y el otro dominio de unión a antígeno está dirigido contra un marcador de células cancerosas, como CD24, CD166, CD56, CD326, CD298, CD29, CD63, CD9 CD164, CD99, CD46, CD59, CD57, CD165, EpCAM, etc.

25 **[0070]** En general, como el término se utiliza en la especificación, "anticuerpo" o "resto de anticuerpo" pretenden incluir cualquier estructura molecular que contiene la cadena de polipéptido que tiene una forma específica que se adapta a y reconoce un epítipo, donde una o más interacciones de unión no covalentes estabilizan el complejo entre la estructura molecular y el epítipo. Para los anticuerpos monoclonales, se pueden formar hibridomas aislando las células inmunes estimuladas, como las del bazo del animal inoculado. Estas células luego se fusionan con células inmortalizadas, como las células de mieloma o células transformadas, que son capaces de replicarse indefinidamente en cultivos celulares, produciendo una línea celular inmortal, secretora de inmunoglobulina. La línea celular inmortal utilizada se selecciona preferiblemente para ser deficiente en las enzimas necesarias para la utilización de ciertos nutrientes. Muchas de estas líneas celulares (como los mielomas) son conocidas por los expertos en la materia, e incluyen, por ejemplo: timidina quinasa (TK) o transferasa de fosforribosilo de hipoxantina-guanina (HGPRT). Estas deficiencias permiten la selección de células fusionadas de acuerdo con su capacidad para crecer en, por ejemplo, medio de hipoxantina aminoptimidina (HAT).

35 **[0071]** Los anticuerpos que tienen una propensión reducida para inducir una respuesta inmune violenta o perjudicial en humanos (tales como choque anafiláctico), y que también exhiben una propensión reducida para cebar una respuesta inmune que impediría la dosificación repetida con el agente terapéutico o de formación de imágenes del anticuerpo (por ejemplo, la respuesta "HAMA" del anticuerpo anti-murino humano), se prefiere para uso en la invención. Estos anticuerpos son preferidos para todas las rutas administrativas. Por lo tanto, los anticuerpos humanos humanizados, quiméricos o xenogénicos, que producen menos de una respuesta inmune cuando se administran a seres humanos, se prefieren para uso en la presente invención.

40 **[0072]** Los anticuerpos quiméricos pueden ser hechos por medios recombinantes mediante la combinación de las regiones murinas de luz variable y cadena pesada (VK y VH), obtenidas a partir de un clon de hibridoma murino (o de otro animal derivado), con la luz constante humana y regiones de cadena pesada, para producir un anticuerpo con dominios predominantemente humanos. La producción de tales anticuerpos quiméricos está bien conocida en la técnica, y puede lograrse por medios estándar (como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 5,624,659). Los anticuerpos humanizados están diseñados para contener incluso más dominios de inmunoglobulina de tipo humano, e incorporan solo las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo derivado de animal. Esto se logra examinando cuidadosamente la secuencia de los bucles hipervariables de las regiones variables del anticuerpo monoclonal, y ajustándolos a la estructura de las cadenas de anticuerpos humanos. Aunque es complejo facialmente, el proceso es sencillo en la práctica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6,187,287.

45 **[0073]** Alternativamente, los anticuerpos policlonales o monoclonales se pueden producir a partir de animales que han sido alterados genéticamente para producir inmunoglobulinas humanas. El animal transgénico puede producirse

produciendo inicialmente un animal "knock-out" que no produce los anticuerpos naturales del animal, y transformando de manera estable el animal con un locus de anticuerpo humano (por ejemplo, mediante el uso de un cromosoma artificial humano). Sólo los anticuerpos humanos son producidos por el animal. Las técnicas para generar tales animales, y derivar anticuerpos de los mismos, se describen en la patente de EE.UU. N^{os} 6,162,963 y 6,150,584. Tales anticuerpos xenogénicos completamente humanos son un anticuerpo preferido para uso en las composiciones de la presente invención. Alternativamente, pueden producirse anticuerpos de cadena única a partir de bibliotecas de fagos que contienen regiones variables humanas. Véase la patente de EE.UU. N^o 6,174,708.

[0074] Además de las inmunoglobulinas enteras (o sus homólogos recombinantes), los fragmentos de inmunoglobulina que comprenden el sitio de unión de epítipo (por ejemplo, Fab', F(ab')₂, u otros fragmentos) son útiles como restos de anticuerpo en la presente invención. Dichos fragmentos de anticuerpos pueden generarse a partir de inmunoglobulinas completas mediante ficina, pepsina, papaína u otra escisión de proteasas. Las "inmunoglobulinas" o "fragmentos" pueden diseñarse utilizando técnicas de inmunoglobulina recombinante. Por ejemplo, las inmunoglobulinas "Fv" para uso en la presente invención pueden producirse uniendo una región de cadena ligera variable a una región de cadena pesada variable a través de un enlazador peptídico (por ejemplo, poliglicina u otra secuencia que no forma una hélice alfa o motivo de hoja beta).

[0075] Los fragmentos Fv son heterodímeros del dominio variable de cadena pesada (V_H) y el dominio de cadena ligera variable (V_L). Los heterodímeros de los dominios de la cadena pesada y ligera que se producen en la IgG completa, por ejemplo, están conectados por un enlace disulfuro. Los Fv recombinantes en los que V_H y V_L están conectados por un enlazador peptídico son típicamente estables, ver, por ejemplo, Huston et al., Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU. 85: 5879 5883 (1988) y Bird et al., Science 242: 423 426 (1988). Estos son Fv de cadena única que se ha encontrado que conservan la especificidad y la afinidad y se ha demostrado que son útiles para la obtención de imágenes de tumores y para producir inmunotoxinas recombinantes para la terapia de tumores. Sin embargo, los investigadores han encontrado que algunos de los Fv de cadena única tienen una afinidad reducida por el antígeno y el enlazador peptídico puede interferir con la unión. Fv mejorados también han sido hechos que comprenden enlaces disulfuro estabilizantes entre las regiones V_H y V_L, como se describe en la Patente de EE.UU. N^o 6,147,203. Cualquiera de estos anticuerpos mínimos se puede utilizar en la presente invención, y los que se humanizan para evitar reacciones de HAMA se prefieren para uso en realizaciones de la invención.

[0076] Los polipéptidos derivatizados con enlazadores químicos añadidos, restos detectables tales como colorantes fluorescentes, enzimas, sustratos, restos quimioluminiscentes, restos de unión específica tales como estreptavidina, avidina, o biotina, o conjugados de fármaco se pueden utilizar en las composiciones de la presente invención.

[0077] En algunas realizaciones, los reactivos de polipéptidos están acoplados o conjugados con uno o más restos terapéuticos, citotóxicos, o de formación de imágenes. Como se usa en este documento, "resto citotóxico" (C) simplemente significa un resto que inhibe el crecimiento celular o promueve la muerte celular cuando está cerca o es absorbido por la célula. Los restos citotóxicos adecuados a este respecto incluyen isótopos radiactivos (radionúclidos), agentes quimioxicóticos tales como inductores de diferenciación y pequeños fármacos quimiotóxicos, proteínas de toxina y derivados de los mismos. Los agentes pueden conjugarse con un reactivo polipeptídico mediante cualquier técnica adecuada, con la consideración apropiada de la necesidad de estabilidad farmacocinética y una toxicidad general reducida para el paciente. Un agente terapéutico se puede acoplar a un resto adecuado ya sea directa o indirectamente (por ejemplo, a través de un grupo enlazador). Una reacción directa es posible cuando cada uno posee un grupo funcional capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleofílico, como un grupo amino o sulfhidrilo, puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente. (por ejemplo, un haluro). Alternativamente, se puede usar un grupo enlazador químico adecuado. Un grupo enlazador puede funcionar como un espaciador para distanciar un reactivo polipeptídico de un agente para evitar la interferencia con las capacidades de unión. Un grupo enlazador también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente en un resto o un reactivo polipeptídico, y así aumentar la eficiencia de acoplamiento. Un aumento en la reactividad química también puede facilitar el uso de fracciones, o grupos funcionales en las mitades, que de otro modo no serían posibles.

[0078] Químicas de enlace adecuadas incluyen enlazadores maleimidilo y enlazadores de haluro de alquilo (que reaccionan con un sulfhidrilo en el resto de anticuerpo) y enlazadores de succinimidilo (que reaccionan con una amina primaria en el resto de anticuerpo). Varios grupos de amina primaria y sulfhidrilo están presentes en las inmunoglobulinas, y se pueden diseñar grupos adicionales en moléculas de inmunoglobulina recombinante. Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden emplear una variedad de reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homo como heterofuncionales (como los descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.) como un grupo enlazador. El acoplamiento puede efectuarse, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o residuos de carbohidratos oxidados. Existen numerosas referencias que describen dicha metodología, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N^o 4,671,958. Como un método de acoplamiento alternativo, los restos citotóxicos se pueden acoplar a un reactivo polipeptídico a través de un grupo de carbohidrato oxidado en un sitio de glicosilación, como se describe en la patente de EE.UU. N^{os} 5,057,313 y 5,156,840. Otro método alternativo para acoplar un reactivo polipeptídico a un resto citotóxico o terapéutico es mediante el uso de un par de unión no covalente, como estreptavidina/biotina, o avinina/biotina. En estas realizaciones, un miembro del par

está acoplado covalentemente al resto anti-CD47, CV1, etc. y el otro miembro del par de unión está acoplado covalentemente al resto terapéutico, citotóxico o de formación de imágenes.

5 [0079] Cuando un resto citotóxico es más potente cuando está libre de la porción de unión de un reactivo de polipéptido, puede ser deseable usar un grupo enlazador que es escindible durante o tras la internalización en una célula, o que se disminuya de forma gradual con el tiempo escindible en el medio extracelular. Se han descrito varios grupos de enlazadores escindibles diferentes. Los mecanismos para la liberación intracelular de un agente de resto citotóxico de estos grupos enlazadores incluyen la escisión por reducción de un enlace disulfuro (por ejemplo, Patente de EE.UU. N° 4,489,710), por irradiación de un enlace fotolábil (por ejemplo, Patente de EE.UU. N° 4,625,014), por hidrólisis de cadenas laterales de aminoácidos derivatizadas (p. ej., Patente de EE.UU. 4,638,045), por hidrólisis mediada por complemento de suero (p. ej., Patente de EE.UU. 4,671,958) y hidrólisis catalizada por ácido (p. ej., EE.UU. Patente N° 4,569,789).

15 [0080] Puede ser deseable acoplar más de un resto a un reactivo polipéptido. Mediante la poli-derivación del reactivo, varias estrategias pueden implementarse simultáneamente, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico puede marcarse para seguimiento mediante una técnica de visualización. Independientemente de la realización particular, los conjugados con más de un resto pueden prepararse de una variedad de formas. Por ejemplo, más de un resto se puede acoplar directamente a una molécula polipeptídica, o se pueden usar enlazadores que proporcionan múltiples sitios para la unión (por ejemplo, dendrímeros). Alternativamente, puede usarse un portador con la capacidad de contener más de un resto citotóxico o de formación de imágenes.

25 [0081] 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 (por ejemplo, Patente de EE.UU. N° 4,507,234), péptidos y polisacáridos tales como aminodextrano (por ejemplo, Patente de EE.UU. N° 4,699,784), cada uno de los cuales tiene múltiples sitios para la unión de restos. Un portador también puede portar un agente por asociaciones no covalentes, como la unión no covalente o por encapsulación, como por ejemplo dentro de una vesícula liposómica (por ejemplo, las patentes estadounidenses N°s 4,429,008 y 4,873,088). Los portadores de encapsulación son especialmente útiles para obtener imágenes de la conjugación de restos con restos de anticuerpos para su uso en la invención, ya que una cantidad suficiente del resto de formación de imágenes (tinte, reactivo de contraste de resonancia magnética, etc.) para la detección puede asociarse más fácilmente con el resto de anticuerpo. Además, los portadores de encapsulación también son útiles en realizaciones terapéuticas quimiotóxicas, ya que pueden permitir que las composiciones terapéuticas liberen gradualmente un resto quimiotóxico a lo largo del tiempo mientras que lo concentran en la vecindad de las células tumorales.

35 [0082] Radionucleidos preferidos para uso como los restos citotóxicos son radionúclidos que son adecuados para la administración farmacológica. Dichos radionucleidos incluyen ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{211}At , ^{67}Cu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{212}Pb y ^{212}Bi . Los isótopos de yodo y astato son radionúclidos más preferidos para su uso en las composiciones terapéuticas de la presente invención, ya que se ha acumulado una gran cantidad de literatura con respecto a su uso.

40 [0083] Los agentes quimiotóxicos preferidos incluyen fármacos de moléculas pequeñas tales como carboplatino, cisplatino, vincristina, taxanos tales como análogos de paclitaxel y docetaxel, hidroxiurea, gemcitabina, vinorelbina, irinotecan, tirapazamina, matrilisina, metotrexato, pirimidina y purina, y otras toxinas pequeñas adecuadas conocidas en la técnica. Los inductores de diferenciación de quimioquinas preferidos incluyen ésteres de forbol y ácido butírico. Los restos quimiotóxicos pueden conjugarse directamente con el resto de anticuerpo a través de un enlazador químico, o pueden encapsularse en un vehículo, que a su vez está acoplado al anticuerpo. Proteínas de toxina preferidas para uso como restos citotóxicos incluyen ricinas A y B, abrina, toxina de la difteria, briedina 1 y 2, momordin, tricocirina, toxina del cólera, gelonina, exotoxina de Pseudomonas, toxina de Shigella, proteína antiviral de pokeweed y otras proteínas de toxina conocidas en técnicas bioquímicas medicinales. Dado que estos agentes de toxina pueden provocar respuestas inmunes indeseables en el paciente, especialmente si se inyectan por vía intravascular, se prefiere que se encapsulen en un vehículo para acoplarse al anticuerpo.

50 [0084] Para la administración, un agente terapéutico específico, o combinación de agentes terapéuticos dirigidos pueden administrarse por separado o en conjunto; y generalmente se administrarán dentro del mismo marco de tiempo general, por ejemplo, dentro de una semana, dentro de 3-4 días, dentro de 1 día o simultáneamente entre sí.

55 [0085] El agente o agentes se mezclan, antes de la administración, con una sustancia de portador aceptable no tóxica farmacéuticamente. Por lo general, esta será una solución acuosa, como solución salina normal o solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución de Ringer, solución de Ringer de lactato o cualquier solución fisiológicamente aceptable isotónica para la administración por los medios elegidos. Preferiblemente, la solución es estéril y libre de pirógenos, y se fabrica y empaqueta según los actuales Good Manufacturing Processes (GMP), según lo aprobado por la FDA. El clínico con habilidades ordinarias está familiarizado con los rangos apropiados para el pH, la adición y los aditivos o conservantes al formular composiciones farmacéuticas para la administración por inyección intravenosa, inyección directa en los ganglios linfáticos, intraperitoneal u otras vías. Además de los aditivos para ajustar el pH o la tonicidad, los agentes pueden estabilizarse contra la agregación y la polimerización con aminoácidos y detergentes no iónicos, polisorbato y polietilenglicol. Opcionalmente, los estabilizadores

adicionales pueden incluir varios carbohidratos y sales fisiológicamente aceptables. Además, se puede agregar polivinilpirrolidona además del aminoácido. Las soluciones terapéuticas de inmunoglobulina adecuadas que se estabilizan para el almacenamiento y la administración a seres humanos se describen en la Patente de EE.UU. N° 5,945,098, Otros agentes, como la albúmina sérica humana (HSA), pueden añadirse a la composición terapéutica o de imagen para estabilizar los conjugados de anticuerpos.

[0086] Las composiciones para uso en la invención se pueden administrar mediante la administración de cualquier procedimiento médicamente apropiado, por ejemplo, intravascular (intravenosa, intraarterial, intracápsular), la inyección en el tumor, etc. La inyección intravascular puede ser mediante inyección intravenosa o inyección intraarterial. La cantidad efectiva de las composiciones terapéuticas que se administrarán a un paciente en particular dependerá de una variedad de factores, varios de los cuales serán diferentes de un paciente a otro. Un médico competente podrá determinar una cantidad eficaz de una composición terapéutica para administrar a un paciente para retardar el crecimiento y promover la muerte de las células tumorales. La dosificación de los agentes dependerá del tratamiento del tumor, la vía de administración, la naturaleza de la terapéutica, la sensibilidad del tumor a la terapéutica, etc. Utilizando datos de animales LD₅₀, y otra información disponible para el conjugado. Un grupo citotóxico o de imagen, un médico puede determinar la dosis máxima segura para un individuo, dependiendo de la vía de administración. Por ejemplo, una dosis administrada por vía intravenosa puede ser más que una dosis administrada localmente, dado el gran cuerpo de líquido en el que se administra la composición terapéutica. De manera similar, las composiciones que se eliminan rápidamente del cuerpo pueden administrarse a dosis más altas, o en dosis repetidas, para mantener una concentración terapéutica. Utilizando una habilidad ordinaria, el clínico competente podrá optimizar la dosificación de una composición terapéutica o de imagen en particular en el curso de ensayos clínicos de rutina.

[0087] Típicamente, una dosis eficaz será de 0,001 a 100 miligramos de anticuerpo por kilogramo de peso corporal del sujeto. La relación de anti-CD47 al segundo agente puede variar de 1:100; 1:50; 1:10; 1:5; 1:2; 1:1; 2:1; 5:1; 10:1; 50:1; 100:1, Los agentes pueden administrarse al sujeto en una serie de más de una administración. Para las composiciones terapéuticas, a veces se requerirá la administración periódica (por ejemplo, cada 2-3 días), o puede ser deseable para reducir la toxicidad. Para composiciones terapéuticas que se utilizarán en regímenes de dosis repetidas, se prefieren los restos de anticuerpos que no provocan HAMA u otras respuestas inmunes.

EJEMPLO 1

[0088] Variantes SIRP α de alta afinidad mejoran la destrucción de macrófagos de cáncer de pulmón de células pequeñas.

[0089] El CD47 permite que las células cancerosas evadan el sistema inmunológico mediante la señalización a través de SIRP α , un receptor inhibitorio en macrófagos. Recientemente desarrollamos antagonistas de CD47 de próxima generación mediante la ingeniería del dominio de inmunoglobulina N-terminal de SIRP α . Estas "variantes de SIRP α de alta afinidad" tienen una afinidad por CD47 humano (K_D) tan baja como 11,1 pM, aproximadamente 50.000 veces mejor que la SIRP α de tipo silvestre. Cuando se combinan con anticuerpos específicos del tumor, las variantes de SIRP α de alta afinidad actúan como adyuvantes inmunoterapéuticos para maximizar la destrucción de macrófagos de las células cancerosas.

[0090] Hemos aplicado ahora estos reactivos a cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), un cáncer con un mal pronóstico para los cuales existen anticuerpos clínicamente ensayados. Encontramos líneas celulares CPCP y las muestras primarias expresaron altos niveles de CD47 en su superficie. Usando macrófagos humanos, encontramos que las terapias de bloqueo de CD47 eran capaces de inducir la fagocitosis de macrófagos de células de CPCP. El tratamiento de ratones con tumores primarios de CPCP en humanos con anticuerpos bloqueadores de CD47 fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral y prolongar significativamente la supervivencia. Para identificar los nuevos antígenos de CPCP que pueden ser atacados en combinación con variantes de SIRP α de alta afinidad, las muestras de CPCP se seleccionaron mediante citometría de flujo utilizando ensayos integrales de anticuerpos.

[0091] Hemos validado antígenos específicos de tumores en la superficie de las células de CPCP, y anticuerpos identificados a estos antígenos que podrían estimular la fagocitosis in vitro. Cuando se combinaron con monómeros de SIRP α de alta afinidad, la capacidad de estos anticuerpos para estimular la fagocitosis se incrementó dramáticamente.

Ejemplo 2

[0092] Las terapias de bloqueo de CD47 estimulan la destrucción de macrófagos del cáncer de pulmón de células pequeñas.

[0093] El cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) es un subtipo muy agresivo de cáncer de pulmón con pronóstico sombrío. No hay anticuerpos, terapias dirigidas o inmunoterapias ensayadas clínicamente para la enfermedad. Encontramos que las muestras de CPCP expresaban altos niveles de CD47, una molécula de la superficie celular que permite que las células cancerosas evadan el sistema inmunológico. En particular, el CD47

promueve la evasión inmune mediante la señalización a través de SIRPa, un receptor inhibitor en macrófagos. Nuestra hipótesis es que las terapias de bloqueo de CD47 podrían aplicarse al tratamiento del CPCP. Encontramos que las terapias de bloqueo de CD47 fueron capaces de inducir la fagocitosis de macrófagos de muestras de CPCP in vitro. Las terapias de bloqueo de CD47 también inhibieron el crecimiento del tumor y la supervivencia significativamente prolongada de ratones que tenían tumores de CPCP. Además, utilizando matrices de anticuerpos integrales, identificamos varias dianas terapéuticas nuevas y establecidas en la superficie de las células CPCP. Los anticuerpos contra estos objetivos podrían provocar fagocitosis de macrófagos y se mejoraron cuando se combinaron con terapias de bloqueo de CD47. Estos hallazgos sugieren que las terapias que interrumpen el eje CD47-SIRPa podrían beneficiar a los pacientes con CPCP, particularmente cuando se combinan con anticuerpos específicos para el tumor.

[0094] El cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), que se deriva de las células neuroendocrinas del pulmón, es uno de los subtipos de cáncer más letales en los seres humanos. Cada año, más de 25.000 pacientes son diagnosticados con CPCP solo en los Estados Unidos, y los pacientes generalmente viven solo de 6 a 12 meses después del diagnóstico. La tasa de supervivencia a 5 años se ha mantenido deprimente, rondando el 5% desde la década de 1970. A excepción de la combinación de radiación y quimioterapia, no ha habido nuevos enfoques terapéuticos implementados en los últimos 30 años. A pesar de una gran cantidad de ensayos clínicos, no se han ensayado terapias dirigidas para el CPCP. CPCP está fuertemente vinculado al consumo excesivo de cigarrillos, y el aumento de las tasas de tabaquismo en los países en desarrollo continuará aumentando la prevalencia mundial de CPCP en el futuro. Por estas razones, existe la necesidad de identificar nuevas dianas terapéuticas y generar nuevos tratamientos para pacientes con CPCP.

[0095] Uno de los avances más prometedores en el campo de la oncología es la inmunoterapia, que tiene como objetivo estimular el propio sistema inmune del paciente para atacar y eliminar el cáncer. A medida que los tumores se desarrollan, adquieren mecanismos para evitar la destrucción del sistema inmunológico. Al comprender estos mecanismos, podemos desarrollar nuevas estrategias para persuadir al sistema inmunitario a reconocer el cáncer como foráneo. Estudios anteriores han identificado CD47, una molécula de superficie celular, como un "marcador de sí mismo" que evita que las células del sistema inmune innato ataquen las neoplasias malignas hematológicas y ciertos tipos de tumores sólidos. El CD47 actúa enviando señales inhibitorias a través de SIRPa, un receptor expresado en la superficie de los macrófagos y otras células mieloides. En este sentido, la interacción CD47-SIRPα representa un punto de control inmunológico específico de la mieloides. Un número de reactivos se han generado para interrumpir la señalización por el eje CD47-SIRPa, incluyendo anticuerpos anti-CD47 y variantes de ingeniería de su receptor, SIRPα. Estudios recientes han demostrado que el bloqueo de CD47 reduce el umbral para la fagocitosis del cáncer por macrófagos. Planteamos la hipótesis de que las células de CPCP también expresan CD47 y que las terapias de bloqueo de CD47 podrían usarse para estimular la fagocitosis de macrófagos de las células de CPCP e inhibir el crecimiento de tumores de CPCP in vivo.

[0096] Además, las terapias CD47 de bloqueo se han mostrado para mejorar la respuesta de los macrófagos a anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales, como el rituximab para el linfoma o el trastuzumab para el cáncer de mama Her2⁺, han demostrado un éxito inmenso en el tratamiento del cáncer. Ningún anticuerpo monoclonal está clínicamente ensayado para el tratamiento de CPCP, por lo tanto, nuestro objetivo fue identificar nuevos antígenos de superficie de CPCP que podrían ser atacados con anticuerpos monoclonales. Si bien el tratamiento con anticuerpos monoclonales puede producir efectos antitumorales robustos, a menudo no logran obtener curas cuando se usan como agentes individuales, lo que resalta la necesidad de mejorar la eficacia de estos enfoques. Por lo tanto, nuestro objetivo fue combinar las terapias de bloqueo de CD47 con otros anticuerpos para lograr respuestas antitumorales máximas contra el CPCP.

[0097] Como un primer paso en nuestro enfoque, se investigó si el CD47 se expresa en la superficie de las muestras de CPCP. A continuación, examinamos si las terapias de bloqueo de CD47 podrían estimular la fagocitosis de macrófagos del CPCP in vitro. Se utilizaron modelos de cáncer humano en ratones para evaluar la respuesta de las muestras de CPCP a las terapias de bloqueo de CD47 in vivo. Para identificar nuevas dianas terapéuticas en la superficie de las muestras de CPCP, realizamos citometría de flujo de alto rendimiento utilizando matrices integrales de anticuerpos. Por último, nos propusimos demostrar que los anticuerpos hacia los antígenos identificados podrían combinarse con terapias de bloqueo de CD47 para aumentar aún más la fagocitosis. Los objetivos generales de este estudio fueron validar las terapias de bloqueo de CD47 para CPCP e identificar anticuerpos adicionales que podrían usarse para dirigirse a CPCP. De esta manera, nuestro objetivo es identificar nuevas combinaciones inmunoterapéuticas que podrían utilizarse en beneficio de los pacientes con CPCP.

Resultados

[0098] El CD47 se expresa en la superficie de CPCP. Para evaluar si las terapias de bloqueo de CD47 podrían aplicarse a CPCP, primero examinamos la expresión de CD47 en la superficie de las células de CPCP. Obtuvimos seis líneas celulares de CPCP y las sometimos a citometría de flujo para evaluar la expresión de CD47 en la superficie celular. Las seis líneas celulares mostraron una alta expresión de CD47 (Figura 5A). También evaluamos la expresión de superficie de CD47 en un xenoinjerto derivado de un paciente de CPCP obtenido de una muestra de un paciente de CPCP primaria. Al igual que las líneas celulares, la muestra del paciente H29 también expresó altos

niveles de CD47 en su superficie (Figura 5B). Estos hallazgos sugieren que CD47 es un objetivo inmunoterapéutico en el CPCP.

[0099] *Los anticuerpos de bloqueo de CD47 inducen la fagocitosis de CPCP por los macrófagos humanos.* Para validar el CD47 como un objetivo terapéutico genuino en el CPCP, realizamos ensayos de fagocitosis in vitro utilizando macrófagos humanos y muestras de CPCP. Los macrófagos se cultivaron conjuntamente con células CPCP en presencia de un control de vehículo o anticuerpos anti-CD47. Ensayamos el clon del anticuerpo anti-CD47 Hu5F9-G4, un anticuerpo anti-CD47 humanizado que bloquea la interacción entre CD47 y SIRPa y está bajo investigación en un ensayo clínico de Fase I para tumores sólidos (Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT02216409). La citometría de flujo de alto rendimiento se usó para medir la fagocitosis, que se evaluó por el porcentaje de macrófagos que engullen células de CPCP marcadas con AM de calceína (Figura 5C y D). La clasificación de células activadas por fluorescencia se usó para confirmar que la población doble positiva contenía macrófagos con células tumorales envueltas (Figura 5E). Cuatro muestras de CPCP se sometieron a evaluación en ensayos de fagocitosis. Tres líneas celulares (NCI-H524, NCI-1688 y NCI-H82) mostraron aumentos significativos en la fagocitosis cuando se trataron con el anticuerpo bloqueador de CD47 (Figura 5F). Una línea celular, NCI-H196, parecía ser resistente a la fagocitosis, lo que sugiere que mecanismos adicionales modifican la susceptibilidad de esta línea celular al ataque de macrófagos. El xenoinjerto H29 derivado del paciente también se sometió a ensayos de fagocitosis con macrófagos humanos. El tratamiento de esta muestra con anticuerpos anti-CD47 también resultó en un aumento significativo de la fagocitosis (Figura 5G).

[0100] *Los anticuerpos bloqueantes de CD47 inhiben el crecimiento de tumores CPCP in vivo.* Para evaluar el potencial de los agentes bloqueadores de CD47 cuando se administran como terapias para el CPCP humano, establecimos modelos de xenoinjerto del CPCP humano. Grabamos células NCI-H82 en los flancos inferiores izquierdos de ratones NSG, que carecen de células T funcionales, células B, y células NK pero conservan macrófagos funcionales. Aproximadamente una semana después del injerto, los ratones fueron aleatorizados en el tratamiento con el control del vehículo o 250 µg de anticuerpo anti-CD47 clon Hu5F9-G4 administrado un día sí un día no. Las mediciones del volumen tumoral se utilizaron para evaluar ratones para una respuesta a la terapia. Después de dos semanas de tratamiento, se observó una diferencia significativa en el volumen mediano del tumor que persistió durante el resto del experimento (Figura 6A). Después de aproximadamente un mes de tratamiento, el volumen mediano del tumor para la cohorte de control del vehículo fue de 837,8 mm³ en comparación con 160,2 mm³ para la cohorte tratada con el anticuerpo anti-CD47 ($P = 0,0281$). Por lo tanto, el anticuerpo bloqueador de CD47 fue capaz de producir una inhibición significativa del crecimiento del tumor.

[0101] Se creó una línea celular GFP-luciferasa+NCI-H82 para controlar el crecimiento y la difusión in vivo. Como modelo ortopédico de CPCP humano, involucramos las células GFP-luciferasa+NCI-H82 en el espacio intratorácico izquierdo. Cuatro días después de las inyecciones, se confirmó el injerto mediante imágenes de bioluminiscencia. A continuación, asignamos al azar ratones en dos cohortes tratadas con control de vehículo o 250 µg de clon de anticuerpo anti-CD47 Hu5F9-G4 administrados cada dos días. Monitoreamos el crecimiento del tumor a lo largo del tiempo mediante imágenes de bioluminiscencia. De nuevo, el anticuerpo bloqueador de CD47 produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral. Además, observamos un beneficio significativo en la supervivencia para la cohorte tratada con el anticuerpo bloqueador de CD47. El análisis post-mortem reveló tumores formados dentro de la cavidad torácica o en la región paratorácica. Los ratones en el grupo de control del vehículo también mostraron metástasis sustanciales en el hígado, que no se observaron en la cohorte tratada con el anticuerpo anti-CD47.

[0102] Dado que las líneas celulares típicamente representan poblaciones clonales de células, a continuación ensayamos la eficacia in vivo de los anticuerpos bloqueadores de CD47 en un xenoinjerto derivado del paciente, que modela de manera más cercana el tratamiento en pacientes ya que mantiene la heterogeneidad del cáncer. Poblaciones celulares dentro de un tumor. La muestra de CPCP primaria H29 se transdujo para expresar GFP-luciferasa para permitir mediciones dinámicas del crecimiento tumoral in vivo. Luego, los tumores se injertaron en los flancos inferiores izquierdos de los ratones y se dejaron establecer durante aproximadamente 2 semanas. Los ratones se asignaron al azar en dos cohortes de tratamiento con control de vehículo o 250 µg de clon de anticuerpo anti-CD47 Hu5F9-G4 administrados cada dos días. Encontramos que el anticuerpo anti-CD47 inhibió significativamente el crecimiento del tumor, según lo evaluado por las mediciones del volumen del tumor y las imágenes de bioluminiscencia (Figura 6B-D). El tratamiento con la terapia de bloqueo de CD47 también produjo beneficios significativos en la supervivencia. Para el día 125 posterior al injerto, todos los ratones del grupo de control habían muerto, mientras que la mayoría de los ratones del grupo de anticuerpos anti-CD47 solo tenían tumores pequeños que no habían progresado incluso después de 225 días del injerto (Figura 6E). Estos modelos demuestran que las terapias de bloqueo de CD47 podrían ser efectivas para pacientes con CPCP.

[0103] *El suero MCP-3 es un biomarcador de respuesta a las terapias de bloqueo de CD47.* Para identificar posibles biomarcadores como respuesta a las terapias de bloqueo de CD47, volvimos a injertar ratones con células NCI-H82, Permitimos que los tumores crezcan a aproximadamente 1,5 cm de diámetro y luego tratamos a los ratones con una dosis única de control de vehículo o con el clon de anticuerpo anti-CD47 Hu5F9-G4. Recolectamos muestras de suero inmediatamente antes del tratamiento y 24 horas después del tratamiento. Sometimos las muestras de suero a múltiples análisis de 38 citoquinas. A partir de este análisis, encontramos que la proteína 3 quimiotáctica de macrófagos (MCP-3) se incrementó sistémicamente luego del tratamiento con el anticuerpo anti CD47 Hu5F9-G4

(Figura 7A). No se observó ningún aumento significativo en MCP-3 en ratones sin tumores que se trataron con el clon de anticuerpo anti-CD47 Hu5F9-G4 (Figura 7A). También realizamos un experimento similar utilizando el xenoinjerto derivado del paciente H29. De nuevo, los ratones con tumores se sometieron a una dosis única del clon del anticuerpo anti-CD47 Hu5F9-G4. El análisis de citoquinas en suero reveló de nuevo que la MCP-3 aumentó significativamente después del tratamiento con el anticuerpo de bloqueo CD47 (Figura 7B). Por lo tanto, MCP-3 puede servir como un biomarcador de respuesta a las terapias de bloqueo de CD47 en pacientes. La secreción de MCP-3 puede ser un mecanismo de retroalimentación positiva que recluta más macrófagos al tumor y podría explicar en parte los efectos robustos de las terapias de bloqueo de CD47 in vivo.

[0104] *Las matrices de anticuerpos integrales identifican los objetivos terapéuticos en el CPCP.* Los anticuerpos monoclonales han demostrado ser algunos de los tratamientos más efectivos para el cáncer. Sin embargo, hay pocas dianas de anticuerpos conocidas en la superficie de CPCP. Por este motivo, nuestro objetivo fue caracterizar el perfil de antígeno de superficie de las células CPCP utilizando matrices de anticuerpos integrales. Sometimos cuatro líneas celulares de CPCP y la muestra primaria de CPCP H29 a un análisis utilizando la matriz BioLegend LEGENDScreen, una colección completa de 332 anticuerpos contra antígenos de superficie de células humanas. ***Discusión del histograma para definir antígenos negativos, bajos y altos (Figura 8A). Identificamos 39 antígenos que fueron altamente expresados en la superficie de las muestras de CPCP, lo que los hace posibles blancos de anticuerpos terapéuticos. Cuando clasificamos estos antígenos según su intensidad de tinción media, encontramos que el CD47 fue el antígeno de superficie de tinción más intensa (Figura 8B). Otro antígeno altamente expresado en todas las muestras fue CD56 (NCAM), un marcador conocido de tumores neuroendocrinos y un objetivo terapéutico actualmente en evaluación para CPCP, validando así nuestro enfoque. También se identificaron varios otros antígenos de superficie altamente expresados que podrían ser dirigidos por terapias con anticuerpos monoclonales, incluyendo CD24, CD29 y CD99 (Figura 8B). Curiosamente, otros ligandos del punto de control inmunitario, como CD80, CD86, PD-L1 o PD-L2, no se expresaron apreciablemente en la superficie de las muestras de CPCP.

[0105] *Combinación de anticuerpos con bloqueo de CD47 mejora la fagocitosis del CPCP.* Para evaluar el potencial terapéutico de los antígenos identificados por los ensayos LEG-ENDScreen, a continuación evaluamos su capacidad de ser atacados por anticuerpos e inducir la fagocitosis in vitro. Obtuvimos anticuerpos contra varios antígenos de superficie altamente expresados, incluidos CD56 (clones HCD56 y MEM-188), CD24, CD29 y CD99. Además, obtuvimos la secuencia de lorvotuzumab, un anticuerpo anti-CD56 que se está evaluando en ensayos clínicos como un conjugado anticuerpo-fármaco, y lo producimos de forma recombinante como un anticuerpo desnudo. Ensayamos estos anticuerpos solos y en combinación con el antagonista de CD47 de alta afinidad CV1, que bloquea a CD47 pero no contribuye con un estímulo Fc adicional (Figura 9A y B). Ensayamos la capacidad de estos anticuerpos para inducir la fagocitosis por macrófagos humanos de dos líneas celulares de CPCP diferentes, NCI-H82 (Figura 9A) y NCI-H524 (Figura 9B). De los tres anticuerpos anti-CD56 ensayados, encontramos que el lorvotuzumab fue capaz de producir el mayor aumento de la fagocitosis, y este efecto se mejoró significativamente mediante la combinación con CV1. Los anticuerpos contra CD24 o CD99 también fueron capaces de inducir una fagocitosis comparable o superior a la del tratamiento con el clon anti-CD47 Hu5F9-G4. Como se esperaba, la fagocitosis con Hu5F9-G4 se bloqueó completamente cuando se combinó con CV1, ya que CV1 compite por la misma superficie de unión y se une con una afinidad extremadamente alta. Curiosamente, el anticuerpo anti-CD29 no fue capaz de inducir fagocitosis incluso en combinación con CV1, una demostración importante de que factores adicionales como la geometría de unión a la superficie o la capacidad de participar en los receptores Fc pueden modificar la respuesta de los macrófagos a anticuerpos terapéuticos.

[0106] Dado que el lorvotuzumab está bajo evaluación como un agente terapéutico para el CPCP, investigamos su capacidad para inducir fagocitosis en un rango variable de concentraciones. El tratamiento con lorvotuzumab solo produjo una relación dosis-respuesta para inducir la fagocitosis de macrófagos. Es importante destacar que, en cada concentración de lorvotuzumab analizada, la adición de CV1 produjo un mayor grado de fagocitosis (Figura 9C). Estos hallazgos demuestran que CV1 podría aumentar tanto la eficacia máxima como la potencia de lorvotuzumab, como se observó anteriormente cuando CV1 se combinó con rituximab, trastuzumab y cetuximab.

[0107] Debido a su mal pronóstico y la escasez de opciones de tratamiento efectivas, existe una necesidad inminente de identificar nuevos tratamientos para el CPCP. Las inmunoterapias están surgiendo como algunas de las nuevas terapias más prometedoras para el cáncer, y aquí mostramos que el CD47, el punto de control inmunológico específico del mieloides, es un verdadero objetivo inmunoterapéutico para el CPCP. CD47 fue altamente expresado en la superficie de todas las muestras de CPCP analizadas, y encontramos que el bloqueo de macrófagos con CD47 permitía la realización de muestras de CPCP in vitro. Usando múltiples modelos de xenoinjerto, el anticuerpo Hu5F9-G4 bloqueador de CD47 fue capaz de inhibir el crecimiento del tumor y prolongar la supervivencia de los ratones portadores de tumores CPCP. De manera importante, observamos la eficacia antitumoral en un modelo de xenoinjerto derivado del paciente de CPCP, que mantiene la complejidad de la población de células iniciadoras del tumor y, por lo tanto, sirve como un modelo más preciso para el tratamiento en humanos. Además, identificamos MCP-3 como un biomarcador de suero que se correlaciona con la respuesta a las terapias de bloqueo de CD47, dado que el anticuerpo anti-CD47 Hu5F9-G4 se está investigando en un ensayo clínico de Fase I para tumores malignos sólidos humanos (Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT02216409), nuestros hallazgos brindan una justificación científica para una evaluación adicional de los anticuerpos anti-CD47 en subconjuntos de pacientes con CPCP.

[0108] Además, mediante el uso de matrices de anticuerpos integrales, identificamos varios antígenos en la superficie de las muestras de CPCP que podrían dirigirse con terapias de anticuerpos monoclonales. Usando la variante de SIRP α CV1, un antagonista de CD47 de próxima generación, encontramos que el bloqueo de CD47 aumentaba la eficacia de los anticuerpos antitumor para CPCP, como se ha demostrado para otros cánceres. La combinación de variantes de SIRP α de alta afinidad con anticuerpos de unión a tumores independientes proporcionó una estrategia óptima para apuntar a CD47 en CPCP. El bloqueo de CD47 en la superficie de CPCP no fue suficiente para inducir la fagocitosis de macrófagos, pero en cambio aumentó la fagocitosis de macrófagos cuando están presentes anticuerpos de unión a CPCP. Los anticuerpos contra CD56, CD24 y CD99 demostraron ser efectivos para inducir la fagocitosis de CPCP, particularmente cuando se combinaron con CV1,

[0109] Además, encontramos que el bloqueo de CD47 fue capaz de mejorar la eficacia de lorvotuzumab, un anticuerpo que avanza a través de ensayos clínicos para CPCP como un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) con el agente citotóxico mertansina. La combinación de anticuerpos terapéuticos con terapias de bloqueo de CD47 representa un método alternativo para mejorar la eficacia de los anticuerpos terapéuticos. Un beneficio de CV1 sobre ADC es que puede combinarse con cualquier anticuerpo sin ingeniería adicional. Los ADC a menudo dependen de la internalización para entregar su carga útil citotóxica, y esta dependencia puede limitar la eficacia y aumentar los efectos secundarios. Dado que el bloqueo de CD47 estimula a los macrófagos para identificar células para su eliminación, puede haber una capa adicional de especificidad conferida por las interacciones célula-célula que la lograda por los ADC. No obstante, es probable que incluso lorvotuzumab-mertansina pueda beneficiarse de la combinación con CV1 si se conserva la capacidad de participar en los receptores Fc.

[0110] Nuestro enfoque para identificar nuevos antígenos de superficie de CPCP se puede aplicar a otros tipos de cáncer, y en el futuro podría usarse para ensamblar cócteles oligoclonales de anticuerpos que podrían usarse para simular la respuesta inmune humoral natural contra patógenos o células extrañas. Estos cócteles podrían combinarse con terapias de bloqueo de CD47 y otras inmunoterapias para montar una respuesta inmunitaria eficaz contra las células de CPCP. Estos estudios muestran que el CPCP responde a las terapias de bloqueo de CD47,

Materiales y métodos

[0111] Líneas celulares y cultivo: NCI-H82, NCI-524, NCI H69 y NCI-1688 se obtuvieron de ATCC. Las células se cultivaron en RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10% (Hyclone), 1x Glutamax (Invitrogen), y 100 U/mL de penicilina y 100 ug/mL de estreptomina (Vitrógeno). Las líneas celulares se cultivaron en suspensión (NCI-H82, NCI-524, NCI-H69) y se disociaron mediante pipeteo suave o breve incubación con 1x TrypLE (Invitrogen). Las células NCI-1688 se cultivaron en monocapas adherentes y se eliminaron mediante breve incubación con 1x TrypLE. Las líneas celulares se cultivaron en incubadoras humidificadas a 37°C con 5% de dióxido de carbono.

[0112] Diferenciación de macrófagos humanos: las cámaras del sistema de reducción de leucocitos se obtuvieron de donantes de sangre anónimos en el Centro de Sangre de Stanford. Los monocitos se purificaron en un AutoMACS (Miltenyi) usando microperlas CD14⁺ o microcuentas CD14⁺ de sangre completa (Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los monocitos CD14⁺ purificados se colocaron en placas de cultivo de tejidos de 15 cm a una densidad de 10 millones de monocitos por placa. Los monocitos se diferenciaron a macrófagos por cultivo en IMDM suplementado con 10% de suero A-B humano (Invitrogen), 1x GlutaMax (Invitrogen) y 100 U/mL de penicilina y 100 ug/mL de estreptomina durante aproximadamente 7-10 días.

[0113] Ensayos de fagocitosis in vitro: los ensayos de fagocitosis in vitro se realizaron como se describió anteriormente. Brevemente, las células cancerosas CPCP se retiraron de las placas y se lavaron con IMDM sin suero. Se usaron células GFP-luciferasa⁺ o células marcadas con calceína AM (Invitrogen) como células diana. Los macrófagos se lavaron dos veces con HB-SS, luego se incubaron con 1x TrypLE durante aproximadamente 20 minutos en incubadoras humidificadas a 37°C. Los macrófagos se extrajeron de las placas con elevadores de células (Corning) y luego se lavaron dos veces con IMDM sin suero. Las reacciones de fagocitosis se llevaron a cabo utilizando 50.000 macrófagos y 100.000 células tumorales. Las células se cocultivaron durante dos horas a 37°C en presencia de terapias con anticuerpos. Después del cocultivo, las células se lavaron con un tampón de funcionamiento autoMACS (Miltenyi) y se prepararon para el análisis por citometría de flujo. Los macrófagos se tiñeron usando anticuerpos conjugados con fluoróforo para CD45 (BioLegend) en presencia de 100 μ g/ml de IgG de ratón (Lampire). Las células muertas se excluyeron del análisis mediante tinción con DAPI (Sigma). Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un LSRFortessa (BD Biosciences) equipado con un muestreador de alto rendimiento. La fagocitosis se evaluó como el porcentaje de macrófagos de calceína-AM⁺ utilizando FlowJo v9.4.10 (Tree Star) y se normalizó a la respuesta máxima de cada donante independiente cuando se indicó. Se determinó la significación estadística y los datos se ajustaron a las curvas de dosis-respuesta sigmoidales utilizando Prism 5 (Graphpad).

[0114] Reactivos adicionales utilizados en la fagocitosis incluyen la variante SIRP α de alta afinidad monómero CV1, que se había producido como se describió anteriormente y se utiliza a una concentración de 1 μ m para bloquear. Se usaron anticuerpos contra los antígenos de CPCP identificados en los ensayos de fagocitosis a una concentración de 10 μ g/ml, incluido el clon anti-CD56 (NCAM) HCD56 (BioLegend), anti-CD56 (NCAM), clon MEM-188

(BioLegend), anti-CD24 clon ML5 (Biolegend), anti-CD29 clon TS2/16 (BioLegend), clon anti-CD99 12E7 (Abcam). Además, lorvotuzumab se elaboró de forma recombinante utilizando las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera disponibles en la base de datos de KEGG (Drug: D09927). Las regiones variables de lorvotuzumab se clonaron en pFUSE-CHlg-hG1 y pFUSE2-CLlg-hK (Invivogen) para la expresión. El lorvotuzumab se produjo de forma recombinante mediante transfección transitoria de células 293F (Invitrogen) utilizando 293fectina (Invitrogen), seguido de purificación sobre una columna de Proteína A HiTrap (GE Healthcare). El anticuerpo purificado se eluyó con tampón citrato 100 mM (pH 3,0) y se neutralizó con 1/10^o volumen de tampón tris (pH 8,0). El anticuerpo se desalificó utilizando una columna PD-10 (GE Healthcare).

[0115] Clasificación de las poblaciones de macrófagos después de la fagocitosis: 2,5 millones de macrófagos humanos se combinaron con 5 millones células GFP⁺ NCI-H82 y 10 µg/ml de anticuerpo anti-CD47 (clon Hu5F9-G4) en medio libre de suero y se incubaron durante dos horas. Los macrófagos se identificaron mediante tinción con anti-CD45 y las poblaciones de macrófagos se clasificaron en un clasificador de células FACSAria II (BD Biosciences). Las células de las poblaciones clasificadas se centrifugaron en portaobjetos de microscopio y luego se tiñeron con tinción de Wright-Giemsa modificada (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se tomaron imágenes en un microscopio de luz vertical DM5500 B (Leica).

[0116] Ratones: Los ratones Nod.Cg-PRKDC^{scid} IL2RG^{tm1Wjl}/SZJ (NSG) se utilizaron para todos los experimentos in vivo. Los ratones fueron injertados con tumores en aproximadamente 6-10 semanas de edad, y los experimentos se realizaron con cohortes emparejados por edad y sexo. Los ratones se mantuvieron en una instalación de barrera bajo el cuidado del Centro de Servicios Veterinarios de Stanford y se manejaron de acuerdo con los protocolos ensayados por el Panel Administrativo de la Universidad de Stanford para el Cuidado de Animales de Laboratorio.

[0117] Modelos in vivo de tratamiento de CPCP: 1,25 X 10⁶ células NCI H82 se injertaron por vía subcutánea en los flancos de ratones GSN. Los tumores se dejaron crecer durante 8 días, luego los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento con PBS o 250 µg de anticuerpo anti-CD47 (clon Hu5F9-G4). El tratamiento se administró en días alternos mediante inyección intraperitoneal. El crecimiento del tumor se controló mediante mediciones de la dimensión de la troma que se usaron para calcular los volúmenes de tumores de acuerdo con la fórmula del elipsoide ($\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho}^2$). Para un modelo de xenoinjerto de CPCP derivado del paciente, 3 X 10⁶ células GFP-luciferasa+H29 se injertaron por vía subcutánea con Matrigel al 25% (BD Biociencias) en los flancos de ratones NSG. Se permitió que los tumores crecieran durante 15 días, luego los ratones se asignaron al azar al tratamiento con grupos de tratamiento con PBS o 250 µg de anticuerpo anti-CD47 (clon Hu5F9-G4). El tratamiento se administró cada dos días por inyección intraperitoneal. El crecimiento del tumor se controló mediante imágenes de bioluminiscencia y mediciones del volumen del tumor como se describió anteriormente. La importancia estadística del crecimiento del tumor se determinó mediante la prueba de Mann-Whitney. La supervivencia se analizó mediante la prueba de Mantel-Cox. Se realizaron experimentos piloto in vivo con células H82 y células H29 con cohortes más pequeñas de ratones con resultados similares.

[0118] La fluorescencia de GFP de nódulos tumorales se visualizó en un microscopio de disección fluorescente M205 FA (Leica) equipado con una cámara DFC 500 (Leica).

[0119] Imágenes de bioluminiscencia: ratones portadores de GFP-luciferasa+tumores se obtuvieron imágenes como se describe anteriormente. Brevemente, a los ratones anestesiados se les inyectó 200 µl de sal de potasio (Biosynth) de luciferina D (luciérnaga) reconstituida a 16,67 mg/ml en PBS estéril. Las imágenes de bioluminiscencia se realizaron utilizando un Espectro IVIS (Caliper Life Science) durante 20 minutos para registrar la radiancia máxima. Los valores máximos de flujo total se evaluaron a partir de la región anatómica de interés utilizando Living Image 4.0 (Caliper Life Sciences) y se utilizaron para el análisis.

[0120] Detección exhaustiva de anticuerpos basada en FACS: los antígenos en la superficie de las muestras de CPCP se analizaron utilizando los kits de detección de células humanas LEGENDScreen (BioLegend), de acuerdo con el protocolo del fabricante con las siguientes modificaciones. Brevemente, los anticuerpos liofilizados se reconstituyeron en agua de grado de biología molecular y se agregaron a muestras de células a una dilución de 1:8, Aproximadamente 20-40 X 10⁶ células totales se utilizaron para el análisis por muestra de CPCP. NCI-H82 se marcó con calcio-AM y se analizó simultáneamente con NCI-H524, NCI-H69 se marcó con calceína-AM y se analizó simultáneamente con NCI-H1688. La muestra primaria de pacientes H69 se analizó de forma independiente. Se separó recientemente de un xenoinjerto de paso bajo y las células de la línea de ratón se excluyeron del análisis mediante tinción con H-2K_a anti-ratón de Pacific Blue (BioLegend). Las muestras se incubaron con anticuerpos durante 30 minutos en hielo protegido de la luz. Para todas las muestras, las células muertas se excluyeron del análisis mediante tinción con DAPI. Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Parque CY, Chao MP, Majeti R, et al. El CD47 está regulado al alza sobre las células madre hemopoyéticas en circulación y las células leucémicas para evitar la fagocitosis. Cell. 2009; 138: 271-85, Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, Jr., y otros. El CD47 es un factor de pronóstico adverso y un objetivo de anticuerpos terapéuticos en las células madre de la leucemia mieloide aguda humana. Cell. 2009; 138: 286-99, Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P, Mitra SS, et al. La interacción de la proteína reguladora de señal CD47 (SIRPa) es un objetivo terapéutico para los tumores humanos sólidos. Procedimientos de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América. 2012; 109: 6662-7,

- Weiskopf K, Ring AM, Ho CC, Volkmer JP, Levin AM, Volkmer AK, et al. Variantes de SIRPalfa diseñadas como adyuvantes inmunoterapéuticos de los anticuerpos contra el cáncer. *Science*. 2013,
- Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Myklebust JH, Varghese B, Gill S, et al. El anticuerpo anti-CD47 se sinergiza con rituximab para promover la fagocitosis y erradicar el linfoma no Hodgkin. *Cell*. 142: 699-713.
- 5 Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) terapia con anticuerpos monoclonales anti-CD20 en pacientes con recaída de linfoma no Hodgkin de grado bajo. *Blood*. 1997; 90: 2188-95,
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Eficacia y seguridad del trastuzumab como agente único en el tratamiento de primera línea del cáncer de mama metastásico con sobreexpresión de HER2, *J Clin Oncol*. 2002; 20: 719-26,
- 10 Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab y quimioterapia como tratamiento inicial para el cáncer colorrectal metastásico. *N Engl J Med*. 2009; 360: 1408-17,
- . Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, Sahoo D, Dalerba P, Mitra SS, et al. La interacción de la proteína reguladora alfa de señal CD47 (SIRPa) es un objetivo terapéutico para los tumores sólidos humanos. *Proc Natl Acad Sci EE.UU*. 109: 6662-7,
- 15 Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, et al. Desarrollo de células linfoides y mieloides humanas en ratones gamma nulos IL2R NOD/LtSz-scid engendrados con células madre hemopoyéticas humanas movilizadas. *Journal of immunology*. 2005; 174: 6477-89.

20

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un agente dirigido que bloquea selectivamente CD47 que se une a SIRP α , para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón de células pequeñas en un paciente, administrando:
- (i) el agente dirigido que bloquea selectivamente la unión de CD47 a SIRP α en combinación con
 - (ii) un anticuerpo que se une específicamente a uno o más antígenos de la superficie celular en células de cáncer de pulmón, en donde el agente que bloquea selectivamente la unión de CD47 a SIRP α es:
- 10 (a) un anticuerpo que se une específicamente a CD47,
 (b) un anticuerpo que se une específicamente a SIRP α , o
 (c) un polipéptido SIRP α soluble,
- 15 y en el que el uno o más antígenos de la superficie celular en las células de cáncer de pulmón se seleccionan de entre Ep-CAM, CD24, CD166, CD56, CD326, CD298, CD29, CD63, CD9, CD164, CD99, CD46, CD59, CD57 y CD165.
- 20 **2.** Un anticuerpo que se une específicamente a uno o más antígenos de la superficie celular en células de cáncer de pulmón, para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón de células pequeñas en un paciente, mediante la administración de:
- (i) el anticuerpo que se une específicamente a uno o más antígenos de la superficie celular en células de cáncer de pulmón en combinación con
 - (ii) un agente dirigido que bloquea selectivamente la unión de CD47 a SIRP α ,
 - (iii) en donde el agente que bloquea selectivamente la unión de CD47 a SIRP α es:
- 25 (a) un anticuerpo que se une específicamente a CD47,
 (b) un anticuerpo que se une específicamente a SIRP α , o
 (c) un polipéptido SIRP α soluble,
- 30 y en el que el uno o más antígenos de la superficie celular en las células de cáncer de pulmón se seleccionan de entre Ep-CAM, CD24, CD166, CD56, CD326, CD298, CD29, CD63, CD9, CD164, CD99, CD46, CD59, CD57 y CD165.
- 35 **3.** El agente dirigido para el uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo para el uso de la reivindicación 2, en el que el agente que bloquea selectivamente la unión de CD47 a SIRP α es un anticuerpo que se une específicamente a:
- (i) CD47, o
 - (ii) SIRP α .
- 40 **4.** El agente dirigido para el uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo para el uso de la reivindicación 2, en el que el agente que bloquea selectivamente la unión de CD47 a SIRP α es un polipéptido de SIRP α soluble.
- 45 **5.** El agente dirigido para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, o el anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que el tratamiento comprende administrar la combinación de agentes simultáneamente.
- 50 **6.** El agente dirigido para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, o el anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que el tratamiento comprende administrar la combinación de agentes de forma secuencial.
- 55 **7.** El agente dirigido para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, o el anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que el tratamiento comprende administrar la combinación de agentes en regímenes de dosificación solapados.
- 8.** El agente dirigido para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-7, o el anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en el que el paciente es un ser humano.
- 60 **9.** El agente dirigido para el uso o el anticuerpo para el uso de la reivindicación 8, en el que el uno o más antígenos de la superficie celular en células de cáncer de pulmón se seleccionan entre Ep-Cam, CD56, CD99 y CD44.

Dianas terapéuticas de CD47 para
el cáncer de pulmón de células pequeñas

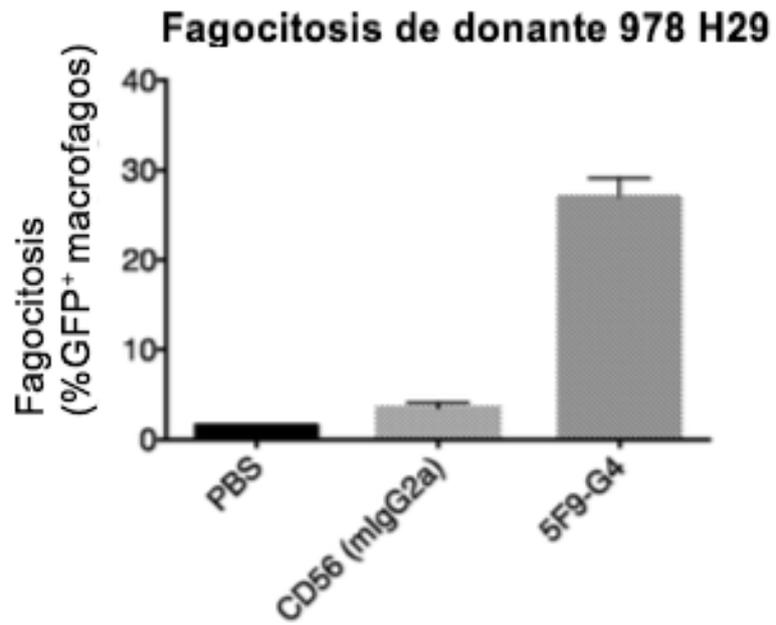


FIGURA 1

Terapias de bloqueo de CD47 son efectivas
contra el cáncer de pulmón de células pequeñas

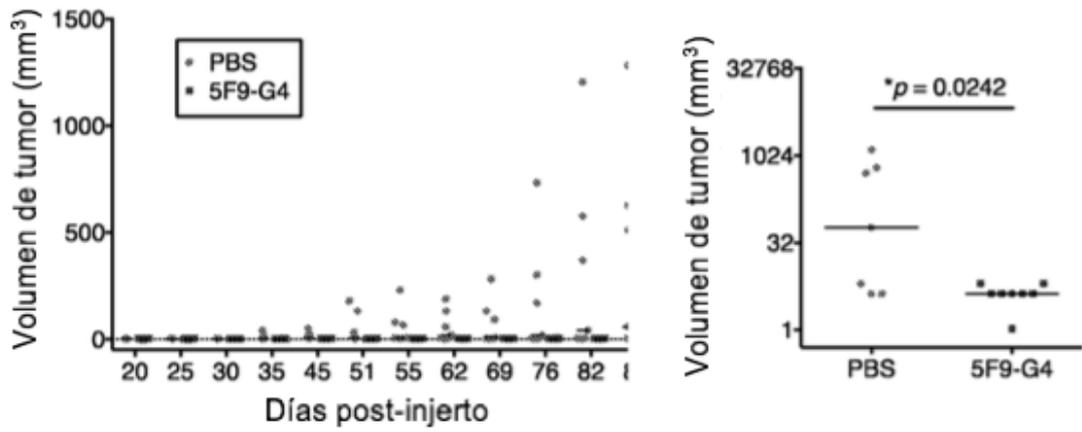


FIGURA 2

Dianas terapéuticas nuevas expresadas intensamente en la superficie de células cancerosas de pulmón de células pequeñas humanas primarias

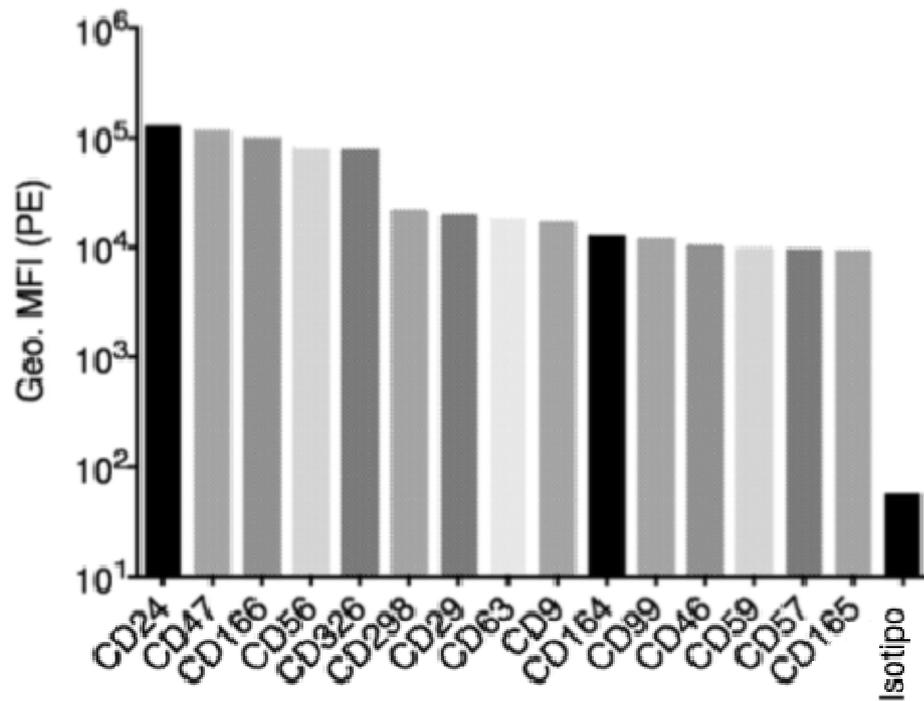


FIGURA 3

Fagocitosis de líneas celulares de cáncer de células pequeñas (H82, H69) con anticuerpos específicos a tumores solos y en combinación con monómeros SIRP α de alta afinidad

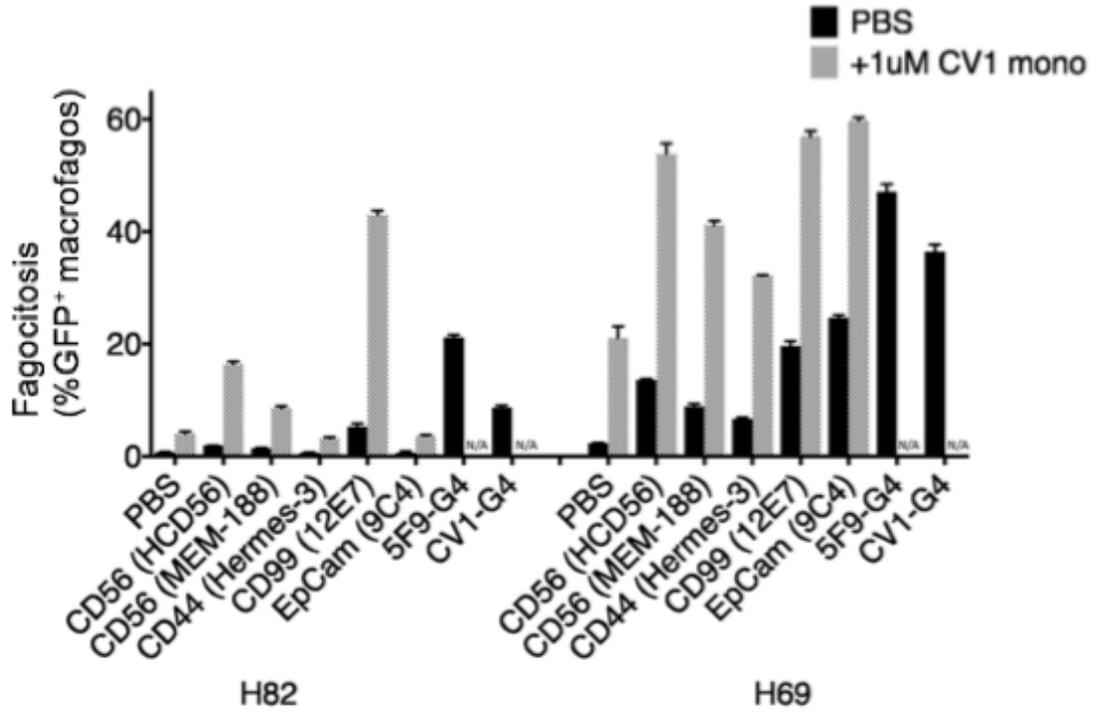


FIGURA 4

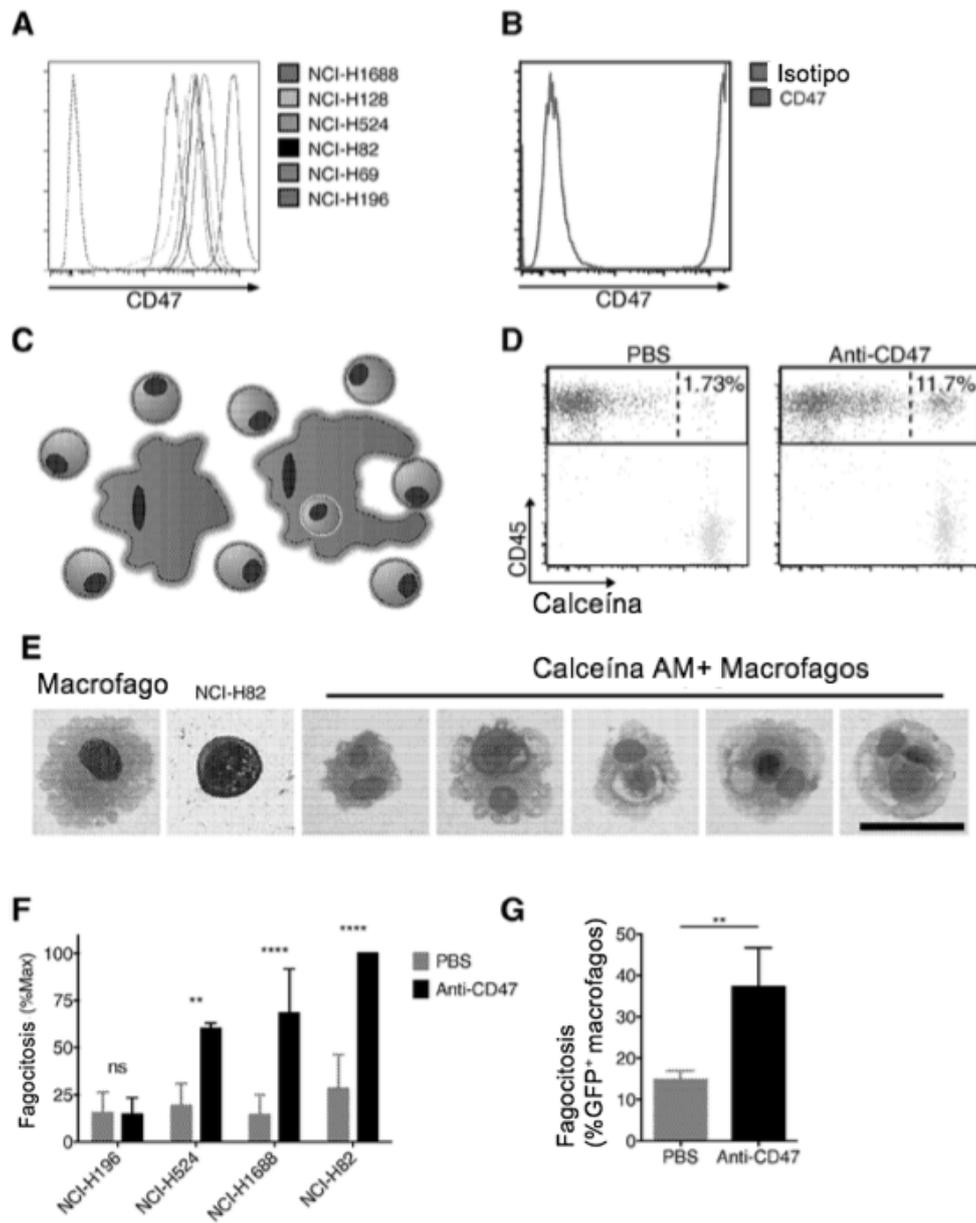


FIGURA 5

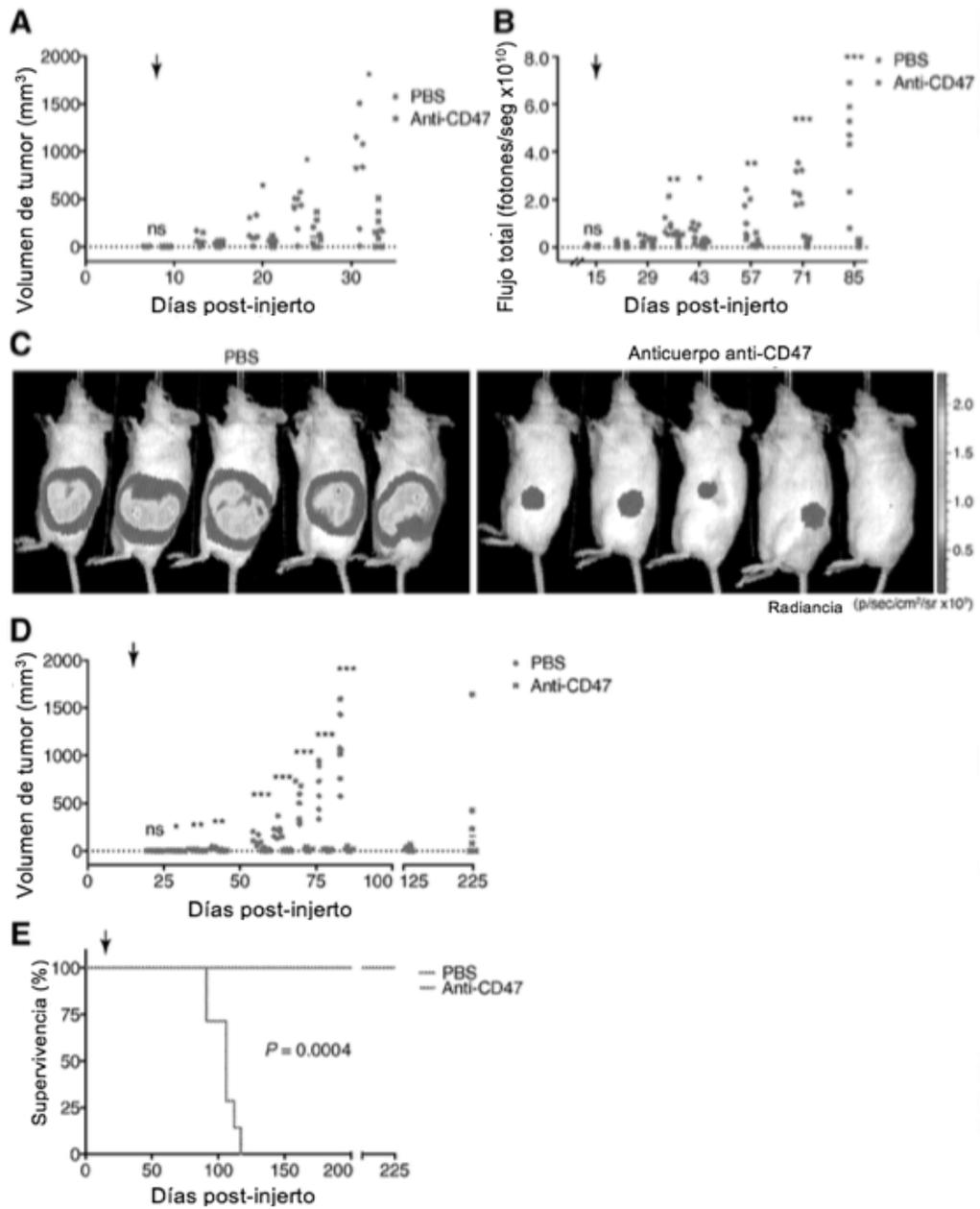


FIGURA 6

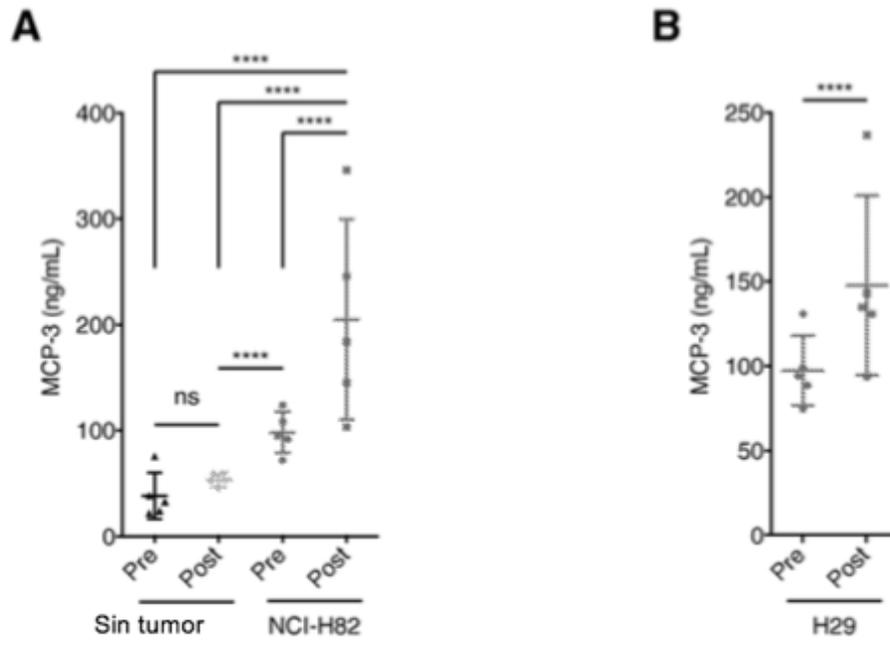


FIGURA 7

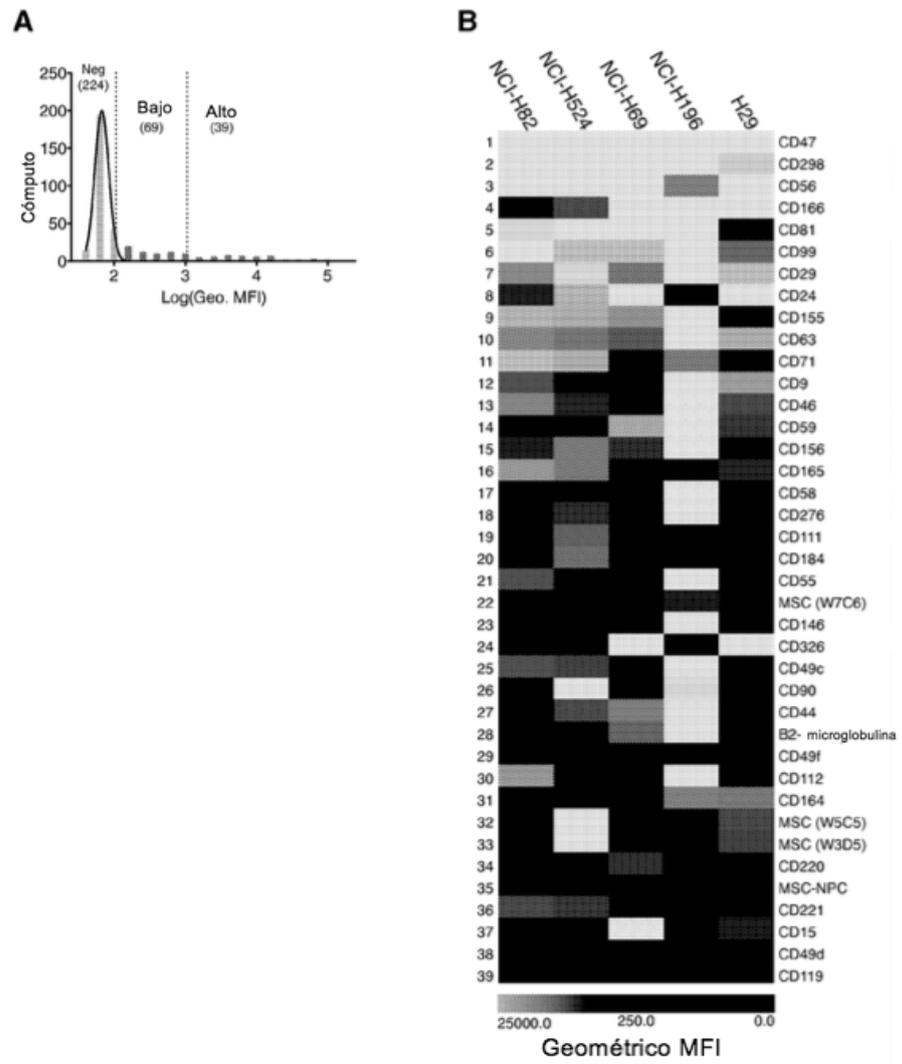


FIGURA 8

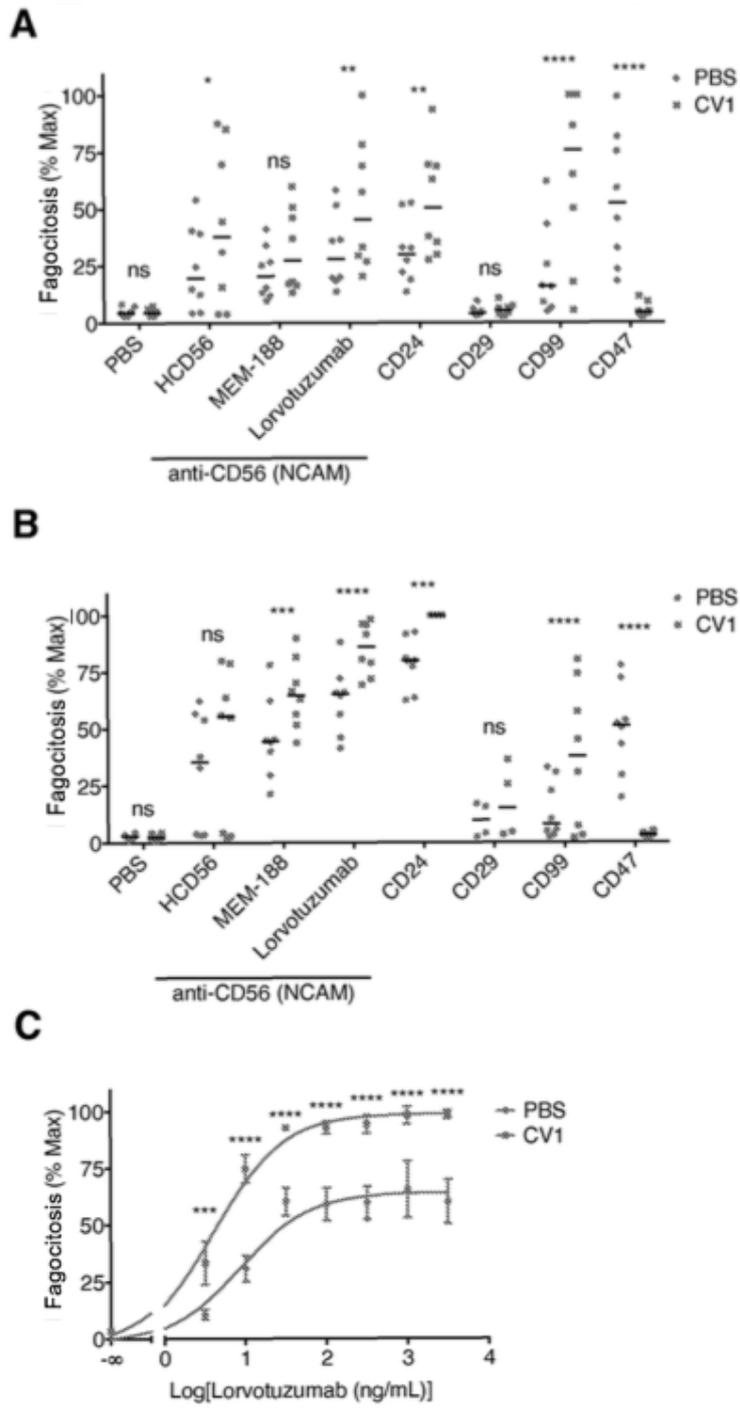


FIGURA 9