

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 144**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2009 E 16160470 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3056514**

54 Título: **Métodos para manipular fagocitosis mediada por CD47**

30 Prioridad:

**15.01.2008 US 11324 P**  
**22.08.2008 US 189786 P**

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

**16.12.2019**

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:

**JAIWAL, SIDDHARTHA;  
WEISSMAN, IRVING L.;  
JAMIESON, CATRIONA, HELEN M. y  
MAJETI, RAVINDRA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 735 144 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para manipular fagocitosis mediada por CD47

## 5 ANTECEDENTES

10 El sistema reticuloendotelial (RES) es una parte del sistema inmunológico. El RES consta de las células fagocíticas localizadas en el tejido conectivo reticular, principalmente monocitos y macrófagos. El RES consiste en 1) circular monocitos; 2) macrófagos residentes en el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos, el timo, los tejidos submucosos de los tractos respiratorios y digestivos, la médula ósea y los tejidos conectivos; y 3) las células similares a macrófagos, incluyendo células dendríticas en los ganglios linfáticos, las células de Langerhans en la piel y células de la microglía en el sistema nervioso central. Estas células se acumulan en los ganglios linfáticos y el bazo. Las funciones RES para borrar patógenos, materia particulada en circulación, y las células hematopoyéticas envejecidas o dañadas.

15 Para eliminar células extrañas o partículas en la respuesta inmune innata, se induce la fagocitosis mediada por macrófagos cuando el receptor de fosfatidilserina (PSR) reacciona a la fosfatidilserina (PS), que se puede exteriorizar de las membranas de las células muertas, tales como apoptosis y células necróticas. A su vez, la interacción entre el PS y el PSR juega un papel crucial en el aclaramiento de las células apoptóticas por los macrófagos. Una vez se ha realizado la fagocitosis por los macrófagos, la respuesta inflamatoria se regula hacia abajo por un aumento en factores tales como IL-10, TGF- $\beta$ , y la prostaglandina E2 (PGE2). El equilibrio estricto entre las respuestas inflamatorias y anti-inflamatorias, tanto en la inmunidad innata y adaptativa juega un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis celular y la protección de un huésped de la invasión extrínseca.

20 La EP1693385 describe un anticuerpo anti-CD47 humanizado. Manna et al. (2004) Cancer Research 64(3):1026-1036 describe que CD47 media la destrucción de las células de tumor de mama a través de la inhibición dependiente de Gi de la proteína quinasa A. La US 2007/111238 describe métodos para diagnosticar y evaluar el tratamiento de trastornos sanguíneos. Liu et al. (2002) Journal of Biological Chemistry 277(12):10028-10036 describe que la proteína reguladora de señal (SIRPalpha), un ligando celular para CD47, regula la trans migración de neutrófilos. Majeti et al. (2008) describe que CD47 es un factor de pronóstico independiente y un objetivo de anticuerpos terapéuticos en células madre de leucemia mieloide aguda humana. Pettersen et al. (1999) describe que CD47 señala la destrucción de células T. Manna et al. (2003) The Journal of Immunology 170(7):3544-3553 describe un mecanismo de destrucción dependiente de CD47 de células T: la inhibición dependiente de Gi heterodimérica de la proteína quinasa A.

35 La relación causal entre la inflamación y la progresión neoplásica es un concepto ampliamente aceptado. Ahora los datos apoyan el concepto de la inmunovigilancia cáncer - que una de las funciones fisiológicas del sistema inmune es reconocer y destruir las células transformadas. Sin embargo, algunas células tumorales son capaces de evadir el reconocimiento y la destrucción por el sistema inmune. Una vez que las células tumorales han escapado, el sistema inmune puede participar en su crecimiento, por ejemplo mediante la promoción de la vascularización de los tumores.

40 Tanto las células inmunitarias adaptativas e innatas participan en la vigilancia y la eliminación de las células tumorales, pero los monocitos/macrófagos pueden ser la primera línea de defensa en los tumores, ya que colonizan rápidamente y secretan citoquinas que atraen y activan las células dendríticas (DC) y células NK, que a su vez puede iniciar la respuesta inmune adaptativa frente a las células transformadas.

45 Los tumores que se escapan de la maquinaria inmune puede ser una consecuencia de alteraciones que se producen durante la fase de inmunovigilancia. A modo de ejemplo, algunas células tumorales desarrollan deficiencias en el procesamiento y presentación de antígenos vías, que facilitan la evasión de una respuesta inmune adaptativa, tales como la ausencia o funciones anormales de los componentes de la vía de señalización del receptor de IFN- $\gamma$ . Otros tumores suprimen la inducción de las señales de peligro proinflamatorias, lo que lleva, por ejemplo, a la alteración de la maduración de DC. Finalmente, la inhibición de las funciones de protección del sistema inmune también puede facilitar el escape del tumor, tales como el exceso de producción de las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- $\beta$ , que puede producirse por muchas células tumorales sí mismos, sino también por los macrófagos o las células T reguladoras.

50 Un tumor puede ser visto como un órgano aberrante iniciado por una célula de cáncer tumorigénico que adquirió la capacidad para la proliferación indefinida a través de mutaciones acumuladas. En esta vista de un tumor como un órgano anormal, los principios de la biología de células madre normales se pueden aplicar para entender mejor cómo se desarrollan los tumores. Muchas observaciones sugieren que las analogías entre las células madre normales y células tumorigénicas son apropiadas. Tanto las células madre normales y células tumorigénicas tienen una amplia potencial proliferativa y la capacidad de dar lugar a nuevos tejidos (normales o anormales). Tanto los tumores y tejidos normales se componen de combinaciones heterogéneas de células, con diferentes características fenotípicas y diferentes potenciales proliferativos.

65

Las células madre se definen como células que tienen la capacidad de perpetuarse a través de auto-renovación y para generar células maduras de un tejido particular a través de la diferenciación. En la mayoría de los tejidos, las células madre son raras. Como resultado, las células madre deben ser identificadas de forma prospectiva y se purifican cuidadosamente con el fin de estudiar sus propiedades. Quizás la propiedad más importante y útil de las células madre es el de la auto-renovación. A través de esta propiedad, paralelismos sorprendentes se pueden encontrar entre las células madre y las células de cáncer: tumores a menudo pueden proceder de la transformación de las células madre normales, las vías de señalización similares pueden regular la auto-renovación de las células madre y las células cancerosas, y los cánceres pueden comprender células raras con potencial indefinido de auto-renovación que impulsan la tumorigénesis.

El estudio de los marcadores de superficie celulares específicos o regulado hacia arriba específicamente en las células cancerosas es fundamental en la prestación de objetivos para reducir el crecimiento de o para la reducción de células cancerosas. Proporcionado en este documento es un marcador para la leucemia mieloide, especialmente un marcador para la leucemia mieloide aguda (AML). Nuestros estudios han revelado un papel de este marcador en ayudar que las células madre de AML evite un despeje de la fagocitosis. Se proporcionan métodos para el uso de este marcador para aumentar la fagocitosis de las células madre de AML (AML SC), así como para mejorar el trasplante de células madre hematopoyéticas y progenitoras.

Curiosamente, ciertos marcadores se muestran para ser compartidos por las células madre de la leucemia y las células madre hematopoyéticas (HSC). Durante el desarrollo normal, HSCs migran a nichos ectópicos en la vida fetal y adulto a través de la corriente sanguínea. Una vez en el torrente sanguíneo, las HSCs deben navegar los lechos vasculares del bazo y el hígado antes de establecerse en un nicho. En estos lechos vasculares, los macrófagos funcionan para eliminar las células dañadas y las partículas extrañas de la corriente de sangre. Por otra parte, durante los estados inflamatorios, los macrófagos se vuelven más activos fagocíticamente. Así, las células madre recién llegadas tienen que enfrentarse a la posibilidad de ser fagocitadas en ruta, a menos que una protección adicional puede ser generada. La exploración de los mecanismos por los cuales la HSC endógena evita ser despejada por la fagocitosis puede dar una idea de maneras para mejorar el éxito del trasplante de células madre hematopoyéticas y progenitoras. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a CD47 en la superficie de las células cancerosas e inhibe su interacción con el receptor de SIRP $\alpha$  en la superficie de las células fagocíticas, para su uso en el tratamiento de la leucemia aumentando la fagocitosis de las células de leucemia en un sujeto humano, en donde dicho anticuerpo regula por incremento la fagocitosis de dichas células de leucemia inhibiendo la unión de CD47 en la superficie de las células de leucemia al receptor de SIRP $\alpha$  en la superficie de las células fagocíticas.

Se proporcionan métodos para manipular la fagocitosis de las células hematopoyéticas, incluyendo las células hematopoyéticas circulantes, por ejemplo, células de médula ósea. En algunos casos, las células circulantes son células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas, en particular en un contexto del trasplante, donde la protección de la fagocitosis es deseable. En algunas formas de realización las células circulantes son células de leucemia, especialmente leucemia mieloide aguda (AML), donde el aumento de la fagocitosis es deseable. En ciertas realizaciones de la invención, se proporcionan métodos para manipular la fagocitosis de macrófagos de células hematopoyéticas circulantes. En algunas realizaciones de la invención, se proporcionan métodos para manipular la fagocitosis de los tumores sólidos.

En algunas realizaciones, las células madre o progenitoras hematopoyéticas están protegidas de la fagocitosis en circulación proporcionando un animal huésped con una molécula mimética CD47, que interactúa con SIRP $\alpha$  en células fagocíticas, tales como, macrófagos, y disminuye la fagocitosis. El mimético de CD47 puede ser CD47 soluble; CD47 recubierto en la superficie de las células a ser protegida, un mimético de CD47 que se une a SIRP $\alpha$  en el sitio de unión a CD47, y similares. En algunos casos, CD47 se ofrece como una proteína de fusión, por ejemplo CD47 soluble fusionado a un fragmento Fc, por ejemplo, IgG1 Fc, IgG2 Fc, Ig A Fc etc.

En otras realizaciones, las células tumorales, por ejemplo, células de tumores sólidos, las células de leucemia, etc. son objeto de la fagocitosis mediante el bloqueo de CD47 en la superficie celular. Se muestra que las células de leucemia, en particular las células de AML, evadir la vigilancia de los macrófagos por la regulación positiva de la expresión de CD47. La administración de agentes que enmascaran la proteína CD47, por ejemplo anticuerpos que se unen a CD47 y previenen la interacción entre CD47 y SIRP $\alpha$  se administran a un paciente, lo que aumenta el aclaramiento de las células de AML a través de la fagocitosis. En otros aspectos, un agente que enmascara CD47 se combina con anticuerpos monoclonales dirigidos contra uno o más marcadores de, por ejemplo AMLSC, por ejemplo, CD96, y similares, que pueden ser composiciones sinérgicas en el aumento de la fagocitosis y la eliminación de AMLSC en comparación con el uso de agentes individuales. En otras formas de realización, las células de tumores sólidos son objeto de la fagocitosis mediante el bloqueo de CD47 presente en la superficie

celular.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5            Figura 1. Análisis FACS de expresión HSC humana y CD47 progenitora de síndrome mielodisplásico (MDS, azul), leucemia mielógena crónica, fase acelerada (CML AP, verde) y la médula ósea normal (rojo). Figura 2. ET vs PV. Análisis de FACS de expresión CD47 por trastornos mieloproliferativos humanos, tales como trombocitemia esencial (ET, azul) y la policitemia vera (PV, verde) HSC, progenitoras y de linaje de células positivas en comparación con la médula ósea humana normal (rojo).
- 10            La Figura 3A. Perfiles progenitores de médula ósea normal (izquierda), mielofibrosis post-policitemia con metaplasia mieloide (PPMM) y CML crisis blástica. La Figura 3B. El análisis FACS de la médula ósea humana normal (rojo) frente UMPD (verde) frente a PV (azul=ML) frente atípica CML (naranja), HSC, células positivas de linaje progenitoras y la expresión de CD47.
- 15            Figura 4. El aumento de expresión de CD47 a progenitores CMML (azul) en comparación con la médula ósea normal (rojo) con la progresión de la enfermedad.
- 20            Las figuras 5A-5B. (A) Perfiles Progenitores de médula ósea normal (izquierda) frente a la AML (derecha). (B) Análisis FACS de la médula ósea humana normal (rojo) frente a AML (azul) HSC, progenitor y la expresión células positivas de linaje CD47 (explosión).
- 25            Figura 6. CD47 está más altamente expresada en la AML LSC En comparación con sus contrapartes normales. A. Expresión CD47 relativa en médula ósea normal HSC (Lin-CD34+CD38-CD90+) y MPP (Lin-CD34+CD38-CD90-CD45RA), así como LSC (Lin-CD34+CD38-CD90-) y células de leucemia mayores a partir de muestras de AML humanas se determinó por citometría de flujo. Intensidad media de fluorescencia se normalizó para el tamaño celular y contra las células positivas de linaje para tener en cuenta para el análisis en días diferentes. La misma muestra de médula ósea normal (rojo, n=3) o AML (azul, n=13) se indica mediante el mismo símbolo en las diferentes poblaciones. Las diferencias entre la media de expresión de HSC con LSC ( $p=0,003$ ), HSC con leucemia mayor ( $p=0,001$ ), el MPP con LSC ( $p=0,004$ ), y el MPP con leucemia mayor ( $p=0,002$ ) fueron estadísticamente significativas utilizando una prueba t de estudiante de 2 lados. La diferencia entre la media de expresión de la AML LSC en comparación con AML mayor no fue estadísticamente significativa con  $p=0,50$  mediante la prueba t de estudiante en 2 lados. B. Características clínicas y moleculares de las muestras de AML humanas primarias manipuladas in vitro y/o in vivo.
- 30
- 35            Figura 7. Anti-CD47 de anticuerpos in vitro de macrófagos estimula la fagocitosis de AML LSC primaria humana. AML LSC se purificaron mediante FACS a partir de dos muestras de AML humanas primarias, marcadas con el colorante fluorescente CFSE y se incubó con macrófagos derivados de médula ósea de ratón, ya sea en presencia de un control de isotipo (A) o el anticuerpo anti-CD47 (B). Estas células se evaluaron por microscopía de inmunofluorescencia para detectar la presencia de LSC marcado con fluorescencia dentro de los macrófagos. (C) Se determinó el índice de fagocitosis para cada condición mediante el cálculo del número de células ingeridas por 100 macrófagos.
- 40
- 45            La Figura 8A-C. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra fagocitosis preferentemente habilitada de CD47 humano de AML LSC humana por macrófagos humanos y de ratón. AML LSC etiquetada con A, B. CFSE se incubará con los macrófagos humanos periféricos derivados de la sangre (A) o macrófagos derivados de médula ósea de ratón (B) en la presencia de control de isotipo IgG1, anti-CD45 IgG1, o anticuerpo anti-CD47 IgG1 (B6H12.2). Estas células se evaluaron por microscopía de inmunofluorescencia para detectar la presencia de LSC marcado con fluorescencia dentro de los macrófagos (indicado por flechas). C. AML LSC etiquetado con CFSE o médula ósea normal CD34+ de las células se incubaron con macrófagos humanos (izquierda) o de ratón (derecha) en presencia de los anticuerpos indicados y luego evaluados para la fagocitosis por microscopía de inmunofluorescencia. Se determinó el índice fagocítico para cada condición mediante el cálculo del número de células ingeridas por 100 macrófagos. Para AML LSC, las diferencias entre isotipo o anticuerpo anti-CD45 con bloqueo anti-CD47 tratamiento con anticuerpos (B6H12.2 y BRIC126) fueron estadísticamente significativas con  $p < 0,001$  para todas las comparaciones por pares con los macrófagos humanos y de ratón. Para los macrófagos humanos, las diferencias entre AML LSC y las células normales CD34+fueron estadísticamente significativas para B6H12.2 ( $p < 0,001$ ) y BRIC126 ( $p=0,002$ ).
- 50
- 55
- 60            Figura 9. anti-CD47 anticuerpo estimula la fagocitosis de macrófagos in vitro de AML LSC humana primaria. AML LSC se purificaron por FACS de cuatro muestras de AML humanas primarias, marcado con el colorante fluorescente CFSE y se incubó con los macrófagos de sangre periférica humana, ya sea en presencia de un control de isotipo, isotipo anti-CD45, o un anticuerpo anti-CD47. (A) Estas células se evaluaron por microscopía de inmunofluorescencia para detectar la presencia de LSC-marcado con fluorescencia dentro de los macrófagos. Se determinó el índice fagocítico para cada condición mediante el cálculo del número de
- 65

células ingeridas por 100 macrófagos. (B) Los macrófagos se cosecharon, se tiñeron con un anticuerpo anti-macrófagos humano marcado con fluorescencia, y se analizaron por citometría de flujo. hMac+eventos dobles positivos CFSE+identifican los macrófagos que tienen LSC etiquetado con CFSE fagocitado. Cada muestra está representada por un color diferente.

5  
 10  
 15  
 20  
 25

Figura 10A-B: Un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD47 humano inhibe injerto AML LSC in vivo. Tres muestras de AML human primario se incubaron con el control de isotipo IgG1, anti-CD45 IgG1, o anticuerpo anti-CD47 IgG1 (B6H12.2) antes del trasplante en ratones NOG recién nacidos. Una porción de las células se analizó para el recubrimiento por tinción con un anticuerpo anti-IgG de ratón secundario y se analizó mediante citometría de flujo (A). 13 semanas después, los ratones fueron sacrificados y la médula ósea se analizó para el porcentaje de células de leucemia mielóide CD45 humano+CD33+por citometría de flujo (B). La diferencia en el injerto medio entre las células anti-CD47-revestido e isotipo ( $p < 0,001$ ) y anti-CD45 ( $p=0,003$ ) células recubiertas fue estadísticamente significativa.

30  
 35  
 40

Figura 11. CD47 está regulada positivamente en la leucemia mielóide aguda murina. parcelas madre y progenitoras típicas se muestran para las células hMRP8bc12 hMRP8bc12 leucémicas en comparación con los animales de control no leucémicos. Células Lin- c-Kit+Sca-1+cerradas de la médula ósea de control (a) y el bazo leucémico (b) y Lin- c-Kit+ Sca-1+ células cerradas de la médula ósea de control (c) y el bazo leucémico (d) demuestran pertuberancias en la hematopoyesis normal en ratones leucémicos. La frecuencia se muestra como un porcentaje de la totalidad de la fracción mononuclear de la médula ósea o bazo. (e) RT-PCR cuantitativa muestra que CD47 está regulada positivamente en las células BM leucémicas. Los datos se muestran a partir de 3 series de ratones transplantados con células BM hMRP8bc12 leucémicas o control y después sacrificados 2 a 6 semanas más tarde. Los resultados fueron normalizados a beta-actina y la expresión de 18S rRNA. Se determinó doble cambio con respecto a células enteras Bcl-2+BM trasplantadas al control. Las barras de error representan 1 S. D. (F) Los histogramas muestran la expresión de CD47 en las poblaciones cerradas para los ratones leucémicos (gris) y de control (negro).

45  
 50  
 55

Figura 12. La expansión GMP y la regulación positiva CD47 en la leucemia mielóide humana. a) gráficos FACS representativos de los progenitores mieloides (CD34+CD38+Lin-), incluyendo los progenitores mieloides comunes (CMP), progenitores megacariocitos-eritroides (MEP) y progenitores de granulocitos y macrófagos (GMP) presentes en la médula ósea normal (BM) frente a CMLa, BC CML y AML. b) histogramas comparativos FACS de expresión CD47 por leucemia mielógena normal (rojo; n=6) y aguda (AML, azul; n=6) de las células madre hematopoyéticas (HSC; CD34+CD38-CD90+Lin-) y progenitores (CD34+CD38+Lin-). c) histogramas comparativos FACS de la expresión CD47 por normal (rojo) y las células madre hematopoyéticas de la leucemia mielógena crónica (HSC; CD34+CD38-CD90+Lin-) y progenitores comprometidos (CD34+CD38+Lin-). Panel superior: Normal (n=7) frente a CML crónica fase (n=4) HSC, progenitores y células positivas de linaje. El panel medio: Normal (n=7) frente a la eliminación acelerada de CML (n=7) HSC, progenitores y células positivas del linaje. Panel inferior: Normal (n=7) frente a la crisis de explosión CML (n=4) HSC, progenitores y células positivas del linaje.

60  
 65

Figura 13. La sobreexpresión de CD47 murino aumenta tumorigenicidad de células MOLM-13. a) células MOLM-13 fueron transducidas con virus de control o forma de CD47 ADNc murino 2 que expresa virus. Las líneas celulares resultantes, denominadas Tet o Tet-CD47, se trasplantaron competitivamente en RAG/ratones deficientes de cadena gamma común con células no transducidas MOLM-13 ( $5 \times 10^5$  Tet (n=6) o Tet-47 (n=8) células con  $5 \times 10^5$  MOLM-13). Los ratones se analizaron para GFP y quimerismo CD45 humano cuando moribundo. b) MOLM-13 quimerismo en los tejidos hematopoyéticos se determinó por quimerismo CD45 humano y la medición de tamaño de la lesión tumoral. c) La supervivencia de los ratones trasplantados competitivamente con MOLM-13 más Tet o células MOLM-13 más Tet-CD47 se trazó. Los ratones de control murieron de gran carga tumoral en el sitio de la inyección, pero no tenía el injerto en los tejidos hematopoyéticos. d) secciones de hematoxilina y eosina de Tet-CD47 MOLM-13 hígado trasplantado (200x). Periportal (flecha) y la infiltración de tumor sinusoidal (punta de flecha) es evidente. e)  $1 \times 10^6$  Tet (n=5) o Tet-CD47 MOLM-13 (n=4) se inyectaron las células en el fémur derecho de ratones RAG2 -/-, Gc -/- y los tejidos se analizaron 50-75 días más tarde y se determinó el quimerismo de células MOLM-13 en la médula ósea. f) la curva de supervivencia de los ratones trasplantados intrafemorales Tet o células Tet-CD47 MOLM-13. g) Los ejemplos de la formación de tumores de hígado y hepatomegalia en Tet-CD47 MOLM-13 en comparación con ratones trasplantados ratones trasplantados de control. Fluorescencia GFP demuestra la formación de nódulos tumorales, así como infiltración difusa.

Figura 14. Sobre-expresión CD47 impide la fagocitosis de células vivas no opsonizadas MOLM-13. a) las células Tet o Tet-CD47 MOLM-13 se incubaron con macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) para 2, 4, o 6 horas y se determinó el índice fagocítico. Las barras de error representan 1 S. D. (N=6 para cada punto de tiempo). b) Análisis FACS de BMDMs incubaron con células CD47-Tet Tet o. c) Las fotomicrografías de BMDMs incubadas con Tet o Células MOLM-13 Tet-CD47 a las 2 y 24 horas (400X). d) células Tet o Tet-CD47 MOLM-13 fueron trasplantadas en RAG2 -/-, GC -/- ratones y ósea, el bazo y los macrófagos del hígado se analizaron 2 horas más tarde. GFP+fracción de los macrófagos son cerrados. Los resultados son

representativos de 3 experimentos.

Figura 15. Una expresión más alta de CD47 en células MOLM-13 se correlaciona con potencial tumorigénico y la evasión de la fagocitosis. a) células Tet-CD47 MOLM-13 se dividieron en clones de expresión alta y baja como se describe. Histogramas muestran la expresión de CD47 en MOLM-13 alta (negro), MOLM-13 bajo (gris), y células de médula ósea de ratón (sombreadas). Valor obtenido para el MFI/FSC2 ( $\times 10^9$ ) se muestran. b) A los ratones trasplantados con células MOLM-13 CD47<sup>hi</sup> se les dio doxiciclina durante 2 semanas. Los histogramas muestran el nivel de expresión CD47 en ratones no tratados (sombreado) y tratados (sombreados), con los valores de MFI/FSC2 ( $\times 10^9$ ) indicados. c) La supervivencia de RAG2 <sup>-/-</sup>, GC <sup>-/-</sup> ratones trasplantados con  $1 \times 10^6$  CD47<sup>hi</sup>, CD47<sup>lo</sup> células MOLM-13, o CD47<sup>hi</sup> Células MOLM-13 con la administración de doxiciclina después de 2 semanas post-trasplante. d) hígado y el bazo tamaño de los ratones a la necropsia o 75 días después del trasplante con  $1 \times 10^6$  CD47<sup>hi</sup>, CD47<sup>lo</sup> células MOLM-13, o Células MOLM-13 CD47<sup>hi</sup> con la administración de doxiciclina después de 2 semanas post-trasplante. e) de la médula ósea y el bazo quimerismo de las células humanas en ratones a la necropsia o 75 días después del trasplante con  $1 \times 10^6$  CD47<sup>hi</sup>, CD47<sup>lo</sup> células MOLM-13, o células MOLM-13 CD47<sup>lo</sup> con la administración de doxiciclina después de 2 semanas post-trasplante. f) la expresión de CD47 murino en Células MOLM-13 CD47<sup>lo</sup> injerto de médula ósea (abierto) en comparación con la línea celular original (sombreada). Los valores de MFI/FSC2 ( $\times 10^9$ ) se indican. g)  $2,5 \times 10^5$  CD47<sup>hi</sup> o Células MOLM-13 CD47<sup>lo</sup> se incubaron con  $5 \times 10^4$  BMDMs durante 2 horas. Se muestra el índice de fagocitosis. h)  $2,5 \times 10^5$  CD47<sup>hi</sup> RFP y CD47<sup>lo</sup> MOLM-13 células GFP se incubaron con  $5 \times 10^4$  BMDMs durante 2 horas. El índice de fagocitosis se muestra para tres muestras separadas para CD47<sup>hi</sup> RFP (rojo) y CD47<sup>lo</sup> MOLM-13 GFP (verde) células. i)  $2,5 \times 10^5$  CD47<sup>hi</sup> RFP y CD47<sup>lo</sup> MOLM-13 GFP células se incubaron con  $5 \times 10^4$  BMDMs durante 2 horas. Microfotografías muestran campo claro (arriba a la izquierda), RFP (arriba a la derecha), GFP (parte inferior izquierda), y se fusionaron (abajo a la derecha) imágenes.

Figura 16. a) FACS análisis de la expresión CD47 de la Fas no-leucémica lpr/lpr hMRP8bcl-2 (azul) y Fas leucémica lpr/lpr hMRP8bcl-2 (verde) de células madre de médula ósea hematopoyética (c-kit+Sca+Lin-), los progenitores mieloides (c-kit+CEA-Lin-) o blastos (c-kit lo Sca-Lin). b) la médula ósea de ratón fue transducida con retrovirus que contiene p210 bcr/abl como se describió anteriormente<sup>24</sup>. Los ratones se sacrificaron cuando moribundos y se analizaron los bazos. Se muestra la expresión de CD47 en las células +c-Kit + Mac-1 en los bazos de dos ratones leucémicos (histogramas sombreados) y médula ósea de un ratón de tipo silvestre (histograma sombreado). c) Los histogramas muestran la expresión de CD47 en las poblaciones cerradas para los ratones leucémicos hMRP8bcrabl x hMRP8bcl2 (rojo), hMRP8bcl2 no leucémico (azul) y ratones de tipo silvestre (verde). CD47 se tiñó usando conjugado con FITC anti-ratón CD47 (Pharmingen).

Figura 17. Se muestra a) La expresión de CD47 humana (histogramas negros) en líneas celulares de leucemia humana y sangre del cordón umbilical de células madre hematopoyéticas. Tinción de control de isotipo se muestra en gris. b) CD47 IMF sobre el fondo se normalizó al tamaño de la celda de dividir por FSC2. El valor obtenido para cada tipo de célula se muestra por encima de la barra. c) Las células HL-60 se injertan ósea médula de ratón. Se inyectaron  $5 \times 10^5$  células por vía intravenosa en RAG2 <sup>-/-</sup>, Gc <sup>-/-</sup> de los animales y los ratones se analizaron 4 semanas más tarde. d) Las células fueron teñidas con CFSE y co-cultivadas con BMDM. Eventos fagocíticos se contaron después de 2 h. Para la irradiación, las células Jurkat se les dio una dosis de 2 Gray y se incubaron durante 16 h antes del ensayo de fagocitosis.

Figura 18. (a) El análisis de las células madre y progenitoras de la médula ósea de IAP <sup>+/+</sup>, IAP <sup>+/-</sup>, y IAP <sup>-/-</sup> ratones. Las células madre (izquierda) son cerradas en células Sca-1<sup>+</sup> de linaje- c-kit<sup>+</sup>. Progenitores mieloides (derecha) son cerrados en linaje- c-kit<sup>+</sup>/CEA-1<sup>+</sup> células. Frecuencia en toda la médula ósea se muestra junto a cada población cerrada. (b) la producción de colonias en el día 7 de forma individual LT-HSC ordenadas. G-granulocitos, M-macrófago, GM-granulocitos y macrófagos, granulocitos GEMM-cito, macrófagos, eritroides y megacariocitos, Meg-megacariocitos. (c) Curva de supervivencia de los ratones receptores da una dosis de radiación de 9,5 Gray y trasplantados con las células que se muestran. Los ratones de control de radiación murieron dentro de 12-15 días. n=5 para cada grupo. (d) Ejemplos de gráficos de quimerismo CD45,1/CD45,2 a las 4 semanas post-trasplante. Ratones CD45,1 fueron trasplantados con 50 LT-HSC (CD45,2) y  $2 \times 10^5$  CD45,1 ayudante ósea. Las células son cerradas en B220- CD3 Mac-1+dispersión lateral mediados/hi células. IAP <sup>-/-</sup> células no logran injertar. (e) Resumen del análisis quimerismo de ratones trasplantados con o bien 50 o 500 IAP <sup>+/+</sup> o IAP <sup>-/-</sup> células. (f) IAP <sup>+/+</sup> o IAP <sup>-/-</sup> células enriquecidas c-Kit se incubaron con el tipo silvestre BMDM. Los resultados indican índice fagocítico medio calculado a partir de tres muestras separadas. Las barras de error representan 1 s. d. (g) las fotomicrografías de ensayos de fagocitosis tomadas después de 2 horas. Se muestra el genotipo de las células enriquecidas -Kit.

Figura 19. (a) Los ratones fueron movilizados con Cy/G y la médula ósea se analizó en el día 2. El nivel de expresión de CD47 en c-kit+células se muestra. (b) Progenitoras mieloides y el tallo puertos de células se muestran para médula ósea del día 2 movilizado. Histogramas de nivel izquierda muestran la expresión de

CD47 en la médula LT-HSC y GMP para el estado estacionario (histograma sombreado), el día 2 movilizado (línea de color negro), y el día 5 movilizado (línea gris). (c) IFM relativa de CD47 de GMP en los días 0-5 de Cy/G movilización. Los resultados se normalizaron para que el estado de equilibrio GMP eran igual a 100. (d) progenitoras mieloides y el tallo puertas de células se muestran para el día 2 de médula ósea tratamiento post-LPS. Los histogramas muestran el nivel de expresión de CD47 en el día 2 post-LPS (línea de color negro), el día 5 post-LPS (gris oscuro histograma sombreado), el estado de equilibrio (gris claro histograma sombreado), e IAP -/- (negro histograma sombreado) LT HSC y GMP. (e) Evaluación de las células KLS en los órganos hematopoyéticos de IAP +/+ y IAP -/- ratones movilizados en los días 2 a 5. Dos ratones se analizó por genotipo por día.

Figura 20. (a) Nivel de expresión de CD47 de IAP +/+, IAP +/-, e IAP -/- LT-HSC. Los números que se muestran son la IMF para cada grupo. (b) Análisis de los donantes para los trasplantes de quimerismo IAP +/+ (arriba) o IAP +/- (abajo) ratones. Los ratones se sangraron a 2, 8, y 40 semanas después del trasplante.  $2 \times 10^6$  células donantes fueron trasplantadas a receptores irradiados congénicos sub-letales.

Figura 21A-D: Identificación y separación de Progenitores normales y leucémicos desde el mismo paciente en función de expresión diferencial CD47. A. Expresión CD47 en la fracción enriquecida en LSC Lin-CD34+CD38- de espécimen SU008 fue determinado por citometría de flujo. Las células que expresan CD47<sup>hi</sup> y CD47<sup>lo</sup> se identificaron y se purificaron usando FACS. Los paneles de la izquierda son cerrados en las células de linaje negativo, mientras que los paneles de la derecha son cerrados en las células CD34+Lin-CD38-. B. Las células Lin-CD34+CD38-CD47<sup>lo</sup> y Lin-CD34+CD38-CD47<sup>hi</sup> se sembraron en metilcelulosa completa, capaz de soportar el crecimiento de todas las colonias mieloides. 14 días más tarde, la formación de colonias mieloides se determinó por evaluación morfológica. Se presentan representante CFU-G/M (izquierda) y BFU-E (derecha). C. Las células CD34+Lin-CD38 CD47<sup>lo</sup> se trasplantaron en ratones recién nacidos NOG 2. 12 semanas después, los ratones fueron sacrificados y la médula ósea se analizaron para la presencia de células mieloides CD45+CD33+ humano y células CD45+ humanas CD19+ por citometría de flujo linfoides. D. HSC normales de la médula ósea, células de leucemia SU008 a granel, las células Lin-CD34+CD38-CD47<sup>hi</sup>, las células Lin-CD34+CD38-CD47<sup>lo</sup>, o células CD45+ humanas purificadas a partir de la médula ósea de ratones injertados con Lin- CD34+CD38-CD47<sup>lo</sup> se evaluaron las células para la presencia de la mutación FLT3-ITD por PCR. El FLT3 de tipo silvestre y los productos de FLT3 ITD se indican.

Figura 22: Aumento de la expresión de CD47 en la AML humana se asocia con resultados clínicos pobres. Libre de eventos (A, C) y en general (B, D) la supervivencia de 132 pacientes con AML con citogenética normal (A, B) y el subgrupo de 74 pacientes sin la mutación FLT3-ITD (C, D). Los pacientes fueron estratificados en baja CD47 y CD47 grupos de expresión altos basados en un umbral óptimo (28% alto, 72% bajo) determinado por el análisis de microensayos de un conjunto de datos de formación independiente. Las medidas de significación se basan en estimaciones de probabilidad logarítmicas del valor p, cuando se trata el modelo con expresión de CD47 como una clasificación binaria.

Figura 23A-E: Un anticuerpo monoclonal contra CD47 humano dirigido Elimina AML in vivo. Ratones NOG recién nacidos fueron trasplantados con AML LSC, y 8-12 semanas más tarde, la sangre periférica (A, B) y la médula ósea (CE) se analizaron para el injerto de línea de base antes del tratamiento con anti-CD47 (B6H12.2) o anticuerpo de control IgG (Día 0). Los ratones fueron tratados con 100 microgramos diarios inyecciones intraperitoneales durante 14 días, al final del cual, se sacrificaron y la sangre periférica y la médula ósea se analizaron para el porcentaje de leucemia humana CD45+CD33+. A. Quimerismo leucémico humano pre y post-tratamiento en la sangre periférica de anticuerpo anti-CD47 representante y el control de los ratones tratados IgG como se determinó mediante citometría de flujo. B. Resumen de quimerismo leucémico humano en la sangre periférica evaluada en varios días durante el curso del tratamiento demostró la eliminación de la leucemia en los ratones tratados con anticuerpos anti-CD47 en comparación con el tratamiento de control IgG ( $p=0,007$ ). C. Quimerismo leucémico humano pre y post-tratamiento en la médula ósea a partir del anticuerpo anti-CD47 representativo o ratones IgG de control-tratado como se determinó mediante citometría de flujo. D. Resumen de quimerismo leucémico humano en la médula ósea en el día 14 con relación al día 0 demostró una reducción dramática en la carga leucémica en ratones anti-CD47 de anticuerpo tratado en comparación con el tratamiento de control IgG ( $p < 0,001$ ). E. Secciones H&E de las cavidades de la médula ósea del ratón representativo de ratones injertados con SU004 post-tratamiento con cualquiera de los controles de IgG (1,2) o paneles anti-CD47 de anticuerpos (paneles 4,5). Las médulas tratadas con IgG estaban llenas de blastos leucémicos monomorfos, mientras que los tuétanos anti-CD47 tratados eran poco celulares, lo que demuestra la eliminación de la leucemia humana. En algunos ratones tratados con anticuerpos anti-CD47-que contenían la leucemia residual, se detectaron los macrófagos que contienen células fagocitadas picnóticas, la captura de la eliminación de la leucemia humana (paneles de 3,6 flechas).

Figura 24. Aumento de la expresión CD47 predice la supervivencia global peor en DLBCL y cáncer de ovario. (A) Una cohorte de 230 pacientes con linfoma de células B grandes difusas ( $p=0,01$ ). (B) Una cohorte de 133 pacientes con estadio avanzado (III/IV) El carcinoma de ovario ( $p=0,04$ ).

Figura 25: Anticuerpo anti-CD47 permite la fagocitosis de las células madre de tumores sólidos in vitro. Las células indicadas se incubaron con los macrófagos humanos en presencia de isotipo IgG1, anti-HLA, o anticuerpos anti-CD47 y el índice de fagocitosis se determinó por microscopía de inmunofluorescencia. Estadísticas: células cancerosas de vejiga IgG1 isotipo en comparación con anti-HLA ( $p=0,93$ ) y anti-CD47 ( $p=0,01$ ); normal de la vejiga urotelio isotipo IgG1 en comparación con anti-HLA ( $p=0,50$ ) y anti-CD47 ( $p=0,13$ ); células de cáncer de ovario isotipo IgG1 en comparación con anti-HLA ( $p = 0,11$ ) y CD47 anti- ( $p < 0,001$ ). Cada punto de datos individual representa un tumor distinto o muestra de tejido normal.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

Se proporcionan métodos para manipular las células hematopoyéticas, incluyendo las células madre hematopoyéticas circulantes. La invención proporciona un inhibidor de CD47 para su uso en un método de tratamiento del cáncer mediante el aumento de la fagocitosis de las células tumorales que viven en un sujeto humano, en el que dicho inhibidor es un anticuerpo que se une a CD47 en la superficie de una célula tumoral de estar y de ese modo impide la unión de dicha CD47 a un receptor SIRP $\alpha$  en la superficie de una célula fagocítica, la orientación de este modo la célula tumoral viva para la fagocitosis. En algunas realizaciones, las células de leucemia son objeto de la fagocitosis mediante el bloqueo de CD47 en la superficie celular. En otras formas de realización, las células de tumores sólidos son objeto de la fagocitosis mediante el bloqueo de CD47 en la superficie celular. En otra realización, se proporcionan métodos para la orientación o el ozono células madre de cáncer de AML, el método comprende poner en contacto células de la sangre reactivo con un anticuerpo que se une específicamente a CD47 con el fin de orientar o agotar AMLSC. En otra realización, se proporcionan métodos para atacar a las células cancerosas de un tumor sólido en un sujeto humano mediante la administración de un anticuerpo contra CD47 para el sujeto.

Antes de que la presente invención se describe adicionalmente, es de entenderse que esta invención no está limitada a las realizaciones particulares descritas, como tal, puede, por supuesto, variar. Es de entenderse también que la terminología usada en este documento es para el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro establecido o valor intermedio en ese intervalo establecido, se engloba dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también están comprendidos dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos están también incluidos en la invención.

Los métodos citados en esta memoria pueden llevarse a cabo en cualquier orden de los eventos citados que es lógicamente posible, así como el orden enumerado de eventos.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento también se pueden usar en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos.

Hay que señalar que, como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa, además, que la solicitud pueda ser redactada para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de dicha terminología exclusiva como "única", "única" y similar en relación con la recitación de elementos de la reclamación, o el uso de una "limitación negativa".

Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente para su descripción 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 antedatar dicha publicación en virtud de invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas de forma independiente.

## DEFINICIONES

Los polipéptidos de CD47. Las tres variantes de la transcripción de CD 47 humano (variante 1, NM 001777; la variante 2, NM 198793, y la variante 3, NM 001025079) codifican tres isoformas del polipéptido de CD47. CD47

isoforma 1 (NP 001768), la más larga de las tres isoformas, es de 323 aminoácidos de longitud. CD47 isoforma 2 (NP 942088) es de 305 aminoácidos de longitud. CD47 isoforma 3 es de 312 aminoácidos de longitud. Las tres isoformas son idénticas en secuencia en los primeros 303 aminoácidos. Los aminoácidos 1-8 comprenden la secuencia señal, los aminoácidos 9-142 comprenden la inmunoglobulina CD47 como de dominio, que es el fragmento soluble, y los aminoácidos 143 a 300 es el dominio transmembrana.

"Miméticos" CD47 incluyen moléculas que funcionan de manera similar a CD47 mediante la unión y la activación de receptor SIRP $\alpha$ . Las moléculas útiles como miméticos de CD47 incluyen derivados, variantes y fragmentos biológicamente activos de origen natural CD47. Un polipéptido "variante" significa un polipéptido biológicamente activo como se define a continuación que tiene menos de 100% de identidad de secuencia con un polipéptido de secuencia nativa. Tales variantes incluyen polipéptidos en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden en el extremo N- o C-terminal de, o dentro de, la secuencia nativa; desde aproximadamente uno a cuarenta amino se eliminan los residuos de ácido, y opcionalmente sustituidos por uno o más residuos de aminoácidos; y derivados de los polipéptidos anteriores, en el que un residuo de aminoácido ha sido modificado covalentemente de forma que el producto resultante tiene un aminoácido de origen no natural. Ordinariamente, una variante biológicamente activa tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de secuencia nativa, preferiblemente al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente 99%. Los polipéptidos variantes pueden ser de forma natural o no natural glicosilada, es decir, el polipéptido tiene un patrón de glicosilación que difiere del patrón de glicosilación encontrado en la proteína natural correspondiente. Los polipéptidos variantes pueden tener modificaciones postraduccionales que no se encuentran en la proteína CD47 natural.

Los fragmentos de la CD47 soluble, particularmente fragmentos biológicamente activos y/o fragmentos correspondientes a dominios funcionales, son de interés. Los fragmentos de interés serán típicamente de al menos aproximadamente 10 aa a al menos aproximadamente 15 aa de longitud, habitualmente al menos aproximadamente 50 aa de longitud, pero por lo general no excede de alrededor de 142 aa de longitud, donde el fragmento tendrá un tramo de aminoácidos que es idéntica a CD47. Un fragmento "al menos 20 aa de longitud", por ejemplo, pretende incluir 20 o más aminoácidos contiguos de, por ejemplo, el polipéptido codificado por un ADNc para CD47. En este contexto, "aproximadamente" incluye el valor recitado en particular o un valor superior o inferior en varios (5, 4, 3, 2 ó 1) aminoácidos. Las variantes de proteínas descritas en este documento son codificados por polinucleótidos que están dentro del alcance de la invención. El código genético se puede utilizar para seleccionar los codones apropiados para construir las variantes correspondientes. Los polinucleótidos pueden ser utilizados para producir polipéptidos, y estos polipéptidos se pueden usar para producir anticuerpos por métodos conocidos.

Un polipéptido de "fusión" es un polipéptido que comprende un polipéptido o porción (por ejemplo, uno o más dominios) del mismo fusionado o unido a un polipéptido heterólogo. Una proteína de CD47 soluble de fusión, por ejemplo, compartirá al menos una propiedad biológica en común con un polipéptido CD47 soluble secuencia nativa. Los ejemplos de polipéptidos de fusión incluyen inmunoadhesinas, como se describe anteriormente, que combinan una porción del polipéptido CD47 con una secuencia de inmunoglobulina, y los polipéptidos de epítipo etiquetado, que comprenden un polipéptido CD47 soluble o parte del mismo fusionado a un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el que un anticuerpo se puede hacer, sin embargo, es lo suficientemente corto de manera que no interfiere con la actividad biológica del polipéptido CD47. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente al menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 6-60 residuos de aminoácidos.

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. "Derivados funcionales" incluyen, pero no se limitan a, los 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 "derivado" abarca tanto las variantes de secuencia aminoacídica de polipéptidos y modificaciones covalentes de los mismos. Derivados y fusión de CD47 soluble encuentran uso como moléculas miméticas de CD47.

Los primeros 142 aminoácidos del polipéptido CD47 comprenden la región extracelular de CD47 (SEQ ID NO: 1). Las tres isoformas tienen secuencia de aminoácidos idéntica en la región extracelular, y por lo tanto ninguna de las isoformas se pueden utilizar para generar CD47 soluble. "CD47 soluble" es una proteína de CD47 que carece del dominio de transmembrana. CD47 soluble se secreta fuera de la célula que expresa que en lugar de estar localizado en la superficie celular. CD47 soluble puede estar fusionado a otro polipéptido para proporcionar la funcionalidad adicional, por ejemplo, para aumentar la estabilidad in vivo. Generalmente, tales parejas de fusión son una proteína plasmática estable que es capaz de extender la in vivo la vida media plasmática de la proteína CD47 soluble cuando está presente como una fusión, en particular en donde una proteína de plasma estable tal es un dominio constante de inmunoglobulina. En la mayoría de los casos en que la proteína plasmática estable se encuentran habitualmente en una forma multimérica, por ejemplo, inmunoglobulinas o lipoproteínas, en el que los mismos o diferentes cadenas de polipéptidos son normalmente disulfuro y/o no covalentemente unidos para formar un polipéptido de cadena múltiple montado. CD47 soluble fusionado a Ig G1 humana se ha descrito (Motegi S. et al

EMBO J. 22 (11):. 2634-2644).

Las proteínas plasmáticas estables son proteínas que típicamente tienen aproximadamente de 30 a 2000 residuos, que exhiben en su entorno nativo de una prolongada vida media en la circulación, es decir, mayor que aproximadamente 20 horas. Ejemplos de proteínas plasmáticas estables adecuadas son inmunoglobulinas, albúmina, lipoproteínas, apolipoproteínas y transferrina. La región extracelular de CD47 es típicamente fusionada a la proteína de plasma en el extremo N-terminal de la proteína plasmática o fragmento de la misma que es capaz de conferir una vida media prolongada de la CD47 soluble. Los aumentos de más de aproximadamente 100% en la vida media plasmática del CD47 soluble son satisfactorios.

Normalmente, la CD47 soluble se fusiona C-terminal a la N-terminal de la región constante de inmunoglobulinas en lugar de la región variable (s) del mismo, sin embargo las fusiones N-terminales también pueden encontrar uso. Típicamente, tales fusiones retienen al menos bisagra funcionalmente activa, los dominios CH2 y CH3 de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina, que las cadenas pesadas pueden incluir IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE, e IgD, por lo general uno o una combinación de proteínas de la clase IgG. Las fusiones también se realizan en el C-terminal de la porción Fc de un dominio constante, o inmediatamente N-terminal al CH1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera. Esto se logra normalmente mediante la construcción de la secuencia de ADN apropiada y expresándola en cultivo celular recombinante. Alternativamente, los polipéptidos se pueden sintetizar de acuerdo con métodos conocidos.

El sitio preciso en el que se realiza la fusión no es crítico; sitios particulares se pueden seleccionar con el fin de optimizar la actividad biológica, la secreción o las características de unión de CD47. El sitio óptimo se determinará por mentación ex rutina.

En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas híbridas se ensamblan como monómeros, o hetero- u homo-multímeros, y particularmente como dímeros o tetrámeros. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la que existen IgG, IgD, e IgE. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de mayor peso molecular; IgM existe generalmente como un pentámero de unidades básicas de cuatro cadenas se mantienen juntas por enlaces disulfuro. IgA inmunoglobulina, y de vez en cuando de inmunoglobulina IgG, también pueden existir en una forma multimérica en el suero. En el caso de múltímeros, cada unidad de cuatro cadenas puede ser la misma o diferente.

Miméticos CD47 adecuados y/o proteínas de fusión pueden identificarse por investigación de compuestos mediante la detección de la capacidad de un agente para imitar la actividad biológica de CD47. Una actividad biológica de CD47 es la activación del receptor SIRP $\alpha$  en los macrófagos. Los ensayos in vitro pueden llevarse a cabo como una primera pantalla de la eficacia de un agente candidato, y por lo general un ensayo in vivo se llevarán a cabo para confirmar el ensayo biológico. Agentes deseables son eficaces en el bloqueo temporal de la activación del receptor SIRP $\alpha$ . Agentes deseables son de naturaleza temporal, por ejemplo, debido a la degradación biológica.

Ensayos in vitro de actividad biológica CD47 incluyen, por ejemplo, la inhibición de la fagocitosis de las células de porcino por los macrófagos humanos, la unión a receptor SIRP  $\alpha$ , fosforilación tirosina SIRP  $\alpha$ , etc. Un ensayo ejemplar para actividad biológica CD47 contacta 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 lisaron. El lisado de células se mezcla con anticuerpos SIRP  $\alpha$  anti-humanos para inmunoprecipitar SIRP  $\alpha$ . Las proteínas precipitadas se resolvieron mediante SDS PAGE, después se transfirieron a nitrocelulosa y se sondaron con anticuerpos específicos para fosfotirosina. Un agente candidato útil como mimético CD47 aumenta fosforilación tirosina SIRP  $\alpha$  por al menos 10%, o hasta el 20%, o 50%, o 70% o 80% o hasta aproximadamente 90% en comparación con el nivel de fosforilación observada en ausencia de agente candidato. Otro ensayo ejemplar para la actividad biológica CD47 mide la fagocitosis de las células hematopoyéticas por los macrófagos humanos. Un agente candidato útil como resultados miméticos CD47 en la regulación por disminución de la fagocitosis en al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, o hasta aproximadamente 90% en comparación con el nivel de fagocitosis observado en ausencia del agente candidato.

Polinucleótido que codifica CD47 soluble o soluble CD47-Fc se puede introducir en un vector de expresión adecuado. El vector de expresión se introduce en una célula adecuada. Los vectores de expresión generalmente tienen sitios de restricción convenientes situados cerca de la secuencia promotora para proporcionar la inserción de secuencias de polinucleótidos. casetes de transcripción se pueden preparar que comprende una región de transcripción de iniciación, el gen CD47 o fragmento de la misma, y una región de terminación de la transcripción. Los casetes de transcripción pueden introducirse en una variedad de vectores, por ejemplo, plásmido; retrovirus, por ejemplo, lentivirus; adenovirus; y similares, donde los vectores son capaces de mantenerse transitoria o establemente en las células, por lo general por un período de al menos aproximadamente un día, más habitualmente durante un período de al menos aproximadamente varios días a varias semanas.

Las diferentes manipulaciones pueden llevarse a cabo in vitro o se pueden realizar en un huésped apropiado, por ejemplo, E. coli. Después de cada manipulación, la construcción resultante puede ser clonada, el vector aislado, y el ADN controlado o secuenciado para garantizar la exactitud de la construcción. La secuencia puede ser examinada por análisis de restricción, secuenciación, o similares.

CD47 soluble se puede recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes por métodos bien conocidos incluyendo sulfato de amonio o precipitación de etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de afinidad de proteínas G, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Más preferiblemente, se emplea cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") para la purificación.

CD47 soluble también pueden recuperarse a partir de: productos purificados de las células, ya sea directamente aislados o cultivados; productos de procedimientos sintéticos químicos; y productos producidos por técnicas recombinantes a partir de un huésped procarionta o eucariota, incluyendo, por ejemplo, bacterianas, de levadura de plantas superiores, de insectos y células de mamíferos.

Una serie de ensayos se puede ejecutar en paralelo con diferentes concentraciones para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Como se conoce en la técnica, la determinación de la concentración eficaz de un agente normalmente utiliza un intervalo de concentraciones resultantes de 1:10, o de otra escala logarítmica, diluciones. Las concentraciones pueden ser más refinadas con una segunda serie de diluciones, en caso necesario. Típicamente, una de estas concentraciones sirve como control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección del agente o en o por debajo de la concentración de agente que no reconocen un cambio detectable en la unión.

Los compuestos de interés para la investigación incluyen agentes biológicamente activos de numerosas clases químicas, moléculas orgánicas principalmente, aunque también en algunos casos las moléculas inorgánicas, moléculas organometálicas, inmunoglobulinas, proteínas CD47 quiméricas, proteínas relacionadas con CD47, secuencias genéticas, etc. También de interés son moléculas orgánicas pequeñas, que comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlaces de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos una amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, con frecuencia al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos a menudo comprenden estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los agentes candidatos también se encuentran entre biomoléculas, incluyendo péptidos, polinucleótidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

Los compuestos se obtienen a partir de una amplia variedad de fuentes, incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos, incluyendo biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Alternativamente, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles o se producen fácilmente. Además, las bibliotecas y compuestos naturales o producidos sintéticamente se modifican fácilmente a través de química convencional, medios físicos y bioquímicos, y se pueden usar para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc., para producir análogos estructurales.

Por "fagocitosis manipular" se entiende una regulación hacia arriba o una baja regulación de la fagocitosis en al menos aproximadamente 10%, o hasta el 20%, o 50%, o 70% o 80% o hasta aproximadamente 90% en comparación con el nivel de fagocitosis observado en ausencia de intervención. Así, en el contexto de disminución de la fagocitosis de circulación de las células hematopoyéticas, en particular en un contexto del trasplante, la manipulación de la fagocitosis significa una baja regulación de la fagocitosis en al menos aproximadamente 10%, o hasta el 20%, o 50%, o 70% o 80% o hasta aproximadamente 90% en comparación con el nivel de fagocitosis observado en ausencia de intervención.

Los inhibidores de CD47. Agentes de interés como inhibidores de CD47 incluyen miembros de unión específica que impiden la unión de CD47 con el receptor SIRP  $\alpha$ . El término "miembro de unión específica" o "miembro de unión", como se usa aquí se refiere a un miembro de un par de unión específica, es decir, dos moléculas, por lo general dos moléculas diferentes, donde una de las moléculas (es decir, miembro de unión primero específico) a través de química o medio físico se une específicamente a la otra molécula (es decir, miembro de unión específica segundo). Inhibidores de CD47 útiles en los métodos de la invención incluyen análogos, derivados y fragmentos del miembro de unión original, específico.

En una realización preferida, el miembro de unión específica es un anticuerpo. El término "anticuerpo" o "resto de anticuerpo" pretende incluir cualquier estructura molecular polipéptido de cadena que contiene con 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. Los anticuerpos utilizados en la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales, aunque se prefieren los anticuerpos monoclonales, ya que pueden ser reproducidos por el cultivo de células o de forma recombinante, y pueden ser modificados para reducir su antigenicidad.

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, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Cuando se utiliza una proteína entera, o una sección más grande de la proteína, pueden obtenerse anticuerpos inmunizando el animal de producción con la proteína y un adecuado adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund, completo de Freund, de aceite-en-agua, etc.) Cuando se utiliza un péptido más pequeño, es ventajoso conjugar el péptido con una molécula más grande para hacer un conjugado inmunoestimulador. Proteínas conjugadas comúnmente utilizadas que están disponibles comercialmente para tal uso incluyen albúmina de suero bovino (BSA) y hemocianina de lapa californiana (KLH). Con el fin de producir anticuerpos contra epítipos particulares, se pueden utilizar péptidos derivados de la secuencia completa. Alternativamente, con el fin de generar anticuerpos a las porciones de péptidos relativamente cortas de la proteína objetivo, una respuesta inmune superior puede ser provocada si el polipéptido se une a una proteína portadora, tal como la ovoalbúmina, BSA o KLH. Alternativamente, para los anticuerpos monoclonales, los hibridomas pueden formarse mediante el aislamiento de las células inmunes estimuladas, como las del bazo del animal inoculado. Estas células se fusionan a células inmortalizadas, tales como células de mieloma o células transformadas, que son capaces de replicarse indefinidamente en cultivo celular, produciendo de este modo una línea celular inmortal, la inmunoglobulina secretora. Además, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se pueden producir por ingeniería genética. Anticuerpos humanos humanizados, quiméricos, o xenogénicos, que producen menor respuesta inmune cuando se administra a seres humanos, son los preferidos para uso en la presente invención.

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')<sub>2</sub>, u otros fragmentos) son útiles como restos de anticuerpos en la presente invención. Tales fragmentos de anticuerpos pueden ser generados a partir de las inmunoglobulinas enteras por ricina, pepsina, papaína, o de otro tipo de escisión de proteasa. "Fragmento", o inmunoglobulinas mínimos pueden ser diseñados utilizando técnicas de inmunoglobulinas recombinantes. Por ejemplo inmunoglobulinas "Fv" para uso en la presente invención se pueden producir mediante la vinculación de una región de cadena ligera variable de una región de cadena pesada variable a través de un enlazador peptídico (por ejemplo, poli-glicina u otra secuencia que no forma un motivo de hoja de hélice alfa o beta).

La eficacia de un inhibidor de CD47 se evalúa mediante el ensayo de la actividad de CD47. Las versiones de los ensayos antes mencionados o modificados se utilizan de la misma. En un ensayo ejemplar, AML SCs se incuban con macrófagos derivados de médula ósea, en presencia o ausencia del agente candidato. Un inhibidor de CD47 de la superficie celular regulará la fagocitosis hacia arriba por al menos aproximadamente 10%, o hasta el 20%, o 50%, o 70% o 80% o hasta aproximadamente 90% en comparación con la fagocitosis en ausencia del candidato agente. Del mismo modo, un ensayo in vitro para los niveles de fosforilación de la tirosina de SIRPα mostrará una disminución en la fosforilación en al menos aproximadamente 10%, o hasta el 20%, o 50%, o 70% o 80% o hasta aproximadamente 90% en comparación con fosforilación observada en ausencia del agente candidato.

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 a receptor SIRPα presente en la superficie de las células fagocíticas. La cantidad eficaz se determina a través de la rutina de prueba empírica en la técnica. La cantidad eficaz puede variar en función del número de células que se trasplanta, el sitio de trasplante y los factores específicos para el receptor del trasplante.

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

El término "muestra biológica" abarca una variedad de tipos de muestras obtenidas de un organismo y se pueden utilizar en un ensayo de diagnóstico o de control. El término abarca la sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido, tal como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de los mismos o la progenie de los mismos. El término abarca muestras que han sido manipuladas de cualquier forma después de su obtención, como por tratamiento con reactivos, solubilización, o enriquecimiento de determinados componentes. El término abarca una muestra clínica, y también incluye células en cultivo celular, sobrenadantes celulares, lisadocelulares, suero, plasma, fluidos biológicos y muestras de tejido.

Las células madre hematopoyéticas (HSC), como se usa en el presente documento, se refiere a una población de células que tienen la capacidad de auto-renovación, y para dar lugar a todos los linajes hematopoyéticos. Tales poblaciones de células se han descrito en detalle en la técnica. Células progenitoras hematopoyéticas incluyen los progenitores mieloides comprometidos (CMP), los progenitores linfoides cometidos

(CLP), progenitores megacariocitos, y progenitores multipotentes. La célula linfoide restringida antigua conocida en médula ósea de ratón adulto es el linfocito progenitor común (CLP), y la célula mieloides restringida más antigua conocida es el progenitor mieloides común (CMP). Es importante destacar que estas poblaciones de células poseen un nivel extremadamente alto de fidelidad a la linaje de ensayos del desarrollo *in vitro* y *in vivo*. Una descripción completa de estos subconjuntos de células puede encontrarse en Akashi et al. (2000), *Nature* 404 (6774): 193, la patente de EE.UU. n.º. 6.465.247; y la solicitud publicada USSN 09/956.279 (progenitoras mieloides comunes); Kondo et al. (1997) *Cell* 91 (5): 661-7, y la solicitud Internacional WO99/10478 (progenitor linfoide común); y es revisada por Kondo et al. (2003) *Annu Rev Immunol.* 21: 759-806. La composición se puede congelar a temperaturas de nitrógeno líquido y se almacenan durante largos períodos de tiempo, siendo capaces de ser usados en la descongelación. Para una composición de este tipo, las células normalmente se almacenarán en una DMSO 10%, 50% de FCS, 40% RPMI 1640 medio.

Las poblaciones de interés para uso en los métodos de la invención incluyen composiciones sustancialmente puras, por ejemplo al menos aproximadamente 50% HSC, al menos aproximadamente 75% HSC, al menos aproximadamente 85% HSC, al menos aproximadamente 95% HSC o más; o pueden ser combinaciones de una o más de vástago y de las poblaciones de células progenitoras, por ejemplo, células blancas obtenidas de aféresis, etc. Cuando se desean las poblaciones de células purificadas, la población objetivo se puede purificar de acuerdo con técnicas conocidas. Por ejemplo, una población que contiene células blancas de la sangre, en particular incluyendo muestras de sangre o de médula ósea, se tiñen con reactivos específicos para los marcadores presentes de las células madre y progenitoras hematopoyéticas, que los marcadores son suficientes para distinguir los principales grupos madre y progenitoras. Los reactivos, por ejemplo, anticuerpos, pueden marcarse de manera detectable, o pueden marcarse indirectamente en el procedimiento de tinción.

Cualquier combinación de marcadores pueden ser utilizados que son suficientes para seleccionar para las células madre/progenitoras de interés. Una combinación de marcadores de interés puede incluir CD34 y CD38, que distingue las células madre hematopoyéticas, (CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>) a partir de células progenitoras, que son CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>. HSC son linaje marcador negativo y positivo para la expresión de CD90.

En el linaje mieloides son tres poblaciones de células, denominado CMP, GMP, y los eurodiputados. Estas células son CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, que son negativos para múltiples marcadores de linaje maduros incluidos los marcadores linfoides tempranos como CD7, CD10, e IL-7R, y que se distinguen además por los marcadores CD45RA, una isoforma de CD45 que pueden regular negativamente al menos algunos clases de señalización del receptor de citoquinas, y la IL-3R. Estas características son CD45RA IL-3R<sup>lo</sup> (CMP), CD45RA+IL-3R<sup>lo</sup> (BPF), y CD45RA IL-3R<sup>-</sup> (MEPS). células CD45RA IL-3R<sup>lo</sup> dan lugar a las BPF y los diputados y al menos un tercio generan ambas colonias GM y MegE a nivel de una sola célula. Los tres de los progenitores mieloides de linaje tiñen negativamente para los marcadores Thy-1 (CD90), IL-7R $\alpha$  (CD127); y con un panel de marcadores de linaje, que los marcadores de linaje pueden incluir CD2; CD3; CD4; CD7; CD8; CD10; CD11b; CD14; CD19; CD20; CD56; y glicoforina A (GPA) en los seres humanos y CD2; CD3; CD4; CD8; CD19; IgM; Ter110; Gr-1 en ratones. Con la excepción del subconjunto MEP ratón, todas las células progenitoras son células CD34 positivas. En el ratón todos los subconjuntos progenitores pueden caracterizarse adicionalmente como Sca-1 negativa, (Ly-6E y Ly-6A), y c-kit alta. En el ser humano, los tres de los subconjuntos son CD38<sup>+</sup>.

Los progenitores linfoides comunes, CLP, expresan niveles bajos de *c-kit* (CD117) sobre su superficie celular. Los anticuerpos que se unen específicamente *c-kit* en humanos, ratones, ratas, etc., se conocen en la técnica. Alternativamente, el ligando *c-kit*, factor de acero (SLF) puede utilizarse para identificar células que expresan *c-kit*. Las células CLP expresan altos niveles de cadena alfa del receptor de IL-7 (CDw127). Los anticuerpos que se unen a humano o ratón CDw127 son conocidos en la técnica. Alternativamente, las células se identifican por la unión del ligando al receptor, IL-7. CLPs humanos expresan bajos niveles de CD34. Los anticuerpos específicos para CD34 humana están disponibles comercialmente y bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Chen et al. (1997) *Immunol Rev* 157: 41-51. CLP células humanas también se caracterizan como CD38 positivo y CD10 positivo. El subconjunto CLP también tiene el fenotipo de falta de expresión de marcadores específicos de linaje, ejemplificada por B220, CD4, CD8, CD3, Gr-1 y Mac-1. Las células de CLP se caracterizan por carecer de expresión de Thy-1, un marcador que es característico de las células madre hematopoyéticas. El fenotipo de la CLP puede caracterizarse además como Mel-14<sup>-</sup>, CD43<sup>lo</sup>, HSA<sup>lo</sup>, CD45<sup>+</sup> receptor común de citoquinas y cadena positiva.

Las células progenitoras de megacariocitos (MKP) son positivas para la expresión de CD34, y antígeno CD9 tetraspanina. El antígeno CD9 es una molécula de ácido 227-amino con 4 dominios hidrófobos y 1 sitio de N-glicosilación. El antígeno se expresa ampliamente, pero no está presente en ciertas células progenitoras en los linajes hematopoyéticos. Las células MKP expresan CD41, también conocido como el/la integrina IIIa de glicoproteína IIb, que es el receptor de plaquetas para el fibrinógeno y otras moléculas de la matriz extracelular. Para el que los anticuerpos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA., número de catálogo 340929, 555466. Células MKP son positivas para la expresión de CD117, que reconoce el receptor tirosina quinasa *c-Kit*. Los anticuerpos están comercialmente disponibles, por ejemplo, de BD Bio-ciencias, Pharmingen, San Diego, CA, Cat. No. 340529. Células MKP son también linaje negativo y negativo para la expresión

de Thy-1 (CD90).

La frase "tumor sólido" tal como se utiliza aquí se refiere a una masa anormal de tejido que normalmente no contiene quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los diferentes tipos de tumores sólidos se denominan así por el tipo de células que los forman. Ejemplos de tumores sólidos son sarcomas, carcinomas, linfomas etc.

Los anticuerpos anti-CD47. Ciertos anticuerpos que se unen a CD47 impiden su interacción con el receptor SIRP $\alpha$ . Los anticuerpos incluyen anticuerpos libres y fragmentos de unión a antígenos derivados de los mismos, y conjugados, por ejemplo anticuerpos pegilados, fármacos, radioisótopos, o conjugados de toxinas, y similares.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra un epítipo específico, o una combinación de los epítipos, permitirán la focalización y/o el agotamiento de las poblaciones celulares que expresan el marcador. Varias técnicas se pueden utilizar usando anticuerpos monoclonales para la detección de poblaciones celulares que expresan el marcador, e incluyen separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas por anticuerpos, "panning" con anticuerpo unido a una matriz sólida (es decir, placa) y citometría de flujo (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5.985.660; y Morrison et al Cell, 96: 737-49 (1999)). Estas técnicas permiten para el cribado de poblaciones particulares de células; en inmunohistoquímica de muestras de biopsia; en la detección de la presencia de marcadores derramados por las células cancerosas en la sangre y otros fluidos biológicos, y similares.

Las versiones humanizadas de dichos anticuerpos están también dentro del alcance de esta invención. Los anticuerpos humanizados son especialmente útiles para aplicaciones in vivo en los seres humanos debido a su baja antigenicidad.

La frase "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo recombinante o sintético que reconoce más de una proteína. Los ejemplos incluyen anticuerpos biespecíficos 2B1, 520C9xH22, MDX-H210, y MDX447. Los anticuerpos biespecíficos, dirigidos contra una combinación de epítipos, permitirá la orientación y/o el agotamiento de las poblaciones celulares que expresan la combinación de epítipos. anticuerpos biespecíficos de ejemplo se incluyen los dirigidos a una combinación de CD47 y un marcador de células de cáncer, como por ejemplo, CD96, CD97, CD99, PTHR2, HAVCR2 etc. Generación de anticuerpo bi-específico se describe en la literatura, por ejemplo, en el documento USPN 5,989,830 , USPN 5.798.229.

Los términos "tratamiento", "tratar", "tratar" y similares se usa aquí para referirse generalmente a la obtención de un efecto farmacológico deseado y/o fisiológico. 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 curación parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento" como se usa en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un humano, e incluye: (a) la prevención de la enfermedad o síntoma se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o síntoma pero que todavía no ha sido diagnosticado que la tiene; (b) inhibir el síntoma de enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar el síntoma de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o síntoma.

Los términos "receptor", "individuo", "sujeto", "anfitrión" y "paciente", se utilizan aquí de forma intercambiable y se refieren a cualquier sujeto mamífero para quien se desea el diagnóstico, tratamiento o terapia, particularmente en seres humanos.

Una "célula huésped", como se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo o una célula eucariótica o una línea celular cultivada como una entidad unicelular que puede ser, o ha sido, usada como receptor de un vector recombinante o de otros polinucleótidos de transferencia, e incluyen la progenie de la célula original que ha sido transfectada. Se entiende que la progenie de una única célula puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total como el padre original, debido a la mutación natural, accidental, o deliberada.

Los términos "cáncer", "neoplasma", "tumor", y "carcinoma", se utilizan indistintamente en este documento para referirse a células que muestran 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 el tratamiento en la presente solicitud incluyen las precancerosas (por ejemplo, benigno), malignas, pre-metastásicas, metastásicas, y las células no metastásicas. La detección de células cancerosas es de particular interés. El término "normal", como se usa en el contexto de "célula normal", pretende referirse a una célula de un fenotipo sin transformar o que muestra una morfología de una célula no transformada del tipo de tejido que se examina. "Fenotipo canceroso" se refiere generalmente a cualquiera de una variedad de fenómenos biológicos que son característicos de una célula cancerosa, fenómenos que 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, crecimiento incontrolado o proliferación), la regulación del ciclo celular, la movilidad celular, la interacción célula-célula o la metástasis, etc.

"Objetivo terapéutico" se refiere a un producto génico o gen que, tras la modulación de su actividad (por ejemplo, por modulación de la expresión, actividad biológica, y similares), puede proporcionar la modulación del fenotipo canceroso. Tal como se utiliza en todo el documento, "modulación" se entiende que 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 de una actividad biológica o una disminución de una actividad biológica).

#### MÉTODOS PARA TRASPLANTE

Se proporcionan métodos para manipular la fagocitosis de las células hematopoyéticas circulantes. En algunos casos, las células circulantes son células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas, en particular en un contexto del trasplante, donde la protección de la fagocitosis es deseable. En algunas realizaciones de la invención, las células circulantes son células de leucemia, especialmente leucemia mieloide aguda (AML), donde el aumento de la fagocitosis es deseable.

En algunas realizaciones, las células madre o progenitoras hematopoyéticas pueden ser protegidas de la fagocitosis en circulación proporcionando un animal huésped con una molécula mimética CD47, que interactúa con SIRP $\alpha$  en los macrófagos y disminuye la fagocitosis de macrófagos. El mimético de CD47 puede ser CD47 soluble; CD47 recubierto en la superficie de las células a ser protegidas, un mimético de CD47 que se une a SIRP $\alpha$  en el sitio de unión CD47, y similares. En algunos casos, CD47 se ofrece como una proteína de fusión, por ejemplo CD47 soluble fusionado a un fragmento Fc, por ejemplo, IgG1 Fc, IgG2 Fc, Ig A Fc, etc.

Los métodos para la generación de proteínas que carecen de la región transmembrana son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una CD47 soluble se puede generar mediante la introducción de un codón de parada inmediatamente antes de la secuencia de polinucleótido que codifica la región transmembrana. Alternativamente, la secuencia de polinucleótido que codifica la región transmembrana se puede sustituir por una secuencia de polinucleótido que codifica una proteína de fusión tal como IgG1 Fc. Secuencia de fragmentos Fc de diferentes fuentes están disponibles a través de la base de datos accesible al público incluyendo Entrez, EMBL, etc. Por ejemplo, el ARNm que codifica el fragmento IgG1 Fc humana se proporciona por el número de acceso X70421.

Se describen aquí procedimientos para el trasplante de células madre o progenitoras hematopoyéticas en un recipiente mamífero. Una necesidad de un trasplante puede ser causada por condiciones genéticas o ambientales, por ejemplo, quimioterapia, exposición a radiación, etc. Las células para el trasplante pueden ser mezclas de células, por ejemplo linfocitos de la capa leucocitaria de un donante, o pueden ser parcial o sustancialmente pura. Las células pueden ser células autólogas, en particular si retira antes de la citoreductora u otra terapia, o las células alogénicas, y puede ser utilizado para células madre hematopoyéticas o el aislamiento de células progenitoras y su posterior trasplante.

Las células se pueden combinar con mimético CD47 soluble antes de la administración. Por ejemplo, las células se pueden combinar con el mimético a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, etc., a una temperatura de desde alrededor de 4 °, alrededor de 10 °, alrededor de 25°alrededor de 37 °, para un período de tiempo suficiente para recubrir las células, donde en algunos casos, las células se mantienen en hielo. En otros casos se ponen en contacto las células con el mimético CD47 inmediatamente antes de la introducción en el receptor, en donde las concentraciones de mimético son como se describen anteriormente.

La composición que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas y un mimético de CD47 se administra en cualquier medio fisiológicamente aceptable, normalmente por vía intravascular, aunque también pueden introducirse en el hueso u otro sitio conveniente, donde las células pueden encontrar un sitio apropiado para la regeneración y diferenciación. Por lo general, se administrarán al menos  $1 \times 10^5$  células, preferiblemente  $1 \times 10^6$  o más. La composición se puede introducir mediante inyección, catéter, o similares.

#### TRASTORNOS MIELOPROLIFERATIVOS, LEUCEMIAS Y SÍNDROME MIELODISPLÁSICO

Las leucemias agudas son leucemia que progresa rápidamente caracterizada por la sustitución de la médula ósea normal por las células blásticas de un clon derivado de la transformación maligna de una célula hematopoyética. Las leucemias agudas son la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia mieloide aguda (AML). ALL a menudo implica el sistema nervioso central, mientras que la leucemia aguda implica monoblasto las encías, y AML implica colecciones localizadas en cualquier sitio (sarcomas granulocítica o cloromas).

Los síntomas que se presentan son por lo general no específicos (por ejemplo, fatiga, fiebre, malestar general, pérdida de peso) y reflejan el fracaso de la hematopoyesis normal. La anemia y trombocitopenia son muy comunes (75 a 90%). El recuento de glóbulos blancos puede ser disminuido, normal o aumentado. Blastocitos se encuentran generalmente en el frotis de sangre a menos que el recuento de glóbulos blancos disminuye

notablemente. Las explosiones de ALL se pueden distinguir de los de AML mediante estudios histoquímicos, citogenéticos, inmunofenotipificación, y los estudios de biología molecular. Además de los frotis con las manchas habituales, transferasa terminal, mieloperoxidasa, Sudan black B y esterasa específica y no específica.

5 ALL es la neoplasia maligna más común en los niños, con un pico de incidencia entre las edades de 3 a 5 años. También se presenta en adolescentes y tiene un segundo pico, menor en los adultos. El tratamiento típico hace hincapié en la introducción temprana de una intensiva régimen de múltiples fármacos, que puede incluir la prednisona, vincristina, antraciclina o asparaginasa. Otros fármacos y combinaciones son citarabina y etopósido y ciclofosfamida. La recaída se produce normalmente en la médula ósea, pero también puede ocurrir en el sistema nervioso central o testículos, solo o concurrente con la médula ósea. Aunque segundas remisiones pueden ser inducidas en muchos niños, remisiones posteriores tienden a ser breves.

15 La incidencia de la AML aumenta con la edad; es la leucemia aguda más común en los adultos. AML puede estar asociada con la quimioterapia o la irradiación (AML secundaria). Las tasas de inducción de remisión son más bajas que con todas, y la supervivencia libre de enfermedad a largo plazo según los informes, se produce sólo en un 20 a 40% de los pacientes. El tratamiento más difiere de ALL en que la AML responde a un menor número de medicamentos. El régimen básico incluye la inducción de citarabina; junto con daunorrubicina o idarrubicina. Algunos regímenes incluyen 6-tioguanina, etopósido, vincristina y prednisona.

20 La policitemia vera (PV) es un trastorno mieloproliferativo crónico idiopático caracterizado por un aumento en la concentración de Hb y de la masa de glóbulos rojos (eritrocitosis). PV se produce en alrededor de 2,3/100.000 personas por año; más a menudo en los hombres (aproximadamente 1,4:1). La edad media al diagnóstico es de 60 años (rango, 15 a 90 años; rara vez en la infancia); 5% de pacientes <40 años en el inicio. La médula ósea a veces parece normal, pero por lo general es hipercelular; hiperplasia involucra a todos los elementos medulares y sustituye la grasa ósea. Hay un aumento de la producción y la rotación de los glóbulos rojos, neutrófilos y plaquetas. El aumento de megacariocitos puede estar presente en grupos. Hierro en la médula está ausente en > 90% de los pacientes, incluso cuando no se ha realizado la flebotomía.

30 Los estudios de mujeres con PV que son heterocigotas en el locus ligado al cromosoma X para G6PD han mostrado que eritrocitos, neutrófilos y plaquetas tienen el mismo isoenzima G6PD, apoyando un origen clonal de este trastorno en un nivel de células madre pluripotentes.

35 Con el tiempo, alrededor del 25% de los pacientes tienen una supervivencia reducida de glóbulos rojos y dejan de aumentar adecuadamente la eritropoyesis; anemia y mielofibrosis se desarrollan. Hematopoyesis extramedular se produce en el bazo, el hígado y otros sitios con el potencial de formación de células sanguíneas.

40 Sin tratamiento, el 50% de los pacientes sintomáticos mueren dentro de los 18 meses del diagnóstico. Con tratamiento, la supervivencia media es de 7 a 15 años. La trombosis es la causa más común de muerte, seguido de complicaciones de la metaplasia mieloide, hemorragia, y el desarrollo de la leucemia.

La incidencia de la transformación en leucemia aguda es mayor en los pacientes tratados con fosfato radiactivo (<sup>32</sup>P) o agentes alquilantes que en los tratados con la flebotomía sola. PV que se transforma en la leucemia aguda es más resistente a la quimioterapia de inducción de la leucemia de novo.

45 Debido a que PV es la única forma de eritrocitosis para la que puede estar indicada la terapia mielosupresora, un diagnóstico exacto es crítico. La terapia debe ser individualizada de acuerdo a la edad, sexo, estado de salud, las manifestaciones clínicas y los hallazgos hematológicos.

50 El síndrome mielodisplásico (MDS) es un grupo de síndromes (pre-leucemia, anemias refractarias, leucemia mieloide crónica Ph-negativa, leucemia mielomonocítica crónica, metaplasia mieloide) se ven comúnmente en pacientes de edad avanzada. La exposición a carcinógenos puede estar implicada. MDS se caracteriza por una proliferación clonal de las células hematopoyéticas, incluyendo eritroide, mieloide, y formas megacariocíticas. La médula ósea es normal o hipercelular, y hematopoyesis ineficaz provoca citopenias variables, siendo la más frecuente la anemia. La producción de células desordenada también está asociada con anormalidades celulares morfológicas en médula ósea y sangre. Hematopoyesis extramedular puede ocurrir, resultando en hepatomegalia y esplenomegalia. La mielofibrosis es ocasionalmente el momento del diagnóstico o puede desarrollarse durante el curso de MDS. El clon MDS es inestable y tiende a progresar a AML.

60 La anemia es la característica clínica más frecuente, asociada generalmente con macrocitosis y anisocitosis. Un cierto grado de trombocitopenia es habitual; en frotis de sangre, las plaquetas varían en tamaño, y algunos parecen hipogranulares. El recuento de leucocitos puede ser normal, el aumento o disminución. Granularidad citoplasmática de neutrófilos es anormal, con anisocitosis y un número variable de gránulos. Los eosinófilos también pueden tener granularidad anormal. Una monocitosis es característica del subgrupo leucemia mielomonocítica crónica, y las células mieloides inmaduras se pueden producir en los subgrupos menos diferenciados. El pronóstico depende de la clasificación y en cualquier enfermedad altamente asociada. Respuesta

65

de MDS a quimioterapia AML es similar a la de AML, después de que la edad y el cariotipo se consideran.

#### TRATAMIENTO DEL CÁNCER

5 En la presente se divulgan métodos para reducir el crecimiento de las células cancerosas mediante el aumento de su pase de fagocitosis, a través de la introducción de un inhibidor de CD47, que es un anticuerpo anti-CD47. En ciertas realizaciones, las células cancerosas pueden ser células madre de AML. En otras realizaciones, las células cancerosas pueden ser las de un tumor sólido, tal como, glioblastoma, melanoma etc. Mediante el bloqueo de la actividad de CD47, la regulación a la baja de la fagocitosis que se encuentra con ciertas células tumorales, por ejemplo, células de AML, se previene.

10 Además de CD47, se han descubierto una serie de marcadores específicos para la AML SC. Estos incluyen CD96, CD97, CD99, PTHR2, HAVCR2 etc. Estos marcadores se han descrito en la solicitud de patente de EE.UU. nº 61/011.324, presentada el 15 de enero de 2008.

15 "Reducir el crecimiento de células de cáncer" incluye, pero no se limita a, la reducción de la proliferación de células cancerosas, y la reducción de la incidencia de una célula no cancerosa que se convierte 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, [<sup>3</sup>H] -timidina; contando el número de células durante un período de tiempo; la detección y/o medición de un marcador asociado con AML, etc.

20 Si una sustancia o una cantidad específica de la sustancia, es eficaz en el tratamiento de cáncer puede evaluarse usando cualquiera de una variedad de ensayos de diagnóstico conocidos para el cáncer, incluyendo, pero no limitándose a la biopsia, estudios radiográficos de contraste, exploración CAT, y la detección de un marcador tumoral asociado con el cáncer en la sangre del individuo. La sustancia se puede administrar sistémica o localmente, por lo general de forma sistémica.

25 En ciertas realizaciones, un anticuerpo biespecífico se puede utilizar. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico en el que el dominio de unión a antígeno está dirigido contra CD47 y el otro dominio de unión al antígeno está dirigido contra un marcador de células de cáncer, como por ejemplo, CD96 CD97, CD99, PTHR2, HAVCR2 etc. pueden ser utilizados.

30 El agotamiento de AMLSC es útil en el tratamiento de AML. El agotamiento puede lograrse por varios métodos. El agotamiento se define como una reducción de la población objetivo en hasta aproximadamente 30%, o hasta aproximadamente 40%, o hasta aproximadamente 50%, o hasta aproximadamente 75% o más. Una disminución efectiva es generalmente determinada por la sensibilidad de la condición de enfermedad en particular a los niveles de la población objetivo. Así, en el tratamiento de ciertas condiciones un agotamiento de incluso alrededor del 20% podría ser beneficioso.

35 Un agente específico de CD47 que reduce específicamente el AMLSC objetivo se utiliza para ponerse en contacto con la sangre del paciente in vitro o in vivo, en el que después de la etapa de contacto, hay una reducción en el número de AMLSC viable en la población destinataria. Una dosis eficaz de anticuerpos para un propósito de este tipo es suficiente para disminuir la población objetivo en el nivel deseado, por ejemplo como se describe anteriormente. Los anticuerpos para tales fines pueden tener baja antigenicidad en seres humanos o pueden ser anticuerpos humanizados.

#### EJEMPLO 1

#### CD47 ES UN MARCADOR DE LEUCEMIAS MIELOIDES

##### 50 Materiales y Métodos

55 *Imunohistoquímica.* citospinas de dobles poblaciones progenitoras mieloides ordenadas (CMP, GMP), IL-3R $\alpha$  alta CD45 RA+ células y CD14+c-kit+lin- células se realizaron usando un aparato de citospina Shandon. Citospinas fueron teñidas con Giemsa diluyeron 1/5 con H2O durante 10 min seguido por tinción con May-Grunwald durante 20 minutos. Citospinas se analizaron con la ayuda de un microscopio Zeiss.

60 *Médula ósea humana y muestras de sangre periféricas.* Las muestras de médula ósea normal se obtuvieron con el consentimiento informado de donantes de 20 a 25 años de edad remunerados que estaban hepatitis A, B, C y VIH negativos por serología (todas las células). Muestras de médula ósea CMML se obtuvieron con consentimiento informado, de los pacientes no tratados previamente, en la Universidad de Medicina de Stanford.

65 *Médula ósea humana HSC y análisis mieloides progenitor de citometría de flujo y de clasificación de células.* Fracciones mononucleares se extrajeron después de la centrifugación de densidad de Ficoll de acuerdo con métodos estándar y se analizaron directamente o después de la descongelación rápida de muestras previamente

congeladas en 90% de FCS y 10% DMSO en nitrógeno líquido. En algunos casos, las células CD34+se enriquecieron a partir de fracciones mononucleares con la ayuda de bolas inmunomagnéticas (CD34+Progenitor Kit de aislamiento, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania). Antes del análisis FACS y clasificación, los progenitores mieloides fueron teñidas con ficoeritrina marcador de linaje específico de anticuerpos (PE) -Cy5 conjugados incluyendo CD2 RPA-2.10; CD11b, ICRF44; CD20, 2H7; CD56, B159; GPA, GA-R2 (Becton Dickinson - PharMingen, San Diego), CD3, S4.1; CD4, S3.5; CD7, CD7-6B7; CD8, 3B5; CD10, 5-1B4, CD14, TUK4; CD19, SJ25-C1 (Caltag, South San Francisco, CA) y APC-conjugado anti-CD34, HPCA-2 (Becton Dickinson-PharMingen), biotina anti-CD38, hit2 (Caltag) además de PE-conjugado anti-IL -3R $\alpha$ , 9F5 (Becton Dickinson, ParMingen) y FITC-conjugado anti-CD45RA, MEM56 (Caltag) seguido por tinción con estreptavidina -Texas Red para visualizar las células teñidas CD38-BIO y resuspensión en yoduro de propidio para excluir las células muertas. Se incluyeron muestras no teñidas y controles de isotipo para evaluar la fluorescencia de fondo.

Después de la tinción, las células se analizaron y se clasificaron utilizando un FACS Vantage modificado (Becton Dickinson Vacunar Immunocytometry Systems, Mountain View, CA) equipado con un láser de colorante 599 nm y un láser de argón de 488 nm. Se identificaron las células progenitoras ordenadas dobles (HSC) como CD34+CD38+y el linaje negativo. Progenitores mieloides comunes (CMP) fueron identificados en base a la tinción de CD34+CD38+IL-3R $\alpha$ +CD45RA a linealidad y su progenie incluyendo granulocitos/progenitores macrófagos (GMP) eran CD34+CD38+IL-3R $\alpha$ +CD45RA+, mientras que los progenitores de megacariocitos/eritrocitos (MEP) se identificaron sobre la base de CD34+CD38+IL-3R $\alpha$  - CD45RA lin- tinción (Manz, PNAS 11872).

*Expresión CD47 por Progenitores normales frente a mieloproliferativos y AML*

Se tomaron muestras de sangre y médula ósea se obtuvieron con el consentimiento informado de los pacientes con trastornos mieloproliferativos y leucemia mielógena aguda en la Universidad de Medicina de Stanford conforme a las disposiciones de Stanford IRB y HIPAA. Las células mononucleares de sangre periférica o médula ósea (1 - 5x10<sup>6</sup> células) fueron teñidas con un cóctel de linaje como anteriormente pero con exclusión de CD7, CD11b y CD14. Posteriormente, las muestras se tiñeron con CD14 PE (1/25), CD47 FITC (1/25), CD38 Bio (Bio) y c-kit de APC (1/25) o CD34 APC o FITC (1/50) durante 45 minutos seguido de lavado y tinción con estreptavidina Texas Red (1/25) durante 45 min y, finalmente, la resuspensión en yoduro de propidio.

Discusión

Aquí mostramos que sobreexpresión CD47 es característica de la progresión de los trastornos mieloproliferativos humanos para AML (véanse las figuras 1 - 5B). CD47 controla la función de la integrina, pero también la capacidad de los macrófagos para fagocitar las células, dependiendo del nivel de expresión de CD47. Por lo tanto, la expresión de CD47 aberrante puede permitir que LSC evada la inmunidad del huésped tanto innata como adaptativa.

Análisis de expresión de CD47 humano se realiza a través de FACS sobre el trastorno humano normal, trastorno pre-leucémico mieloproliferativo (MPD) o AML HSC, progenitores y el linaje de células positivas derivadas de la médula ósea o sangre periférica. MPD muestras (n=63) incluyó la policitemia vera (PV; n=15), metaplasia post-policitémica mielóide/mielofibrosis (PP- MM/MF; n=5), trombocitemia esencial (TE; n=8), mielógena crónica atípica leucemia (CMLa; n=2), CML (n=7), leucemia eosinofílica crónica (CEL; n=1), leucemia mielomonocítica crónica (CMML; n=13) y la leucemia mielógena aguda (AML; n=12). Como hemos observado con los modelos de ratones transgénicos leucémicos, la progresión de los trastornos mieloproliferativos humanos para AML (n=12) se asoció con una expansión del fondo GMP (70,6% +/- SD 2,15) en comparación con la médula ósea normal (14,7 % +/- SD 2,3). Además, el análisis FACS reveló que la expresión de CD47 aumentó primero 1,7 veces en comparación con AML HSC normal y luego aumentó a 2,2 veces mayor de lo normal con el compromiso de los progenitores AML al linaje mielóide. CD47 fue sobre-expresado por AML progenitores primitivos y su progenie, pero no por la mayoría de MPD (MFI 2,3 +/- S.D.. 0,43) en comparación con la médula ósea normal (MFI 1,9 +/- S.D.. 0,07). Por lo tanto, el aumento de expresión CD47 es un marcador de diagnóstico útil para la progresión a AML y, además, representa una nueva diana terapéutica.

Ejemplo 2

Leucemias humanas y de ratón regulan CD47 hacia arriba para evadir la muerte de los macrófagos

*CD47 Facilita injerto, inhibe la fagocitosis, y está más altamente expresado en la AML LSC.* Determinamos la expresión de CD47 en AML LSC humana y HSC normal mediante citometría de flujo. HSC (Lin-CD34+CD38-CD90+) de tres muestras humanas normales movilizó sangre periférica y AML LSC (Lin-CD34+CD38-CD90-) de siete muestras de AML humana se analizaron para la expresión en superficie de CD47 (Figura 6). CD47 se expresa en niveles bajos en la superficie de HSC normales; Sin embargo, en promedio, que era aproximadamente 5 veces más altamente expresadas en AML LSC, así como blastos leucémicos a granel.

*Anticuerpo monoclonal CD47 anti-humano estimula la fagocitosis e inhibe el injerto de la AML LSC.* Con el

fin de poner a prueba el modelo que sobreexpresión CD47 en AML LSC impide la fagocitosis de estas células a través de su interacción con SIRP $\alpha$  en células efectoras, hemos utilizado un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD47 conocido para interrumpir la interacción CD47- SIRP $\alpha$ . El hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de ratón CD47-anti-humano, denominado B6H12, era obtenido a partir de ATCC y se utiliza para producir anticuerpo purificado. En primer lugar, se realizó en ensayos de fagocitosis in vitro. AML LSC primaria humana se purificaron por FACS a partir de dos muestras de AML humana, y después cargado con el colorante fluorescente CFSE. Estas células se incubaron con macrófagos derivados de médula ósea de ratón y monitoreados mediante microscopía de inmunofluorescencia (Figura 7) y citometría de flujo (Figura 9) para identificar las células fagocitadas. En ambos casos, no se observó fagocitosis en presencia de un anticuerpo control de isotipo; Sin embargo, la fagocitosis significativa se detectó con la adición del anticuerpo anti-CD47 (Figura 9). Por lo tanto, el bloqueo de CD47 humano con un anticuerpo monoclonal es capaz de estimular la fagocitosis de estas células por los macrófagos del ratón.

A continuación se investigó la capacidad del anticuerpo anti-CD47 para inhibir AML LSC injerto in vivo. Dos muestras de AML humanas primarias se dejaron sin tratar o tratado con el anticuerpo anti-CD47 antes del trasplante en ratones recién nacidos NOG. 13 semanas más tarde, se sacrificaron los ratones y se analizaron para hueso leucemia injerto ósea humana mediante citometría de flujo (Figura 10). Los ratones de control demostraron injerto leucémico mientras que los ratones trasplantados con las células recubiertas con anti-CD47 mostraron poco o ningún injerto. Estos datos indican que el bloqueo de CD47 humano con un anticuerpo monoclonal es capaz de inhibir AML LSC injerto.

CD96 es una de Células Madre-específica de la molécula de superficie celular aguda leucemia mielóide humana. CD96, originalmente denominado táctil, fue identificado por primera vez como una molécula de superficie de células T que está altamente regulada positivamente tras la activación de células T. CD96 se expresa en niveles bajos en células T en reposo y NK y está fuertemente regulada hacia arriba a la estimulación en ambos tipos de células. No se expresa en otras células hematopoyéticas, y el examen de su patrón de expresión mostró que sólo es por otro motivo en algunos epitelios intestinales. El dominio citoplásmico de CD96 contiene un motivo ITIM putativo, pero no se sabe si esto funciona en la transducción de señales. CD96 promueve la adhesión de las células NK a células diana que expresan CD155, dando como resultado la estimulación de la citotoxicidad de las células NK activadas.

*Expresión preferencial de superficie celular de moléculas identificadas a partir de análisis de expresión génica.* Más allá de CD47 y CD96, se conocen varias moléculas descritas en la solicitud de patente de EE.UU. N° 61/011.324 que se expresa en AML LSC, incluyendo: CD123, CD44, CD99 y CD33.

La progresión tumoral se caracteriza por varias características distintivas, incluyendo la independencia de crecimiento de la señal, la inhibición de la apoptosis, y la evasión del sistema inmune, entre otros. Mostramos aquí que la expresión de CD47, un ligando para el receptor de macrófagos de señal inhibidora de proteína reguladora alfa (SIRP $\alpha$ ), se incrementa en la leucemia mielóide humana y de ratón y permite a las células para evadir la fagocitosis y aumentar su potencial tumorigénico. CD47, también conocido como proteína asociada a la integrina (IAP), es una transmembrana similar a inmunoglobulina de pentaspanina que se expresa ampliamente en tejidos de mamíferos. Proporcionamos evidencia de que CD47 está regulada positivamente en el ratón y leucemia de células madre y progenitoras mieloides humanos, así como blastos leucémicos. Consistentes con un papel biológico para CD47 en el desarrollo de la leucemia mielóide y mantenimiento, se demuestra que sobreexpresión de ectópico de CD47 permite que una línea celular de leucemia mielóide crezca en los ratones que son deficientes en células T, B y NK, mientras que se elimina de otro modo rápidamente cuando se trasplantan en estos destinatarios. El potencial leucemogénico de CD47 también se demuestra que es dependiente de la dosis, como mayores clones que expresan mayor potencial de formación de tumor de clones de menor expresión. También mostramos que las funciones de CD47 en la promoción de la leucemia mediante la inhibición de la fagocitosis de las células leucémicas por los macrófagos.

CD47 está regulada positivamente de manera significativa en leucémica Fas<sup>lpr/lpr</sup> x hMRP8bcl2 médula ósea transgénica, y en hMRP8bcr leucémica/abl x ratón hMRP8bcl2. Las transcripciones de CD47 se incrementan en hMRP8bcr leucémica/abl x hMRP8bcl2 médula ósea 3 a 4 veces por RT-PCR cuantitativa y 6-7 veces en médula ósea c-Kit enriquecida leucémica en relación con médula ósea sana hMRP8bcl2+ (Figura 11e). Bazo leucémico tenía una expansión del progenitor de macrófagos y granulocitos (GMP) emergente ulación, así como subconjuntos de c-kit+Sca-1+Lin-célula madre y progenitores respecto a ratones control, que eran del mismo genotipo como ratones leucémicos pero no pudo desarrollar la enfermedad (Figura 11a-d). se encontraron niveles de expresión para la proteína CD47 para empezar a aumentar en los ratones leucémicos con respecto a los ratones de control en la etapa de la Flk2- CD34- c-Kit+1 Sca-+ Lin- a largo plazo de células madre hematopoyéticas (LT-HSC) (Figura 11f). Este aumento del nivel de expresión se mantuvo en GMP y Mac-1+explosiones, pero no de progenitores restringidos megacariocitos/eritroides (MEP) (Figura 11f). El aumento de CD47 entre las células leucémicas y normales fue de entre 3 a 20 veces. Todos los ratones que desarrollaron leucemia que hemos examinado de hMRP8bcr/abl x hMRP8bcl2 ratones primarios (n=3) y secundarios trasplantados (n=3), Fas lpr/lpr x hMRP8bcl2 ratones primarios (n=14) y secundarios (n=19), y hMRP8bcl2 x hMRP8bcl2 ratones primarios (n=3) y secundarios CD47 (n=12) habían aumentado expresión. También hemos encontrado una mayor expresión de CD47 en ratones que recibieron retroviralmente células de médula ósea de ratón transducidas p210bcr/abl que desarrollaron

leucemia.

Se realizó un análisis FACS mediada de las poblaciones progenitoras hematopoyéticas humanas en la sangre y la médula ósea derivada de sangre del cordón normal y moviliza la sangre periférica (n=16) y trastornos mieloproliferativos (TMP), incluyendo la policitemia vera (PV; n=16), la mielofibrosis (MF; n=5), trombocitemia esencial (ET; n=7), leucemia mielomonocítica crónica (CMML; n=11) y atípica leucemia mielode crónica (CML atípica; n=1), así como la leucemia mielode crónica fase de crisis blástica (CML; n=19), CML en fase crónica (n=7) y la leucemia mielógena aguda (AML; n=13). Este análisis demostró que los progenitores de granulocitos y macrófagos (GMP) expandidos en MPD con potencial de diferenciación sesgado por mielode incluyendo CML atípico, fase proliferativa CMML y leucemia aguda incluyendo la CML en crisis blástica y AML (Figura 12a). AML HSC y progenitores mostraron uniformemente mayores niveles de expresión CD47 en comparación con los controles normales (Figura 12b); cada muestra de BC-CML y AML tenían niveles elevados de CD47. Además, la progresión de CML en fase crónica a la crisis de explosión se asoció con un aumento significativo en la expresión de CD47 (Figura 12c). Utilizando los métodos descritos en este estudio, hemos encontrado que la expresión de la proteína CD47 humana en CML-BC aumentó 2,2 veces en células CD90+CD34+CD38- Lin- con respecto a normal ( $p=6,3 \times 10^{-5}$ ), 2,3 veces en células CD90- CD34+ CD38- Lin- relativas a la normalidad ( $p=4,3 \times 10^{-5}$ ), y 2,4 veces en las células CD 34+ CD38+Lin- ( $p=7,6 \times 10^{-6}$ ) (Figuras 12b-12c); sin embargo, el uso de un protocolo de tinción más reciente optimizado hemos observado que CD47 se incrementa aproximadamente 10 veces en la AML y BC-CML en comparación con HSCs humanas normales y progenitores.

Fue entonces cuando se le preguntó si la expresión forzada de CD47 de ratón en células leucémicas humanas conferiría una ventaja competitiva en la formación de tumores en ratones. células MOLM-13, que se derivan de un paciente con AML 5A, se transdujeron con Tet-MCS-IRES-GFP (Tet) o Tet-CD47-MCS-IRES-GFP (Tet-CD47) (Figura 13a), y integrantes establex fueron propagados sobre la base de la expresión de GFP. Después las células se trasplantaron por vía intravenosa en un entorno competitivo con células MOLM-13 no transducidas en T, B, y NK recombinación deficiente activación de gen 2, ratones de cadena gamma común deficiente (RAG2-/-, Gc-/-). Sólo las células transducidas con Tet-CD47 fueron capaces de dar lugar a tumores en estos ratones, de injerto de manera eficiente la médula ósea, el bazo y la sangre periférica (figuras 13a-b). Los tumores también se caracterizan por gran carga tumoral en el hígado (Figuras 13b, 13g), que es particularmente significativo debido a que el hígado se cree que tiene el mayor número de macrófagos de cualquier órgano, con estimaciones de que las células de Kupffer pueden comprender 80% de la la población total de los macrófagos del tejido. Estas células también forman 30% del revestimiento sinusoidal, de ese modo estratégicamente colocándolos en los sitios de entrada en el hígado. Por lo tanto, el injerto significativo no tendría que desactivar una respuesta citotóxica de los macrófagos. Además del desarrollo de nódulos tumorales, las células Tet-CD47 MOLM-13 exhibieron patrones de afectación hepática suelen verse con AML humana, con la infiltración de células leucémicas el hígado con un patrón sinusoidal y perivenoso. (Figura 13d). En general, ratones trasplantados con Tet-CD47-MOLM-13 murieron con mayor rapidez que ratones Tet trasplantados con MOLM-13, que tenían prácticamente ningún injerto de las células leucémicas en los tejidos hematopoyéticos (Figura 13c). Ratones Tet-MOLM-13 aún tenían una mortalidad significativa, probablemente debido a un crecimiento localizado en el sitio de la inyección (seno retro-orbital) con extensión en el cerebro.

Dado que CD47 se ha demostrado ser importante para la migración de células hematopoyéticas, y es conocido para modular la unión a proteínas de matriz extracelular, ya sea por la interacción directa o a través de su efecto sobre las integrinas, una posibilidad para la falta de crecimiento de células Tet MOLM-13 en ratones fue su incapacidad para migrar a nichos. Para poner a prueba esta posibilidad, Células Tet MOLM-13 o Tet-CD47 MOLM-13 se inyectaron directamente en la cavidad femoral de ratones inmunodeficientes. Células Tet-CD47 MOLM-13 fueron capaces de injertarse en todos los huesos y otros tejidos hematopoyéticos de ratones receptores, mientras que Tet Células MOLM-13 tenían injerto mínimo, en su caso, en el sitio de la inyección (Figura 13E). Los ratones trasplantados de esta manera con Células Tet-CD47 MOLM-13 murieron en aproximadamente 50-60 días post-trasplante (n=4), mientras que los ratones que recibieron células Tet MOLM-13 (n=5) se mantuvieron vivos durante al menos 75 días sin signos de enfermedad, momento en el que se sacrificaron para su análisis. Estos resultados sugieren una función distinta de o además de la migración para CD47 en injerto MOLM-13.

La falta completa de CD47 se ha demostrado que el resultado de la fagocitosis de los eritrocitos y leucocitos murinos trasplantados, a través de la falta de interacción con SIRP $\alpha$  en los macrófagos. Por lo tanto, hemos probado si la sobreexpresión de CD47 podría prevenir la fagocitosis de las células vivas, no opsonizadas MOLM-13. Incubamos células Tet o Tet-CD47 MOLM-13 con macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) para 2-24 horas y la fagocitosis se evaluó contando el número de células GFP+ ingeridas bajo un microscopio o mediante la evaluación de la frecuencia de macrófagos GFP+ usando un citómetro de flujo. La expresión de CD47 rebajado drásticamente limpieza de los macrófagos de estas células en todos los puntos de tiempo ensayados, mientras que Tet-MOLM-13 se fagocitosó rápidamente de una manera que aumentó con el tiempo (figuras 14a-c). También inyectamos células MOLM-13 en ratones y se analizaron los órganos hematopoyéticos 2 horas más tarde para la evidencia de la fagocitosis de los macrófagos. Los macrófagos en la médula ósea, el bazo y el hígado todos tenían mayor fracción GFP+ cuando se inyecta con células Tet MOLM-13 en comparación con las células que expresan CD47. Esto indica que la sobre-expresión de CD47 puede compensar señales pro-fagocíticas ya presentes en las

células leucémicas, lo que les permite sobrevivir cuando de otra manera se borrarían por los macrófagos.

Un informe reciente indica que la falta de reactividad de CD47 en todas estas especies podría mediar xenorejecciones de las células trasplantadas. Además, un estudio reciente ha demostrado que CD47 humano es incapaz de interactuar con SIRP $\alpha$  de ratones C57BL/6, pero es capaz de reaccionar con el receptor de los ratones no obesos diabéticos (NOD), que son más permisivos para el injerto de células humanas de ratones C57BL/6. Por otra parte, también hemos observado que las células HL-60, una línea celular promielocítica humana con niveles más altos de expresión de CD47 humano que MOLM-13, son capaces de injertar los ratones y causar leucemia. Las células Jurkat, una línea celular de linfocitos T humanos, son muy altos para CD47 humana y son fagocitados por los macrófagos murinos in vitro a una velocidad mucho más baja que MOLM-13. Por lo tanto, nuestros datos indican que la capacidad de las células para injertar ratones in vivo o evadir la fagocitosis in vitro por los macrófagos de ratón se correlaciona con el nivel de expresión de CD47 humano.

Para modelar el efecto tumorigénico de tener expresión de CD47 alta versus baja, nos lo solucionaron clones de CD47 murino que expresan células MOLM-13 en expresadores altos y bajos. Al ajustarse según el tamaño celular, la densidad de CD47 en las células CD47<sup>lo</sup> MOLM-13 fue aproximadamente igual a las células de médula ósea de ratón, mientras que Células CD47<sup>hi</sup> MOLM-13 tenían aproximadamente expresión 9 veces más alta, un aumento acorde con el cambio observado en la expresión de CD47 en leucémica primaria las células en comparación con sus homólogos normales (Figura 15a). Cuando las células de expresión alta o baja se trasplantaron en receptores, sólo los ratones trasplantados con células de elevada expresión sucumbieron a la enfermedad por 75 días de edad (Figura 15c). Por otra parte, organomegalia fue más pronunciada en los ratones trasplantados con células de expresión alta (Figura 15d). Los ratones que recibieron células CD47<sup>lo</sup> MOLM-13 todavía tenían una masa hepática notable. Sin embargo, las masas eran invariablemente 1-2 nodos grandes que eran bien encapsulados y un cuarto separado del parénquima hepático, en marcado contraste con las masas tumorales de Células CD47<sup>hi</sup> MOLM-13 que consistía en cientos de pequeñas masas dispersas por todo el parénquima. Por lo tanto, estas grandes masas tumorales consisten en células que han encontrado macrófagos libres-nichos para crecer separadamente del cuerpo principal de órganos. Como era de esperar, la infiltración de células MOLM-13 en la médula ósea y el bazo de ratones receptores fue mucho mayor para los ratones trasplantados también con células CD47<sup>hi</sup> MOLM-13 (Figura 15e). También se examinó el nivel de expresión de CD47 en dos ratones que recibieron células CD47<sup>lo</sup> MOLM-13 pero que tenían el injerto de médula significativa. En ambos casos, las células que persisten después de 75 días tenían niveles mucho más altos de CD47 que la línea original (Figura 15f), que indica que existe una fuerte presión de selección in vivo para altos niveles de expresión CD47 sobre las células leucémicas. En total, estos datos indican que el nivel de expresión CD47 es un factor significativo en el potencial tumorigénico, y que en una población heterogénea de células leucémicas, existe una fuerte selección para los clones con una expresión alta CD47.

A continuación, preguntó si un mayor nivel de expresión CD47 proporcionaría una protección adicional contra los macrófagos de fagocitosis. Se realizó un ensayo de fagocitosis in vitro con proteína fluorescente roja CD47<sup>hi</sup> y células de expresión de CD47<sup>lo</sup> MOLM-13 (RFP). Después de la incubación con macrófagos, un número mucho mayor de células CD47<sup>lo</sup> fueron fagocitadas en comparación con las células CD47<sup>hi</sup> (Figura 15g). Si los índices de fagocíticas se comparan para las células de control MOLM-13, granel (no clasificado) Células CD47 MOLM-13, CD47<sup>lo</sup> y células MOLM-13 CD47<sup>hi</sup>, a continuación, una correlación directa entre el nivel de expresión de CD47 y la capacidad para evadir la fagocitosis se puede ver (la Figura 14a, la Figura 15f). Por otra parte, cuando células CD47<sup>lo</sup> RFP MOLM-13 y las células CD47<sup>hi</sup> GFP MOLM-13 se incubaron conjuntamente con los macrófagos en los mismos pozos, las células de expresión baja eran mucho más propensas a ser fagocitadas (Figura 15h, 15i). Por lo tanto, en una población mixta de células con diferentes niveles de expresión de CD47, las células de expresión baja son más propensas a ser limpiadas por el aclaramiento de fagocitosis con el tiempo.

También se titularon expresión de CD47 utilizando otro método. Desde CD47 se expresa en células MOLM-13 usando un sistema Tet-OFF, se utilizó el elemento promotor Tet-inducible para controlar la expresión de CD47 en Células MOLM-13. A partir de dos semanas después del trasplante con células MOLM-13 CD47<sup>hi</sup>, una cohorte de ratones se le dio la doxiciclina y seguido por hasta 75 días después del trasplante. Durante este transcurso de tiempo, ninguno de los ratones que recibieron doxiciclina sucumbió a la enfermedad o ha tenido gran infiltración de células MOLM-13 en los órganos hematopoyéticos (Figuras 15b-d). A las dosis de doxiciclina utilizadas en este experimento, la expresión  $\mu$ CD47 en Células MOLM-13 se redujo a niveles por debajo de la de médula ósea de ratón normal, pero en particular no completamente ausente (Figura 15b). Por lo tanto, se requiere un alto nivel sostenido de expresión CD47 para robusto MOLM-13 la supervivencia en los órganos hematopoyéticos.

Muchos ejemplos de aclaramiento de tumor de células T, B y NK han sido descritos en la literatura, lo que indica que un sistema inmunológico saludable es esencial para la regulación del crecimiento del tumor naciente. Sin embargo, hasta la fecha, algunos ejemplos se han producido que indican que la fagocitosis mediada por macrófagos puede comprobar el desarrollo de tumores. En conjunto, nuestros estudios revelan que la expresión ectópica de CD47 puede permitir a las células tumorales de otro modo inmunogénicos a crecer rápidamente en un T, B, y células NK huésped deficiente. Además, este es probable que refleje un mecanismo utilizado por las leucemias mieloides humanas para evadir el sistema inmune del huésped ya que CD47 se regula hacia arriba consistente en murinos y



producido en nuestro laboratorio. Las células fueron teñidas con estreptavidina conjugada Quantum Dot 605 (Chemicon). Las muestras se analizaron usando un FACS Aria (Beckton Dickinson).

5 Para muestras humanas, fracciones mononucleares se extrajeron después de la centrifugación de densidad de Ficoll de acuerdo con métodos estándar y se analizaron directamente o después de la descongelación rápida de muestras previamente congeladas en 90% de FCS y 10% DMSO en nitrógeno líquido. En algunos casos, las células CD34+se enriquecieron a partir de fracciones mononucleares con la ayuda de bolas inmunomagnéticas (CD34+Progenitor kit de aislamiento, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania). Antes del análisis FACS y clasificación, los progenitores mieloides fueron teñidas con ficoeritrina marcador de linaje específico de anticuerpos (PE) -Cy5 conjugados incluyendo CD2 RPA-2.10; CD11b, ICRF44; CD20, 2H7; CD56, B159; GPA, GA-R2 (Becton Dickinson, PharMingen, San Diego), CD3, S4.1; CD4, S3.5; CD7, CD7-6B7; CD8, 3B5; CD10, 5-1 B4, CD14, TUK4; 10 CD19, SJ25- C1 (Caltag, South San Francisco, CA) y APC-conjugado anti-CD34, HPCA-2 (Becton Dickinson-PharMingen), bioti-nylated anti-CD38, hit2 (Caltag) además de PE-conjugado anti-IL-3R $\alpha$ , 9F5 (Becton Dickinson, PharMingen) y FITC-conjugado anti-CD45RA, MEM56 (Caltag) seguido por tinción con estreptavidina -Texas Red para visualizar las células teñidas CD38 BIO. 15

Después de la tinción, las células se analizaron utilizando un FACS Vantage modificado (Becton Dickinson Immunocytometry Sistemas, Mountain View, CA) equipado con un láser de colorante 599 nm y un láser de argón de 488 nm o un FACS Aria. Se identificaron las células madre hematopoyéticas (HSC) como CD34+CD38+CD90+y el linaje negativo. CD47 FITC anti-humano se utilizó (clon B6H12, Pharmingen) para evaluar la expresión CD47 en todas las muestras humanas. Doble cambio para la expresión CD47 se determinó dividiendo la intensidad media de fluorescencia media de CD47 para todas las muestras de CML-BC, CML-CP, o AML por la intensidad media de fluorescencia media de las células normales de una población de células dada. progenitores mieloides comunes (CMP) fueron identificados en base a la tinción de CD34+CD38+IL-3R $\alpha$ +CD45RA a linealidad y su progenie incluyendo progenitores cito/macrófagos granulocitos (GMP) eran CD34+CD38+IL-3R $\alpha$ +CD45RA+Lin- mientras progenitores megacariocitos/eritrocitos (MEP) fueron identificados en función de tinción CD34+CD38+IL-3R $\alpha$  - CD45RA Lin-. 20 25

Para determinar la densidad de CD47 de ratón o humano, las células se tiñeron con cantidades saturantes de anticuerpo anti-CD47 y se analizaron en un FACS Aria. Al ser la dispersión hacia adelante directamente proporcional al diámetro de las células, y la densidad es igual al nivel de expresión por unidad de área de superficie se utilizó el software FloJo para calcular la intensidad geométrica de fluorescencia media de la canal de CD47 y se divide por la media geométrica del valor de dispersión hacia adelante al cuadrado (FSC<sup>2</sup>) para obtener una aproximación de la densidad de la expresión de CD47 en la membrana. 30 35

El injerto de células MOLM-13 se evaluó mediante el uso de anti-CD45 humano PE-Cy7 (Pharmingen), anti-ratón CD45.2 APC (clon AL1-4A2), y anti-ratón CD47 Alexa-680 (mAP301). Todas las muestras se volvieron a suspender en yoduro de propidio que contiene tampón antes del análisis para excluir las células muertas. FACS datos fueron analizados utilizando el software FloJo (TreeStar). 40

*Preparación Lentiviral y transducción.* pRRL.sin-18.PPT.Tet07.IRES.GFP.pre, CMV, VSV, y los plásmidos tet trans-Activador (tTA) se obtuvieron de Luigi Naldini. El ADNc murino de longitud completa para la forma 2 de CD47 fue proporcionada por Eric Brown (UCSF). El constructo CD47 ADNc se ligó en el sitio BamHI/NheI de Tet-MCS-IRES-GFP. El ADN del plásmido se transfeció en células 293T utilizando protocolos estándar. El sobrenadante se recogió y se concentró usando un Beckman LM-8 centrífuga (Beckman). Las células se transdujeron con Tet o Tet-CD47-MCS-IRES-GFP y lentivirus tTA durante 48 horas. Las células GFP+ se clasificaron a la pureza y se dejaron crecer durante varias generaciones para asegurar la estabilidad de los transgenes. 45

*Inyecciones.* Las células se inyectaron por vía intravenosa en los senos retro-orbitales de los ratones receptores o a través de la vena de la cola como se ha señalado. Para las inyecciones intra-femorales, se inyectaron las células en la cavidad femoral de ratones anestesiados en un volumen de 20  $\mu$ l utilizando una aguja de calibre 27. Una cámara de gas isoflurano se utilizó para anestesiarse a los ratones cuando sea necesario. 50

*Injerto de células MOLM-13.* Los animales fueron sacrificados cuando moribundos y la médula ósea, el bazo y el hígado cosechados. La sangre periférica se obtuvo por sangrado de la cola de los animales 1 hora antes de la eutanasia. Se determinó injerto de células MOLM-13 en médula, bazo, y sangre periférica como se describe anteriormente. La carga tumoral en el hígado se determinó calculando el área de cada nódulo tumoral visible utilizando la fórmula ((longitud en mm + anchura en mm)/2) \* $\pi$ . A continuación se añadió área de cada nódulo juntos por el hígado. 55 60

*Administración de doxiciclina.* Se añadió clorhidrato de doxiciclina (Sigma) al agua potable a una concentración final de 1 mg/ml. El agua potable se reemplazó cada 4 días y protegido de la luz. Además, los ratones recibieron un bolo 10 mg de doxiciclina por vía i.p. inyección una vez a la semana. 65

*Macrófagos derivados de médula ósea (BMDM).* Fémur y la tibia se recogieron de ratones C57Bl/6 ka y la

médula ósea se lavó abundantemente y se colocan en una suspensión estéril de PBS. La suspensión de médula ósea se cultivó en IMDM más 10% FBS con un factor de 10 ng/ml de colonias de macrófagos de murina recombinante estimulante (MCSF, Peprotech) durante 7-10 días.

5 *Ensayos in vitro de fagocitosis.* BMDM se recogieron por incubación en tripsina/EDTA (Gibco) durante 5 minutos y raspado suave. Los macrófagos se colocaron en placas a células  $5 \times 10^4$  por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos (Falcon). Después de 24 horas, los medios se sustituyeron con IMDM libre de suero. Después de 2 horas adicionales, se añadieron  $2,5 \times 10^5$  células Tet o Tet-CD47 MOLM-13 a los pocillos de macrófagos que contiene y se incubaron a 37°C durante los tiempos indicados. Después de co-incubación, los pocillos se lavaron a fondo con IMDM 3 veces y se examinan bajo un Eclipse T5100 (Nikon) usando una proteína fluorescente verde mejorada (GFP) o conjunto de filtros Texas Red (Nikon). El número de células GFP+ o RFP+ dentro de los macrófagos se contó y el índice de fagocitosis se calculó utilizando la fórmula: índice fagocítico = número de células ingeridas/(número de macrófagos/100). Al menos 200 macrófagos se contaron por pocillo. Para el análisis de citometría de flujo de los macrófagos de fagocitosis fueron cosechados después de la incubación con células MOLM-13 utilizando tripsina/EDTA y raspado suave. Las células se tiñeron con anti-Mac-1 anticuerpo PE y se analizaron en un BD FACSAria. Imágenes fluorescentes y campo claro se toman por separado utilizando un T5100 Eclipse (Nikon), una lámpara de mercurio de muy alta presión (Nikon), una dotación de proteína verde fluorescente (eGFP) un filtro de paso de banda (Nikon) un filtro de paso de banda Texas Red (Nikon), y un RT deslizador (spot Diagnostics) de la cámara. Las imágenes se fusionan con el software Photoshop (Adobe).

10  
15  
20  
25 Para los ensayos in vivo, la médula de los huesos largos de la pierna, el bazo y el hígado se recogieron 2 horas después de la inyección de las células diana en RAG2  $-/-$ , Gc  $-/-$  ratones. Se prepararon en suspensiones de células individuales en PBS más 2% de FCS. Las células se marcaron con anticuerpos anti-CD45 humano Cy7-PE y anti-ratón de F4/80 biotina (eBiosciences). La mancha secundaria se realizó con Streptavidina-APC (eBiosciences). Células que eran CD45 $-$ , F4/80 $+$  humanos se consideraron macrófagos, y células GFP $+$  en esta fracción se evaluaron.

### EJEMPLO 3

30 Las células madre hematopoyéticas y células progenitoras CD47 regulan hacia arriba para facilitar la movilización y toma de referencia para los tejidos hematopoyéticos

35 Hemos demostrado que las células madre hematopoyéticas (HSC) de ratones CD47 deficientes (IAP  $-/-$ ) no logran injertar los receptores de tipo silvestre. Como era de esperar, estas células se eliminan rápidamente por los macrófagos huésped, mientras que IAP  $+/+$  HSCs no lo son. Cuando las células madre y progenitoras se ven obligadas a dividir y entrar en circulación utilizando ciclofosfamida/G-CSF o lipopolisacárido, CD47 se regula hacia arriba rápidamente en estas células. Proponemos que los niveles más altos de CD47 en las células madre durante el estrés hematopoyesis y movilización proporciona protección frente a la fagocitosis por los macrófagos activados añadidos del sistema reticuloendotelial. En apoyo de esta hipótesis, se muestra que células IAP  $+/-$  trasplantadas en receptores de tipo silvestre pierden el injerto con el tiempo, mientras que las células del donante de tipo silvestre no lo hacen. Llegamos a la conclusión que la fagocitosis es un mecanismo fisiológico significativo que despeja progenitores hematopoyéticos con el tiempo, y que requiere sobre-expresión CD47 para evitar holgura fagocítica.

40  
45 HSCs tienen la capacidad de migrar a nichos ectópicos en la vida fetal y adulto a través de la corriente de la sangre. Además, las HSC se pueden poner en circulación utilizando una combinación de agentes citotóxicos y citoquinas que primero expanden números HSC in situ. Una vez en la corriente sanguínea, HSCs deben navegar los lechos vasculares del bazo y el hígado. Los macrófagos en estos sitios funcionan para eliminar las células dañadas y las partículas extrañas de la corriente de sangre. Por otra parte, durante estados inflamatorios, los macrófagos se vuelven más activos fagocíticamente. Por lo tanto, podría ser necesaria una protección adicional contra la fagocitosis de las células madre recién llegadas en estos sitios.

50 Hemos determinado si la expresión de CD47 en las células madre y progenitoras de médula ósea tuvo un papel en la regulación de hematopoyesis normal. La expresión CD47 se ha demostrado ser esencial para la prevención de la fagocitosis de las células rojas de la sangre, células T, y células de médula ósea entera en un entorno de trasplante. Por lo tanto, nos preguntamos si la falta de CD47 impediría que las HSC de injertar después de haber sido entregado por vía intravenosa. Para probar esto, hemos empleado el ratón noqueado CD47 (IAP  $-/-$ ). Estos ratones desarrollan normalmente y no muestran ninguna anomalía bruta. Ellos, sin embargo, mueren muy rápidamente después de la exposición bacteriana intraperitoneal porque los neutrófilos no migran al intestino rápidamente. Además, las células de estos ratones no pueden trasplantar en receptores de tipo silvestre, pero van a injertarse en IAP  $-/-$  receptores.

55  
60 Primero examinamos las frecuencias madre y progenitoras en IAP $^{+/-}$  y IAP $^{-/-}$  ratones. Al examinar para las células en el compartimiento progenitor tallo y mielóide, no hubo diferencia entre estos ratones y ratones de tipo silvestre (Figura 18a). A continuación, pusimos a prueba las células madre de estos ratones para determinar su capacidad de formar colonias en un ensayo in vitro. Ordenamos células madre Fik2- CD34- KLS altamente

65

purificadas de estos ratones y los sembraron en metilcelulosa en presencia de un cóctel de citoquinas estándar. Se examinó la formación de colonias en el día 7 y se encontró que no había diferencia importante entre el tipo silvestre e células IAP<sup>-/-</sup> en el número y tipo de colonias formadas (Figura 18b) del tallo.

5 A continuación, preguntamos si las células de médula ósea de ratones IAP<sup>-/-</sup> podrían rescatar a los ratones receptores de los efectos de la irradiación letal. Típicamente, una dosis de  $2 \times 10^5$  células de médula ósea rescatará 100% de los ratones receptores de tipo silvestre en este ensayo. Se encontró que la médula ósea IAP<sup>-/-</sup> no pudo rescatar a estos receptores (Figura 18c). Sin embargo, la administración de estas células hizo prolongar la vida útil; normalmente, los ratones mueren entre el día 12 y 15 después de la irradiación, pero los ratones que recibieron médula ósea IAP<sup>-/-</sup> vivieron cerca de 7 a 10 días más (Figura 18c). Todavía no sabemos la razón de la prolongación de la vida útil en este caso, aunque se ha observado que los progenitores multipotentes y progenitores de eritrocitos de megacariocitos pueden prolongar la supervivencia después de la irradiación letal, y que la contribución de estas células después de un trasplante de médula ósea completa puede tener contribuir al alargamiento del tiempo de supervivencia.

15 A continuación, se ordenan las células madre Flk-2- CD34- KLS de tipo silvestre y células IAP<sup>-/-</sup> y las trasplantaron en receptores de tipo silvestre, además de  $2 \times 10^5$  células competidoras. Ninguno de los ratones que recibieron IAP<sup>-/-</sup> HSCs, ya sea en una dosis de 50 o 500 tenía cualquier injerto de células donantes, lo que indica que CD47 fue en efecto necesario para la capacidad de estas células para trasplante (Figura 18d-e). Especulamos que esto era debido a la fagocitosis de las células que carecían de CD47, como se ha demostrado para los eritrocitos y las células T. Para probar esto, hemos enriquecido c-Kit+células de la médula ósea de tipo silvestre y ratones IAP<sup>-/-</sup> y los co-incubaron con macrófagos derivados de médula ósea. Células IAP<sup>-/-</sup> madre y progenitoras fueron fagocitadas fácilmente en este ensayo, mientras que las células de tipo silvestre fueron fagocitadas sólo mínimamente (Figura 18f-g). Curiosamente, cuando se incubaron con IAP<sup>-/-</sup> macrófagos, hubo significativamente menos fagocitosis de IAP<sup>-/-</sup> células, confirmando que los macrófagos de estos ratones son de hecho anormales en su capacidad fagocítica.

20 Dado que la movilización de las células madre y progenitoras implica varios pasos en los que entran en contacto con los macrófagos (egreso desde los sinusoides de la médula, la entrada en los sinusoides ósea y el hígado, y en la zona marginal esplénica), nos preguntamos si CD47 está regulada hacia arriba en la médula ósea de los ratones que han sido inducidas a someterse a movilización. El protocolo más comúnmente utilizado implica la administración del medicamento ciclofosfamida (Cy), que mata a las células en división (progenitoras principalmente mieloide), seguido por el tratamiento con el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Esto implica la administración de ciclofosfamida en el primer día, y después dando G-CSF cada día a partir de entonces. Por convención, el primer día después de la administración de ciclofosfamida se llama el día 0. Los números máximos de las células madre de la médula ósea se consiguen en el día 2; de 3-4 días salen de la médula ósea hacia la periferia, y sus números en el bazo y el hígado alcanzan un pico en el día 5; También se movilizan progenitores mieloeitroide. Hay un aumento característico en la frecuencia de células madre y progenitores mieloides durante la respuesta de movilización.

30 De este modo, se administró este protocolo de movilización de los ratones de tipo silvestre y ratones sacrificados en los días 2 a 5. Se encontró que hubo un aumento notable de CD47 en las células c-kit<sup>+</sup> de médula ósea en el día 2 (Figura 19a). Se encontró que hubo aproximadamente un aumento de cuatro veces en el nivel de CD47 en las células madre y progenitoras en día 2 de movilización (Figura 19b). El aumento se observó en todos los niveles de la jerarquía progenitora mieloide, como LT-HSC, así como las BPM muestran este incremento en la expresión de CD47 (Figura 19b). Por día 5, cuando la salida de la médula ósea se había detenido en gran medida, los niveles de CD47 se habían vuelto a niveles casi normales. En la Figura 19C, la intensidad media de fluorescencia de la expresión de CD47 en las BPM se muestra en los días 0 a 5 de la movilización. Los niveles de CD47 son en realidad subnormales siguiendo la mieloablación en día 0, pero que se elevan rápidamente a un máximo en el día 2. La expresión disminuye rápidamente a partir de entonces y los niveles por día 5 son equivalentes a estado estacionario.

40 También se cree que las endotoxinas contribuyen a la movilización de la médula ósea. Esto puede representar una respuesta fisiológica a la infección, donde la producción ósea normal de las células inmunes necesita ser aumentada para borrar patógenos. El lipopolisacárido (LPS) es un componente de la pared celular de las bacterias gram-negativas. Se une a la proteína de unión a lípidos (LBP) en el suero, que puede formar un complejo con CD1411 y receptor 4 (TLR-4) 12 en monocitos, macrófagos, y células dendríticas. Esto resulta en la activación de los macrófagos y los resultados en una respuesta pro-inflamatoria. la administración de LPS también se ha demostrado que aumenta la capacidad fagocítica de los macrófagos. Esto puede ser debido al hecho de que los complejos LBP-LPS actúan como opsoninas.

55 Pusimos a prueba si la administración de LPS en ratones podría afectar la expresión de CD47 en las células madre y progenitoras. Como reflejo del patrón visto en la movilización inducida Cy/G, LPS provocó la expansión de las células madre y progenitoras de 2 días post-tratamiento, seguido de la migración hacia el bazo y el hígado (Figura 19d). El día 2 después de la administración de LPS, el tallo y las células progenitoras de la médula

ósea CD47 habían regulado hacia arriba en un grado similar que en movilización Cy/G. Durante el día 5, cuando la respuesta inflamatoria se resolvió, los niveles de la proteína habían caído a niveles de estado estacionario (Figura 19d).

5 Dado que CD47 constantemente se reguló hacia arriba en la respuesta de movilización, decidimos poner a prueba la capacidad de las células madre y progenitoras para movilizar siguiente Cy/G. El ratón noqueado CD47 tiene defectos en la migración de neutrófilos a sitios de inflamación<sup>8</sup> y de las células dendríticas a los órganos linfoides secundarios. El papel exacto de CD47 en la migración de estas células no se conoce, pero puede referirse a que la mala asociación integrina en la circulación (CD47 se une a varias integrinas) o la falta de interacción con SIRP $\alpha$  en las células endoteliales. De ahí que se razonó que si CD47 participó en la capacidad de migración de estas células en la respuesta de movilización, a continuación, IAP<sup>-/-</sup> ratones se muestran números reducidos de células en los órganos periféricos después de Cy/G.

15 Para probar esta hipótesis se administró Cy/G para ratones de tipo silvestre y noqueados y los ratones se sacrificaron en los días 2-5. Para cada ratón, se analizaron el número de células madre y progenitoras de médula ósea, el bazo y el hígado. Decidimos utilizar la población cruda KLS como un sustituto de las HSC porque los números de células CD34 disminuye considerablemente en los estados proliferativos, haciendo un cálculo preciso de los números LT-HSC difíciles. Desde GMP son los más expandidos de todas las poblaciones en la movilización, hemos decidido analizar sus números también. Para calcular el recuento progenitor absoluto, la celularidad total de médula ósea, el bazo y el hígado se calculó contando el número de células mononucleares en todo el órgano por hemocitómetro. Para la médula ósea, se asumieron los huesos largos de la pierna para representar 15% de la médula ósea total. A continuación, este número se multiplicó por la frecuencia de la población de células para determinar un recuento absoluto.

25 Se encontró que había poca diferencia en la movilización de KLS o GMP entre los de tipo silvestre y ratones IAP<sup>-/-</sup> (Figura 19e). Hubo una modesta disminución en la capacidad de IAP<sup>-/-</sup> ratones para mover progenitores al bazo por día 3, pero por días 4 y 5 que había restaurado números normales de células a la periferia. Los compartimentos de médula ósea y el hígado parecían similares a los ratones de tipo silvestre. Por lo tanto, ratones IAP<sup>-/-</sup> no tienen un defecto importante de movilización.

30 Eritrocitos heterocigotos IAP<sup>+/-</sup> tienen aproximadamente la mitad de la cantidad de CD47 como eritrocitos de tipo silvestre y las plaquetas. También hay un aumento dependiente de la dosis en la cantidad de la fagocitosis que se produce en eritrocitos IAP<sup>+/-</sup> de inmunoglobulina opsonizada y plaquetas con respecto al de tipo silvestre. Nuestra observación de que los niveles de CD47 aumentan en los estados de estrés y la movilización nos llevó a formular la hipótesis de que las células que eran genéticamente hemizigotas para CD47 pueden ser más propensas a fagocitosis y el aclaramiento por los macrófagos en el tiempo. Por lo tanto, nos preguntamos si células madre IAP<sup>+/-</sup> estarían a una desventaja en relación con las células madre de tipo silvestre en la contribución a largo plazo para la hematopoyesis.

40 Se analizaron primero los niveles de CD47 expresados en la IAP<sup>+/+</sup>, IAP<sup>+/-</sup>, y células madre IAP<sup>-/-</sup>. El análisis FACS de células madre CD34- Flk-2- KLS reveló que la IMF de CD47 en heterocigoto HSCs era de hecho aproximadamente la mitad del nivel de las células madre de tipo silvestre (Figura 20a). A continuación, trasplantaron estas células y se analizó su capacidad para injertarse y producir células hematopoyéticas en un recipiente. Dimos a ratones 475 Gy receptores de tipo silvestre congénicos, una dosis subletal de irradiación. A continuación, 45 trasplantamos una cohorte de receptores con  $2 \times 10^6$  células de la médula ósea entera de tipo silvestre, y otro con la misma dosis de células de médula ósea IAP<sup>+/-</sup>. Se esperaba que una dosis Tal pudiera contener aproximadamente 50 a 100 HSCs. Al ser quimerismo de granulocitos en la sangre periférica un buen marcador sustituto de la aptitud de células madre, se analizaron las células de la sangre de estos receptores a intervalos periódicos. Cuando la médula ósea de tipo silvestre fue trasplantada a receptores de tipo silvestre, el quimerismo de granulocitos se mantuvo durante hasta 40 semanas. Sin embargo, cuando se trasplantaron células IAP<sup>+/-</sup>, 3 de los 50 5 ratones perdieron quimerismo del donante con el tiempo, a pesar de tener un éxito del injerto inicialmente (Figura 20b).

55 Se ha observado que CD47 está regulado en la superficie de las células hematopoyéticas en la progresión de la leucemia. También hemos encontrado un aumento análogo en el nivel de expresión de CD47 cuando los ratones fueron estimulados para movilizar las células madre y progenitores a la periferia usando Cy/G, o cuando se estimularon con LPS. Pero ¿por qué se reguló hacia arriba CD47 en estos estados? Varios estudios han descrito un efecto dependiente de la dosis de CD47 en la prevención de la fagocitosis. Eritrocitos IAP<sup>+/-</sup> y plaquetas, que tienen la mitad del nivel de CD47 como células de tipo silvestre, son fagocitadas más fácilmente que sus contrapartes normales. La evidencia también indica que el nivel de expresión de CD47 en las células se correlaciona bien con la capacidad de la célula para activar el receptor inhibitor SIRP $\alpha$  en los macrófagos. Recientemente Danska et al informaron de que la capacidad de los ratones NOD-SCID para apoyar el trasplante de células hematopoyéticas humanas correlacionadas con una mutación en el receptor SIRP $\alpha$  en estos ratones. Aquí mostramos que las células madre y progenitores que expresan mayores niveles de CD47 son menos propensos a ser eliminados por fagocitosis.

65

Estos estudios apuntan a un papel para regulación hacia arriba CD47 en la protección de las células madre hematopoyéticas durante los estados cuando son más propensos a ser fagocitados por los macrófagos, como después de la mielosupresión y durante la movilización. Los macrófagos tienen la función de eliminación de células envejecidas o dañadas que encuentran; parece que pueden eliminar las células madre dañadas también. Por lo tanto, las células madre de recuperación saludable pueden regular hacia arriba CD47 durante la respuesta a la movilización para evitar la liquidación, mientras que las células madre dañadas no lo hacen y se borran. Especulamos que este es un mecanismo por el cual el sistema hematopoyético auto-regula a sí mismo para asegurar que se permiten únicamente las células sanas, en buen estado a sobrevivir y proliferar y utilizar recursos durante los estados de estrés. La movilización de HSC y progenitores en el torrente sanguíneo y de allí a los sitios hematopoyéticos siguiendo inflamación inducida por LPS es muy interesante; HSC migran desde la sangre hasta la médula ósea usando integrina  $\alpha\beta 1$  (Wagers y Weissman, *Stem Cells* 24 (4): 1087-1094, 2006) y el receptor de quimiocinas CXCR4 (Wright DE et al, *J Exp Med* 195 (9): 1145-1154, 2002). Hemos demostrado anteriormente que la integrina  $\alpha\beta 1$  se une a VCAM1 en estroma hematopoyético (Mikaye K et al *J Exp Med* 173 (3): 599-607, 1991); VCAM1 es también adhesina vascular en los buques que las células T inflamatorias utilizan para reconocer y entrar en los sitios locales de la muerte celular y la inflamación. Además de expresar la integrina asociada a proteína CD47, itinerante HSC expresa integrina funcional  $\alpha\beta 1$ , dando lugar a la especulación de que la migración de células madre hematopoyéticas y progenitores en estados de inflamación puede no sólo regenerar la hematopoyesis de la médula ósea, sino también participar en la inflamación local.

#### 20 Materiales y métodos

Ratones. Ratones C57BL/6 CD45.1 y C57BL/6 CD45.2 (de tipo silvestre) se mantuvieron en nuestra colonia. Ratones IAP<sup>-/-</sup> se obtuvieron de Eric Brown (Universidad de California, San Francisco). Estos fueron criados en C57BL/6J de fondo y cruzados con nuestra colonia de tipo silvestre.

Proyección. IAP +/- se cruzaron entre sí para generar descendencia IAP<sup>-/-</sup> e IAP<sup>+/-</sup>. Los ratones fueron seleccionados por PCR de ADN de la cola. Se utilizaron los siguientes cebadores: 3' NeogCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTC; 5'IAP<sup>-</sup> TCACCTTGTTGTTCTGTACTAC AAGCA; 3' IAP<sup>-</sup> TGTCACCTCGCAAGTGTAGTTCC.

La tinción celular y clasificación. La tinción de las células madre y progenitoras de ratón se realizó utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales: Mac-1, Gr-1, CD3, CD4, CD8, B220, y Ter119 conjugados con Cy5-PE (eBioscience) se utilizaron en el cóctel de linaje, c-kit de PE-Cy7 (eBioscience), Sca-1 Alexa680 (e13-161-7, producido en nuestro laboratorio), CD34 FITC (eBioscience),/32 (FcGR1/III) APC CD16 (Pharmingen), y CD135 (Flk-2 ) PE (eBioscience) se utilizaron como se ha descrito anteriormente a la mancha de ratón madre y progenitoras subconjuntos 21 22. Anticuerpo de ratón CD47 (clon mIAP301) se evaluó utilizando el anticuerpo biotinilado producido en nuestro laboratorio. Las células fueron teñidas con estreptavidina conjugada Quantum Dot 605 (Chemicon). Las muestras se analizaron usando un FACS Aria (Beckton Dickinson).

Las células madre CD34 Flk2- KLS se ordenaron en doble usando un BD FACS Aria. Se obtuvieron células de sangre periférica de purga vena de la cola y los glóbulos rojos se eliminaron por precipitación Dextran T500 (Sigma) y la lisis ACK. Las células fueron teñidas con anti-CD45.1 APC, anti-CD45.2 FITC, anti-Ter119 PE (Pharmingen), anti-B220 Cy5-PE (eBiosciences), anti-CD3 Cascada Azul, y anti-Mac-1 Cy7- PE (eBiosciences). Los granulocitos eran Ter119- B220- CD3-Mac-1+SSC hola. Las células se analizaron usando un BD FACS Aria.

Todas las muestras se volvieron a suspender en yoduro de propidio que contiene tampón antes del análisis para excluir las células muertas. FACS datos fueron analizados utilizando el software FloJo (TreeStar).

En el ensayo de formación de colonias in vitro. LT-HSC fueron directamente clon ordenadas en un 96 pocillos medios metilcelulosa placa que contiene (Methocult 3100) que se preparó como se ha descrito. Los medios de comunicación también se complementó con el ratón recombinante factor de células madre (SCF), la interleucina (IL) -3, IL-11, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), trombosis bopoietin (Tpo) y eritropoyetina (Epo). Las colonias se puntuaron para CFU-G, CFU-M, CFU-GM, CFU-GEMM, y Meg.

Transferencias celulares. Para las transferencias completas de la médula ósea, células IAP<sup>+/+</sup>, IAP<sup>+/-</sup> o IAP<sup>-/-</sup> fueron recién aisladas de los huesos largos de las piernas. Las células se contaron usando un hemocitómetro y se resuspendieron en PBS+2% de FCS a 100uL. Para algunos experimentos, se utilizaron células CD45.1 de ratones C57BL/6 Ka CD45.1 como donantes en los ratones de tipo silvestre CD45.2.

Para células clasificadas, las células fueron ordenadas en tampón PBS en la dosis correcta (es decir, 50 o 500 células por tubo) y se volvieron a suspender en 100uL de PBS+2% FCS. Para los experimentos de competición, 2 x 10<sup>5</sup> células recién aisladas de médula ósea entera de C57BL/6 de CD45.1 se añadieron a la 100uL suspensión de células madre.

C57Bl/6 Ka CD45.1 o C57Bl/6 J CD45.2 ratones receptores se irradiaron usando una fuente de cesio a las dosis indicadas. dosis subletales fue de 4,75 Gray y dosis letal era una dosis dividida de 9,5 Gray. Las células se transfieren por medio de una jeringa de calibre 27 en los senos retro-orbitales de los ratones anestesiados con isofluorano.

5 Ensayo de movilización. Los ratones se movilizaron con ciclofosfamida (Sigma) (200 mg/kg) y G-CSF (Neupogen) (250 mg/kg) como se describe anteriormente. LPS bacteriano de *E. coli* 055: B5 (Sigma) se administró a una dosis de 40 mg/kg en la cavidad peritoneal.

10 Para el análisis de órganos movilizados, el bazo, el hígado entero conjunto, y los huesos largos de la pierna se prepararon en una suspensión de células individuales. Se determinó la densidad de células utilizando un hemocitómetro para determinar la celularidad global de las células hematopoyéticas en estos órganos.

15 El enriquecimiento de c-Kit<sup>+</sup>células. Ósea de ratón entera se tiñó con CD117 microbolas (Miltenyi). c-Kit<sup>+</sup>células se seleccionaron en una columna de AutoMACS Midi (Miltenyi) utilizando un separador magnético.

20 En el ensayo de fagocitosis in vitro. BMDM se prepararon como se ha descrito anteriormente. Células de médula ósea enriquecidas con c-Kit fueron teñidas con CFSE (Invitrogen) antes del ensayo. Células  $2,5 \times 10^5$  enriquecidas con c-Kit se sembraron con  $5 \times 10^4$  macrófagos. Los macrófagos y células c-Kit se obtuvieron a partir de ratones IAP <sup>+/+</sup> o IAP <sup>-/-</sup>. Las células se incubaron durante 2 horas y se determinó el índice fagocítico. Se tomaron fotografías como se describió anteriormente.

#### Ejemplo 4

25 CD47 es un Factor Independiente de Pronóstico y Anticuerpo Diana Terapéutico en Células Humanas Aguda de Leucemia Mieloide

30 La leucemia mielógena aguda (AML) se organiza como una jerarquía celular iniciada y mantenida por un subconjunto de células madre de leucemia auto-renovadas (LSC). La hipótesis de que el aumento de expresión CD47 en AML LSC contribuye a la patogénesis de la inhibición de su fagocitosis a través de la interacción de CD47 con un receptor inhibitor sobre los fagocitos. Se encontró que CD47 fue más altamente expresado en AML LSC que sus homólogos normales, y que el aumento de expresión CD47 predijo peor supervivencia global en 3 cohortes independientes de pacientes de AML de adultos. Además, el bloqueo de anticuerpos monoclonales contra CD47 preferentemente permitió fagocitosis de AML LSC por los macrófagos in vitro, e inhibe su injerto in vivo. Finalmente, el tratamiento de ratones injertados-AML humanos con anticuerpo anti-CD47 eliminó AML in vivo. En resumen, el aumento de expresión CD47 es un factor de mal pronóstico independiente que puede ser dirigido sobre las células madre humanas de AML con anticuerpos monoclonales capaces de estimular la fagocitosis de LSC.

#### RESULTADOS

40 *CD47 está más altamente expresado en AML LSC que sus contrapartes normales y se asocia con la mutación FLT3-ITD.* En nuestra investigación de varios modelos de ratón de leucemia mielóide, hemos identificado un aumento de la expresión de CD47 en las células de leucemia de ratón en comparación con la médula ósea normal. Esto llevó a la investigación de la expresión de CD47 en AML LSC humana y sus contrapartes normales. El uso de la citometría de flujo, CD47 fue más altamente expresado en múltiples muestras de AML LSC que HSC normal de la médula ósea y el MPP (Figura 6). Este aumento de la expresión se extendió a las células de leucemia a granel, que expresaban CD47 de manera similar a la fracción enriquecida en LSC.

50 El examen de un subconjunto de estas muestras indicó que la expresión de superficie CD47 correlacionado con la expresión de CD47 ARNm. Para investigar la expresión de CD47 en subgrupos morfológicos, citogenéticos y moleculares de AML, se analizaron los datos de expresión génica de una cohorte previamente descrita de 285 pacientes adultos (Valk et al., 2004 N Engl J Med 350, 1617-1628). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de subtipos CD47 entre FAB (franco-americano-británica). En la mayoría de los subgrupos citogenéticos, CD47 se expresó en niveles similares, excepto en los casos que albergan t (8; 21) (q22; q22), un grupo de riesgo favorable, que tenía una expresión de CD47 estadísticamente significativa más baja. En los subgrupos de AML caracterizados molecularmente, no se encontró una asociación significativa entre la expresión de CD47 y las mutaciones en el dominio de tirosina quinasa del FLT3 (FLT3-TKD), la sobre-expresión de EVI1, o mutaciones en CEBPA, las ANR, o KRAS. Sin embargo, el aumento de expresión de CD47 fue fuertemente correlacionada con la presencia de FLT3-ITD ( $p < 0,001$ ), que se observa en casi un tercio de la AML con cariotipos normales y se asocia con peor supervivencia global. Este hallazgo fue confirmado por separado en dos conjuntos de datos independientes de 214 y 137 pacientes con AML (Tabla 1).

65

Tabla 1: Características clínicas y moleculares de muestras de AML para validación Cohorte y comparación entre Expresión de grupos bajo CD47 y Alto CD47

característica clínica*	En general n=137	Bajo CD47 N=95	Alto CD47	P*
Edad frente a distancia media	46 16-60	47 24-60	46 16-60	0.26
WBC x10 <sup>9</sup> /L Distancia media	24 1-238	17 1-178	35 1-238	<0.01
revisado centralmente Clasificación no. (%)				0.29
M0	11(8)	9(9)	2(5)	
M1	28(20)	16(17)	2(32)	
M2	36(26)	22(23)	11(30)	
M4	33(24)	25(26)	8(22)	
M5	19(14)	16(17)	3(8)	
M6	2(1)	2(2)	0(0)	
Sin clasificación	6(4)	4(4)	0(0)	
FLT3-ITD, no. (%)				<0.05
Negativo	84(61)	63(66)	17(46)	
Positivo	53(39)	32(34)	20(54)	
FLT3-TKD, no. (%)				0.24
Negativo	109(87)	78(89)	27(79)	
Positivo	17(13)	10(11)	7(21)	
NPM1, no. (%)				0.10
Silvestre	55(45)	41(49)	10(30)	
Mutado	66(55)	43(51)	23(70)	
CEBPA, no. (%)				1
Silvestre	100(86)	70(86)	27(87)	
Mutado	16(14)	11(14)	4(13)	
MLL-PTD, no. (%)				1
Negativo	121(93)	83(92)	34(94)	
Positivo	9(7)	7(8)	2(6)	
Supervivencia libre de eventos Media, nos.	14	17.1	6.8	0.004
Libre de enfermedad a los 3 años, % (95% CI)	36(27-44)	41(31-55)	22(8-36)	
Supervivencia en general Media, nos.	18.5	22.1	9.1	0.002
Vivos a los 3 años, % (95% CI)	39(31-48)	44(33-55)	26(12-41)	
Tasa de remisión completa, no. (%)				0.33
CR después de la 1ª Inducción no. (%)	60(46%)	46(48%)	14(38%)	
CR después de la 2ª Inducción, no. (%)	84(74%)	64(75%)	20(69%)	0.63
Selección al azar de la terapia secundaria consolidativa Alogénico-HSCT, no. (%)	29(22%)	25(26%)	4(11%)	0.09
Autólogo-HSCT, no. (%)	23(17%)	17(18%)	6(16%)	0.98

Tabulada clínica y las características moleculares en el diagnóstico. WBC indica recuento de glóbulos blancos, FAB, francés y británico; FLT3-ITD interna en tándem duplicación del gen FLT3 (por 10 casos con falta de estado de FLT3-ITD, el estado de FLT3-ITD predicho basado en la expresión génica se sustituye utilizando el método de Bullinger en al., 2008); FLT3-TKD, tirosina dominio quinasa mutación del gen FLT3; NPM1, la mutación del gen NPM1; MLL-PTD, la duplicación en tándem parcial del gen MLL; y CEBPA, la mutación de la remisión CEPBA gen. Remisión completa de CR. CR se evaluó tanto después de los regímenes de primera y segunda inducción, que comprendían el ICE (idarubicina, etopósido, citarabina) o A-HAM ((Ácido trans-retinoico y dosis altas de citarabina más mitoxantrona) autólogo HSC: trasplante autólogo; Alogénico-TPH, el trasplante alogénico.

+P Valor compara las diferencias en las características moleculares y clínicos en el diagnóstico entre los pacientes cuyos niveles de expresión de ARNm de CD47 de baja y alta. la expresión de CD47 fue dicotomizada basada en un óptimo punto de corte para la estratificación de la supervivencia general que fue identificada en una base de datos publicada de microformaciones (Valk v al. 2004) . como se describe

*Identificación y separación de progenitores normales y leucémicos desde el mismo paciente en función de expresión diferencial CD47.* En la fracción enriquecida por LSC Lin-CD34+CD38 de espécimen SU008, se detectó una población rara de células que expresan CD47<sup>lo</sup>-, además de la mayoría de células de expresión de CD47<sup>hi</sup>- (Figura 21A). Estas poblaciones se aislaron por células activadas por fluorescencia (FACS) para > 98% de pureza y, o bien se trasplantaron en ratones NOG recién nacidos o en metilcelulosa completa. Las células CD47<sup>hi</sup> no pudieron injertarse in vivo o formar cualesquiera colonias in vitro, como se observa con algunos especímenes de AML.

Sin embargo, las células CD47<sup>lo</sup> se injertaron con hematopoyesis normal mielo-linfoide in vivo y formaron

numerosas colonias mieloides morfológicamente normales in vitro (Figura 21B, C). Este espécimen albergaba la mutación FLT3-ITD, que se detectó en las células de leucemia a granel (Figura 21 D). Las células CD47<sup>hi</sup> purificadas contenían la mutación FLT3-ITD, y por lo tanto, eran parte del clon leucémico, mientras que las células CD47<sup>lo</sup> no lo hicieron. Las células humanas aisladas de ratones injertados con las células CD47<sup>lo</sup> contenían únicamente FLT3 de tipo silvestre, lo que indica que las células CD47<sup>lo</sup> contenían progenitores hematopoyéticos normales.

*El aumento en la expresión de CD47 en la AML humana se asocia con resultados clínicos pobres.* La hipótesis de que el aumento de expresión de CD47 en la AML humana contribuye a la patogénesis. A partir de esta hipótesis, predijimos que la AML con una mayor expresión de CD47 se asocia con peores resultados clínicos. Consistente con esta hipótesis, el análisis de un grupo previamente descrito de 285 pacientes adultos con AML con diversas anomalías citogenéticas y moleculares (Valk et al., 2004) reveló que una estratificación dicotómica de los pacientes en grupos de expresión bajos en CD47 y altos en CD47 se asoció con un aumento significativo del riesgo de muerte en el grupo de alta expresión ( $p=0,03$ ). La asociación de la supervivencia general con esta estratificación dicotómica de la expresión de CD47 fue validada en una segunda cohorte de ensayo de 242 pacientes adultos (Metzeler et al., 2008 Sangre) con cariotipos normales (NK-AML) ( $p=0,01$ ).

La aplicación de esta estratificación a una cohorte de validación distinta de 137 pacientes adultos con cariotipo normal (Bullinger et al., 2008 Blood 111, 4490-4495), que confirmó el valor pronóstico de la expresión de CD47 por tanto en general y supervivencia libre de eventos (Figura 22). Análisis de las características clínicas de los grupos de expresión de CD47 altas y bajas en esta cohorte de validación cruzada también identificaron diferencias estadísticamente significativas en los glóbulos blancos (WBC) y el estado de FLT3-ITD, y no hubo diferencias en las tasas de remisión completas y tipo de terapia de consolidación incluyendo trasplante alogénico (Tabla 1). El análisis de Kaplan-Meier demostró que la expresión alta de CD47 al momento del diagnóstico se asoció significativamente con una peor supervivencia libre de eventos y general (Figura 22A, B). Los pacientes en el grupo de la expresión baja de CD47 tuvieron una supervivencia libre de eventos mediana de 17,1 meses en comparación con 6,8 meses en el grupo de alta expresión de CD47, que corresponde a un riesgo relativo de 1,94 (intervalo de confianza del 95% 1.30 a 3,77,  $p=0,004$ ). Para la supervivencia general, los pacientes en el grupo de la expresión baja de CD47 tenían una mediana de 22,1 meses en comparación con 9,1 meses en el grupo de alta expresión de CD47, que corresponde a una razón de riesgo de 2,02 (IC del 95% 1,37 a 4,03,  $p=0,002$ ). Cuando la expresión CD47 se consideró como una variable continua, el aumento de expresión también se asoció con una supervivencia peor libre de eventos ( $p=0,02$ ) y global ( $p=0,02$ ).

A pesar de la asociación con FLT3-ITD (Tabla 1), expresión incrementada de CD47 al momento del diagnóstico se asoció significativamente con una peor supervivencia libre de eventos y general en el subgrupo de 74 pacientes sin FLT3-ITD, cuando se considera ya sea como una clasificación binaria (Figura 22C, D) o como una variable continua ( $p=0,02$  para supervivencia libre de eventos y general). En el análisis multivariable teniendo en cuenta la edad, el estado de FLT3-ITD, y la expresión de CD47 como una variable continua, el aumento de la expresión de CD47 se mantuvo asociado con una peor supervivencia libre de evento con un riesgo relativo de 1,33 (95% intervalo de confianza 1.03 a 1,73;  $p=0,03$ ) y la supervivencia general con un cociente de riesgos instantáneos de confianza de 1,31 (95% intervalo de 1.00 a la 1.71  $p=0,05$ ) (Tabla 2).

Tabla 2

Medición de Resultado/Variables consideradas	HR	95%	P
<b>Supervivencia libre de eventos</b>			
<b>Expresión CD47, continua, por aumento de 2 veces</b>	<b>1,33</b>	<b>1,03 a 1,73</b>	<b>0,03</b>
<b>FLT3-ITD, positivo vs negativo</b>	<b>2,21</b>	<b>1,39 a 3,53</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Edad, al año</b>	<b>1,03</b>	<b>1,00 a 1,06</b>	<b>0,03</b>
<b>Sobrevivencia general</b>			
<b>Expresión CD47, continua, por aumento de 2 veces</b>	<b>1,31</b>	<b>1,00 a 1,71</b>	<b>0,05</b>
<b>FLT3-ITD, positivo vs negativo</b>	<b>2,29</b>	<b>1,41 a 3,68</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Edad, al año</b>	<b>1,03</b>	<b>1,01 a 1,06</b>	<b>0,01</b>

*Anticuerpos monoclonales dirigidos contra Fagocitosis preferentemente habilitada de CD47 humana de AML LSC por los macrófagos humanos.* La hipótesis de que el aumento de expresión CD47 en AML humano contribuye a la patogénesis mediante la inhibición de la fagocitosis de las células de leucemia, que nos lleva a predecir que la interrupción de la interacción CD47-SIRP $\alpha$  con un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD47 preferencialmente permite la fagocitosis de AML LSC. Varios anticuerpos monoclonales CD47 anti-humano se han generado entre

ellos algunos capaces de bloquear la interacción CD47-SIRP $\alpha$  (B6H12.2 y BRIC126) y otros que no pueden hacerlo (2D3) (Subramanian et al., 2006 Sangre 107, 2548-2556). La capacidad de estos anticuerpos para permitir la fagocitosis de AML LSC, o médula ósea normal CD34 de humana+células, por humanos Macrófagos in vitro se ensayó. La incubación de AML LSC con los macrófagos humanos en presencia de anticuerpo de control de isotipo IgG1 o anticuerpo monoclonal anti-CD45 humano IgG1 de ratón no dio lugar a la fagocitosis significativa como queda determinado por microscopía de inmunofluorescencia (Figura 8A) o citometría de flujo. Sin embargo, la adición del bloqueo anti-CD47 anticuerpos B6H12.2 y BRIC126, pero no el 2D3 de no bloqueo, la fagocitosis permitida de AML LSC (Figura 8A, C). No se observó fagocitosis de células CD34+ normales con cualquiera de los anticuerpos (Figura 8C).

*Anticuerpos monoclonales dirigidos contra fagocitosis humana habilitada CD47 de AML LSC por macrófagos de ratón.* La interacción CD47-SIRP $\alpha$  ha sido implicada como un regulador crítico de rechazo de xenotrasplantes en varias especies de trasplantes de cruz; sin embargo, hay informes contradictorios de la capacidad de CD47 de una especie a unir y estimular SIRP $\alpha$  de una especie diferente. Para evaluar directamente el efecto de la inhibición de la interacción de CD47 humano con el ratón SIRP $\alpha$ , los ensayos de fagocitosis in vitro descritos anteriormente se llevaron a cabo con los macrófagos de ratón. La incubación de AML LSC con macrófagos de ratón en presencia de anticuerpo de control de isotipo IgG1 o anticuerpo monoclonal anti-CD45 humano IgG1 de ratón no dio lugar a la fagocitosis significativa como queda determinada por microscopía de inmunofluorescencia (Figura 8B) o citometría de flujo. Sin embargo, la adición de anticuerpos de bloqueo anti-CD47 B6H12.2 y BRIC126, pero no el 2D3 de no bloqueo, permitió la fagocitosis de AML LSC (Figura 8B, C).

*Un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD47 inhibe el injerto AML LSC humano y elimina la AML en Vivo.* La capacidad del anticuerpo anti-CD47 de bloqueo B6H12.2 para apuntar AML LSC in vivo fue se puso a prueba. En primer lugar, una estrategia de pre-recubrimiento se utilizó en el que AML LSC se purificaron mediante FACS y se incubaron con el control de isotipo IgG1, CD45 anti-humano, o anticuerpo anti-CD47 humano. Una alícuota de las células se analizó para el recubrimiento por tinción con un anticuerpo secundario que demuestra que tanto anti-CD45 como anticuerpo anti-CD47 unieron las células (Figura 10A). Las células restantes fueron trasplantadas en ratones NOG recién nacidos que se analizaron para el injerto leucémico 13 semanas después (Figura 10B). En todos los ratones menos uno, el control de isotipo y las células recubiertas de anticuerpo anti-CD45 mostraron injerto leucémico a largo plazo. Sin embargo, la mayoría de los ratones trasplantados con las células recubiertas con anticuerpo anti-CD47 no tenían injerto de leucemia detectable.

A continuación, una estrategia de tratamiento se utilizó en el que los ratones fueron injertados primero con AML LSC humano y luego se administraron inyecciones intraperitoneales diarias de 100 microgramos de IgG de ratón o anti-CD47 anticuerpo durante 14 días, con leucémica injerto determinado antes y después del tratamiento. El análisis de la sangre periférica mostró una casi eliminación completa de la leucemia circulante en ratones tratados con anticuerpo anti-CD47, a menudo después de una sola dosis, sin respuesta en los ratones de control (Figura 23A, B). De manera similar, hubo una reducción significativa en el injerto leucémico en la médula ósea de ratones tratados con anticuerpo anti-CD47, mientras que la participación leucémica aumentó en ratones tratados con IgG-de control (Figura 23C, D). El análisis histológico de los blastos en la médula ósea identificada monomorfa leucémica en los ratones tratados con IgG de control (Figura 23E, paneles de 1,2) y despejadas las áreas hipocelulares en ratones tratados con anticuerpos anti-CD47 (Figura 23E, paneles de 4,5). En la médula ósea de algunos ratones tratados con anticuerpo anti-CD47-que contenían leucemia residual, se detectaron los macrófagos que contenían células picnóticas fagocitadas, la captura de la eliminación de la leucemia humana (Figura 23E, los paneles de 3,6).

Se presenta aquí la identificación de expresión más alta de CD47 en AML LSC en comparación con sus homólogos normales y la hipótesis de que el aumento de expresión de CD47 en humanos AML contribuye a la patogénesis mediante la inhibición de la fagocitosis de estas células a través de la interacción de CD47 con SIRP $\alpha$ . Consistente con esta hipótesis, se demuestra que el aumento de expresión de CD47 en la AML humana se asocia con una disminución de la supervivencia global. También demostramos que la interrupción de la interacción CD47-SIRP $\alpha$  con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD47 preferentemente permite la fagocitosis de AML LSC por los macrófagos in vitro, inhibe el injerto de AML LSC, y elimina AML in vivo. En conjunto, estos resultados establecen la justificación para considerar el uso de un anticuerpo monoclonal anti-CD47 como una nueva terapia para AML humano.

La influencia patógena de CD47 parece mecánicamente distinta de las dos principales clases de complementación de mutaciones en un modelo propuesto para la patogénesis AML. De acuerdo con este modelo, las mutaciones de clase I, principalmente la proliferación y la apoptosis de impacto (por ejemplo, FLT3 y ANR), y de clase II mutaciones, lo que perjudica principalmente la diferenciación de células hematopoyéticas (por ejemplo, CEBPA, MLL, y NPM1), cooperan de la leucemia. Como se ha demostrado aquí, CD47 contribuye a la patogénesis a través de un mecanismo distinto, que confiere una ventaja de supervivencia a LSC y la progenie explosiones a través de la evasión de la fagocitosis por el sistema inmune innato. Aunque se han descrito estrategias para la evasión de la respuesta inmune por muchos tumores humanos, creemos que el aumento de expresión CD47 representa la primera de tales mecanismos de evasión inmune con implicaciones pronósticas y terapéuticas para AML humano.

Expresión más alta de CD47 es un marcador de las células madre de la leucemia y el pronóstico para la supervivencia global en AML. AML LSC se enriquecen en la fracción Lin-CD34+CD38-, que en la médula ósea normal contiene HSC y MPP. La identificación de moléculas de superficie celular que puede distinguir entre las células madre leucémicas y normales es esencial para el flujo de la evaluación basada en citometría de enfermedad residual mínima (MRD) y para el desarrollo de estrategias de separación de potenciales para su uso en terapias celulares. Varias moléculas candidatas han sido recientemente identificadas, incluyendo CD123, CD96, CLL-1, y ahora CD47. CD123 fue la primera molécula que demostró ser más altamente expresada en la AML LSC en comparación con poblaciones normales enriquecidas con HSC. Se identificó previamente AML expresión LSC-específica de CD96 en comparación con HSC normales, y se demostró que sólo CD96 +, CD96- y no las células leucémicas fueron capaces de injertarse in vivo.

La CLL-1 se identificó como una molécula de superficie AML LSC-específica expresada en la mayoría de las muestras de AML y HSC no normal; significativamente, la presencia de CD38-CLL-1+células de la médula ósea de varios pacientes en remisión hematológica Lin-CD34+fue predictiva de recaída. Aquí se demuestra que el CD47 no sólo es más altamente expresado en AML LSC en comparación con HSC normal y MPP, pero que esta expresión diferencial se puede utilizar para separar HSC/MPP normal de LSC. Esta es la primera demostración de la separación prospectiva normal a partir de células madre leucémicas en la misma muestra del paciente, y ofrece la posibilidad de terapias de trasplante de HSC autólogas LSC-reducido.

Inicialmente se identificó una mayor expresión de CD47 en AML LSC, pero se observó que la expresión de explosiones a granel era la misma. Debido a esto, decidimos utilizar los datos de expresión génica publicados sobre AML mayor para investigar la relación entre la expresión de CD47 y los resultados clínicos. De acuerdo con nuestra hipótesis, se encontró que el aumento de expresión CD47 era independientemente predictivo de un resultado clínico peor en los pacientes con AML con un cariotipo normal, incluyendo el subconjunto sin la mutación FLT3-ITD, que es el mayor subgrupo de pacientes con AML. Al ser este análisis dependiente de la expresión relativa de CD47 ARNm, un ensayo de PCR cuantitativo para AML pronóstico se puede basar en el nivel de expresión CD47. Dicho ensayo podría ser utilizado en el riesgo adaptado de toma de decisiones terapéuticas, particularmente en el gran subgrupo de pacientes con AML con cariotipos normales que carecen de la mutación FLT3-ITD.

Orientación de CD47 en AML LSC con moléculas de superficie celular de anticuerpos terapéuticos monoclonales expresados preferentemente en AML LSC en comparación con sus homólogos normales son candidatos para la orientación con anticuerpos monoclonales terapéuticos. Hasta el momento, varias moléculas han sido objetivo de AML incluyendo CD33, CD44, CD123, CD47 y ahora. CD33 es el objetivo del anticuerpo monoclonal conjugado ozogamicina de gemtuzumab (Mylotarg), que está aprobado para el tratamiento de la recaída de AML en pacientes de edad avanzada. La focalización de CD44 con un anticuerpo monoclonal ha demostrado reducir notablemente AML injerto en ratones, con la evidencia de que actúa específicamente sobre LSC para inducir la diferenciación. Un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD123 se informó recientemente tener eficacia en la reducción de la función AML LSC in vivo. Aquí mostramos que un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD47 es capaz de estimular la fagocitosis de AML LSC in vitro e inhibir el injerto in vivo.

Varias líneas de evidencia sugieren que la orientación de CD47 con un anticuerpo monoclonal probable actúa mediante la interrupción de la interacción CD47-SIRP $\alpha$ , evitando de este modo una señal inhibitoria fagocítica. En primer lugar, dos anticuerpos bloqueantes anti-CD47 activados AML fagocitosis LSC, mientras que un anticuerpo no bloqueante no lo hizo, a pesar de que los tres se unen a las células de manera similar. En segundo lugar, en el caso del anticuerpo B6H12.2 utilizado para la mayoría de nuestros experimentos, el anticuerpo anti-CD45 isotipo, que también se une LSC, no produjo los mismos efectos. De hecho, el anticuerpo es B6H12.2 isotipo IgG1 de ratón, que es menos eficaz en participar receptores de Fc de ratón que los anticuerpos de isotipo IgG2a o IgG2b.

Para los tratamientos clínicos humanos, el bloqueo de CD47 en AML LSC con anticuerpos monoclonales humanizados promueve la fagocitosis LSC a través de un mecanismo similar, como se indica por la humana mediada por macrófagos en la fagocitosis in vitro (Figura 8A, C). Expresión más alta de CD47 se detectó en la AML LSC; Sin embargo, CD47 se expresa en los tejidos normales, incluyendo HSC de la médula ósea. Se identificaron un efecto preferencial de anticuerpos anti-CD47 para permitir la fagocitosis de AML LSC en comparación a la médula ósea normal CD34+ de las células por los macrófagos humanos in vitro. De hecho, no se detectó aumento de la fagocitosis de las células normales CD34+ en comparación con control de isotipo, demostrando que el bloqueo de CD47 con anticuerpos monoclonales es una estrategia terapéutica viable para AML humano.

La evidencia experimental que se presenta aquí expone las razones para los anticuerpos monoclonales anti-CD47 como monoterapia para la AML. Sin embargo, tales anticuerpos pueden ser igualmente eficaz, si no más eficaz como parte de una estrategia de combinación. La combinación de un anticuerpo anti-CD47, capaz de bloquear una señal inhibitoria fuerte para la fagocitosis, con un segundo anticuerpo capaz de unirse a una molécula de LSC-específico (por ejemplo CD96) y hacer que participen receptores Fc sobre los fagocitos, ofreciendo de esta forma una señal positiva fuerte para fagocitosis, puede dar lugar a un estímulo sinérgico para la fagocitosis y la eliminación específica de la AML LSC. Además, las combinaciones de anticuerpos monoclonales para la AML LSC

que incluyen el bloqueo de CD47 anti-IgG1 y anticuerpos humanos dirigidos contra otros dos antígenos de superficie celular será más probable que elimine las células leucémicas con variantes de epítipo pre-existentes o pérdida de antígeno que es probable que se repita en los pacientes tratados con un único anticuerpo.

## 5 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

*Muestras Humanas.* Células mononucleares de médula ósea humanas normales fueron adquiridas de AllCells Inc. (Emeryville, CA). Muestras agudas de leucemia mieloide humana (Figura 1 A) se obtuvieron de los pacientes en el Centro Médico de la Universidad de Stanford con el consentimiento informado, de acuerdo con un protocolo aprobado por el IRB (IRB # 76935 Stanford y 6453). Células positivas CD34 humanas fueron enriquecidas con perlas magnéticas (Miltenyi Biotech).

*Análisis de citometría de flujo y clasificación de células.* Un panel de anticuerpos se utilizó para el análisis y la clasificación de la AML LSC (Lin-CD34+CD38-CD90-, donde el linaje incluido CD3, CD19, CD20 y), HSC (Lin-CD34+CD38-CD90 +), y el MPP (Lin- CD34+CD38-CD90-CD45RA) como se describe previamente (Majeti et al., 2007). Análisis de la expresión CD47 se realizó con un anticuerpo anti-CD47 humano PE (clon B6H12, BD Biosciences, San Jose CA).

*Preparación de ADN genómico y análisis de FLT3-ITD por PCR.* ADN genómico se aisló de los sedimentos celulares utilizando el Kit Gentra Puregene de acuerdo con el protocolo del fabricante (Gentra Systems, Minneapolis, MN). El estado de FLT3-ITD se proyectó por PCR utilizando cebadores que generan un producto de tipo silvestre de 329 pb y productos ITD de tamaños más grandes variables.

*Anticuerpos antihumanos CD47.* Anticuerpos CD47 antihumanos monoclonales de ratón incluyen: BRIC126, IgG2b (Abcam, Cambridge, MA), 2D3, IgG1 (eBiosciences San Diego, CA.) y B6H12.2, IgG1. El hibridoma B6H12.2 se obtuvo de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). El anticuerpo se purificó a partir de proteínas utilizando cromatografía de afinidad hibridoma supernatante G de acuerdo con los procedimientos estándar o se obtuvo de BioXCell (Lebanon, NH).

*Ensayo de colonia metilcelulosa.* La formación de colonias de metilcelulosa se ensayó en placas de células clasificadas en una placa de 6 pocillos, conteniendo cada pocillo 1 ml de metilcelulosa completa (Methocult GF+H4435, Stem Cell Technologies). Las placas se incubaron durante 14 días a 37°C y después se anotaron sobre la base de la morfología.

*Ensayos de Fagocitosis in Vitro.* Células AML LSC humanas o médula ósea normal CD34+ se etiquetaron CFSE y se incubaron con el ratón o los macrófagos humanos en presencia de 7 mg/ml de control de isotipo IgG1, anti-CD45 IgG1 o anti-CD47 (clones B6H12.2, BRIC126, o 2D3) anticuerpo durante 2 horas. Las células fueron analizadas por microscopía de fluorescencia para determinar el índice de fagocitosis (número de células ingeridas por 100 macrófagos). En algunos casos, las células se recogieron a continuación y se tiñeron con un ratón o un marcador de macrófagos humanos y las células fagocitadas se identificaron por citometría de flujo como macrófagos+CFSE+. El análisis estadístico utilizando la prueba t de estudiante se realizó con GraphPad Prism (San Diego, CA).

*Ensayo de injerto preinvestimiento in vivo.* LSC aislado a partir de muestras de AML se incubaron con 28 ug/ml de control de isotipo IgG1, anti-CD45 IgG1, o anticuerpo anti-CD47 IgG1 (B6H12.2) a 4°C durante 30 minutos. Una pequeña alícuota de las células a continuación se tiñó con un anticuerpo secundario anti-ratón de burro PE (eBioscience) y se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar recubrimiento. Aproximadamente 10<sup>5</sup> LSC recubierto se trasplantó en cada ratón irradiado recién nacido NOD. Cg- Prkdcscid112rgtm1Wjl/Szj (NOG). Los ratones se sacrificaron 13 semanas después del trasplante de médula ósea y se analizó para la leucemia de injerto humano (hCD45+hCD33+) por citometría de flujo (Majeti et al., 2007 Cell Stem Cell 1, 635-645). La presencia de la leucemia humana fue confirmada por tinción de Wright-Giemsa de hCD45+células y FLT3-ITD PCR. El análisis estadístico utilizando la prueba t de estudiante se realizó con GraphPad Prism (San Diego, CA).

Tratamiento con anticuerpos in vivo de los ratones injertados AML. Purificado por FACS 1-25x10<sup>5</sup> LSC se trasplantaron en cachorros NOG. Entre ocho a doce semanas después, el injerto AML humano (células hCD45+CD33+) se evaluó en la sangre periférica y la médula ósea por sangrado de la cola y la aspiración del fémur, respectivamente. Ratones injertados se trataron con inyecciones intraperitoneales diarias de 100 microgramos de anticuerpo anti-CD47 o IgG control durante 14 días. En el día 15 los ratones fueron sacrificados y la sangre y la médula ósea periférica se analizaron para AML.

*Pacientes AML, datos de microensayos de expresión génica, y análisis estadístico.* Se analizó la expresión génica y datos clínicos para tres cohortes previamente descritas de pacientes con AML adultos: (1) una formación de datos de 285 pacientes con diversas anomalías citogenéticas y moleculares descritas por Valk et al, (2) un conjunto de datos de prueba de 242 pacientes con cariotipos normales descritos por Metzeler et al., y (3) un conjunto de datos de validación de 137 pacientes con cariotipos normales descritos por Bullinger et al. Los criterios de valoración

clínicos analizados incluyeron la supervivencia global y libre de eventos, con eventos definidos como el intervalo entre el inicio del estudio y el retiro del estudio debido a la falta de remisión completa, la recaída o muerte por cualquier causa, con datos censurados para los pacientes que hicieron no tienen un evento en la última visita de seguimiento.

5 *FLT3-ITD PCR.* Todas las reacciones se realizaron en un volumen de 50  $\mu$ l que contienen 5  $\mu$ l de 10x tampón de PCR (KCl 50 mM/10 mM Tris/2 mM MgCl<sub>2</sub>/0,01% de gelatina), 1  $\mu$ l de 10 mM de dNTPs, 2 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen), 1  $\mu$ l de 10  $\mu$ M cebador delantero 11F (5'-GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3') y revertir 12R imprimación (3'-5'-GCAACC CTTTCAGCATTGACG-'), y 10-50 ng de ADN genómico. Las condiciones de PCR para la amplificación del gen FLT3 fueron 40 ciclos de desnaturalización (30 seg a 95°C) de recocido (30 seg a 62°C), y extensión (30 segundos a 72°C).

15 *Preparación del ratón y macrófagos humanos.* Células mononucleares de médula ósea de ratón BALB/c fueron cosechadas y se cultivaron en IMDM que contiene 10% de FBS, complementado con 10 ng/ml murino recombinante de colonias de macrófagos factor estimulante (M-CSF, Peprotech, Rocky Hill, NJ) durante 7-10 días a permitir la diferenciación terminal de los monocitos a macrófagos. Las células mononucleares de sangre periférica humana se prepararon a partir de sangre normal descartada desde el Centro Médico de la Universidad de Stanford. Los monocitos se aislaron mediante la adhesión de células mononucleares a placas de cultivo durante una hora a 37°C, después de lo cual las células no adherentes se eliminaron mediante lavado. Las células restantes fueron > 20 95% CD14 y CD11b positivo. Las células adherentes fueron incubadas en IMDM más suero humano al 10% (Valle Biomedical, Winchester, VA) durante 7-10 días para permitir la diferenciación terminal de los monocitos a macrófagos.

25 *Ensayo in vitro de fagocitosis.* BMDM o macrófagos de sangre periférica se recogieron por incubación en tripsina/EDTA (Gibco/Invitrogen) durante 5 minutos, seguido por raspado suave. 5 x 10<sup>4</sup> macrófagos se sembraron en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos en 10% IMDM que contiene 10% de FBS. Después de 24 horas, los medios se sustituyeron con IMDM libre de suero y las células se cultivaron durante 2 horas adicionales. LSC se marcaron fluorescentemente con CFSE de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen), marcado con CFSE 2 x 10<sup>4</sup> LSC se añadieron a los pocillos que contienen los macrófagos junto con 7  $\mu$ g/ml de anticuerpo de isotipo IgG1 (eBiosciences), anti-CD45 (clon HI30, eBiosciences), o anti-CD47, y se incubó durante 2 horas. A 30 continuación, los pocillos se lavaron 3 veces con IMDM y se examinaron bajo un microscopio de inmunofluorescencia Eclipse T5100 (Nikon) usando un filtro de proteína verde fluorescente capaz de detectar fluorescencia CFSE. El número de células CFSE positivos dentro de los macrófagos se contó y el índice de fagocitosis se determinó como el número de células ingeridas por 100 macrófagos. Al menos 200 macrófagos se 35 contaron por pocillo. En flor y las imágenes de campo claro se tomaron separadamente y se combina con la imagen Pro Plus (Media Cybernetics, Bethesda, MD). En la Figura 22A, B, las tres imágenes izquierda presentan un aumento de 200x, con la imagen de la derecha anti-CD47 aumento de 400x. Por citometría de análisis de flujo de la fagocitosis, las células se recogieron a continuación de cada pocillo usando tripsina/EDTA. Suspensiones de células fueron teñidas con un anticuerpo de macrófago de ratón anti-ratón de F4/80-PECy7 (eBiosciences) o CD14-PECy7 40 (eBiosciences) anti-humano y se analizaron en un FACSAria. Fagocitados LSC se define como células CFSE+F4/80+ o CFSE+CD14+ cuando se incuban con macrófagos murinos o humanos, respectivamente.

45 *Datos de microensayos de expresión génica.* Panel A de la Figura Adicional 22 describe los principales microensayos conjuntos de datos analizados en este documento, incluyendo las cohortes de entrenamiento, prueba y validación. La serie de entrenamiento: los datos de expresión génica, datos de citogenética molecular y datos para pacientes 285 y 465 con AML perfiladas con Affymetrix HG-U133A y HG-U133 Plus 2,0 microensayos de Valk et al. y Jongen-Lavrenčič et al. respectivamente, se obtuvieron de la Expresión Génica Omnibus utilizando los números de acceso correspondientes (GSE1159 y GSE6891). Los datos de resultado únicamente estaban disponibles para el conjunto anterior de datos, y la información clínica correspondiente fue amablemente proporcionada por los autores. Esta cohorte se presenta como el conjunto de datos de "formación". Este último conjunto de datos se utilizó para 50 confirmar asociaciones univariadas con cariotipo y mutaciones moleculares descritos en el primero. Sin embargo, estos dos conjuntos de datos se superponen en que 247 de los 285 pacientes en el primer estudio se incluyeron en el segundo, y en consecuencia se excluyeron en la validación de la asociación de FLT3-ITD con la expresión de CD47 en el segundo conjunto de datos. Usando NetAffx4, RefSeq5, y la UCSC Genoma Browser6, identificamos 211075\_s\_at y 213857\_s\_at como conjuntos de sonda Affymetrix en el mapeo microensayo U133 Plus 2,0 55 exclusivamente a los exones de CD47 transcritos constitutivamente. La media geométrica de la base-2 logaritmos de estos dos conjuntos de sonda se empleó para estimar el nivel de expresión de ARNm de CD47, y estadísticas medidas para las asociaciones con la clasificación FAB, cariotipo, y las mutaciones moleculares correspondientes. Debido a que los datos proporcionados por Valk et al. como GSE1159 eran mediciones de la intensidad de Affymetrix, convertimos a estas intensidades normalizadas en logaritmos de base 2 de las proporciones para permitir 60 la comparación con las mediciones correspondientes de microensayos de ADNc utilizando un esquema convencional. Específicamente, primero (1) normalizamos datos en bruto utilizando archivos CEL de los 291 microensayos dentro de este conjunto de datos utilizando gcRMA8, entonces (2) relaciones generadas dividiendo la medida de intensidad para cada gen en una matriz dada por la intensidad media del gen en todos los ensayos, (3) 65 log-transformaron (base 2) las proporciones resultantes, y (4) centraron en la mediana los datos de expresión a

través de las matrices después a través de genes. Para la evaluación del valor pronóstico de CD47, se empleó el 213857\_s\_at sonda conjunto de la Affymetrix HG U133A y HG-U133 Plus 2,0 microensayos, dada su distribución de expresión similar (Adicional Figura 3B), y teniendo en cuenta su posición dentro del transcrito de ARNm como en comparación con los clones de ADNc en los microensayos de ADNc Stanford como anotada dentro del recurso NetAffx.

Conjunto de de prueba: La expresión de genes y datos clínicos de los 242 pacientes adultos con NKAML perfiladas con Affymetrix HG U133A y HG-U133 Plus 2,0 microensayos por Metzeler et al. se obtuvieron de la Expresión Génica Omnibus utilizando los números de acceso correspondientes (GSE12417). Dado que los datos brutos no estaban disponibles para este conjunto de datos, con el propósito de evaluar el valor pronóstico de CD47, se emplearon los conjuntos de datos normalizados proporcionados por los autores (base 2 LOGARITHM ritmos) y la expresión de CD47 evaluado utilizando el conjunto de sondas en los microensayos 213857\_s\_at correspondientes.

Conjunto de validación: de datos de expresión génica de los 137 pacientes con AML cariotipo normal perfilado con microensayos de ADNc por Bullinger et al. se obtuvieron de la Stanford Microarray Database<sup>10</sup>. La información clínica correspondiente incluyendo los datos de resultados y estado de mutación del FLT3 fueron amablemente proporcionados por los autores. Uso de las anotaciones originales de características de microensayo, así como SOURCE11, RefSeq5, y la UCSC Genome Browser<sup>6</sup>, identificamos IMAGEN: 811819 como una secuencia de clon de ADNc verificada al 3' terminal de exón de CD47 constitutivamente transcrita en los microensayos de ADNc correspondientes.

Detalles del tratamiento: los pacientes con AML descritos por Valk et al. (Conjunto de entrenamiento), fueron tratados de acuerdo con varios protocolos del grupo de Hematología-Oncología Cooperativa belga-holandesa. La mayoría (90%) de los pacientes NK-ALD descritos por Metzeler et al. (conjunto de prueba) fueron tratados por protocolo AMLCG-1999 del Grupo Cooperativo AML alemán, con todos los pacientes que recibieron intensiva doble inducción y quimioterapia de consolidación. Todos los 137 pacientes NK-AML descritos por Bullinger et al. (conjunto de validación) recibieron estándar de atención intensificada regímenes de tratamiento (protocolo de AML HD98A), que incluyeron 2 ciclos de terapia de inducción con idarubicina, citarabina y etopósido, un ciclo de consolidación de dosis altas de citarabina y mitoxantrona (HAM), seguidas de asignación aleatoria a un ciclo de consolidación tardía de HAM en comparación con trasplante de células hematopoyéticas autólogas en caso de que ningún donante familiar HLA idéntico estuviese disponible para el trasplante alogénico de células hematopoyéticas.

Análisis estadístico. Se han utilizado dos pruebas t y análisis de la varianza de cola para la estimación de diferencias significativas en el nivel de expresión de CD47 entre los subgrupos de AML en base a categorizaciones morfológicas, citogenéticas y moleculares. Las asociaciones entre los grupos de CD47 altos y bajos y características clínicas, demográficas y moleculares de referencia fueron analizadas mediante pruebas de suma de rangos exactos y Mann-Whitney de Fisher para las variables categóricas y continuas, respectivamente. Se consideraron los valores de p de dos lados de menos de 0,05 para indicar la significación estadística.

El valor pronóstico de la expresión de CD47 se midió a través de la comparación de la supervivencia global y libre de eventos de los pacientes con estimación de las curvas de supervivencia por el método del producto límite de Kaplan-Meier y la prueba de log-rank. Dentro de este análisis, primero derivamos una clasificación binaria de los pacientes con AML en alta CD47 y grupos de bajos de expresión de CD47 mediante la comparación de la expresión de CD47 (tal como se mide por 213857\_s\_at dentro GSE1159) con respecto a un umbral óptimo. Este umbral se determinó utilizando X-Tile<sup>16</sup>, un método que se empleó para maximizar el estadístico chi-cuadrado entre los dos grupos para la esperada en función del número observado de muertes. Esta estratificación segrega a los 261 pacientes con AML con datos de resultados disponibles en dos grupos de tamaño desigual, con un 72% de los pacientes con menor expresión CD47 considerada baja, y el 28% con la más alta expresión de CD47 considerada alta. Estos dos grupos tienen supervivencia general diferente, con una razón de riesgo de 1,42 para el grupo alto CD47, y el correspondiente valor de p no corregida de 0,033, lo que requiere la validación cruzada para evitar el riesgo de sobreajuste.

Como consecuencia, se evaluó la validez y firmeza de la estratificación del riesgo mediante la expresión de CD47 mediante la aplicación de este umbral óptimo para una cohorte de prueba independiente de 242 pacientes con LMA-NK descritos por Metzeler et al. Cabe destacar que, a pesar de la presencia de otras variables que potencialmente confunden asociaciones con la supervivencia (incluyendo edad más avanzada, y diferentes terapias), la derivación de un punto de corte de óptimo uso de los 242 pacientes NK-AML dentro del conjunto de datos de prueba arrojó una estratificación similar, con el 74% de los pacientes con menor expresión CD47 considerada baja, y el 26% con la más alta expresión de CD47 considerada alta.

A continuación, se evaluó la validez de esta estratificación en una cohorte de validación cruzada de 137 pacientes con NK-AML tratados uniformemente descritos por Bullinger et al. Dentro de este conjunto de datos de validación, podríamos definir de manera similar dos grupos de tamaño similar (es decir, el 72% y el 28% con bajos y más altos niveles de CD47, respectivamente), y estos dos grupos tuvieron resultados significativamente diferentes cuando se evaluaron para la supervivencia global (figura 22B,  $p = 0,002$ , índice de riesgo 2,02, IC del 95%: 1,37 a

4,03), y la supervivencia libre de eventos (Figura 223A,  $p = 0,004$ , razón de riesgo: 1,94; IC del 95%: 1,30 a la 3,77). De los 137 pacientes, 5 no tuvieron mediciones fiables para CD47 cuando se utilizan los criterios de selección de datos y normalización descritos por los autores.

5 Para determinar la solidez de esta asociación, que también examinó el valor predictivo de la expresión de CD47 cuando la cohorte de validación se dividió en grupos de expresión de CD47 de expresión baja y alta basada en la relativa a la mediana, o como una variable continua. Como se ha descrito anteriormente, una mayor expresión de CD47 se asocia a una peor supervivencia libre de eventos y global. De los 137 pacientes estudiados, un subgrupo de 123 pacientes tenían datos disponibles de supervivencia, los datos de expresión de CD47, y el estado de FLT3-ITD reportados. Dentro de este grupo, se evaluó la relación entre el nivel de expresión CD47 como una variable continua con el resultado mediante el análisis univariado de Cox de riesgos proporcionales, con una supervivencia libre de eventos o la supervivencia general como la variable dependiente. Se utilizó el análisis multivariante de Cox-riesgos proporcionales con la supervivencia libre de eventos o la supervivencia global como la variable dependiente y el estado FLT3-ITD, edad y nivel de expresión continua de CD47 como variables independientes directamente evaluadas.

Las asociaciones de CD47 con otras variables (por ejemplo, NPM1, CEBPA) estaban limitadas por el tamaño de la muestra y los datos que faltan para covariables. Se utilizó la prueba de Wald para evaluar la importancia de cada covariable en el análisis multivariado. Análisis univariados y multivariados de riesgos proporcionales se realizaron utilizando la función `coxph` en el paquete estadístico R.

#### Ejemplo 5

CD47 es un factor pronóstico y terapéutico anticuerpo diana en células madre del cáncer de tumor sólido

Se ha encontrado que el aumento de expresión CD47 se asocia con peores resultados clínicos en el linfoma difuso de células grandes B- (DLBCL) y carcinoma de ovario (Figura 24). Además, se ha encontrado ahora que los anticuerpos anti-CD47 permiten la fagocitosis de células madre de cáncer de vejiga, carcinoma de ovario, y meduloblastoma in vitro con macrófagos humanos (Figura 25).

#### LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University
- <120> Métodos para manipular fagocitosis mediada por CD47
- <130> P068101EP
- <150> EP 09701993.9
- <151> 2009-01-15
- <150> US 61/011,324
- <151> 2008-01-15
- <150> US 61/189,786
- <151> 2008-08-22
- <150> PCT/US2009/000319
- <151> 2009-01-15
- <160> 18
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 142
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

65

ES 2 735 144 T3

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe  
 20 25 30  
 5 Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala  
 35 40 45  
 Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp  
 50 55 60  
 10 Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp  
 65 70 75 80  
 Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala  
 85 90 95  
 15 Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr  
 100 105 110  
 Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu  
 115 120 125  
 20 Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn  
 130 135 140

<210> 2  
 <211> 5346  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

ggggagcagg cgggggagcg ggcgggaagc agtgggagcg cgcgtgcgcg cggccgtgca 60  
 gcctgggcag tgggtcctgc ctgtgacgcg cggcggcggc cggtcctgcc tgtaacggcg 120  
 30 gcggcggtg ctgctccaga cacctgcggc ggcggcggcg acccgcggc gggcgcgag 180  
 atgtggcccc tggtagcggc gctgttgctg ggctcggcgt gctgcggatc agctcagcta 240  
 ctatttaata aaacaaaatc tgtagaattc acgttttgta atgacactgt cgtcattcca 300  
 tgctttgtta ctaatatgga ggcacaaaac actactgaag tatacgtaaa gtggaaattt 360

35  
  
40  
  
45  
  
50  
  
55  
  
60  
  
65

ES 2 735 144 T3

aaaggaagag atatttacac ctttgatgga gctcetaaaca agtccactgt cccactgac 420  
 ttttagtagtg caaaaattga agtctcacia ttactaaaag gagatgcctc tttgaagatg 480  
 gataagagtg atgctgtctc acacacagga aactacactt gtgaagtaac agaattaacc 540  
 agagaagggtg aaacgatcat cgagctaaaa tatcgtggtt tttcatgggt ttctccaaat 600  
 5 gaaaatattc ttattgttat tttcccaatt tttgctatac tcctgttctg gggacagttt 660  
 ggtattaaaa cacttaaata tagatccggg ggtatggatg agaaaacaat tgctttactt 720  
 gttgctggac tagtgatcac tgtcattgtc attggtggag ccattccttt cgtcccaggt 780  
 gaatattcat taaagaatgc tactggcctt ggtttaattg tgacttctac agggatatta 840  
 atattacttc actactatgt gtttagtaca gcgattggat taacctcctt cgtcattgcc 900  
 10 atattggtta ttcagggtgat agcctatata ctcgtgtggg ttggactgag tctctgtatt 960  
 gcggcgtgta taccaatgca tggccctctt ctgatttcag gtttgagtat cttagctcta 1020  
 gcacaattac ttggactagt ttatatgaaa tttgtggcct ccaatcagaa gactatacaa 1080  
 cctcctagga aagctgtaga ggaaccctt aatgcattca aagaatcaaa aggaatgatg 1140  
 aatgatgaat aactgaagtg aagtgatgga ctccgatttg gagagtagta agacgtgaaa 1200  
 15 ggaatacact tgtgtttaag caccatggcc ttgatgattc actggtgggg agaagaaca 1260  
 agaaaagtaa ctggttgtca cctatgagac ccttacgtga ttgtagtta agtttttatt 1320  
 caaagcagct gtaatttagt taataaaaata attatgatct atgtttgttg cccaattgag 1380  
 atccagtttt ttggtgttat ttttaataca ttaggggcaa tagtagaatg gacaatttcc 1440  
 aagaatgatg cctttcaggt cctagggcct ctggcctcta ggtaaccagt ttaaattggg 1500  
 20 tcagggtgat aactacttag cactgcctcg gtgattacc agagatatct atgaaaacca 1560  
 gtggcttcca tcaaaccctt gccactcag gttcacagca gctttgggca gttatggcag 1620  
 tatggcatta gctgagaggt gtctgccact tctgggtcaa tggataata aattaagtac 1680  
 aggcaggaat ttggttggga gcactctgta tgatctcctg atgatgtgat attgatggag 1740  
 25 atagtgttcc tcattcttgg gggttgcct tcccacattc ccccttcaac aaacagtgt 1800  
 acaggtcctt cccagattta gggtactttt attgatggat atgttttctt tttattcaca 1860  
 taacccttg aaaccctgtc ttgtcctcct gttacttgct tctgctgtac aagatgtagc 1920  
 accttttctc ctctttgaac atggctagt gacacggtag caccagttgc aggaaggagc 1980  
 cagacttggt ctccagagcac tgtgttcaca cttttcagca aaaatagcta tggttgtaac 2040  
 30 atatgtattc ccttctctcg atttgaaggc aaaaatctac agtgtttctt cacttctttt 2100  
 ctgatctggg gcatgaaaaa agcaagattg aaatttgaac tatgagtctc ctgcatggca 2160  
 acaaaatgtg tgtcaccatc aggccaacag gccagcctt gaatggggat ttattactgt 2220  
 tgtatctatg ttgcatgata aacattcatc accttctcct tgtagtctcg cctcgtactc 2280  
 cccttccctt atgattgaaa agtaaacaaa acccacattt cctatcctgy ttagaagaaa 2340  
 35 attaatgttc tgacagttgt gatcgcctgg agtactttta gacttttagc attcgtttt 2400  
 tacctgtttg tggatgtgtg tttgtatgtg catacgtatg agataggcac atgcatcttc 2460  
 tgtatggaca aaggtgggg acctacagga gagcaaagg taattttgtg cttttagtaa 2520  
 aacatttta atacaaagtt ctttattggg tggattata tttgatgcaa atatttgatc 2580  
 acttaaaact tttaaaactt ctaggttaatt tgccacgctt tttgactgct caccaatacc 2640  
 40 ctgtaaaaat acgtaattct tctgtttgt gtaataagat atcattat ttagctgcat 2700  
 taataatagt tatttcttag tccatcagat gttcccgtgt gcctcttcta tgccaaattg 2760  
 attgtcatat ttcattgttg gaccaagtag tttgcccag gcaaacctaa atttatgacc 2820  
 tgctgaggcc tctcagaaaa ctgagcatac tagcaagaca gctcttctg aaaaaaaaa 2880  
 45 tatgtataca caaatatata cgtatatcta tatatacgta tgtatataca cacatgtata 2940  
 ttcttctctg attgtgtagc tgtccaaaat aataacatat atagaggag ctgtattcct 3000  
 ttatacaaat ctgatggctc ctgcagcact ttttcttctt gaaaatattt acattttgct 3060  
 aacctagttt gttactttta aatcagttt tgatgaaagg agggaaaagc agatggactt 3120  
 gaaaaagatc caagctccta ttagaaaagg tatgaaaatc tttatagtaa aattttttat 3180  
 aaactaaagt tgtacctttt aatatgtagt aaactctcat ttatttgggg ttcgctcttg 3240  
 50 gatctcatcc atccattgtg ttctctttaa tgctgctgc cttttgaggc attcactgcc 3300  
 ctagacaatg ccaccagaga tagtggggga aatgccagat gaaaccaact cttgctctca 3360  
 ctagtgtca gcttctctgg ataagtgacc acagaagcag gagtcctcct gcttgggcat 3420  
 cattggggcca gttccttctc tttaaatcag atttgtaatg gctcccaaat tccatcacat 3480  
 cacattttaa ttgcagacag tgttttgac atcatgtatc tgttttgtcc cataatatg 3540  
 55 tttttactcc ctgatcccag tttctgctgt tgactcttc attcagttt attttattg 3600  
 tgttctcaca gtgacacat ttgtcctttt ctgcaacaac ctttcagct acttttgcca 3660  
 aattctattt gtcttctcct tcaaaacatt ctcccttgca gttcctctc atctgtgtag 3720  
 ctgctctttt gtctcttaac ttaccattcc tatagtactt tatgcatctc tgcttagttc 3780  
 tattagtttt ttggccttgc tcttctcctt gattttaaaa ttcttctat agctagagct 3840  
 60 tttctttctt tcattctctc ttcctgcagt gttttgcata catcagaagc taggtacata 3900  
 agttaaatga ttgagagttg gctgtattta gatttatcac tttttaatag ggtgagcttg 3960  
 agagttttct ttctttctgt ttttttttt tgtttttttt ttttttttt ttttttttt 4020  
 ttttgactaa tttcacatgc tctaaaaacc ttcaaagggt attatttttc tcctggaac 4080  
 65 tccaggtcca ttctgtttaa atccctaaga atgtcagaat taaaataaca gggctatccc 4140

ES 2 735 144 T3

gtaattggaa atatttcttt tttcaggatg ctatagtcaa tttagtaagt gaccaccaaa 4200  
 ttgttatttg cactaacaaa gctcaaaaca cgataagttt actcctccat ctcagtaata 4260  
 aaaattaagc tgtaatcaac cttctagggt tctcttgtct taaaatgggt attcaaaaat 4320  
 5 ggggatctgt ggtgtatgta tggaaacaca tactccttaa tttacctgtt gttggaaact 4380  
 ggagaaatga ttgtcgggca accgtttatt ttttattgta ttttatttgg ttgagggatt 4440  
 tttttataaa cagttttact tgtgtcatat tttaaaatta ctaactgcca tcacctgctg 4500  
 gggtcctttg ttaggtcatt ttcagtgact aatagggata atccaggtaa ctttgaagag 4560  
 atgagcagtg agtgaccagg cagtttttct gccttttagct ttgacagttc ttaattaaga 4620  
 10 tcattgaaga ccagctttct cataaatttc tctttttgaa aaaaagaaag catttgtact 4680  
 aagctcctct gtaagacaac atcttaaata ttaaaagtgt tgttatcatg actggtgaga 4740  
 gaagaaaaca ttttgttttt attaaatgga gcattattta caaaaagcca ttggtgagaa 4800  
 ttagatccca catcgtataa atatctatta accattctaa ataaagagaa ctccagtgtt 4860  
 gctatgtgca agatcctctc ttggagcttt tttgcatagc aattaaaggt gtgctatttg 4920  
 15 tcagtagcca tttttttgca gtgatttgaa gaccaaagtt gttttacagc tgtgttaccg 4980  
 ttaaaggttt ttttttttat atgtattaaa tcaatttatc actgtttaaa gctttgaata 5040  
 tctgcaatct ttgccaaggt acttttttat ttaaaaaaaa acataacttt gtaaatatta 5100  
 ccctgtaata ttatatatac ttaataaaaac attttaagct attttgttgg gctatttcta 5160  
 20 ttgctgctac agcagaccac aagcacattt ctgaaaaatt taatttatta atgtattttt 5220  
 aagttgctta tattctagggt aacaatgtaa agaagattt aaaaatattaa ttatgaattt 5280  
 tttgagtata atacccaata agcttttaat tagagcagag ttttaattaa aagttttaaa 5340  
 tcagtc 5346

25 <210> 3  
 <211> 5288  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 3

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 735 144 T3

	ggggagcagg	cgggggagcg	ggcgggaagc	agtgggagcg	cgcgtagcgcg	cggccgtgca	60
	gcctgggcag	tgggtcctgc	ctgtgacgcg	cggcggcggt	cggtcctgcc	tgtaacggcg	120
	gcgggcggctg	ctgctccaga	cacctgcggc	ggcggcggcg	accccgcggc	gggcgcgag	180
5	atgtggcccc	tggtagcggc	gctgttgctg	ggctcggcgt	gctgcggatc	agctcagcta	240
	ctatttaata	aaacaaaatc	tgtagaattc	acgttttgta	atgacactgt	cgtcattcca	300
	tgctttgtta	ctaatatgga	ggcacaaaac	actactgaag	tatacgtaaa	gtggaaattt	360
	aaaggaagag	atatttacac	ctttgatgga	gctctaaaca	agtccactgt	ccccactgac	420
	tttagtagtg	caaaaattga	agtctcacia	ttactaaaag	gagatgcctc	tttgaagatg	480
10	gataagagtg	atgctgtctc	acacacagga	aactacactt	gtgaagtaac	agaattaacc	540
	agagaaggtg	aaacgatcat	cgagctaaaa	tatcgtgttg	tttcatggtt	ttctccaaat	600
	gaaaatattc	ttattgttat	tttcccaatt	tttgctatac	tctgttctg	gggacagttt	660
	ggtattaata	cacttaaata	tagatccggg	ggtatggatg	agaaaacaat	tgctttactt	720
	gttgctggac	tagtgatcac	tgtcattgtc	attgttggag	ccattctttt	cgtcccaggt	780
15	gaatattcat	taaagaatgc	tactggcctt	ggtttaattg	tgacttctac	agggatatta	840
	atattacttc	actactatgt	gtttagtaca	gcgattggat	taacctcctt	cgtcattgcc	900
	atattggtta	ttcaggtgat	agcctatata	ctcgcgtgtg	ttggactgag	tctctgtatt	960
	gcggcgtgta	taccaatgca	tggccctcct	ctgatttcag	gtttgagtat	cttagctcta	1020
20	gcacaattac	ttggactagt	ttatatgaaa	tttgtggctt	ccaatcagaa	gactatacaa	1080
	cctcctagga	ataactgaag	tgaagtgatg	gactccgatt	tggagagtag	taagacgtga	1140
	aaggaataca	cttgtgttta	agcaccatgg	ccttgatgat	tcactgttgg	ggagaagaaa	1200
	caagaaaagt	aactggttgt	cacctatgag	acccttacgt	gattgttagt	taagttttta	1260
	ttcaaagcag	ctgtaattta	gttaataaaa	taattatgat	ctatgttgtt	tgcccaattg	1320
25	agatccagtt	ttttgttgtt	atthttaatc	aattaggggc	aatagtagaa	tgacaatttt	1380
	ccaagaatga	tgcctttcag	gtcctagggc	ctctggcctc	taggtaacca	gtttaaattg	1440
	gttcagggtg	ataactactt	agcactgccc	tggtgattac	ccagagatat	ctatgaaaac	1500
	cagtggcttc	catcaaacct	ttgccaactc	aggttcacag	cagctttggg	cagttatggc	1560
	agtatggcat	tagctgagag	gtgtctgcca	cttctgggtc	aatggaataa	taaattaagt	1620
30	acaggcagga	atthggttgg	gagcatcttg	tatgatctcc	gtatgatgtg	atattgatgg	1680
	agatagtgg	cctcattcct	gggggttgcc	attcccacat	tcccccttca	acaacagtg	1740
	taacaggtcc	ttcccagatt	tagggactct	ttattgatgg	atatgttttc	cttttattca	1800
	cataaccctc	tgaaccctg	tcttgtcctc	ctgttacttg	cttctgctgt	acaagatgta	1860
	gcaccttttc	tctcttttga	acatggtcta	gtgacacggt	agcaccagtt	gcaggaagga	1920
35	gccagacttg	ttctcagagc	actgtgttca	cacttttcag	caaaaatagc	tatggttgta	1980
	acatatgtat	tcccttcctc	tgatttgaag	gcaaaaatct	acagtgtttc	ttcacttctt	2040
	ttctgatctg	gggcatgaaa	aaagcaagat	tgaaatttga	actatgagtc	tctgcatgg	2100
	caacaaaatg	tgtgtcacca	tcaggccaac	aggccagccc	ttgaatgggg	atthattact	2160
40	gttgtatcta	tgttgcatga	taaacattca	tcaccttctc	cctgtagtcc	tgcctcgtac	2220

45

50

55

60

65

5 tccccttccc ctatgattga aaagtaaaca aaaccacat ttcctatcct ggttagaaga 2280  
 aaattaatgt tctgacagtt gtgatcgct ggagacttt tagactttta gcattcgttt 2340  
 tttacctggt tgtggatgtg tgtttgtatg tgcatacgta tgagataggc acatgcatct 2400  
 tctgtatgga caaaggtggg gtacctacag gagagcaaag gtttaattttg tgcttttagt 2460  
 aaaaacattt aaatacaaaag ttctttattg ggtggaatta tatttgatgc aaatatttga 2520  
 tcacttaaaa cttttaaaac ttctaggtaa tttgccacgc tttttgactg ctcaccaata 2580  
 ccctgtaaaa atacgtaatt cttcctgttt gtgtaataag atattcatat ttgtagtgc 2640  
 attaataata gttatttctt agtccatcag atgttcccgt gtgcctcttt tatgccaaat 2700  
 10 tgattgtcat atttcatggt gggaccaagt agtttgccca tggcaaacct aaatttatga 2760  
 cctgctgagg cctctcagaa aactgagcat actagcaaga cagctcttct tgaaaaaaaa 2820  
 aatatgtata cacaaatata tacgtatata tatatatac tatgtatata cacacatga 2880  
 tattcttcct tgattgtgta gctgtccaaa ataataacat atatagagg agctgtattc 2940  
 ctttatacaa atctgatggc tcctgcagca ctttttctt ctgaaaaatatt tacattttg 3000  
 15 ctaacctagt ttgttacttt aaaaatcagt tttgatgaaa ggaggggaaa gcagatggac 3060  
 ttgaaaaaga tccaagctcc tattagaaaa ggtatgaaaa tctttatagt aaaatttttt 3120  
 ataaactaaa gttgtacctt ttaatatgta gtaaacctctc atttatttgg ggttcgctct 3180  
 tggatctcat ccatccattg tgttctcttt aatgctgcct gccttttgag gcattcactg 3240  
 ccctagacaa tgccaccaga gatagtgggg gaaatgccag atgaaaccaa ctcttgctct 3300  
 20 cactagttgt cagcttctct ggataagtga ccacagaagc aggagtccct ctgcttgggc 3360  
 atcattgggc cagttccttc tctttaaatc agatttgtaa tggctcccaa attccatcac 3420  
 atcacattta aattgcagac agtgttttgc acatcatgta tctgttttgt cccataatat 3480  
 gctttttact ccctgatccc agtttctgct gttgactctt ccattcagtt ttatttattg 3540  
 25 tgtgttctca cagtgcacc atttgtcctt ttctgcaaca acctttccag ctacttttgc 3600  
 caaattctat ttgtcttctc cttcaaaaaca ttctccttg cagttcctct tcatctgtgt 3660  
 agctgctctt ttgtctctta acttaccatt cctatagtac tttatgcatc tctgcttagt 3720  
 tctattagtt ttttggcctt gctcttctcc ttgattttta aattccttct atagctagag 3780  
 cttttctttc tttcattctc tcttctgca gtgttttgca tacatcagaa gctaggtaca 3840  
 30 taagttaaat gattgagagt tggctgtatt tagatttatc actttttaat agggtgagct 3900  
 tgagagtttt ctttctttct gttttttttt tttgtttttt tttttttttt tttttttttt 3960  
 ttttttgact aatttcacat gctctaaaaa ccttcaaagg tgattatttt tctcctggaa 4020  
 actccaggtc cattctgttt aaatccctaa gaatgtcaga attaaaataa cagggctatc 4080  
 ccgtaattgg aaatatttct tttttcagga tgctatagtc aatttagtaa gtgaccacca 4140  
 35 aattgttatt tgcactaaca aagctcaaaa cacgataagt ttactcctcc atctcagtaa 4200  
 taaaaattaa gctgtaatca accttctagg ttctccttgt cttaaaatgg gtattcaaaa 4260  
 atggggactc gtggtgtatg tatggaaaaca catactcctt aatttacctg ttgttggaaa 4320  
 ctggagaaat gattgtcggg caaccgttta ttttttattg tattttattt ggttgagggg 4380  
 tttttttata aacagtttta cttgtgtcat attttaaaat tactaactgc catcacctgc 4440  
 40 tggggctcctt tgttaggtca ttttcagtga ctaataggga taatccagg aactttgaag 4500  
 agatgagcag tgagtgacca ggcagttttt ctgcctttag ctttgacagt tcttaattaa 4560  
 gatcattgaa gaccagcttt ctcataaatt tctctttttg aaaaaaagaa agcatttgta 4620  
 ctaagctcct ctgtaagaca acatcttaa tcttaaaagt gttgttatca tgactggtga 4680  
 45 gagaagaaaa cattttgttt ttattaaatg gagcattatt tacaaaaagc cattgttgag 4740  
 aattagatcc cacatcgtat aaatatctat taaccattct aaataaagag aactccagtg 4800  
 ttgctatgtg caagatcctc tcttggagct tttttgcata gcaattaaag gtgtgctatt 4860  
 tgtcagtagc cattttttttg cagtgatttg aagaccaaag ttgttttaca gctgtgttac 4920  
 cgttaaaggt tttttttttt atatgtatta aatcaattta tcaactgtta aagctttgaa 4980  
 50 tatctgcaat ctttgccaag gtactttttt atttaaaaaa aaacataact ttgtaaatat 5040  
 taccctgtaa tattatata acttaataaa acattttaag ctattttggt gggctatttc 5100  
 tattgctgct acagcagacc acaagcacat ttctgaaaaa ttttaattat taatgtattt 5160  
 ttaagttgct tatattctag gtaacaatgt aaagaatgat ttaaaatatt aattatgaat 5220  
 55 tttttgagta taatacccaa taagctttta attagagcag agttttaatt aaaagtttta 5280  
 aatcagtc 5288

<210> 4  
 <211> 5313  
 60 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 4

ES 2 735 144 T3

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

```
ggggagcagg cgggggagcg ggcgggaagc agtgggagcg cgcgtgcgcg cggccgtgca 60
gcctgggcag tgggtcctgc ctgtgacgcg cggcggcggt cggtcctgcc tgtaacggcg 120
gcggcggctg ctgctccaga cacctgcggc ggcggcggcg accccgcggc gggcgcggag 180
atgtggcccc tggtagcggc gctgttgctg ggctcggcgt gctgcggatc agctcagcta 240
ctatttaata aaacaaaatc tgtagaattc acgttttgta atgacactgt cgtcattcca 300
tgctttgtta ctaatatgga ggcacaaaac actactgaag tatacgtaaa gtggaaattt 360
```

ES 2 735 144 T3

aaaggaagag atatttacac ctttgatgga gctcctaaaca agtccactgt cccactgac 420  
 ttttagtagtg caaaaattga agtctcacaa ttactaaaag gagatgcctc tttgaagatg 480  
 gataaagagt atgctgtctc acacacagga aactacactt gtgaagtaac agaattaacc 540  
 agagaagggt aaacgatcat cgagctaaaa tatcgtgttg tttcatgggt ttctccaaat 600  
 5 gaaaatattc ttattgttat tttcccaatt tttgctatac tcctgttctg gggacagttt 660  
 ggtattaaaa cacttaaata tagatccggg ggtatggatg agaaaacaat tgctttactt 720  
 gttgctggac tagtgatcac tgtcattgtc attggtggag ccattccttt aggccagggt 780  
 gaatattcat taaagaatgc tactggcctt gggttaattg tgacttctac agggatatta 840  
 atattacttc actactatgt gtttagtaca gcgattggat taacctcctt cgtcattgcc 900  
 10 atattggtta ttcagggtgat agcctatata ctcgctgtgg ttggactgag tctctgtatt 960  
 gcggcgtgta taccaatgca tggcctcctt ctgatttcag gtttgagat cttagctcta 1020  
 gcacaattac ttggactagt ttatatgaaa tttgtggcct ccaatcagaa gactatacaa 1080  
 cctcctagga aagctgtaga ggaaccctt aatgaataac tgaagtgaag tgatggactc 1140  
 cgatttggag agtagtaaga cgtgaaagga atacacttgt gtttaagcac catggccttg 1200  
 15 atgattcact gttggggaga agaacaaga aaagtaactg gttgtcacct atgagaccct 1260  
 tacgtgattg ttagttaagt ttttattcaa agcagctgta atttagttaa taaaataatt 1320  
 atgatctatg ttgtttgccc aattgagatc cagttttttg ttgttatttt taatcaatta 1380  
 ggggcaatag tagaatggac aattccaag aatgatgcct ttcaggtcct agggcctctg 1440  
 gcctctaggt aaccagttta aattggttca gggtgataac tacttagcac tgccctgggtg 1500  
 20 attaccacaga gatatctatg aaaaccagtg gcttccatca aacctttgcc aactcagggt 1560  
 cacagcagct ttgggcagtt atggcagtat ggcattagct gagaggtgtc tgccacttct 1620  
 ggtcaatgg aataataaat taagtacagg caggaatttg gttgggagca tcttgtatga 1680  
 tctccgtatg atgtgatatt gatggagata gtggtcctca ttcttggggg ttgccattcc 1740  
 cacattcccc cttcaacaaa cagtgaaca ggtccttccc agatttaggg tacttttatt 1800  
 25 gatggatatg ttttctttt attcacataa ccccttgaaa ccctgtcttg tcctcctgtt 1860  
 acttgcttct gctgtacaag atgtagcacc ttttctcctc tttgaacatg gtctagtgc 1920  
 acggtagcac cagttgcagg aaggagccag acttgttctc agagcactgt gttcacactt 1980  
 ttcagcaaaa atagctatgg ttgtaacata tgtattccct tcctctgatt tgaaggcaaa 2040  
 aatctacagt gtttcttcac ttcttttctg atctggggca tgaaaaaagc aagattgaaa 2100  
 30 tttgaactat gagtctcctg catggcaaca aaatgtgtgt caccatcagg ccaacaggcc 2160  
 agccttgtaa tggggattta ttactgttgt atctatgttg catgataaac atcatcacc 2220  
 ttctcctgtg agtctgcct cgtactcccc tccccctatg attgaaaagt aaacaaaacc 2280  
 cacatttctt atcctggtta gaagaaaatt aatgttctga cagttgtgat cgcctggagt 2340  
 35 acttttagac ttttagcatt cgttttttac ctgtttggg atgtgtgttt gtatgtgcat 2400  
 acgtatgaga taggcacatg catcttctgt atggacaaag gtggggtacc tacaggagag 2460  
 caaaggttaa ttttgtgctt ttagtaaaaa catttaaata caaagttctt tattgggtgg 2520  
 aattatattt gatgcaata tttgatcact taaaactttt aaaacttcta ggtaatttgc 2580  
 cacgtttttt gactgctcac caataccctg taaaaatag taattcttcc tgtttgtgta 2640  
 40 ataagatatt catatttgta ttgcattaa taatagtat ttcttagtcc atcagatgtt 2700  
 cccgtgtgcc tcttttatgc caaattgatt gtcataattc atggtgggac caagtagttt 2760  
 gccatggca aacctaaatt tatgacctgc tgaggcctct cagaaaactg agcatactag 2820  
 caagacagct cttcttgaaa aaaaaaatat gtatacacia atataacgt atatctatat 2880  
 atacgtatgt atatacacac atgtatattc ttcttgatt gtgtagctgt ccaaataat 2940  
 45 aacatatata gagggagctg tattccttta tacaatctg atggctcctg cagcactttt 3000  
 tccttctgaa aatatttaca ttttgctaac ctagtgtgtt actttaaaaa tcagttttga 3060  
 tgaaaggagg gaaaagcaga tggacttgaa aaagatccaa gctcctatta gaaaaggat 3120  
 gaaaatcttt atagtaaaat ttttataaa ctaaggtgt accttttaac atgtagtaaa 3180  
 ctctcattta tttgggttc gctcttggat ctcacatc cattgtgttc tctttaatgc 3240  
 50 tgctgcctt ttgaggcatt cactgccta gacaatgcca ccagagatag tgggggaaat 3300  
 gccagatgaa accaactctt gctctcacta gttgtcagct tctctggata agtgaccaca 3360  
 gaagcaggag tcctcctgct tgggcatcat tgggcccagtt ccttctctt aaatcagatt 3420  
 tgtaatggct cccaaattcc atcacatcac atttaaattg cagacagtgt tttgcacatc 3480  
 atgtatctgt tttgtcccat aatatgcttt ttactccctg atcccagttt ctgctgttga 3540  
 55 ctcttccatt cagtttttatt tattgtgtgt tctcacagt acaccatttg ttctttctg 3600  
 caacaacctt tccagctact tttgccaaat tctatgttc tctccttca aaactctctc 3660  
 ctttgcagtt cctcttcac tgtgtagctg ctcttttctc tcttaactta ccattcctat 3720  
 agtactttat gcatctctgc ttagttctat tagttttttg gccttgctct tctccttgat 3780  
 tttaaaattc cttctatagc tagagctttt ctttctttca ttctctctc ctgcagttt 3840  
 60 ttgcatacat cagaagctag gtacataagt taaatgatt agagttggct gtatttagat 3900  
 ttatcacttt ttaatagggt gagcttgaga gttttctttc tttctgtttt tttttttgt 3960  
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tgactaattt cacatgctct aaaaacctc 4020  
 aaaggtgatt atttttctcc tggaaactcc aggtccattc tgtttaaate cctaagaatg 4080  
 65 tcagaattaa aataacaggg ctatcccgtat attggaataa tttctttttt caggatgcta 4140

ES 2 735 144 T3

tagtcaatth agtaagtgac caccaaattg ttatthtgac taacaaagct caaaacacga 4200  
 taagthtact cctccatctc agtaataaaa attaagctgt aatcaacctt ctaggtthtct 4260  
 cttgtcttaa aatgggtatt caaaaatggg gatctgtggg gtatgtatgg aaacacatac 4320  
 5 tccttaatth acctgttggt ggaaactgga gaaatgattg tcgggcaacc gthtatttht 4380  
 tattgtatth tatttggttg agggattht ttataaacag thttacttgt gtcataatth 4440  
 aaaattacta actgccatca cctgctgggg tcctthtgta ggtcattthc agtgactaat 4500  
 agggataatc caggttaactt tgaagagatg agcagtgagt gaccaggcag thtttctgcc 4560  
 thtagctthg acagthtcta attaagatca ttgaagacca gctthtctcat aaatthtctc 4620  
 10 thttgaaaaa aagaaagcat ttgtactaag ctctctgta agacaacatc ttaaatctta 4680  
 aaagtgttgat tatcatgact ggtgagagaa gaaaacatth tgthtttatt aaatggagca 4740  
 thattttacaa aaagccattg ttgagaatta gatcccacat cgtataaata tctattaacc 4800  
 attctaaata aagagaactc cagtgttgct atgtgcaaga tcctctcttg gagctthtth 4860  
 gcatagcaat taaaggtgtg ctatthgtca gtagccatth thttgcagtg atthgaagac 4920  
 15 caaagthgtt thacagctgt gthaccgtha aaggtthtth thtttatatg thttaaatca 4980  
 atthtactact gthttaaagct ttgaatatct gcaatctthg ccaaggthct thtttattta 5040  
 aaaaaaaaca thaactthgta aatattacc tgtaatatta tataactta ataaaacatt 5100  
 thaaagctatt thgttgggct atthtctattg ctgctacagc agaccacaag cacatthtctg 5160  
 20 aaaaatthaa thtattaatg thttthtaag ttgcttatat tctaggthaac aatgthaaaga 5220  
 atgattthaa atattaatta tgaatthtth gagtataata cccaataagc thtttaattg 5280  
 agcagagtht thaattaaaag thtttaaatca gtc 5313

<210> 5  
 <211> 323  
 25 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 5

30  
  
 35  
  
 40  
  
 45  
  
 50  
  
 55  
  
 60  
  
 65

ES 2 735 144 T3

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe  
 20 25 30  
 5 Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala  
 35 40 45  
 Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp  
 50 55 60  
 10 Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp  
 65 70 75 80  
 Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala  
 85 90 95  
 15 Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr  
 100 105 110  
 Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu  
 115 120 125  
 Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu  
 130 135 140  
 20 Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe  
 145 150 155 160  
 Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr  
 165 170 175  
 25 Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val  
 180 185 190  
 Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr  
 195 200 205  
 30 Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His  
 210 215 220  
 Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala  
 225 230 235 240  
 Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu  
 245 250 255  
 35 Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile  
 260 265 270  
 Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr  
 275 280 285  
 40 Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys  
 290 295 300  
  
 Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met  
 305 310 315 320  
 45 Asn Asp Glu

<210> 6  
 <211> 305  
 <212> PRT  
 50 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 6

55

60

65

ES 2 735 144 T3

5 Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly  
 1 5 10  
 Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe  
 20 25 30  
 10 Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala  
 35 40 45  
 Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp  
 50 55 60  
 15 Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp  
 65 70 75 80  
 Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala  
 85 90 95  
 Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr  
 100 105 110  
 20 Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu  
 115 120 125  
 Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu  
 130 135 140  
 25 Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe  
 145 150 155 160  
 Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr  
 165 170 175  
 30 Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val  
 180 185 190  
 Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr  
 195 200 205  
 Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His  
 210 215 220  
 35 Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala  
 225 230 235 240  
 Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu  
 245 250 255  
 Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile  
 260 265 270  
 Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr  
 275 280 285  
 40 Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Asn  
 290 295 300  
 Asn  
 305

45 <210> 7  
 <211> 312  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50 <400> 7

55 Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly  
 1 5 10  
 Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe

60

65

ES 2 735 144 T3

				20					25				30			
	Cys	Asn	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Pro	Cys	Phe	Val	Thr	Asn	Met	Glu	Ala
			35					40					45			
5	Gln	Asn	Thr	Thr	Glu	Val	Tyr	Val	Lys	Trp	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Asp
		50					55					60				
	Ile	Tyr	Thr	Phe	Asp	Gly	Ala	Leu	Asn	Lys	Ser	Thr	Val	Pro	Thr	Asp
	65					70					75					80
	Phe	Ser	Ser	Ala	Lys	Ile	Glu	Val	Ser	Gln	Leu	Leu	Lys	Gly	Asp	Ala
					85					90					95	
10	Ser	Leu	Lys	Met	Asp	Lys	Ser	Asp	Ala	Val	Ser	His	Thr	Gly	Asn	Tyr
				100					105					110		
	Thr	Cys	Glu	Val	Thr	Glu	Leu	Thr	Arg	Glu	Gly	Glu	Thr	Ile	Ile	Glu
			115					120					125			
15	Leu	Lys	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Trp	Phe	Ser	Pro	Asn	Glu	Asn	Ile	Leu
		130						135				140				
	Ile	Val	Ile	Phe	Pro	Ile	Phe	Ala	Ile	Leu	Leu	Phe	Trp	Gly	Gln	Phe
	145					150						155				160
	Gly	Ile	Lys	Thr	Leu	Lys	Tyr	Arg	Ser	Gly	Gly	Met	Asp	Glu	Lys	Thr
20						165				170					175	
	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	Leu	Val	Ile	Thr	Val	Ile	Val	Ile	Val
					180				185					190		
	Gly	Ala	Ile	Leu	Phe	Val	Pro	Gly	Glu	Tyr	Ser	Leu	Lys	Asn	Ala	Thr
			195					200					205			
25	Gly	Leu	Gly	Leu	Ile	Val	Thr	Ser	Thr	Gly	Ile	Leu	Ile	Leu	Leu	His
		210					215					220				
	Tyr	Tyr	Val	Phe	Ser	Thr	Ala	Ile	Gly	Leu	Thr	Ser	Phe	Val	Ile	Ala
	225					230						235				240
30	Ile	Leu	Val	Ile	Gln	Val	Ile	Ala	Tyr	Ile	Leu	Ala	Val	Val	Gly	Leu
					245					250					255	
	Ser	Leu	Cys	Ile	Ala	Ala	Cys	Ile	Pro	Met	His	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile
				260					265					270		
	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	Leu	Ala	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Val	Tyr
35			275					280					285			
	Met	Lys	Phe	Val	Ala	Ser	Asn	Gln	Lys	Thr	Ile	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys
		290					295					300				
	Ala	Val	Glu	Glu	Pro	Leu	Asn	Glu								
40							310									

<210> 8  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador directo de ARN 18S

<400> 8  
 ttgacggaag ggcaccacca g 21

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador inverso de ARN 18S

<400> 9  
 gcaccaccac ccacggaatc g 21

<210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo de beta-actina  
 5  
 <400> 10  
 ttcttcttg ggtatggaat 20  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de beta-actina  
 15  
 <400> 11  
 gagcaatgat ctgacccctc 20  
 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Cebador directo de CD47  
 25  
 <400> 12  
 aggccaagtc cagaagcatt c 21  
 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de CD47  
 35  
 <400> 13  
 aatcattctg ctgctcggtg c 21  
 <210> 14  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR 3' Neo  
 45  
 <400> 14  
 gcatcgatt gtctgagtag gtgtcattct attc 34  
 <210> 15  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR 5' IAP  
 55  
 <400> 15  
 tcacctgtt gttctgtac tacaagca 28  
 <210> 16  
 <211> 23  
 60  
 65

# ES 2 735 144 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> Cebador de PCR 3' IAP

<400> 16  
tgtcacttcg caagttagt tcc 23

10 <210> 17  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Cebador Directo 11F de PCR FLT3-ITD

<400> 17  
gcaatttagg tatgaaagcc agc 23

20 <210> 18  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Cebador Inverso 12R de PCR FLT3-ITD

<400> 18  
ctttcagcat tttgacggca acc 23

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

5     **1.** Una composición que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a CD47 en la superficie de células de leucemia e inhibe su interacción con el receptor de SIRP $\alpha$  en la superficie de las células fagocíticas, para su uso en el tratamiento de leucemia aumentando la fagocitosis de las células de leucemia en un sujeto humano, en donde dicho anticuerpo regula por incremento la fagocitosis de dichas células de leucemia inhibiendo la unión de CD47 en la superficie de las células de leucemia al receptor de SIRP $\alpha$  en la superficie de las células fagocíticas.

10    **2.** La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha leucemia es leucemia mielógena aguda (AML).

15    **3.** La composición para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

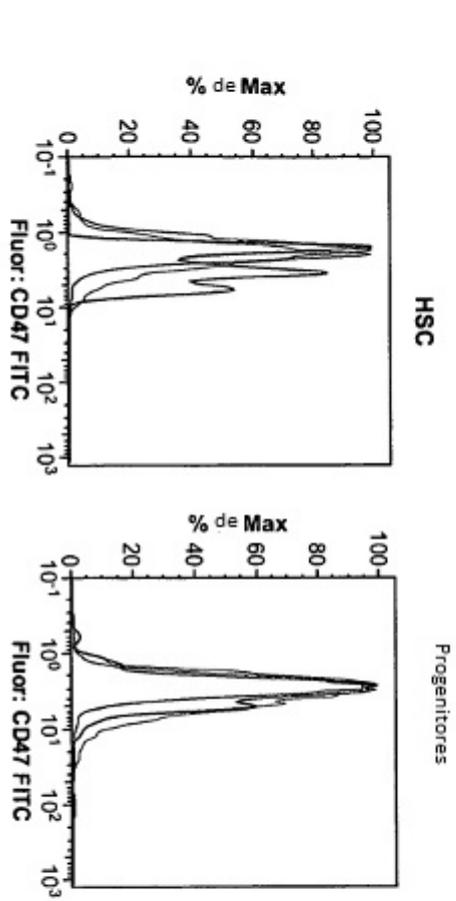


FIG. 1

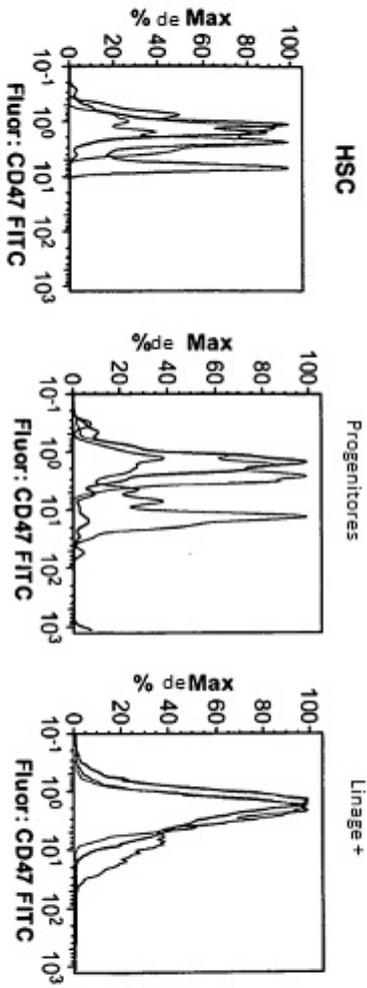
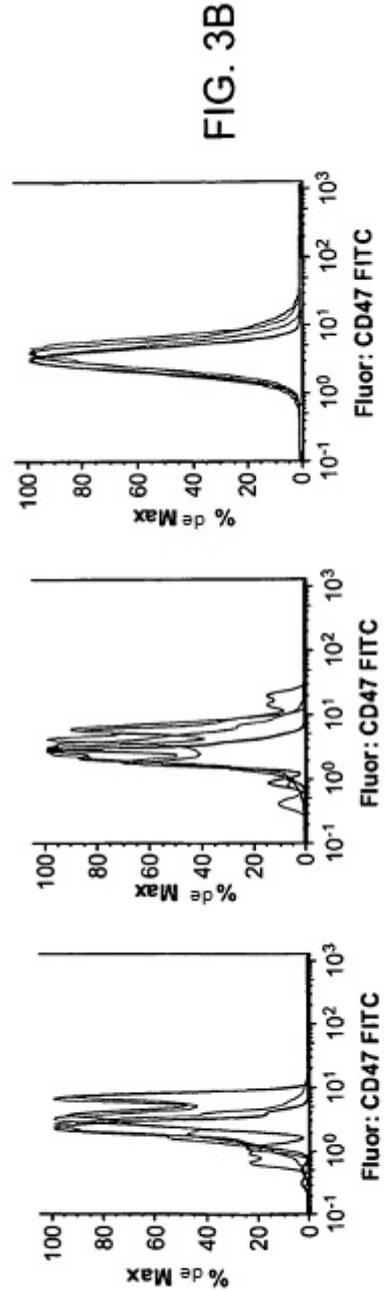
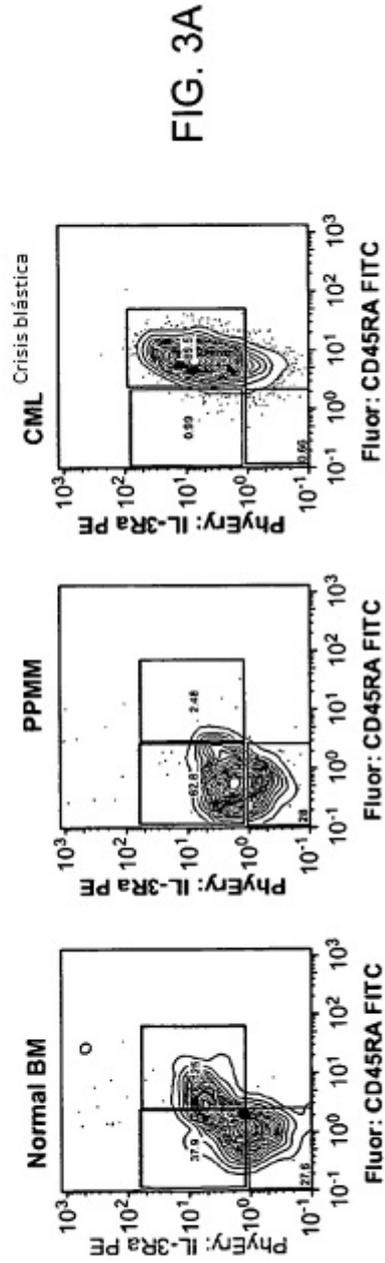


FIG. 2



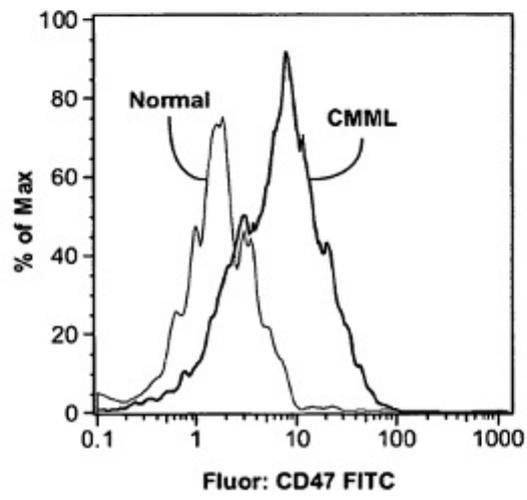


FIG. 4

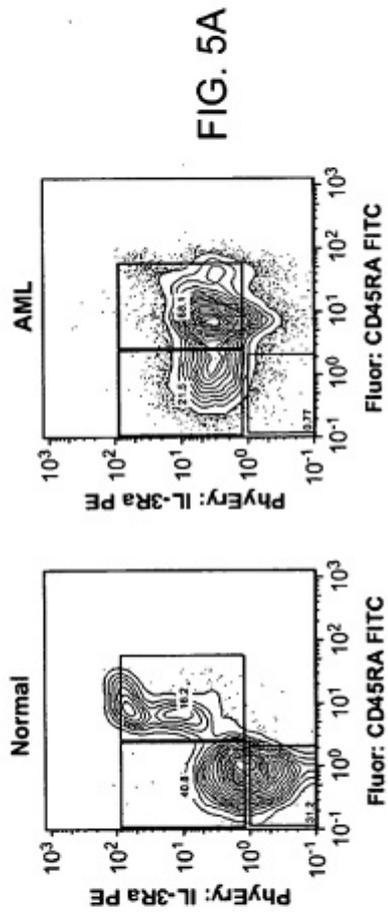


FIG. 5A

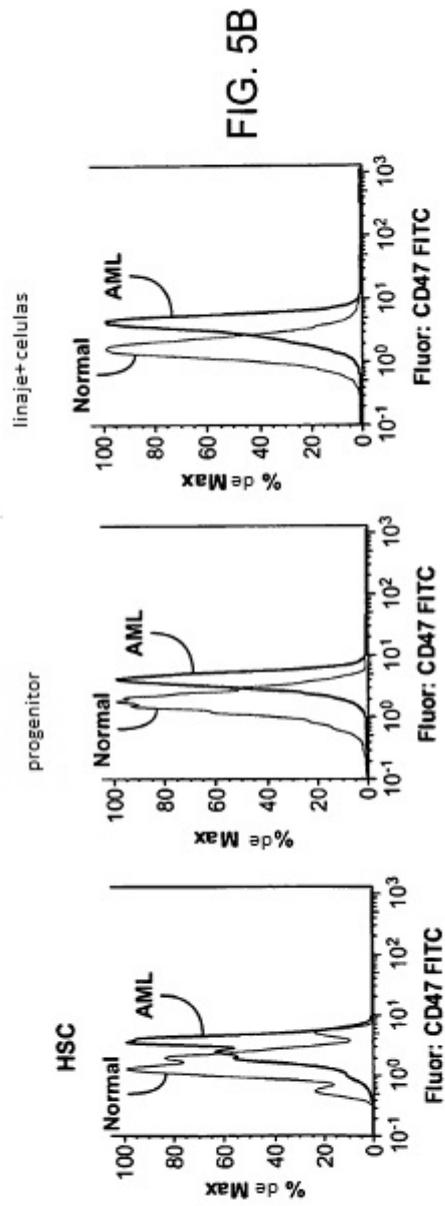


FIG. 5B

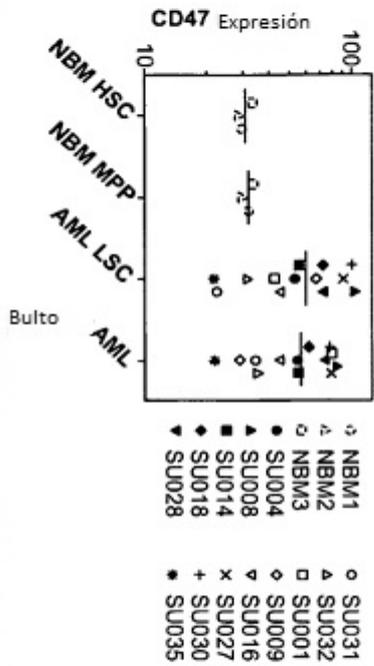


FIG. 6A

MUESTRA	EDAD	GÉNERO	Primario/ Secundario	Nuevo/ Reincidente	Citogenética	Fit-3ITD	%CD34	Clasificación WWHO	FAB
SU001	59	MUJER	Primario	Reincidente	Normal	Negativo	99	AML de otro modo no está especificado	M2
SU004	47	MUJER	Primario	Reincidente	Normal	Positivo	38	AML de otro modo no está especificado	M5
SU008	64	HOMBRE	Primario	Nuevo	Normal	Positivo	3	AML de otro modo no está especificado	M1
SU009	43	HOMBRE	Primario	Nuevo	Normal	Negativo	73	AML con displasia multilineal Sin antecedentes MDS	M2
SU014	59	HOMBRE	Primario	Nuevo	Normal	Positivo	18	AML de otro modo no está especificado	NS
SU016	59	HOMBRE	Primario	Nuevo	Normal	Positivo	10	AML con displasia multilineal Sin antecedentes MDS	NS
SU018	21	HOMBRE	Primario	Reincidente	Normal	Positivo	55	AML de otro modo no está especificado	M5
SU027	61	HOMBRE	Primario	Reincidente	Dejado de crecer	Desconocido	10	AML de otro modo no está especificado	M5
SU028	53	MUJER	Primario	Reincidente	Complejo	Positivo	50	AML de otro modo no está especificado	M5
SU030	53	MUJER	Primario	Nuevo	Normal	Positivo	40	AML con displasia multilineal Sin antecedentes MDS	M4
SU031	31	MUJER	Primario	Nuevo	Inv(16)(p13;q22)	Negativo	97	AML con inv(16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q22)	M4eo
SU032	47	HOMBRE	Primario	Nuevo	Normal	Negativo	68	AML de otro modo no está especificado	M5
SU035	46	HOMBRE	Primario	Nuevo	Dejado de crecer	Negativo	98	AML de otro modo no está especificado	M5

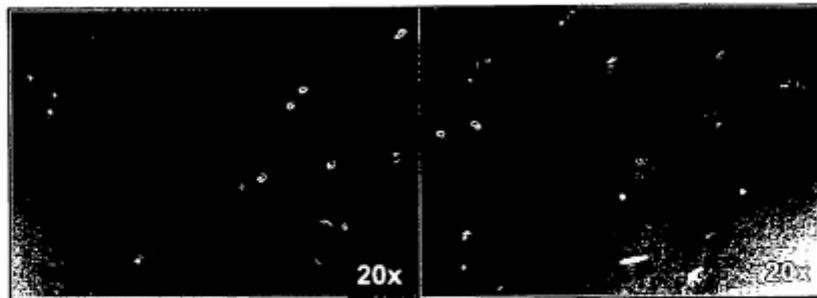


FIG. 7A

FIG. 7B

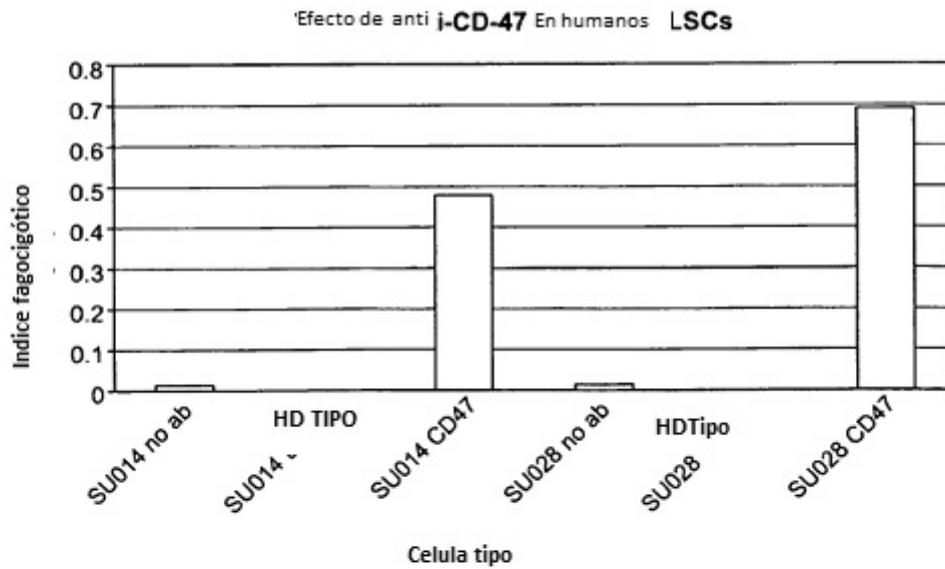


FIG. 7C

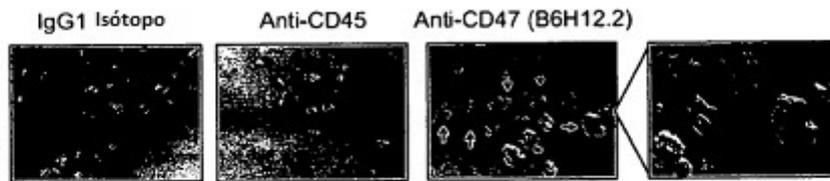


FIG. 8A

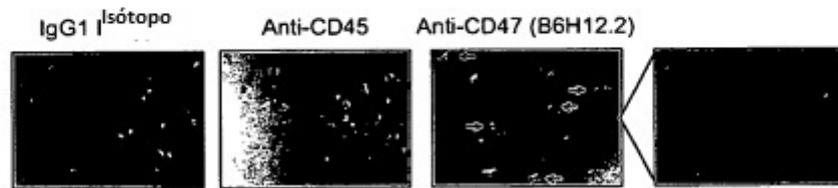


FIG. 8B

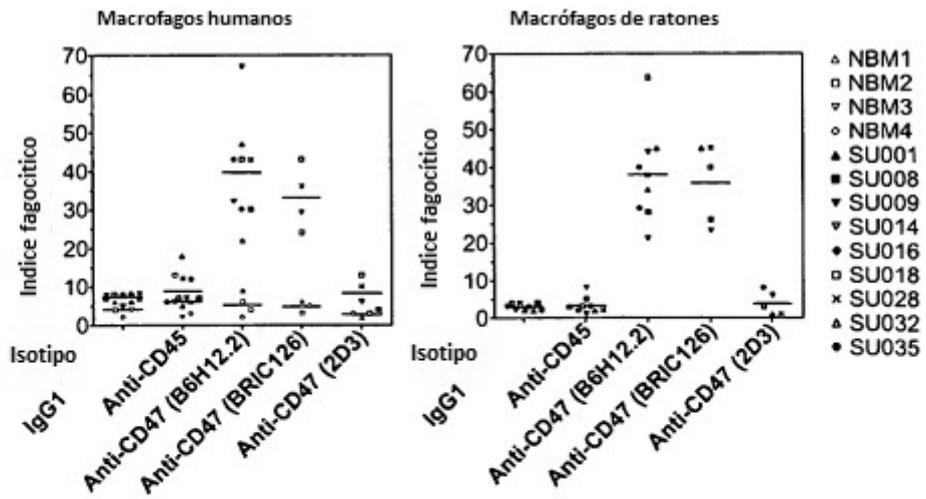


FIG. 8C

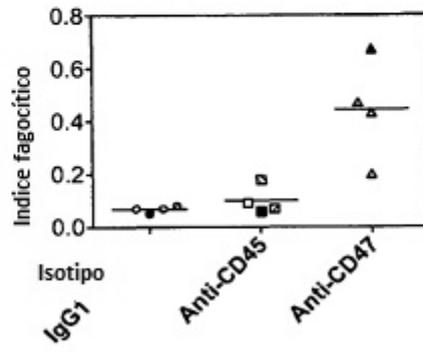


FIG. 9A

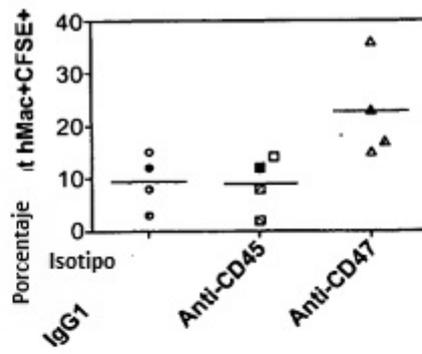
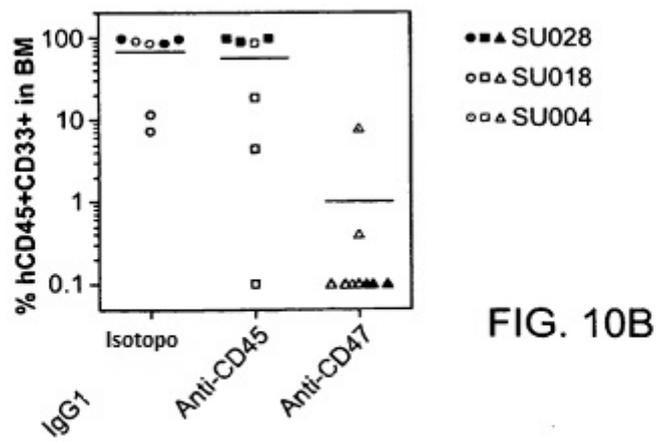
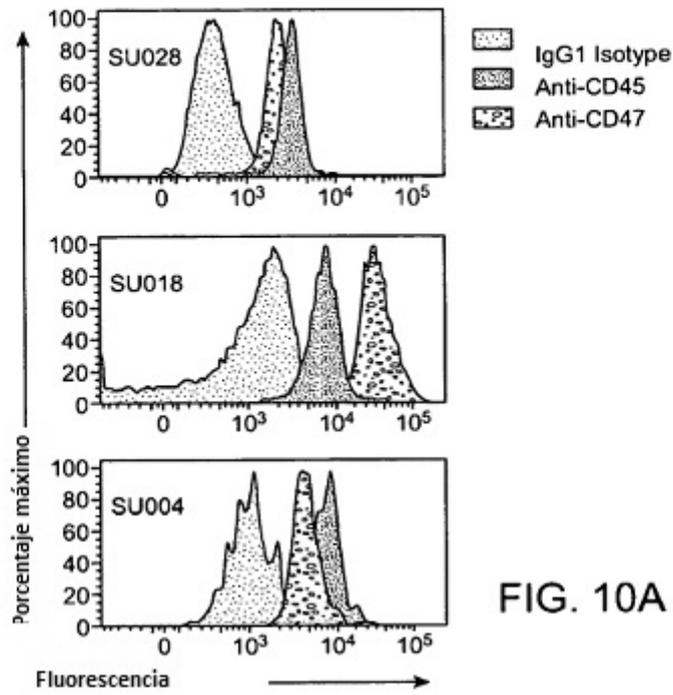


FIG. 9B



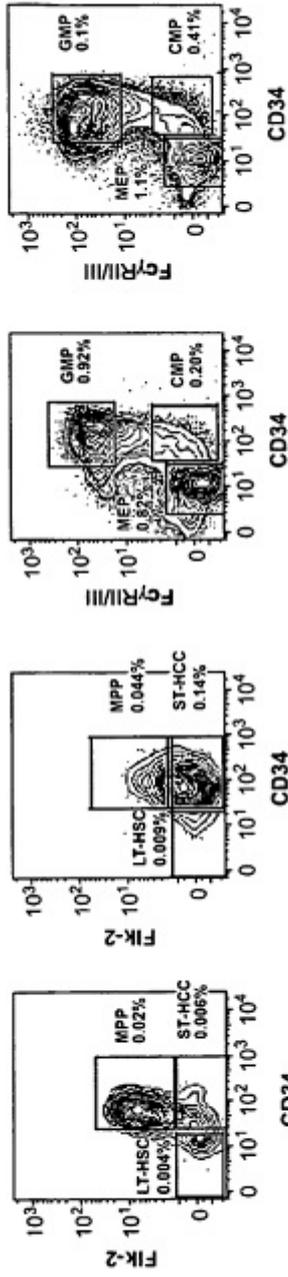


FIG. 11d

FIG. 11c

FIG. 11b

FIG. 11a

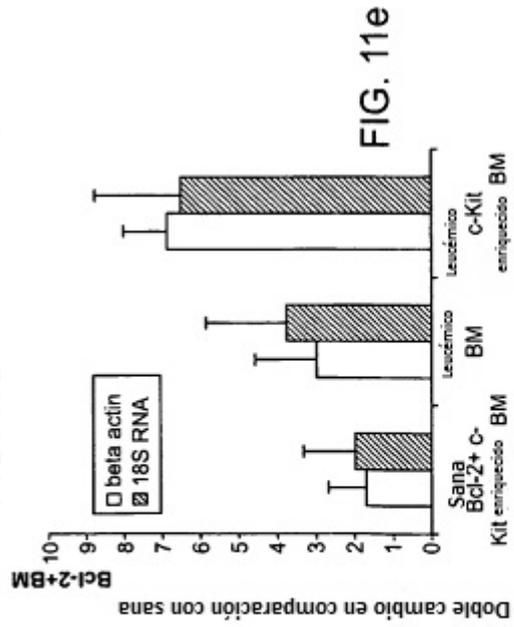
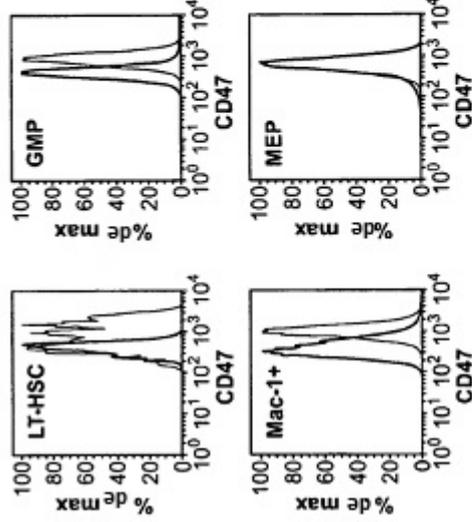


FIG. 11f



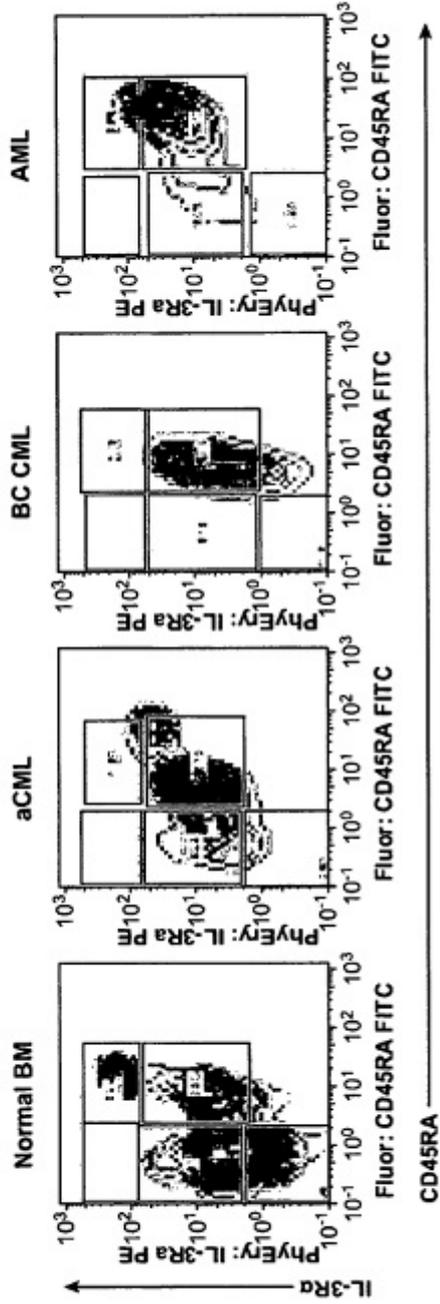


FIG. 12a

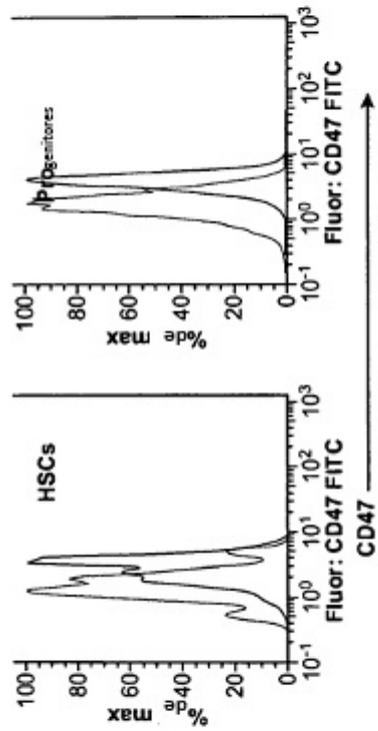


FIG. 12b

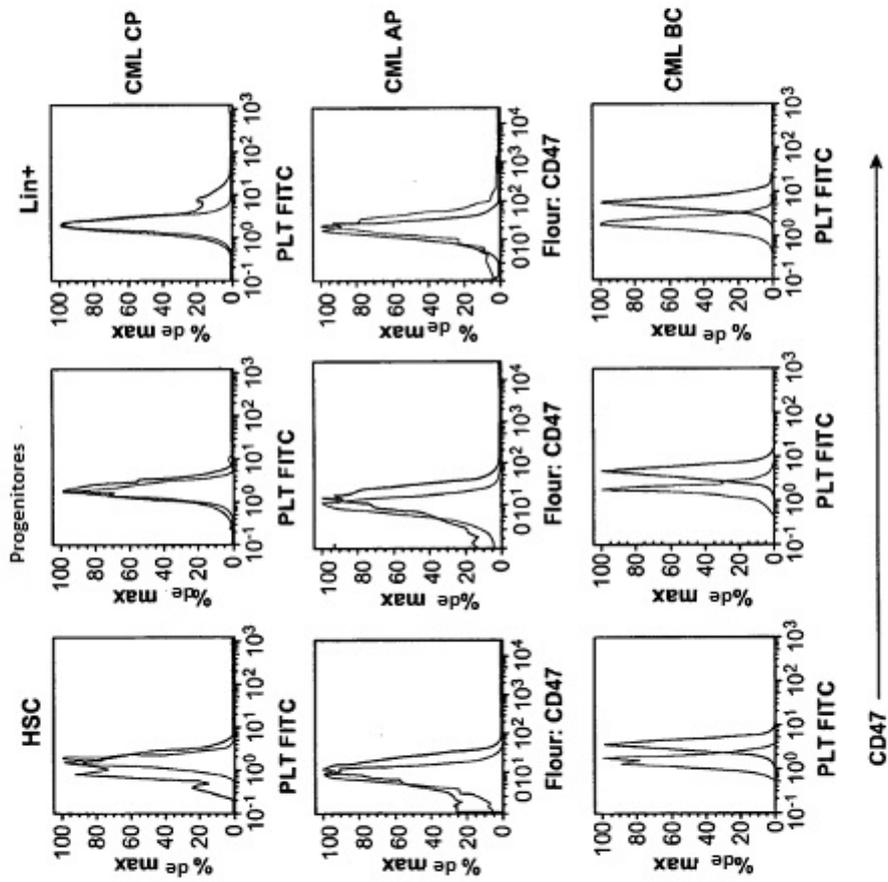


FIG. 12c

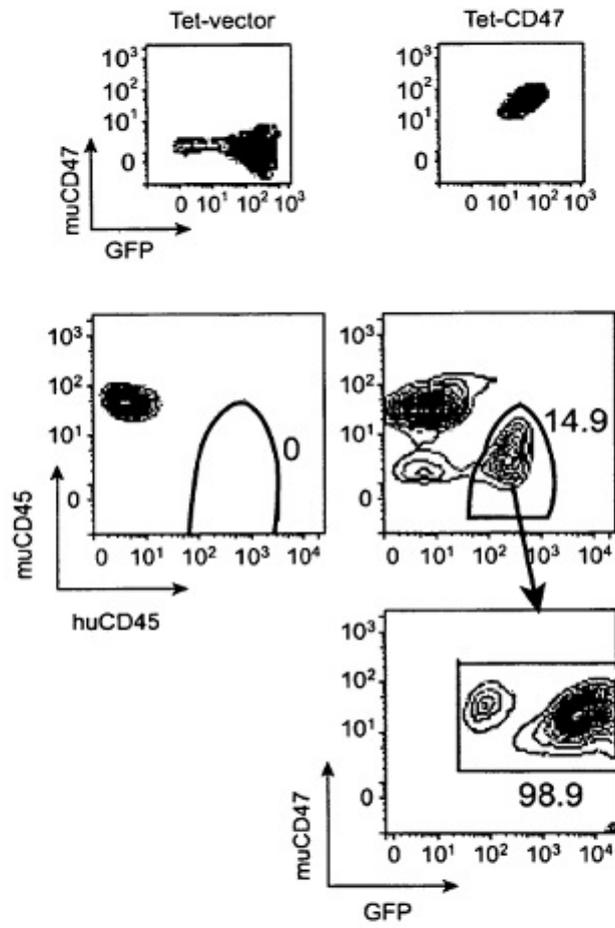


FIG. 13a

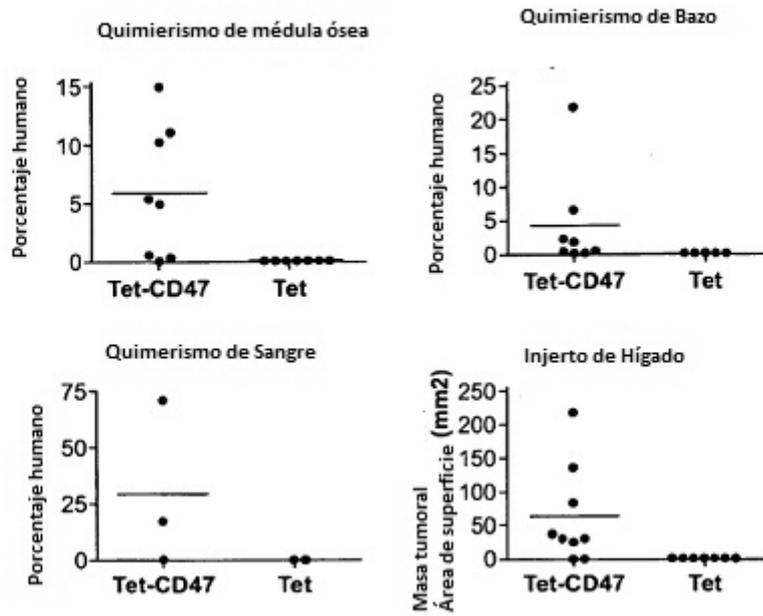


FIG. 13b

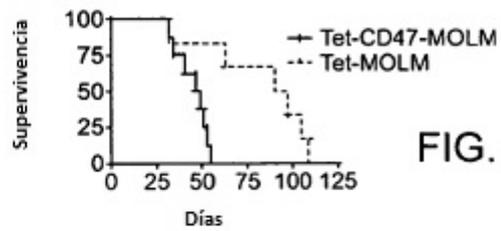


FIG. 13c

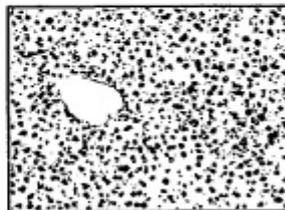


FIG. 13d

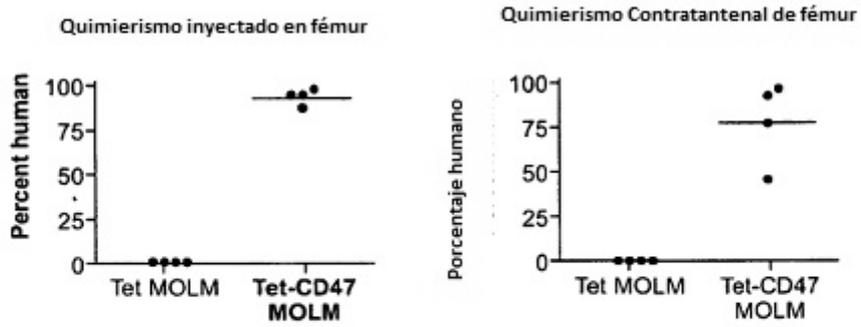


FIG. 13e

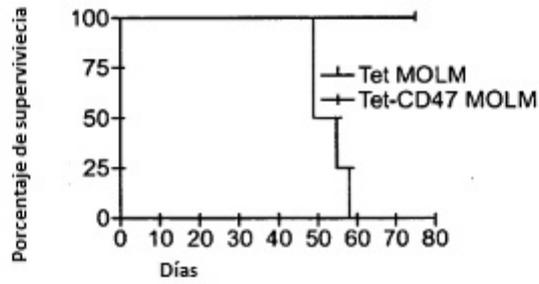


FIG. 13f



FIG. 13g

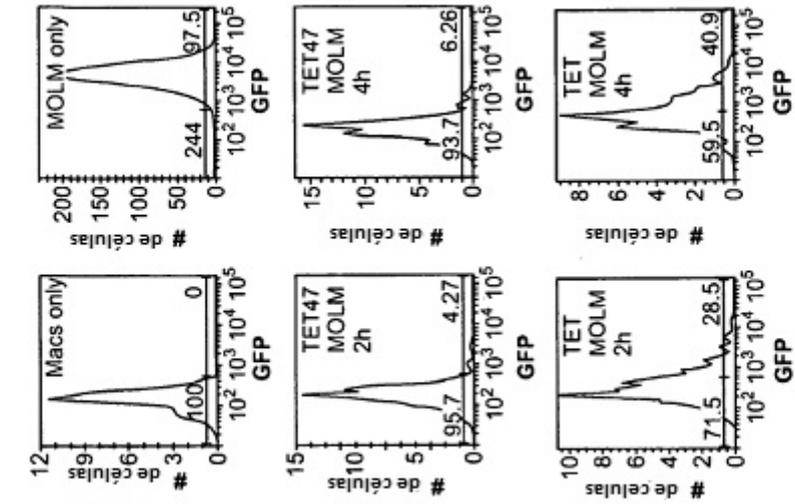


FIG. 14b

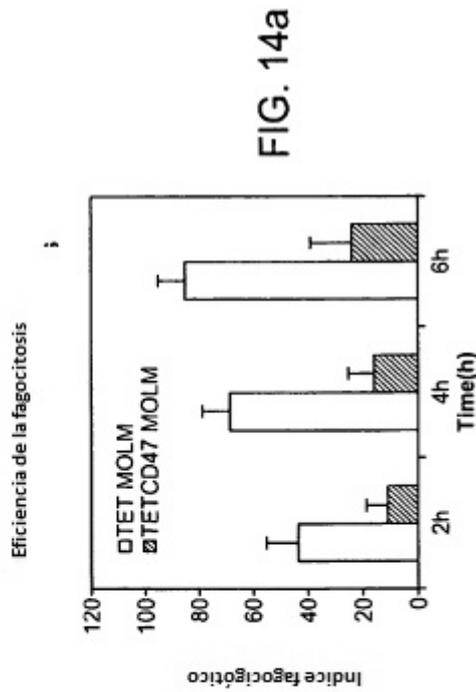


FIG. 14a

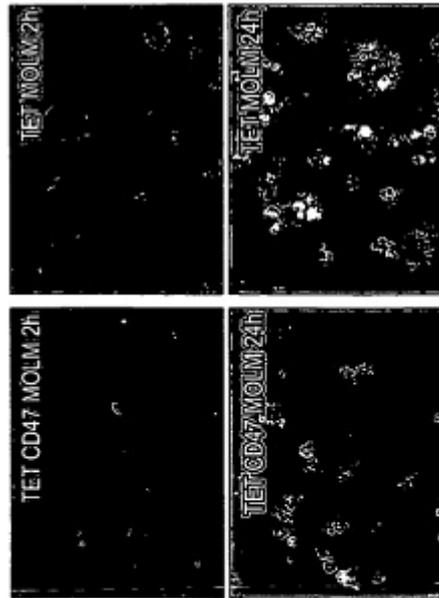


FIG. 14c

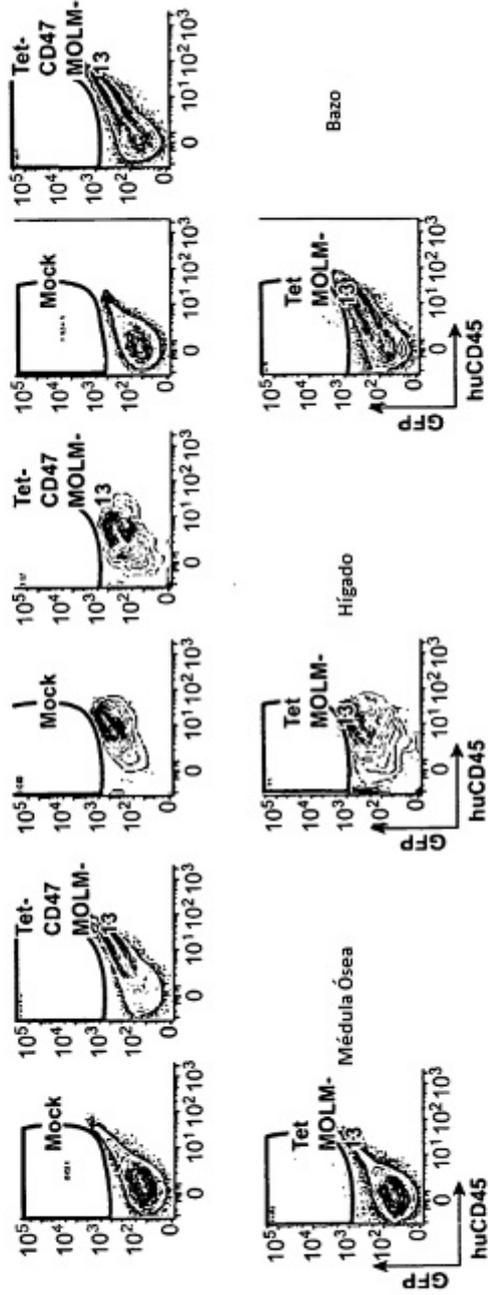


FIG. 14d

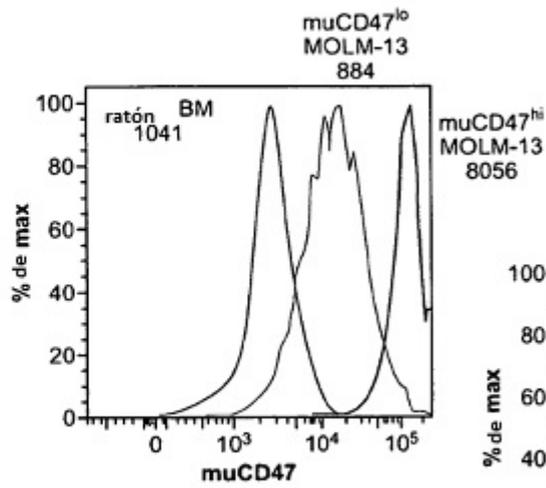


FIG. 15a

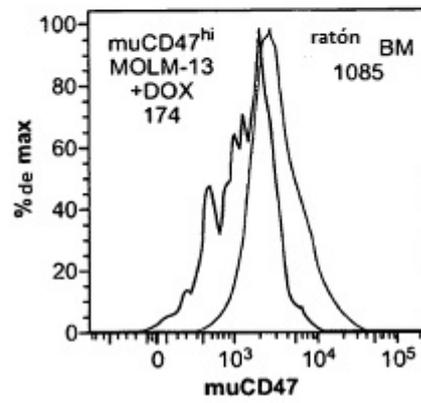


FIG. 15b

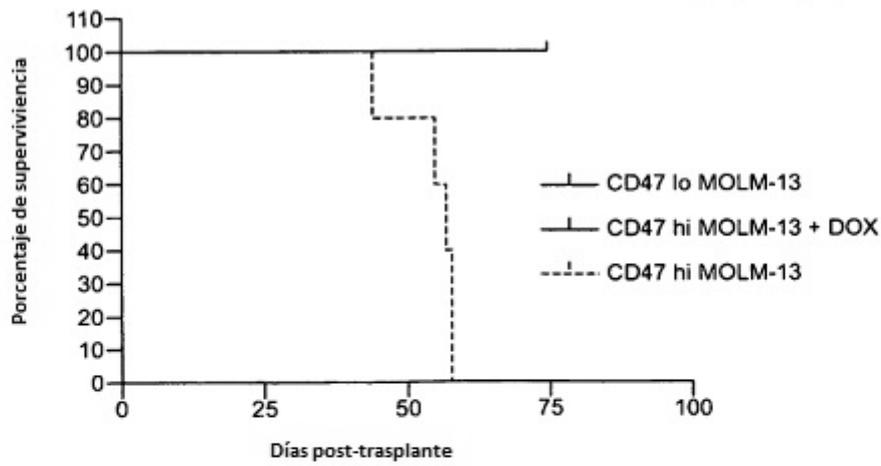


FIG. 15c



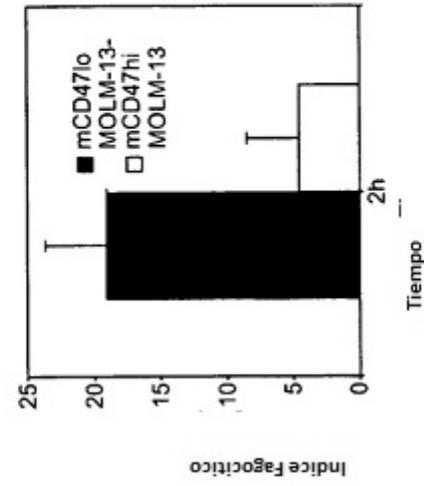


FIG. 15g

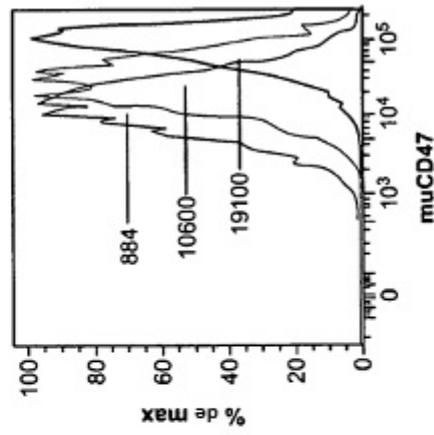


FIG. 15f

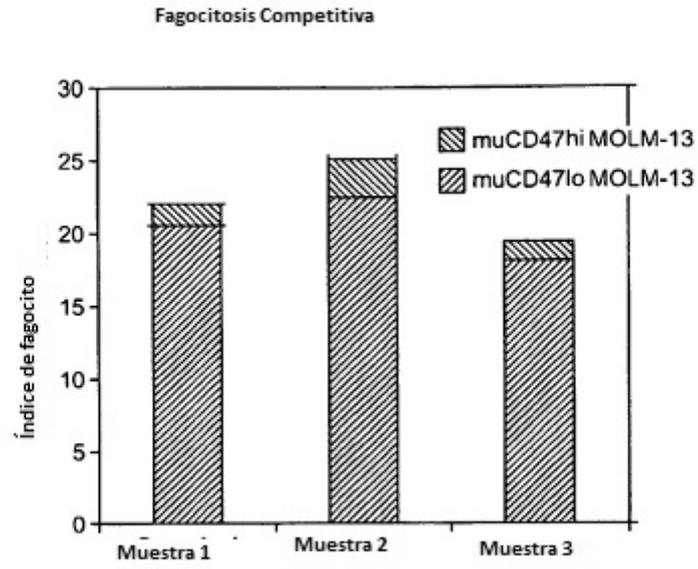


FIG. 15h

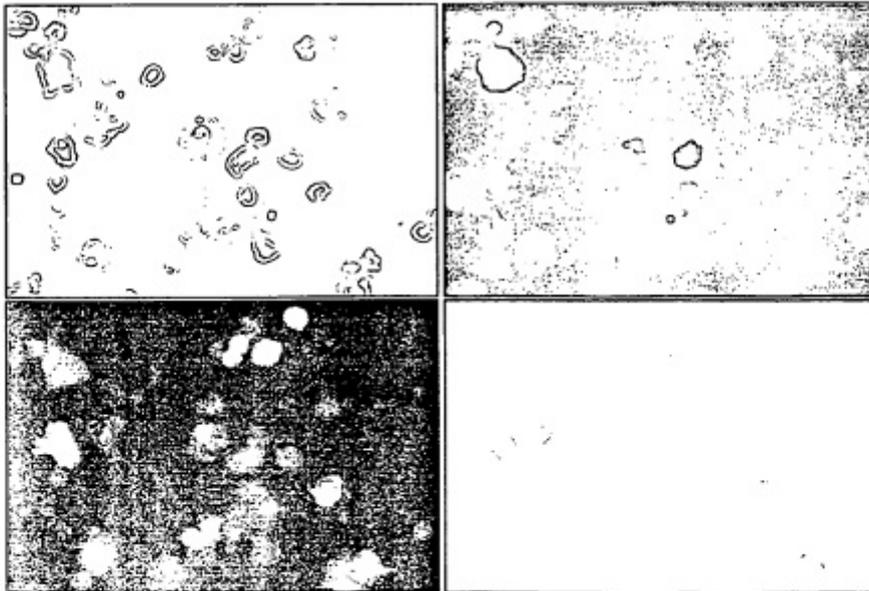


FIG. 15I

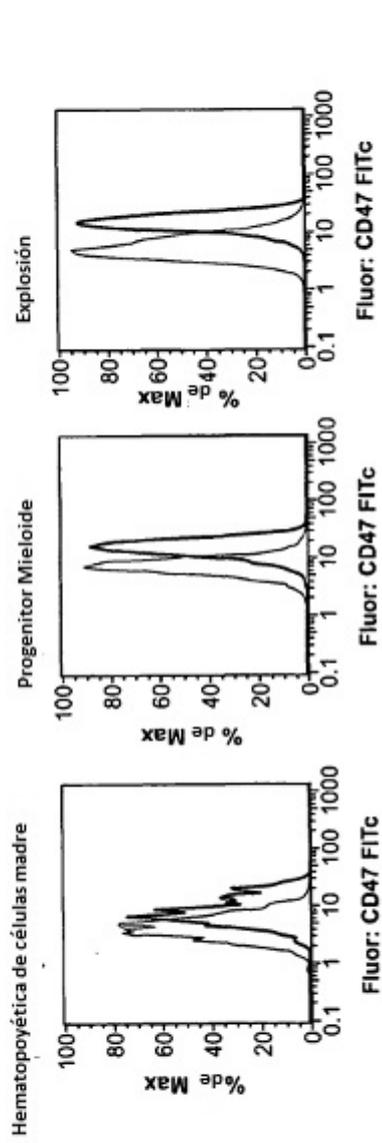


FIG. 16a

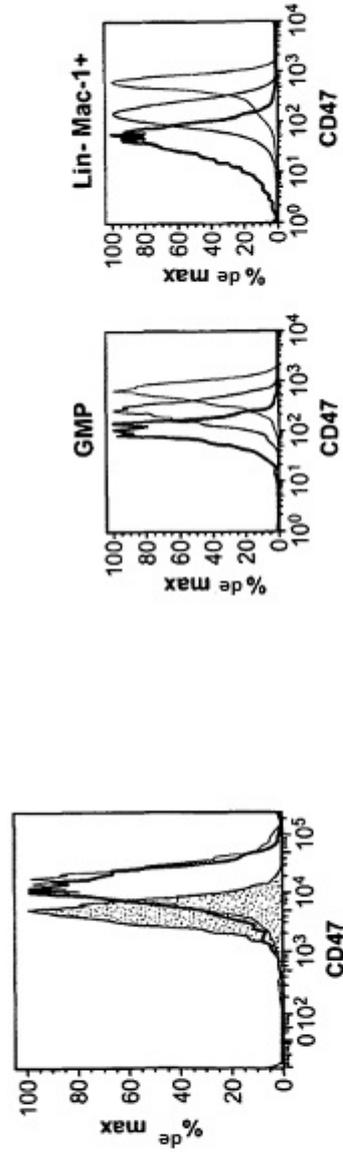


FIG. 16c

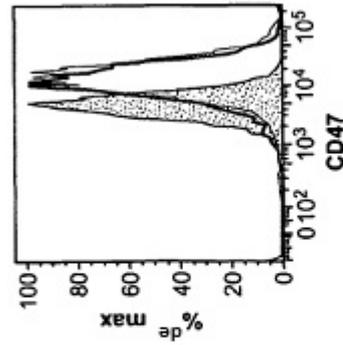


FIG. 16b

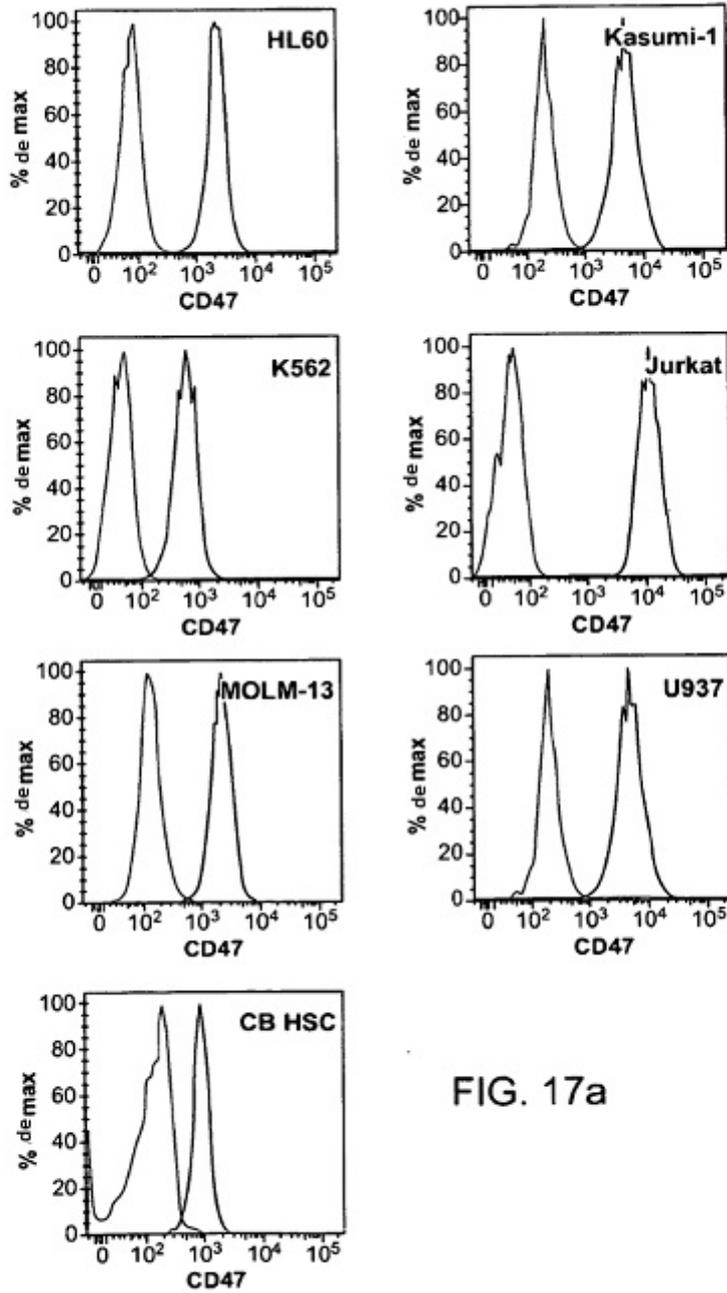


FIG. 17a

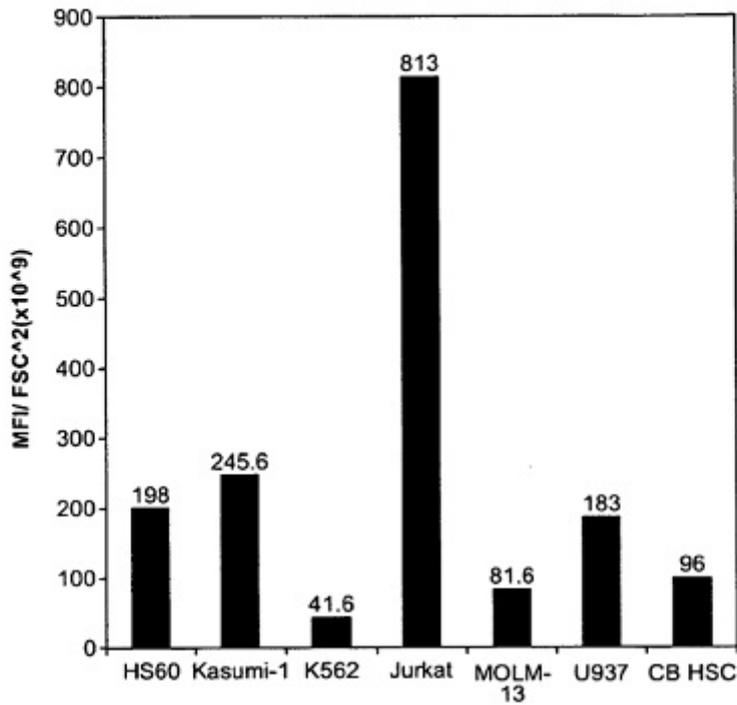


FIG. 17b

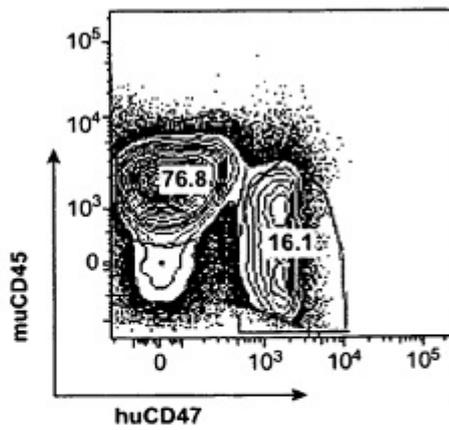


FIG. 17c

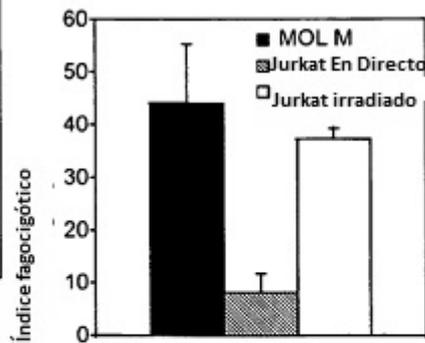


FIG. 17d

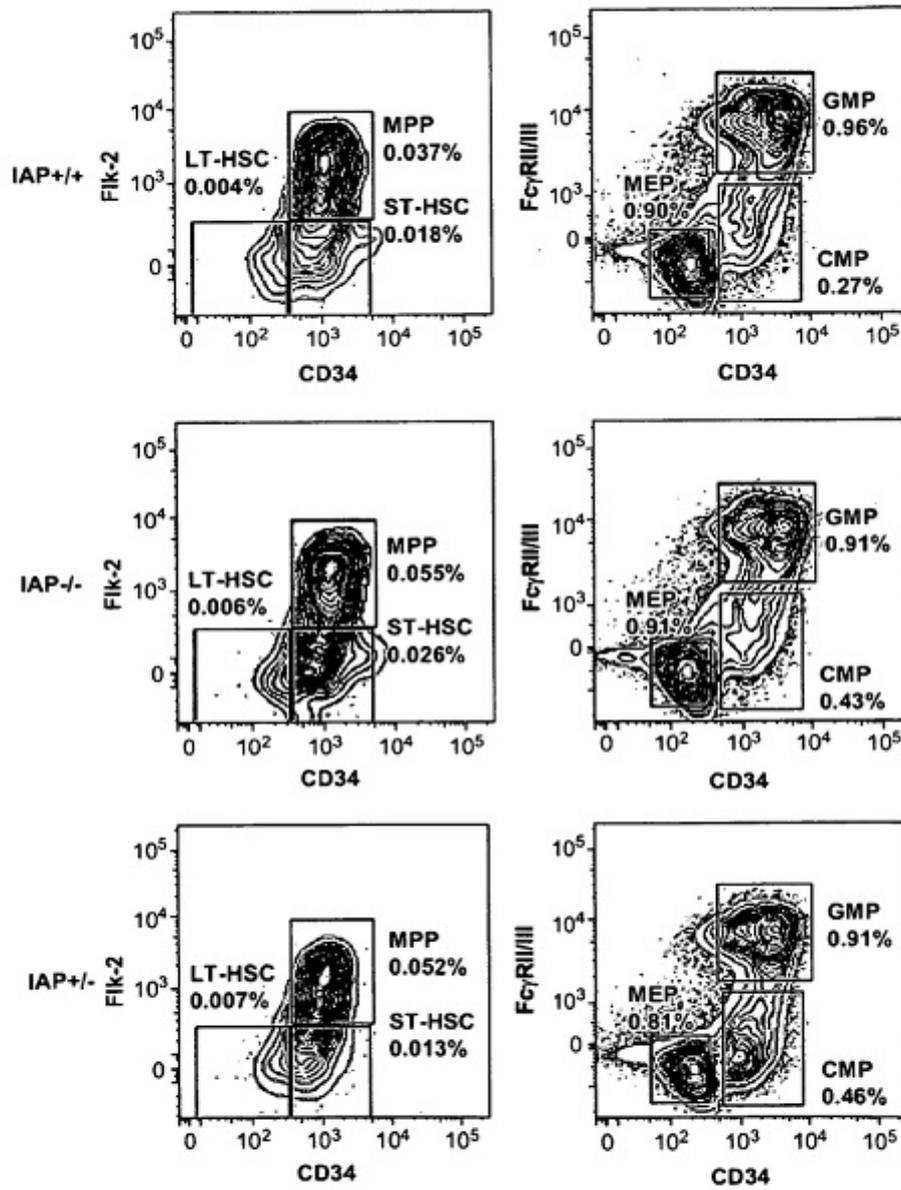


FIG. 18a

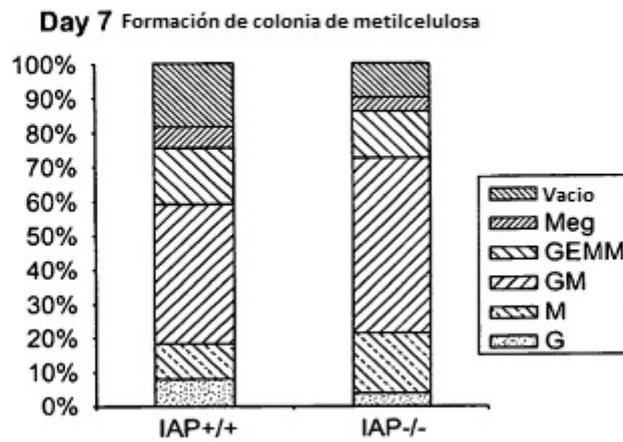


FIG. 18b

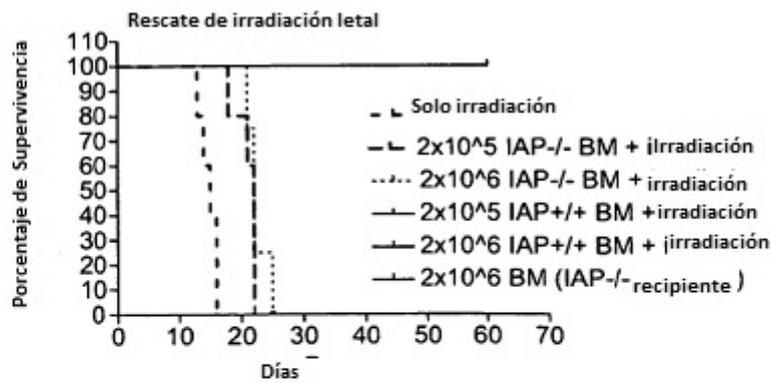


FIG. 18c

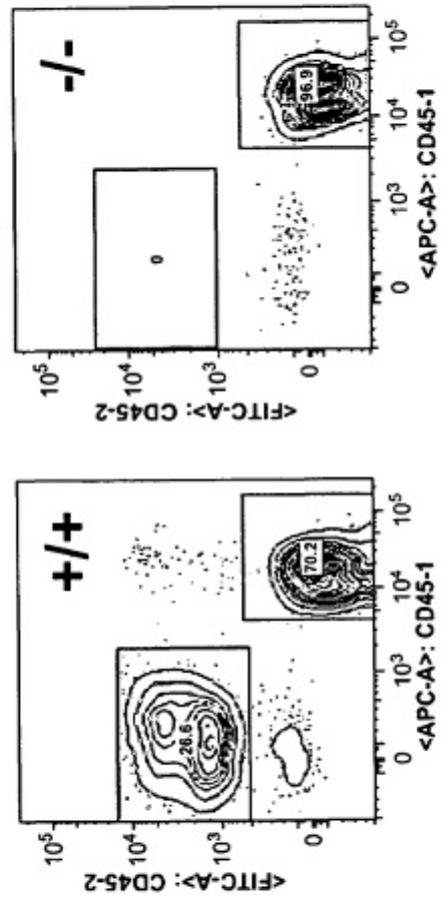


FIG. 18d

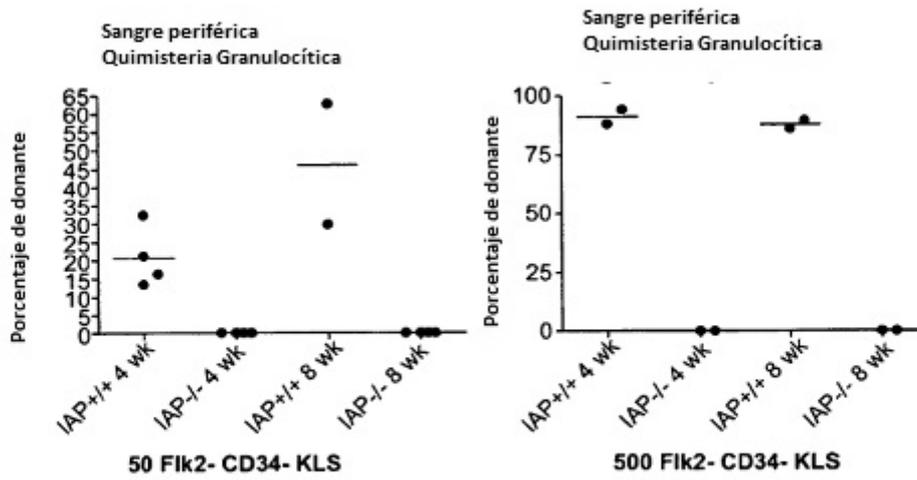


FIG. 18e

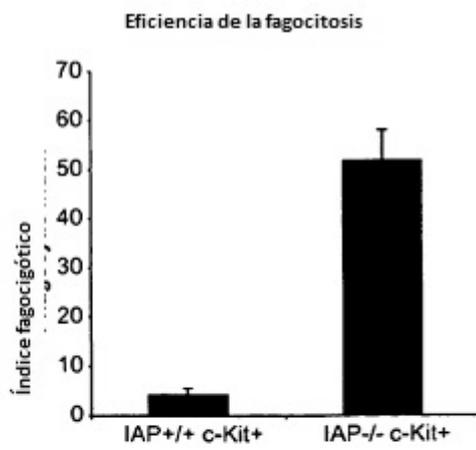


FIG. 18f

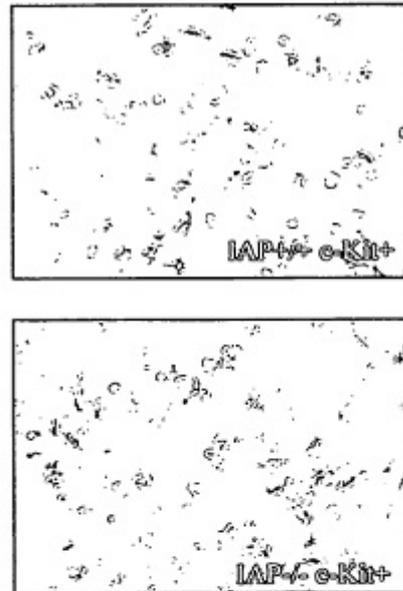


FIG. 18g

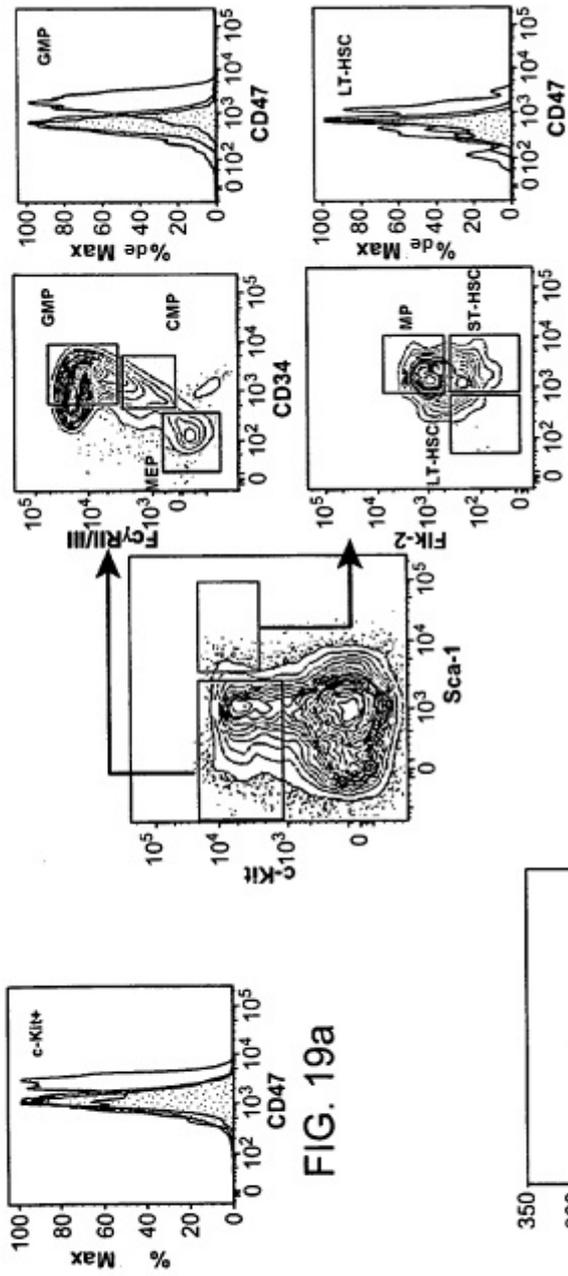


FIG. 19b

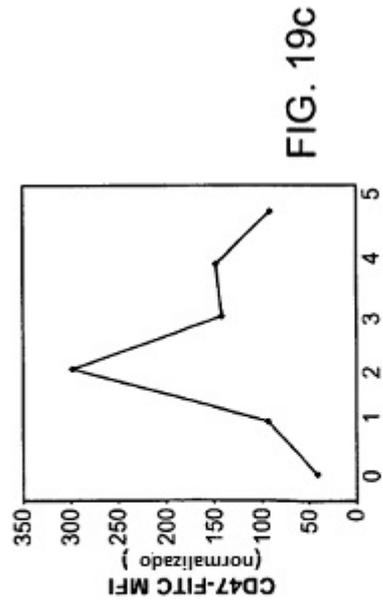


FIG. 19c

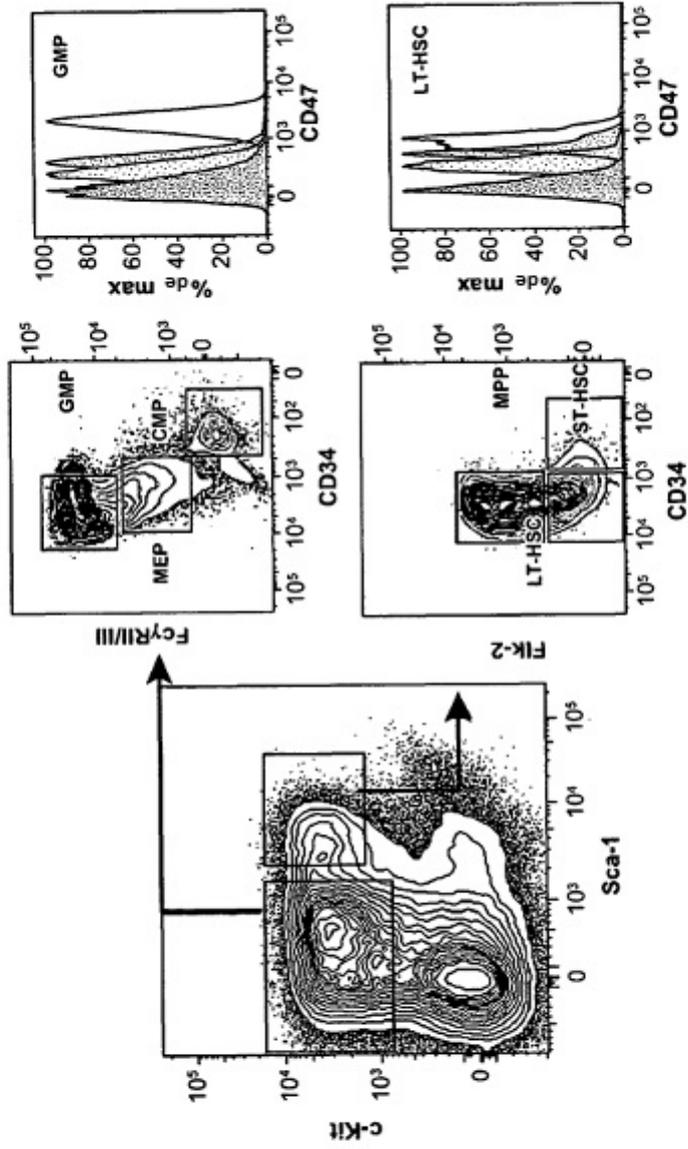


FIG. 19D

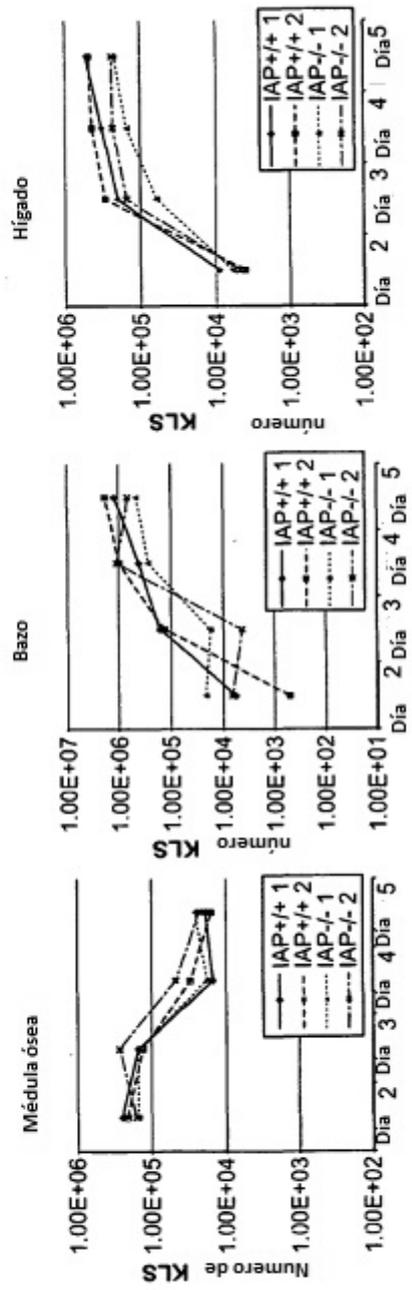


FIG. 19E

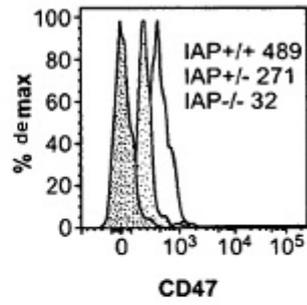


FIG. 20a

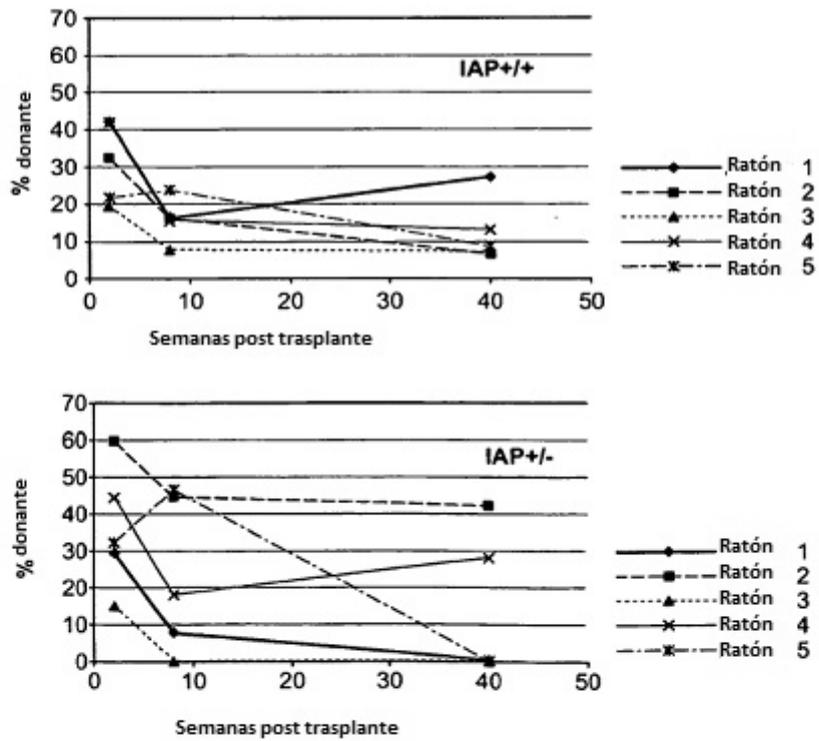


FIG. 20b

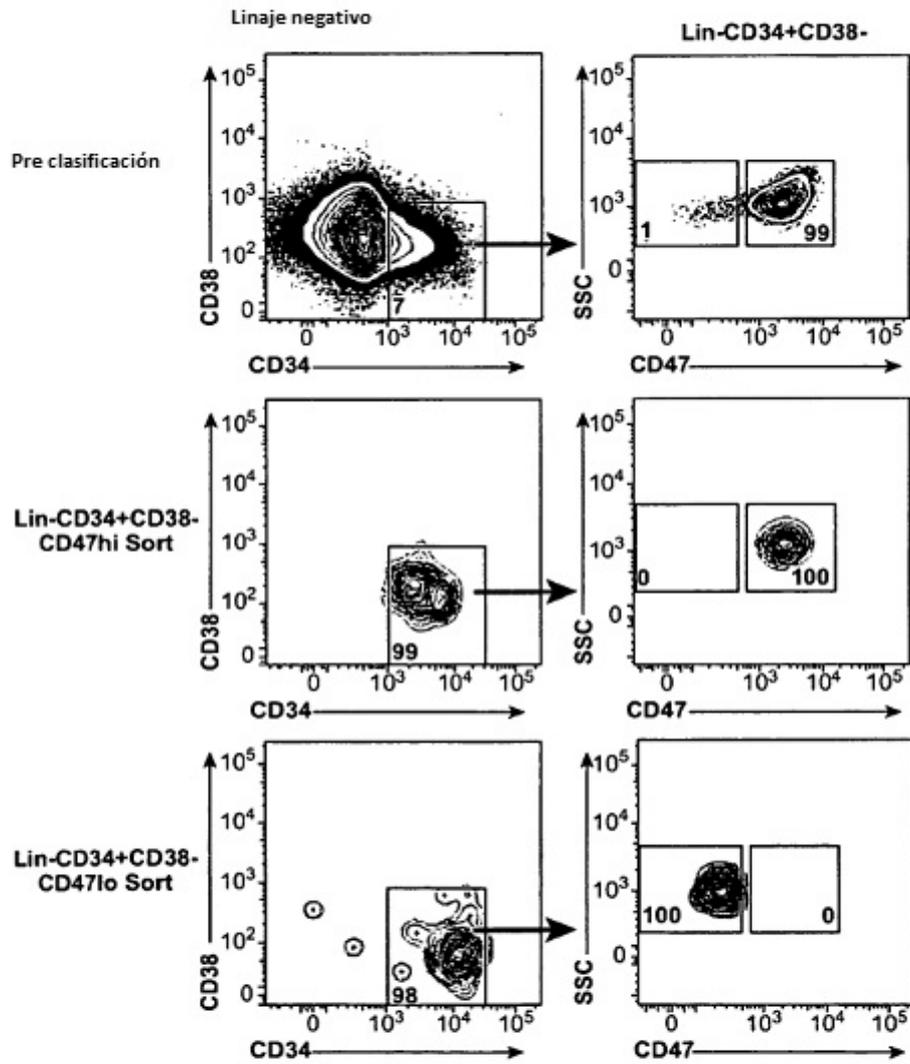


FIG. 21A

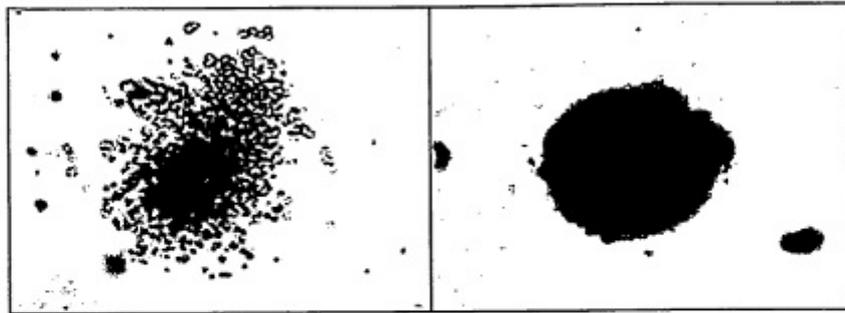


FIG. 21B

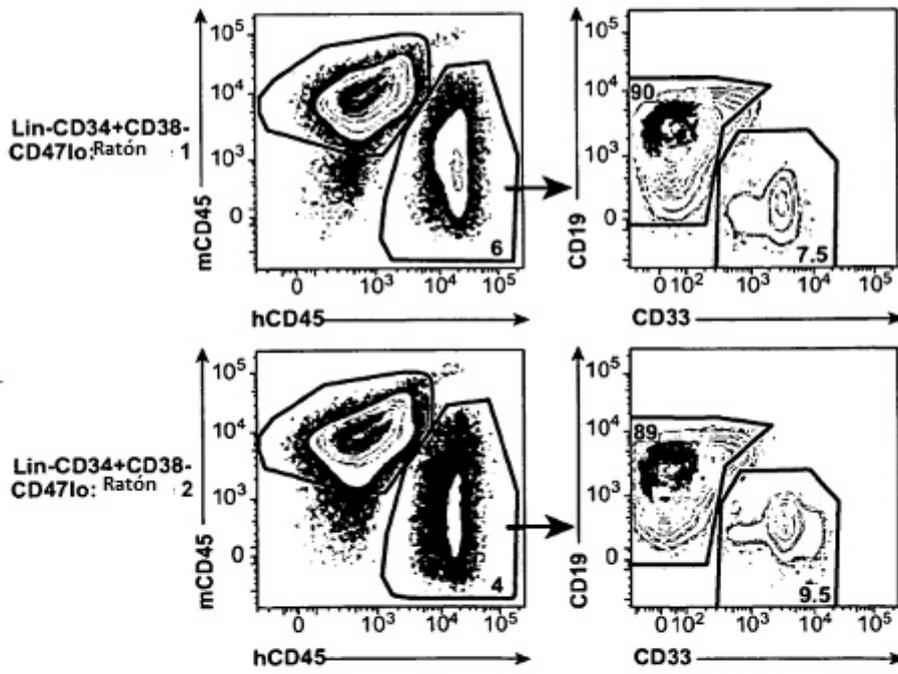


FIG. 21C

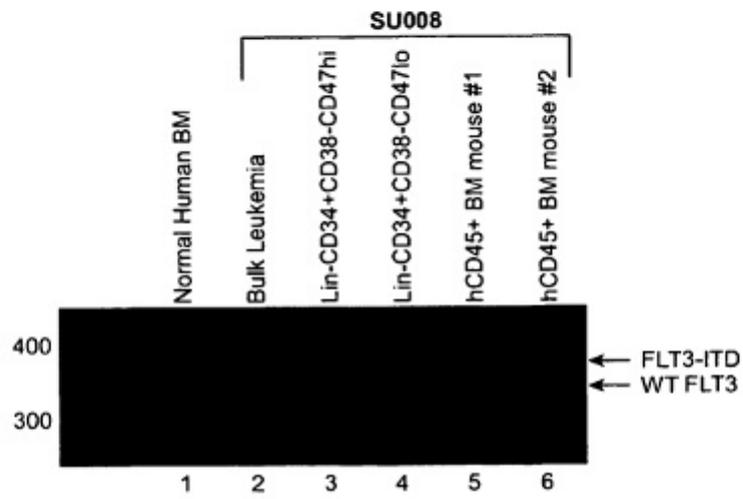
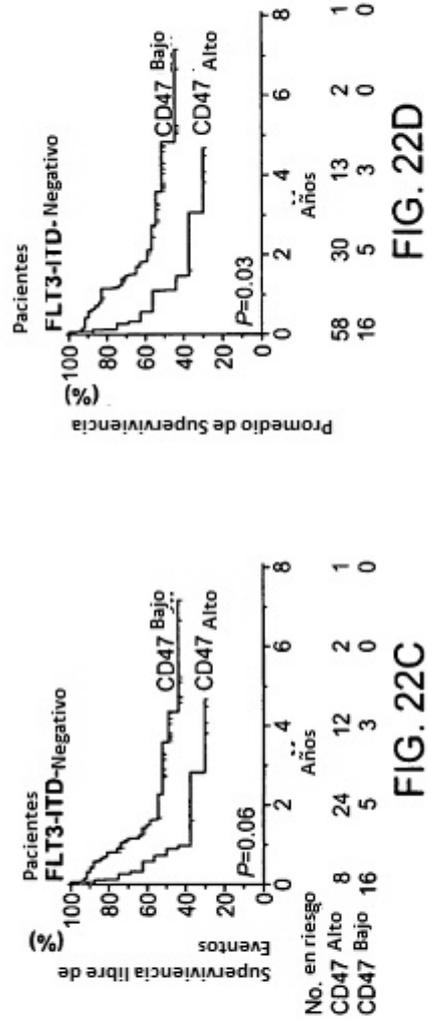
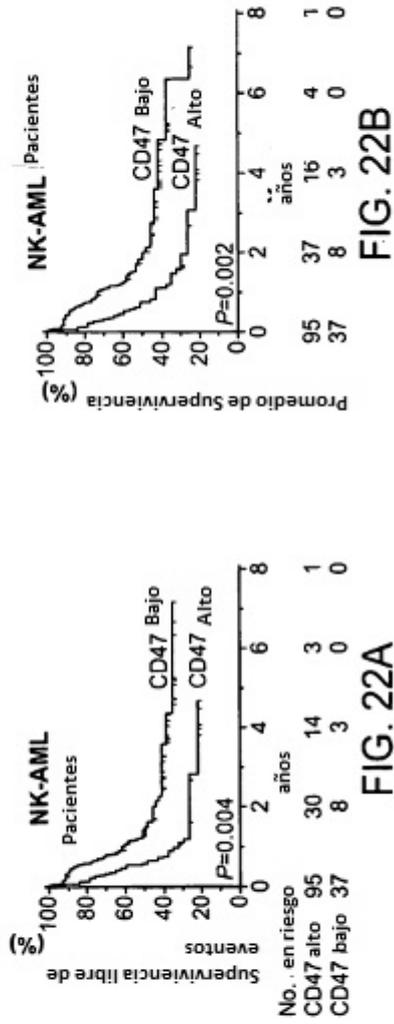


FIG. 21D



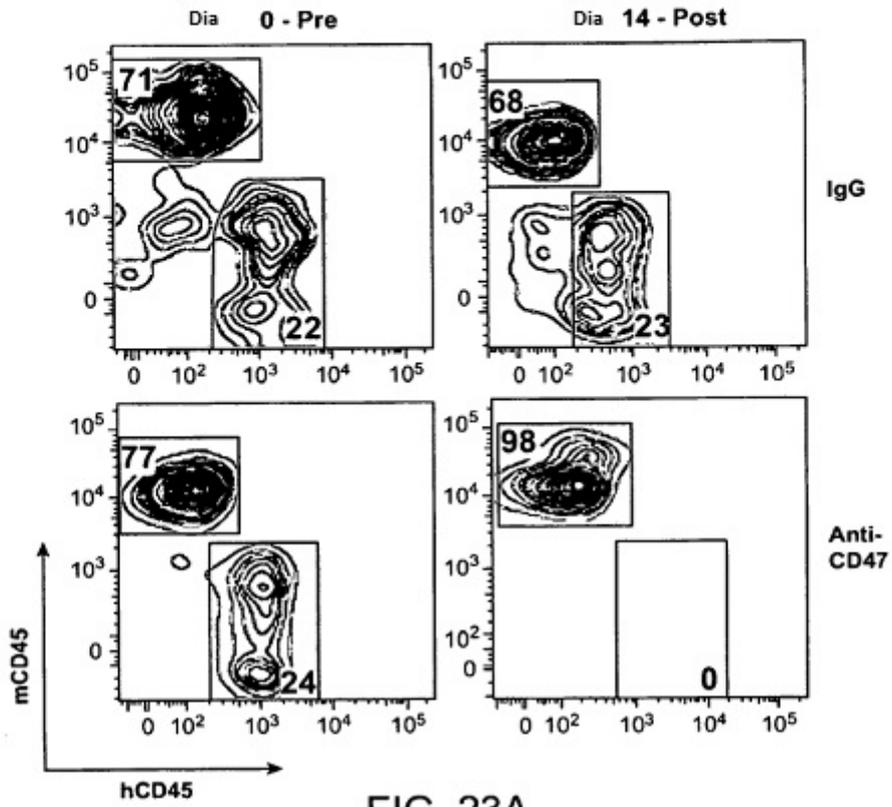


FIG. 23A

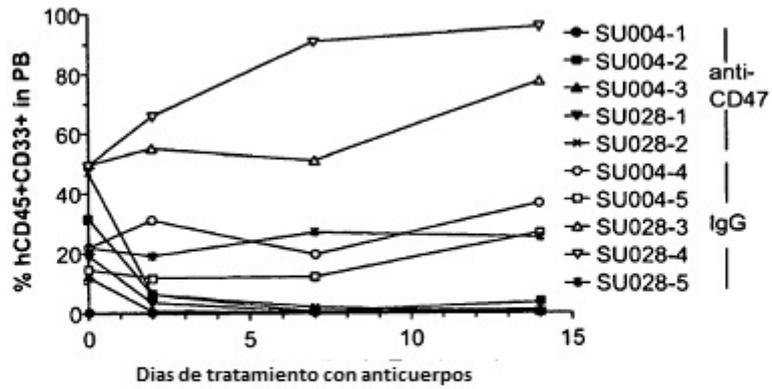


FIG. 23B

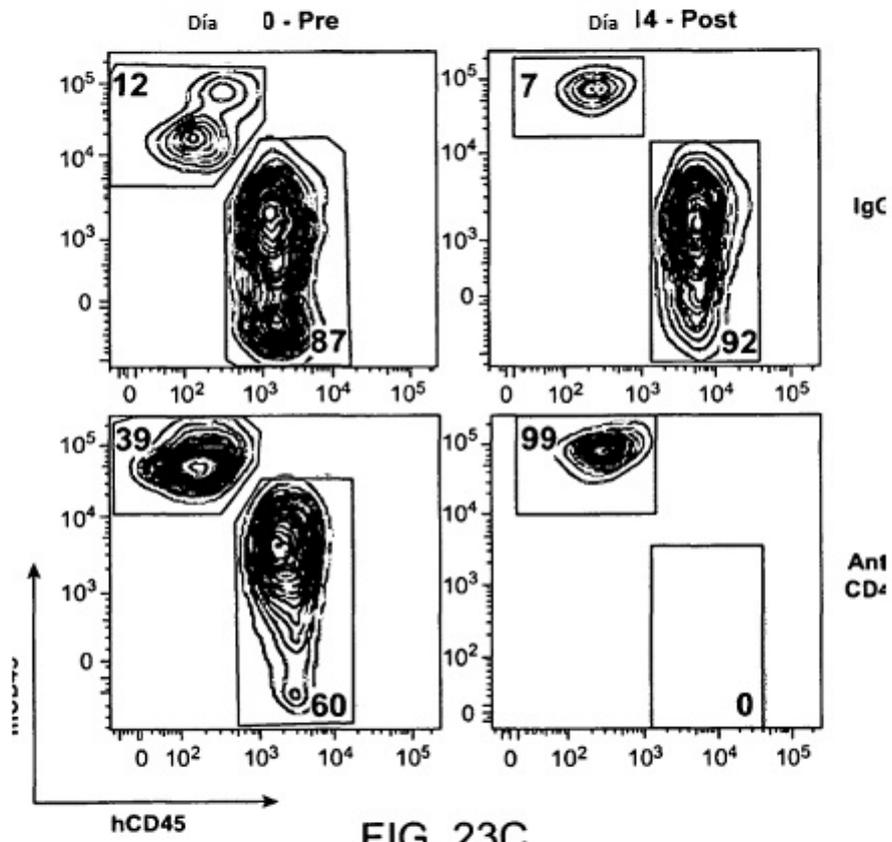


FIG. 23C

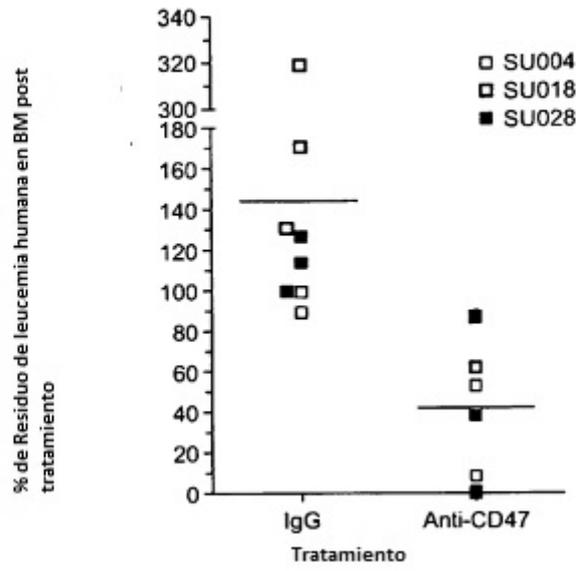


FIG. 23D

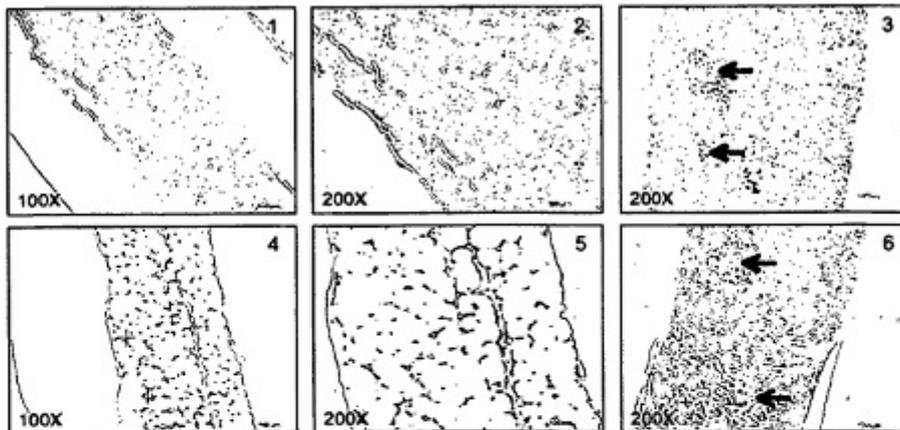


FIG. 23E

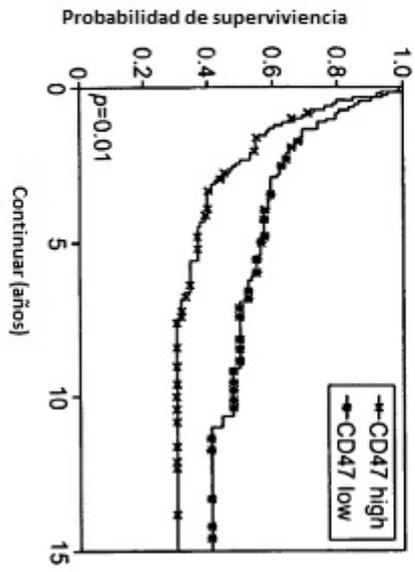


FIG. 24A

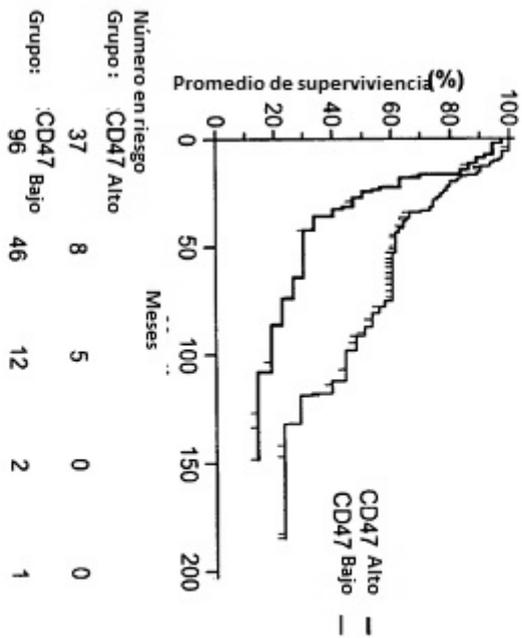


FIG. 24B

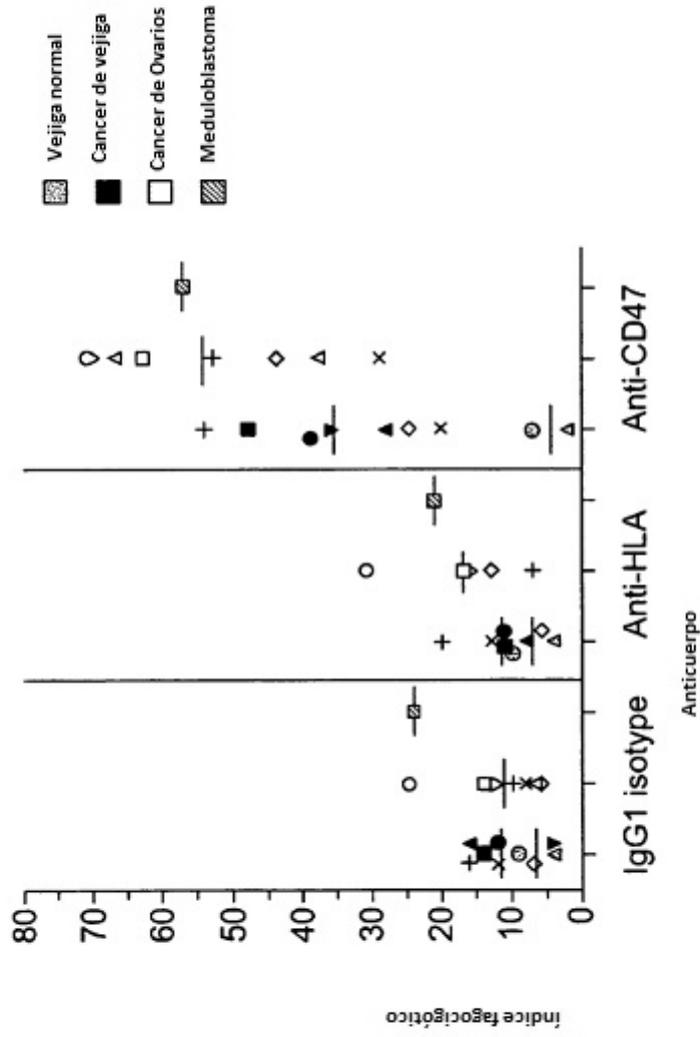


FIG. 25