

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 203**

51 Int. Cl.:

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2013 PCT/US2013/024995**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13119714**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2013 E 13746964 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 2812443**

54 Título: **Anticuerpos CD47 y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

06.02.2012 US 201261595216 P
14.06.2012 US 201261659752 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.02.2020

73 Titular/es:

INHIBRX, INC. (100.0%)
11025 N. Torrey Pines Road, Suite 200
La Jolla, CA 92037, US

72 Inventor/es:

ECKELMAN, BRENDAN;
TIMMER, JOHN;
RAZAI, AMIR;
DEVERAUX, QUINN;
JONES, KYLE y
NGUY, PETER, L.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 743 203 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

Anticuerpos CD47 y métodos de uso de los mismos

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere en general a anticuerpos monoclonales que reconocen CD47, más específicamente a anticuerpos CD47 que no causan un nivel significativo de hemaglutinación de glóbulos rojos humanos, a métodos de generación de estos anticuerpos, y a estos anticuerpos monoclonales para el uso terapéutico.

Antecedentes de la invención

10 CD47, también conocida como proteína asociada a la integrina (IAP), antígeno del cáncer de ovario OA3, antígeno relacionado con Rh y MER6, es un receptor transmembrana que atraviesa la membrana múltiples veces, y pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. La expresión y/o actividad de CD47 se han implicado en varias enfermedades y trastornos. En consecuencia, existe la necesidad de terapias dirigidas a CD47.

15 Babic et al. utiliza un anticuerpo anti-CD47 (mIAP301) para investigar si CD47 desempeñó un papel en la agregación de células Ba/F3 que expresan SHPS-1 (The Journal of Immunology, 2000, 164: 3652-3658). Majeti et al. describe varios anticuerpos anti-CD47 (Cell, 2009, 138: 286-299). Chao et al. investiga el papel de un anticuerpo anti-CD47 en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda humana (Cancer Res. 2011, 71: 1374-1384).

Sumario de la invención

20 La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une al CD47 humano, en donde el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo se une a un epítipo discontinuo en CD47, en donde el epítipo discontinuo comprende los residuos de aminoácidos Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104 y E106 de CD47 cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 147, y en donde el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo impide que el CD47 interactúe con la proteína α reguladora de señal (SIRP α), y no causa un nivel significativo de aglutinación de las células después de la administración.

25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo es quimérico o humanizado.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo promueve la fagocitosis mediada por macrófagos de una célula que expresa CD47.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo es de un isotipo IgG seleccionado del grupo que consiste en el isotipo IgG1, el isotipo IgG2, el isotipo IgG3 y el isotipo IgG4.

30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo es de un isotipo IgG seleccionado de IgG4P e IgG4PE.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende:

- 35 (i) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 72,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 71, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- 40 (ii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
45 una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;

ES 2 743 203 T3

- (iii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 67,
5 una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 69, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (iv) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
10 una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 67,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 70, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (v) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
15 una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (vi) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
20 una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 72,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (vii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 72,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 71, y
25 una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (viii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 76,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,
30 una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (ix) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,

ES 2 743 203 T3

- una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 76,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 71, y
- 5 una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55
- (x) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 77,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
- 10 una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (xi) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 57,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
- 15 una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (xii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 60,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
- 20 una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (xiii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 61,
- 25 una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55; o
- 30 (xiv) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 62,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
- 35 una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende:

ES 2 743 203 T3

- (i) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 5, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 31;
- (ii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 5, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 32;
- 5 (iii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 33;
- (iv) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 34;
- (v) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- 10 (vi) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 36;
- (vii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 37;
- 15 (viii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 38;
- (ix) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 39;
- (x) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 43;
- 20 (xi) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 8, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 39;
- (xii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 11, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 42;
- 25 (xiii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 11, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 43;
- (xiv) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 11, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 44;
- (xv) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 11, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 47;
- 30 (xvi) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 15, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 43;
- (xvii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 15, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 44;
- 35 (xviii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 16, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xix) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 17, y

- una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xx) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 20, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xxi) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 21, y
5 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xxii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 22, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xxiii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 27, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- 10 (xxiv) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 28, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xxv) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 29, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35; o
- (xxvi) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 30, y
15 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo de la invención y un vehículo.

La presente invención proporciona además un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo de la invención para el uso en un método para aliviar un síntoma de un cáncer u otra afección neoplásica en un sujeto.

- 20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el sujeto es un ser humano.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además administrar quimioterapia.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además administrar radioterapia.

- 25 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que reconocen y se unen a CD47, particularmente a CD47 humano. Los anticuerpos de la invención son capaces de modular, por ejemplo, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar, neutralizar o interferir de otra manera con la expresión, actividad y/o señalización de CD47, y estos anticuerpos no causan un nivel significativo de hemaglutinación de glóbulos rojos humanos, también denominados en la presente memoria eritrocitos. Sin embargo, la capacidad de los anticuerpos de la presente invención de unirse a CD47 en la superficie celular y no causar un fenómeno de agregación celular no se limita a los glóbulos rojos. Los anticuerpos de la presente invención se unen de forma única a CD47 de una manera que no promueve la agregación de células positivas para CD47. Los anticuerpos de la invención y sus derivados son capaces de modular, por ejemplo, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar, neutralizar o interferir de otro modo con la interacción entre CD47 y SIRP α (proteína α reguladora de señal), y estos anticuerpos no causan un nivel significativo de hemaglutinación de glóbulos rojos humanos. Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria se denominan colectivamente "anticuerpos CD47". Los anticuerpos CD47 de la invención son una mejora significativa respecto de los anticuerpos CD47 existentes que causan la hemaglutinación de los glóbulos rojos humanos (véase, por ejemplo, Kikuchi Y, Uno S, Yoshimura Y et al. A bivalent singlechain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. Biochem Biophys Res Commun 2004; 315: 912-8). Por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención son una mejora significativa con respecto a los anticuerpos CD47 B6H12, BRIC126 y CC2C6 existentes, cada uno de los cuales bloquea SIRP α , pero causa hemaglutinación de los RBCs, como se describe con detalle a continuación. Los anticuerpos CD47 IgG completos de la presente invención (por ejemplo, 2A1 y sus derivados humanizados, incluidos los proporcionados en la Tabla 1) no aglutinan las células a un nivel significativo. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención no hemaglutinan los glóbulos rojos (RBCs). En la presente memoria se describen los primeros anticuerpos CD47 en un formato completo de IgG que bloquean SIRP α y no causan un nivel significativo de aglutinación.
- 30
35
40

- 45 Los anticuerpos CD47 de la invención exhiben numerosas características deseables, tales como, a modo de ejemplo no limitante, el bloqueo potente de la interacción entre CD47 y su ligando SIRP α , sin causar un nivel significativo de hemaglutinación de eritrocitos, así como también una potente actividad antitumoral. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención bloquean al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 95%, o al menos el 99% de la interacción entre CD47 y SIRP α en comparación con el nivel de interacción entre CD47 y SIRP α en

ausencia del anticuerpo CD47 descrito en la presente memoria.

Los anticuerpos CD47 de la invención no causan un nivel significativo de aglutinación de células, por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención no causan un nivel significativo de hemaglutinación de glóbulos rojos. En algunos casos, un nivel significativo de aglutinación de células se refiere al nivel de aglutinación en presencia de los anticuerpos CD47 existentes. En un aspecto, el nivel de aglutinación en presencia de los anticuerpos CD47 de la invención se reduce en al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, o al menos el 99% en comparación con el nivel de aglutinación en presencia de los anticuerpos CD47 existentes. En algunas realizaciones, los anticuerpos CD47 de la invención no causan un nivel significativo de aglutinación si el nivel de aglutinación en presencia de los anticuerpos CD47 de la invención se reduce en al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, o al menos el 99% en comparación con el nivel de aglutinación en presencia de los anticuerpos CD47 existentes. En otras realizaciones, los anticuerpos CD47 de la invención no causan un nivel significativo de aglutinación si el nivel de aglutinación en presencia de los anticuerpos CD47 de la invención se reduce en al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, o al menos el 99% en comparación con el nivel de aglutinación en presencia del anticuerpo CD47, 1B4, que comprende una secuencia variable de la cadena ligera y de la cadena pesada proporcionadas en la SEQ ID N°: 80 y la SEQ ID N°: 81, respectivamente. Preferiblemente, los anticuerpos CD47 de la invención no causan un nivel significativo de aglutinación de células a una concentración de anticuerpo de entre 10 pM y 10 µM, por ejemplo, a una concentración de anticuerpo de 50 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 1 µM o 5 µM.

Los anticuerpos de la presente invención también son significativamente más potentes en modelos de tumores en comparación con los anticuerpos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la capacidad de los macrófagos de fagocitar células tumorales en presencia de los anticuerpos CD47 de la invención aumenta en al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 99% en comparación con la capacidad de los macrófagos de fagocitar células tumorales en presencia de los anticuerpos CD47 existentes.

Los expertos en la técnica reconocerán que es posible cuantificar, sin experimentación excesiva, el nivel de aglutinación, por ejemplo, el nivel de hemaglutinación de los RBCs. Por ejemplo, los expertos en la técnica reconocerán que el nivel de hemaglutinación se determina midiendo el área de un punto de RBC después de realizar un ensayo de hemaglutinación en presencia de los anticuerpos CD47 de la invención, como se describe en los ejemplos más adelante. En algunos casos, el área del punto de RBC en presencia del anticuerpo CD47 de la invención se compara con el área del punto de RBC en ausencia de un anticuerpo CD47, es decir, en presencia de hemaglutinación cero. De esta manera, la hemaglutinación se cuantifica respecto de un control de referencia. Un área de puntos de RBC más grande corresponde a un nivel más alto de hemaglutinación. Alternativamente, la densitometría del punto de RBC también puede utilizarse para cuantificar la hemaglutinación.

Los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria son útiles para tratar, retrasar la progresión, prevenir la recaída o aliviar un síntoma de un cáncer u otra afección neoplásica. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria son útiles para tratar tumores malignos hematológicos y/o tumores, por ejemplo, tumores malignos hematológicos y/o tumores. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria son útiles para tratar tumores CD47+. A modo de ejemplo no limitante, los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria son útiles para tratar el linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LCL), leucemia mielógena crónica (CML), mieloma múltiple (MM), cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, leiomioma, leiomiomasarcoma, glioma, glioblastoma, etc. Los tumores sólidos incluyen, por ejemplo, tumores de mama, tumores de ovario, tumores de pulmón, tumores de páncreas, tumores de próstata, melanomas, tumores colorrectales, tumores de pulmón, tumores de cabeza y cuello, tumores de vejiga, tumores esofágicos, tumores de hígado y tumores de riñón.

Como se usa en la presente memoria, "cáncer hematológico" se refiere a un cáncer de la sangre e incluye leucemia, linfoma y mieloma, entre otros. "Leucemia" se refiere a un cáncer de la sangre en el que se producen demasiados glóbulos blancos que son ineficaces para combatir las infecciones, desplazando así las otras partes que forman la sangre, como plaquetas y glóbulos rojos. Se entiende que los casos de leucemia se clasifican como agudos o crónicos. Ciertas formas de leucemia incluyen, a modo de ejemplo no limitante, la leucemia linfocítica aguda (LLA); leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia mielógena crónica (LMC); trastorno mieloproliferativo/neoplasia (MPDS); y síndrome de mielodisplasia. "Linfoma" puede referirse a un linfoma de Hodgkin, tanto el linfoma no Hodgkin de escasa malignidad como el agresivo, linfoma de Burkitt y linfoma folicular (células pequeñas y células grandes), entre otros. El mieloma puede referirse al mieloma múltiple (MM), mieloma de células gigantes, mieloma de cadenas pesadas y mieloma de cadenas ligeras o de Bence-Jones.

Los anticuerpos monoclonales ejemplares de la invención incluyen, por ejemplo, los anticuerpos descritos en la presente memoria. Los anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos que tienen una cadena pesada variable seleccionada de las SEQ ID N°: 5-30 y una cadena ligera variable seleccionada de las SEQ ID N°: 31-47. Los anticuerpos también incluyen anticuerpos que tienen una cadena pesada variable que es al menos un 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la secuencia expuesta en al menos una de las SEQ ID N°: 5-30 y una cadena ligera variable que es al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % o más idéntica a la secuencia expuesta en al menos una de las SEQ ID N°: 31-47. Preferiblemente, los anticuerpos reconocen y se unen al CD47 humano y no causan un nivel significativo de hemaglutinación de los glóbulos rojos humanos. Estos anticuerpos se mencionan respectivamente en la presente memoria como anticuerpos CD47. Los anticuerpos CD47 incluyen anticuerpos monoclonales completamente humanos, así como anticuerpos monoclonales humanizados y anticuerpos quiméricos. Estos anticuerpos muestran especificidad por el CD47 humano, y se ha demostrado que modulan, por ejemplo, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o interfieren con la expresión, actividad y/o señalización de CD47 sin causar un nivel significativo de hemaglutinación de los glóbulos rojos.

Los anticuerpos CD47 proporcionados en la presente memoria exhiben actividad inhibitoria, por ejemplo, inhibiendo la expresión de CD47 (por ejemplo, inhibiendo la expresión en la superficie celular de CD47), la actividad y/o la señalización, o interfiriendo con la interacción entre CD47 y SIRP α . Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria reducen total o parcialmente o modulan de otro modo la expresión o actividad de CD47 al unirse a, o de otro modo, interactuar con, CD47, por ejemplo, un CD47 humano. La reducción o modulación de una función biológica de CD47 es completa, significativa o parcial tras la interacción entre los anticuerpos y el polipéptido y/o el péptido CD47 humano. Se considera que los anticuerpos inhiben completamente la expresión o actividad de CD47 cuando el nivel de expresión o actividad de CD47 en presencia del anticuerpo disminuye en al menos el 95%, por ejemplo, en el 96%, 97%, 98%, 99% o 100% en comparación con el nivel de expresión o actividad de CD47 en ausencia de interacción, por ejemplo, unión, con el anticuerpo descrito en la presente memoria. Se considera que los anticuerpos CD47 inhiben significativamente la expresión o actividad de CD47 cuando el nivel de expresión o actividad de CD47 en presencia del anticuerpo CD47 disminuye en al menos el 50%, por ejemplo, 55%, 60%, 75%, 80%, 85% o 90% en comparación con el nivel de expresión o actividad de CD47 en ausencia de unión con un anticuerpo CD47 descrito en la presente memoria. Se considera que los anticuerpos inhiben parcialmente la expresión o actividad de CD47 cuando el nivel de expresión o actividad de CD47 en presencia del anticuerpo disminuye en menos del 95%, por ejemplo, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% o 90% en comparación con el nivel de expresión o actividad de CD47 en ausencia de interacción, por ejemplo, unión, con un anticuerpo descrito en la presente memoria.

Los anticuerpos de la invención también incluyen anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a CD47, en donde el anticuerpo no causa un nivel significativo de aglutinación, por ejemplo, hemaglutinación de glóbulos rojos ("hemaglutinación de RBCs"). Los anticuerpos de la presente invención se unen de forma única a CD47 de una manera que no promueve la agregación de células positivas para CD47; sin embargo, la capacidad de los anticuerpos de la presente invención de unirse a CD47 en la superficie celular y no causar un fenómeno de agregación celular no se limita a los glóbulos rojos.

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden incluir un anticuerpo de la invención y un vehículo. Estas composiciones farmacéuticas pueden incluirse en kits, tales como, por ejemplo, kits de diagnóstico.

La invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a CD47 o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, en donde el anticuerpo no causa un nivel significativo de aglutinación de células después de la administración, por ejemplo, el anticuerpo no causa un nivel significativo de hemaglutinación de glóbulos rojos después de la administración. En algunas realizaciones, el anticuerpo es quimérico, humanizado o completamente humano. En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen a CD47 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo evita que el CD47 interactúe con la SIRP α . Se considera que los anticuerpos inhiben completamente la interacción de CD47 y SIRP α cuando el nivel de interacción CD47/SIRP α en presencia del anticuerpo disminuye en al menos el 95%, por ejemplo, en el 96%, 97%, 98%, 99% o 100% en comparación con el nivel de interacción CD47/SIRP α en ausencia de interacción con el anticuerpo, por ejemplo, unión con el anticuerpo. Se considera que los anticuerpos inhiben parcialmente la interacción CD47/SIRP α cuando el nivel de interacción CD47/SIRP α en presencia del anticuerpo disminuye en menos del 95%, por ejemplo, el 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% o 90% en comparación con el nivel de interacción CD47/SIRP α en ausencia de interacción con el anticuerpo, por ejemplo, la unión con el anticuerpo.

La cantidad de anticuerpo suficiente para tratar o prevenir el cáncer en el sujeto es, por ejemplo, una cantidad que es suficiente para reducir la señalización de CD47 (véase, por ejemplo, Yamauchi et al., 2013 Blood, 4 de enero. [Epub antes de la edición impresa]; Soto-Pantoja et al., 2013 Expert Opin Ther Targets, 17: 89-103; Irandoust et al., 2013 PLoS One, Epub del 8 de enero; Chao et al., 2012 Curr Opin Immunol, 24: 225-32; Theocharides et al., 2012 J Exp Med, 209 (10): 1883-99; Csanyi et al., 2012 Arterioscler Thromb Vasc Biol, 32: 2966-73; Maxhimer et al., 2009 Sci Transl Med, 1: 3ra7; Sarfati et al., 2008 Curr Drug Targets, 9: 842-850; Miyashita et al., 2004 Mol. Biol Cell, 15: 3950-3963; EJ Brown y WA Frazier, 2001 Trends Cell Biol, 11: 130-135; Oldenborg et al., 2001 J Exp Med, 193: 855-862; Blazar et al., 2001 J Exp Med, 194: 541-549; Oldenborg et al., 2000 Science, 288: 2051-2054; y Gao et al., 1996 J Biol Chem, 271: 21-24). Por ejemplo, la cantidad de anticuerpo suficiente para tratar o prevenir el cáncer en el sujeto es una cantidad que es suficiente para reducir la señal inhibitoria fagocítica en macrófagos generada por la interacción CD47/SIRP α en el eje de señalización CD47/SIRP α , es decir, el anticuerpo de la invención promueve la fagocitosis mediada por macrófagos de una célula que expresa CD47. Como se usa en la presente memoria, el término "reducido" se refiere a una señalización de CD47 disminuida en presencia del anticuerpo de la invención. La señalización mediada por CD47 disminuye cuando el nivel de señalización de CD47 en presencia de un anticuerpo CD47 de la invención es mayor o igual al 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% más bajo que

un nivel de control de la señalización de CD47 (es decir, el nivel de señalización de CD47 en ausencia del anticuerpo). El nivel de señalización de CD47 se mide utilizando cualquiera de una variedad de técnicas habituales, como, por ejemplo, a modo de ejemplo no limitante, la medición de la activación de genes posteriores y/o ensayos con indicadores de luciferasa que responden a la activación de CD47. Los expertos en la técnica apreciarán que el nivel de señalización de CD47 se puede medir utilizando una variedad de ensayos, incluidos, por ejemplo, los kits disponibles comercialmente.

5

En algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo es de un isotipo IgG. En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo es de isotipo IgG1 humano, que tiene una secuencia de aminoácidos:

```

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKEVP
KSCDKHTHTCP PCPAPELGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVSV
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFCSSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID N°: 1)

```

10

En algunas realizaciones, la región constante de IgG1 humana se modifica en el aminoácido Asn297 (recuadrada, numeración de Kabat) para impedir la glicosilación del anticuerpo, por ejemplo Asn297Ala (N297A). En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo se modifica en el aminoácido Leu235 (numeración de Kabat) para alterar las interacciones con el receptor de Fc, por ejemplo, Leu235Glu (L235E) o Leu235Ala (L235A). En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo se modifica en el aminoácido Leu234 (numeración de Kabat) para alterar las interacciones con el receptor de Fc, por ejemplo, Leu234Ala (L234A). En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo se altera tanto en el aminoácido 234 como en el 235, por ejemplo Leu234Ala y Leu235Ala (L234A/L235A) (índice EU de Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest).

15

En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo es de isotipo IgG2 humano, que tiene una secuencia de aminoácidos:

20

```

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVNHNKPS NTKVDKTVR
KCCVECPKCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVVDVSHEDP
EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC
KVSNNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG
FYPSDISVEW ESNQGPENNY KTTTPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID N°: 2)

```

En algunas realizaciones, la región constante de IgG2 humana se modifica en el aminoácido Asn297 (recuadrada, numeración de Kabat) para impedir la glicosilación del anticuerpo, por ejemplo, Asn297Ala (N297A).

25

En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo es de isotipo IgG3 humano, que tiene una secuencia de aminoácidos:

```

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHNKPS NTKVDKRVEL
KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC
DTPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVVDVSHED
PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESSGOPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NIFSCSVMHE ALHNRFTQKS LSLSPGK (SEQ ID N°: 3)

```

En algunas realizaciones, la región constante de IgG3 humana se modifica en el aminoácido Asn297 (recuadrada, numeración de Kabat) para impedir la glicosilación del anticuerpo, por ejemplo, Asn297Ala (N297A). En algunas realizaciones, la región constante de IgG3 humana se modifica en el aminoácido 435 para prolongar la vida media, por ejemplo, Arg435His (R435H) (índice EU de Kabat et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest).

30

En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo es de isotipo IgG4 humano, que tiene una secuencia de

aminoácidos:

```

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NIKVDKRVES
KYGPPCP[S]CP APEF[L]GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSDQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFN[S]STY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID N°: 4)

```

5 En algunas realizaciones, la región constante de IgG4 humana se modifica dentro de la región de la bisagra para impedir o reducir el intercambio de cadenas, por ejemplo, Ser228Pro (S228P). En otras realizaciones, la región constante de IgG4 humana se modifica en el aminoácido 235 para alterar las interacciones con el receptor de Fc, por ejemplo, Leu235Glu (L235E). En algunas realizaciones, la región constante de IgG4 humana se modifica dentro de la bisagra y en el aminoácido 235, por ejemplo, Ser228Pro y Leu235Glu (S228P/L235E). En algunas realizaciones, la región constante de IgG4 humana se modifica en el aminoácido Asn297 (numeración de Kabat) para impedir la glicosilación del anticuerpo, por ejemplo, Asn297Ala (N297A). (Índice EU de Kabat et al 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest).

10 En algunas realizaciones, la región constante de IgG humana se modifica para mejorar la unión a FcRn. Los ejemplos de mutaciones en Fc que mejoran la unión a FcRn son Met252Tyr, Ser254Thr, Thr256Glu (M252Y, S254T, T256E, respectivamente) (numeración de Kabat, Dall'Acqua et al 2006, J. Biol Chem, Vol. 281 (33) 23514-23524), o Met428Leu y Asn434Ser (M428L, N434S) (Zalevsky et al., 2010 Nature Biotech, Vol. 28 (2) 157-159). (Índice EU de Kabat et al 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest). En algunas realizaciones, la región constante de IgG humana se modifica para alterar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, las modificaciones de aminoácidos descritas en Natsume et al., 2008 Cancer Res, 68 (10): 3863-72; Idusogie et al., 2001 J Immunol, 166 (4): 2571-5; Moore et al., 2010 mAbs, 2 (2): 181-189; Lazar et al., 2006 PNAS, 103 (11): 4005-4010, Shields et al., 2001 JBC, 276 (9): 6591-6604; Stavenhagen et al., 2007 Cancer Res, 67 (18): 8882-8890; Stavenhagen et al., 2008 Advan. Enzyme Regul., 48: 152-164; Alegre et al, 1992 J Immunol, 148: 3461-3468; Revisado en Kaneko y Niwa, Biodrugs 2011, 25 (1): 1-11.

15 En algunas realizaciones, la región constante de IgG humana se modifica para inducir la heterodimerización. Por ejemplo, al tener una modificación de aminoácidos dentro del dominio CH3 en Thr366, que cuando se reemplaza con un aminoácido más voluminoso, por ejemplo, Try (T366W), es capaz de emparejarse preferentemente con un segundo dominio CH3 que tiene modificaciones de aminoácidos con aminoácidos menos voluminosos en las posiciones Thr366, Leu368 y Tyr407, por ejemplo, Ser, Ala y Val, respectivamente (T366S/L368A/Y407V). La heterodimerización a través de modificaciones en CH3 se puede estabilizar aún más mediante la introducción de un enlace disulfuro, por ejemplo, cambiando Ser354 a Cys (S354C) e Y349 a Cys (Y349C) en dominios CH3 opuestos (Revisado en Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7-15).

20 La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más anticuerpos monoclonales que se unen a CD47 o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, en donde el anticuerpo no causa un nivel significativo de hemaglutinación de glóbulos rojos después de la administración.

25 La hemaglutinación es un ejemplo de una interacción homotípica, en la que se hace que dos células que expresan CD47 se agreguen o se agrupen cuando se tratan con una entidad de unión a CD47 bivalente. La capacidad de los anticuerpos de la presente invención de unirse a CD47 en la superficie celular y no causar un fenómeno de agregación celular no se limita a los glóbulos rojos. Se ha observado que los anticuerpos de la presente invención se unen de forma única a CD47 de una manera que no promueve la agregación de líneas celulares positivas para CD47, por ejemplo, células Daudi.

30 En algunos casos, el anticuerpo comprende una región de la cadena pesada variable (VH) seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 5-30. El anticuerpo comprende opcionalmente una región variable de la cadena ligera (VL) seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 31-47. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región de la cadena VH seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 5-30 y una región de la cadena VL seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 31-47. Los anticuerpos de la invención también incluyen anticuerpos que tienen una cadena pesada variable que es al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la secuencia establecida en al menos una de las SEQ ID N°s: 5-30, y una cadena ligera variable que es al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% o más idéntica a la secuencia establecida en al menos una de las SEQ ID N°s: 31-47. En otros aspectos, el anticuerpo comprende una región VH provista en cualquiera de las SEQ ID N°s: 5, 7, 8, 11, 15-17, 20-22 y 27-30 emparejada con una región VL proporcionada en cualquiera de las SEQ ID N°s: 31-39, 42, 43, 44 y 47. En otra realización, el anticuerpo comprende una región VH proporcionada en una cualquiera de las SEQ ID N°: 5, 7, 8, 11, 12, 15-17, 20-22 y 27-30 emparejada con una región VL proporcionada en cualquiera de las SEQ ID N°s: 31, 32, 35, 40, 41, 42, 43, 44 y 47. En aún otro aspecto, el anticuerpo comprende una combinación de una región de la cadena VH y una región de la cadena VL

seleccionadas de las combinaciones enumeradas en la Tabla 1.

En algunas realizaciones, el anticuerpo CD47 o un fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende una secuencia de la región 1 determinante de la complementariedad (CDR1) de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50, SEQ ID N°: 57, SEQ ID N°: 58, SEQ ID N°: 59, SEQ ID N°: 60, SEQ ID N°: 61, SEQ ID N°: 62, SEQ ID N°: 63, SEQ ID N°: 64, SEQ ID N°: 65, o SEQ ID N°: 66, una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51, SEQ ID N°: 72, SEQ ID N°: 73, SEQ ID N°: 74, SEQ ID N°: 75, o SEQ ID N°: 76, una secuencia de CDR3 VH expuesta en la SEQ ID N°: 52 o SEQ ID N°: 77, una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53, SEQ ID N°: 67, o SEQ ID N°: 68, una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, o SEQ ID N°: 71 y una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55. Por ejemplo, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50, una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51, una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52, una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53, una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55. En otro ejemplo, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50, una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 72, una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52, una CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53, una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 71 y una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención se unen a CD47 en una orientación ladeada que coloca la cadena pesada cerca de la membrana de la célula que expresa CD47, mientras que la cadena ligera ocluye el sitio de unión a SIRP α en CD47. En otra realización, los anticuerpos de la presente invención se unen a CD47 en una orientación ladeada que coloca la cadena ligera cerca de la membrana de la célula que expresa CD47, mientras que la cadena pesada ocluye el sitio de unión a SIRP α en CD47.

Los anticuerpos CD47 se unen a un epítipo que incluye uno cualquiera de los residuos de aminoácidos 1-116 de CD47 cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 147 (es decir, la SEQ ID N°: 48 excluyendo la secuencia señal (aminoácidos 1-18)). Por ejemplo, los anticuerpos pueden unirse a un epítipo que incluye uno o más de los residuos de aminoácidos Q31, N32, T33, T34, E35, V36, Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, 147, Y48, T49, F50, D51, G52, A53, L54, N55, K56, S57, T58, V59, P60, T61, D62, F63, S64, S65, A66, K67, 168, E69, V70, S71, Q72, L73, L74, K75, G76, D77, A78, S79, L80, K81, M82, D83, K84, S85, D86, A87, V88, S89, H90, T91, G92, N93, Y94, T95, C96, E97, V98, T99, E100, L101, T102, R103, E104, G105, E106, T107, I108, I109 y E110 de CD47 cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 147.

En algunos casos, los anticuerpos pueden unirse a un epítipo discontinuo que incluye uno o más de los residuos de aminoácidos Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, I47, Y48, T49, F50 y D51 de CD47 cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 147. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención se unen a un epítipo discontinuo que comprende los residuos de aminoácidos Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104 o E106 de CD47 cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 147. Por ejemplo, los anticuerpos pueden unirse a un epítipo discontinuo que incluye al menos los residuos del bucle KGRD (SEQ ID N°: 56) (residuos 43-46) de CD47 cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 147. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención se unen a un epítipo discontinuo que incluye al menos los residuos Y37, K39, K41, el bucle KGRD (SEQ ID N°: 56) (residuos 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104 y E106 de CD47 cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 147. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención se unen a un epítipo discontinuo que incluye los residuos Y37, K39, K41, el bucle KGRD (SEQ ID N°: 56) (residuos 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104 y E106 de CD47 cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 147.

La región VH de los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria está involucrada principalmente en la unión al bucle KGRD (SEQ ID N°: 56) de CD47. Por lo tanto, el epítipo único al que se unen los anticuerpos de la presente invención está en el lado de CD47. A diferencia de los anticuerpos CD47 existentes conocidos en la técnica, la orientación del dominio VH de los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria en una posición proximal a la membrana es una característica crítica de estos anticuerpos que evita la agregación celular, por ejemplo, la hemaglutinación de glóbulos rojos, al restringir los anticuerpos de tal manera que no pueden unirse a las moléculas CD47 en las células adyacentes. Además, dado que el dominio VK de los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria interactúa con residuos apicales como Y37, T102 y E104, que están involucrados en la unión a SIRP α , es principalmente el dominio VK el que excluye físicamente la unión de SIRP α a CD47.

También se proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que compite con los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria para evitar que el CD47 interactúe con SIRP α .

Además, en la presente memoria se describe un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104 y E106 de CD47 cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 147. También se describe un polipéptido que comprende cualquiera de los restos de aminoácidos 1-116 de CD47 cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 147. Por ejemplo, el polipéptido comprende uno o más de los residuos de aminoácidos Q31, N32, T33, T34, E35, V36, Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, 147, Y48, T49, F50, D51, G52, A53, L54, N55, K56, S57, T58, V59, P60, T61, D62, F63, S64, S65, A66, K67, 168, E69, V70, S71, Q72, L73, L74, K75, G76, D77, A78, S79, L80, K81, M82, D83, K84, S85, D86, A87, V88, S89, H90,

T91, G92, N93, Y94, T95, C96, E97, V98, T99, E100, L101, T102, R103, E104, G105, E106, T107, I108, I109 y E110 de CD47 cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 147. También se describen métodos para usar este polipéptido como un antígeno, por ejemplo, un antígeno que se une a un anticuerpo CD47.

5 La invención también proporciona un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo para el uso en métodos para aliviar un síntoma de un cáncer u otra afección neoplásica administrando a un sujeto que lo necesita uno o más anticuerpos monoclonales que se unen a CD47 o un fragmento inmunológicamente activo del mismo, en el que el anticuerpo no causa un nivel significativo de hemaglutinación de glóbulos rojos después de la administración. El anticuerpo se administra en una cantidad suficiente para aliviar el síntoma del cáncer u otra afección neoplásica en el sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo es quimérico, humanizado o completamente humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a CD47 humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo evita que el CD47 interactúe con la SIRP α . En algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo es de un isotipo IgG seleccionado del grupo que consiste en isotipo IgG1, isotipo IgG2, isotipo IgG3 e isotipo IgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo es de un isotipo IgG seleccionado de IgG4P e IgG4PE.

10 En algunas realizaciones, los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria se usan junto con uno o más agentes adicionales o una combinación de agentes adicionales. Los agentes adicionales adecuados incluyen terapias farmacéuticas y/o quirúrgicas actuales para una aplicación prevista, tales como, por ejemplo, cáncer. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 pueden usarse junto con uno o más agentes quimioterapéuticos o antineoplásicos adicionales. Alternativamente, el agente quimioterapéutico adicional es la radioterapia. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un agente inductor de muerte celular. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico induce una pérdida de asimetría de fosfolípidos en la membrana plasmática, por ejemplo, provoca la exposición a la superficie celular de fosfatidilserina (PS). En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico induce el estrés del retículo endoplásmico (RE). En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un inhibidor del proteasoma. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico induce la translocación de proteínas del RE a la superficie celular. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico induce la translocación y la exposición a la superficie celular de calreticulina.

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo CD47 y el agente adicional se formulan en una única composición terapéutica, y el anticuerpo CD47 y el agente adicional se administran simultáneamente. Alternativamente, el anticuerpo CD47 y el agente adicional están separados unos de otros, por ejemplo, cada uno se formula en una composición terapéutica separada, y el anticuerpo CD47 y el agente adicional se administran simultáneamente, o el anticuerpo CD47 y el agente adicional se administran en diferentes momentos durante un régimen de tratamiento. Por ejemplo, el anticuerpo CD47 se administra antes de la administración del agente adicional, el anticuerpo CD47 se administra después de la administración del agente adicional, o el anticuerpo CD47 y el agente adicional se administran de manera alterna. Como se describe en la presente memoria, el anticuerpo CD47 y el agente adicional se administran en dosis únicas o en dosis múltiples.

20 Un experto en la técnica apreciará que los anticuerpos de la invención tienen una variedad de usos. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se utilizan como agentes terapéuticos, como reactivos en kits de diagnóstico o como herramientas de diagnóstico, o como reactivos en ensayos de competición para generar reactivos terapéuticos.

40 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1A es un gráfico que representa la unión de CD47 en células Daudi con anticuerpos en sobrenadantes de hibridoma según se evaluó mediante citometría de flujo. La Figura 1B es un gráfico que muestra la capacidad de algunos de los anticuerpos CD47 del sobrenadante de hibridoma de bloquear la unión de SIRP α humana recombinante a CD47 humana recombinante, según lo determinado mediante un ELISA.

45 La Figura 2 es una serie de gráficas que representan (A) la unión de anticuerpos CD47 murinos purificados a células Raji, una línea cultivada de células linfoblastoides derivadas de un linfoma de Burkitt, y (B) células CCRF-CEM, una línea celular similar a linfoblastos de células T humanas positivas para CD47, como se analiza mediante citometría de flujo. Este experimento compara la unión de los anticuerpos murinos de la presente invención con los anticuerpos CD47 disponibles comercialmente, B6H12 y 2D3.

50 La Figura 3 es una serie de gráficos que representan la capacidad de los anticuerpos CD47 de bloquear la unión de SIRP α utilizando (A) un ELISA con proteína humana recombinante, o (B) mediante citometría de flujo utilizando células CCRF-CEM y proteína SIRP α humana recombinante.

55 La Figura 4 es una serie de fotografías, gráficos y una tabla que muestra la hemaglutinación de RBCs mediante anticuerpos CD47. La hemaglutinación de RBCs se evidencia por una apariencia de turbidez en el pocillo, mientras que los RBCs sin aglutinar aparecen como punteados.

La Figura 4A muestra que el anticuerpo 2A1 no muestra hemaglutinación a ninguna de las concentraciones ensayadas. El índice de hemaglutinación se representa en el gráfico. La Figura 4B muestra que 2A1 es raro entre muchos anticuerpos CD47 por su incapacidad de aglutinar RBCs. También se muestra la falta de actividad aglutinante de la

versión quimérica humana de 2A1 (2A1-xi).

La Figura 4C muestra que el anticuerpo monoclonal CD47 2D3, que no bloquea SIRP α , no causa hemaglutinación. La Figura 4D muestra un alto rango de concentraciones de los anticuerpos CD47 en el ensayo de hemaglutinación y demuestra el efecto prozona. El índice de hemaglutinación se representa en el gráfico. La Figura 4E demuestra el rango de concentraciones más estrecho para la hemaglutinación mediante el anticuerpo CD47, 1B4, mientras que este efecto está ausente en la unión de 2A1. La Figura 4F muestra que 2A1, 2A1 quimérico (2A1-xi), y las variantes humanizadas no causan hemaglutinación. En la mayoría de los experimentos, se usó el anticuerpo 9E4 y el anticuerpo B6H12 comercial como controles positivos para la hemaglutinación. Otros anticuerpos disponibles comercialmente utilizados en estos ensayos fueron los anticuerpos bloqueantes de SIRP α , BRIC126 y CC2C6, y el anticuerpo no bloqueante de SIRP α , 2D3.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la unión de 2A1 y B6H12 a células B de mono cynomolgus (*cyno*) y células Raji, según se evaluó mediante citometría de flujo. El 2A1 se une al CD47 humano y al *cyno* con una afinidad equivalente, al igual que el B6H12, aunque con una afinidad más baja tanto al CD47 humano como al CD47 *cyno* que el 2A1.

La Figura 6 es una gráfica que representa la unión de 2A1, 2A1-xi y B6H12 a células Raji, según se evaluó mediante citometría de flujo. Es importante destacar que la gráfica muestra que las secuencias de la región variable de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) se dilucidaron correctamente en la versión quimérica de 2A1.

La Figura 7A-7J es una serie de gráficos que muestran la unión de variantes humanizadas de 2A1 a células Raji. 2A1-xi se usó como control interno en la mayoría de los gráficos. Se probaron numerosas combinaciones de cadenas pesadas y ligeras como se describe en el Ejemplo 8.

La Figura 8A es una imagen del trazo de la cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una FLPC AKTA con una columna superdex200. Se muestran las variantes IgG1, IgG4P e IgG4PE del anticuerpo AB6.12. Las tres variantes son monoméricas en más del 97%. La Figura 8B es una fotografía de un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de numerosas variantes humanizadas de 2A1 en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR).

La Figura 9 es una serie de gráficos que representan la capacidad de los anticuerpos CD47 de promover la fagocitosis de líneas celulares de tumores humanos por macrófagos derivados de monocitos humanos (MDM). La Figura 9A es una gráfica que muestra el índice fagocítico, en donde los anticuerpos utilizados fueron el anticuerpo comercial B6H12, el anticuerpo murino 2A1, una variante humanizada AB2.05 y el anticuerpo comercial no bloqueante 2D3. La Figura 9B es un gráfico que muestra el índice fagocítico, en el que los anticuerpos utilizados fueron el anticuerpo comercial B6H12, el anticuerpo humanizado AB2.05 (IgG1 humano) y las variantes IgG1, IgG4P e IgG4PE del anticuerpo humanizado AB6.12. Las células CCRF-CEM se usaron como la línea celular objetivo CD47 en estos experimentos.

La Figura 10 es una serie de gráficos que muestran los efectos antitumorales de los anticuerpos CD47 en un modelo de tumor Raji. La Figura 10A es una gráfica que muestra la eficacia de los anticuerpos murinos 9E4, 1B4, 2A1 y el anticuerpo comercial B6H12. La Figura 10B es una gráfica que muestra la eficacia de los isotipos IgG1, IgG4P e IgG4PE del anticuerpo humanizado AB6.12, junto con el anticuerpo murino 2A1. En ambos modelos, los ratones se trataron con dosis de anticuerpo de 200 μ g tres veces a la semana.

La Figura 11 es una representación gráfica de los complejos de cocrystal de CD47-IgV con el dominio SIRP α -IgV (A, (Referencia del Banco de Datos de Proteínas (PDB) n° 2JJS), B6H12 (B) y 2A1 (C). 2A1 y B6H12 se unen en orientaciones muy diferentes y epítomos distintos en CD47, los cuales se superponen con el sitio de unión de SIRP α . El anticuerpo 2A1 se une en una orientación ladeada en la proteína CD47.

Descripción detallada

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a CD47, incluyendo CD47 humano. Estos anticuerpos se denominan colectivamente en la presente memoria anticuerpos CD47.

CD47, un receptor transmembrana que atraviesa la membrana múltiples veces y pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, interactúa con SIRP α (proteína reguladora de señal α) en los macrófagos y, por lo tanto, reduce la fagocitosis. Las células cancerosas que cooptan esta vía evaden la fagocitosis. Como se describe en detalle a continuación, este es un nuevo mecanismo de evitación inmune de tumores, y el objetivo terapéutico de CD47 tiene una amplia aplicación en numerosos cánceres.

La expresión de CD47 se correlaciona con peores resultados clínicos en muchas neoplasias malignas diferentes, como el linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), cáncer de ovario, glioma, glioblastoma, etc. Además, se ha identificado CD47 como marcador de células madre del cáncer en leucemias y tumores sólidos (Jaiswal et al., 2009 Cell, 138 (2): 271-85; Chan et al., 2009 Proc Natl Acad Sci USA, 106 (33): 14016-21; Chan et al., 2010 Curr Opin Urol, 20 (5): 393-7; Majeti R et al., 2011 Oncogene, 30 (9): 1009-19).

Los anticuerpos bloqueadores de CD47 han demostrado actividad antitumoral en múltiples modelos de tumores *in vivo*. Además, se ha demostrado que estos anticuerpos actúan de manera sinérgica con otros anticuerpos terapéuticos, incluidos Rituxan® y Herceptin® en modelos de tumores. El bloqueo de la interacción de CD47 con

SIRP α es capaz de promover la fagocitosis de las células que expresan CD47 por los macrófagos (revisado en Chao et al., 2012 Curr Opin Immunol, 24 (2): 225-32). Los ratones que carecen de CD47 son notablemente resistentes a la radioterapia, lo que sugiere un papel en la selección como objetivo de CD47 en combinación con la radioterapia (Isenberg et al., 2008 Am J Pathol, 173 (4): 1100-1112; Maxhimer et al., 2009 Sci Transl Med, 1 (3): 3ra7). Además, los modelos de tumores singénicos en estos ratones muestran una metástasis ósea disminuida en comparación con los ratones de tipo natural (Uluçkan et al., 2009 Cancer Res, 69 (7): 3196-204).

Es importante destacar que la mayoría de los anticuerpos contra CD47 causan hemaglutinación de los eritrocitos humanos. La hemaglutinación es un ejemplo de una interacción homotípica, en la que se hace que dos células que expresan CD47 se agreguen o se agrupen cuando se tratan con una entidad de unión a CD47 bivalente. Por ejemplo, se ha informado que el anticuerpo CD47, MABL, en forma de una IgG completa o F(ab')₂, causa hemaglutinación de eritrocitos y, solo cuando la MABL se modificó hasta un scFv o scFv bivalente, este efecto se mitigó. (Véase, por ejemplo, Uno S, Kinoshita Y, Azuma Y et al. Antitumor activity of a monoclonal antibody against CD47 in xenograft models of human leukemia. Oncol Rep 2007; 17: 1189-94; Kikuchi Y, Uno S, Yoshimura Y et al. A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. Biochem Biophys Res Commun 2004; 315: 912-8). Otros anticuerpos CD47 conocidos, que incluyen B6H12, BRIC126 y CC2C6, también causan la hemaglutinación de los eritrocitos, como se describe con detalle a continuación. Por lo tanto, la agregación de células representa una limitación importante de la orientación terapéutica de CD47 con los anticuerpos IgG completos existentes.

Además, una característica importante de los anticuerpos CD47 es la capacidad de bloquear la interacción de CD47 y SIRP α para promover la fagocitosis de las células que expresan CD47 por los macrófagos. Muchos anticuerpos CD47 existentes bloquean SIRP α ; sin embargo, antes de la invención descrita en la presente memoria, los anticuerpos existentes que bloqueaban SIRP α causaban el efecto secundario de hemaglutinación, que, como se describió anteriormente, no es deseable. Otros anticuerpos existentes, como el 2D3, no causan hemaglutinación; sin embargo, estos anticuerpos tampoco bloquean SIRP α , lo que los hace ineficaces en la promoción de la fagocitosis. Por lo tanto, antes de la invención descrita en la presente memoria, existía una necesidad apremiante de identificar anticuerpos CD47 que bloqueasen SIRP α sin provocar agregación celular.

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une al CD47 humano, en donde el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo se une a un epítipo discontinuo en CD47, en donde el epítipo discontinuo comprende los residuos de aminoácidos Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104 y E106 de CD47 cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 147, y en donde el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo impide que el CD47 interactúe con la proteína α reguladora de señal (SIRP α), y no causa un nivel significativo de aglutinación de las células después de la administración.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo es quimérico o humanizado.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo promueve la fagocitosis mediada por macrófagos de una célula que expresa CD47.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo es de un isotipo IgG seleccionado del grupo que consiste en el isotipo IgG1, el isotipo IgG2, el isotipo IgG3 y el isotipo IgG4.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo es de un isotipo IgG seleccionado de IgG4P e IgG4PE.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende:

- (i) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 72,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 71, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (ii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,

- una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- 5 (iii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 67,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 69, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- 10 (iv) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 67,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 70, y
- 15 una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (v) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,
- 20 una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (vi) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 72,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
- 25 una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (vii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 72,
- 30 una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 71, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (viii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
- 35 una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 76,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,

ES 2 743 203 T3

- una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (ix) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 76,
5 una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 71, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55
- (x) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
10 una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 77,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (xi) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 57,
15 una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
20 una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (xii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 60,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
25 una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (xiii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 61,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
30 una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55; o
- (xiv) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 62,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
35 una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y

una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55.

Según algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende:

- 5 (i) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 5, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 31;
- (ii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 5, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 32;
- (iii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 33;
- 10 (iv) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 34;
- (v) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (vi) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
15 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 36;
- (vii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 37;
- (viii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 38;
- 20 (ix) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 39;
- (x) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 43;
- (xi) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 8, y
25 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 39;
- (xii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 11, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 42;
- (xiii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 11, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 43;
- 30 (xiv) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 11, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 44;
- (xv) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 11, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 47;
- (xvi) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 15, y
35 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 43;
- (xvii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 15, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 44;

- (xviii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 16, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xix) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 17, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- 5 (xx) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 20, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xxi) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 21, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xxii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 22, y
10 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xxiii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 27, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xxiv) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 28, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- 15 (xxv) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 29, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35; o
- (xxvi) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 30, y una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35.

20 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo de la invención y un vehículo.

La presente invención proporciona además un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo de la invención para el uso en un método para aliviar un síntoma de un cáncer u otra afección neoplásica en un sujeto.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el sujeto es un ser humano.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además administrar quimioterapia.

25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además administrar radioterapia.

30 Los anticuerpos CD47 de la presente invención evitan el efecto indeseable de la hemaglutinación, incrementando así la eficacia de la selección como objetivo terapéutico de CD47, y mantienen la capacidad de bloquear la interacción de CD47 con SIRP α , promoviendo así la fagocitosis de las células que expresan CD47. Específicamente, los anticuerpos CD47 de IgG completos de la presente invención (por ejemplo, 2A1 y sus derivados humanizados, incluidos los proporcionados en la Tabla 1) no aglutinan las células a un nivel significativo. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención no hemaglutinan los RBCs a un nivel significativo. En la presente memoria se describen los primeros anticuerpos CD47 en un formato completo de IgG que bloquean SIRP α y no causan un nivel significativo de hemaglutinación. En conjunto, los anticuerpos de la invención (por ejemplo, el anticuerpo 2A1 y sus derivados humanizados) son únicos entre los anticuerpos CD47 existentes por su capacidad de bloquear SIRP α , pero no causan
35 un nivel significativo de hemaglutinación.

40 Los anticuerpos CD47 de la invención exhiben numerosas características deseables, tales como, a modo de ejemplo no limitante, un bloqueo potente de la interacción entre CD47 y su ligando SIRP α , sin causar un nivel significativo o de otro modo modular la hemaglutinación de eritrocitos, así como una potente actividad antitumoral. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención bloquean al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 95%, o al menos el 99% de la interacción entre CD47 y SIRP α en comparación con el nivel de interacción entre CD47 y SIRP α en ausencia del anticuerpo CD47 descrito en la presente memoria. Los anticuerpos CD47 de la invención no causan un nivel significativo de aglutinación de células, por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención no causan un nivel significativo de hemaglutinación de glóbulos rojos. Por ejemplo, el nivel de aglutinación en presencia de los
45 anticuerpos CD47 de la invención se reduce en al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, o al menos

el 99% en comparación con el nivel de aglutinación en presencia de los anticuerpos CD47 existentes. En algunas realizaciones, los anticuerpos CD47 de la invención no causan un nivel significativo de aglutinación si el nivel de aglutinación en presencia de los anticuerpos CD47 de la invención se reduce en al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, o al menos el 99% en comparación con el nivel de aglutinación en presencia del anticuerpo CD47, 1B4, que comprende una secuencia de la cadena pesada variable y ligera variable proporcionada en la SEQ ID N°: 80 y la SEQ ID N°: 81, respectivamente. Los anticuerpos de la presente invención también son significativamente más potentes en modelos de tumores en comparación con los anticuerpos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la capacidad de los macrófagos de fagocitar células tumorales en presencia de los anticuerpos CD47 de la invención aumenta en al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos el 99% en comparación con la capacidad de los macrófagos de fagocitar células tumorales en presencia de los anticuerpos CD47 existentes.

Los expertos en la técnica reconocerán que es posible cuantificar, sin experimentación excesiva, el nivel de aglutinación, por ejemplo, el nivel de hemaglutinación de los RBCs. Por ejemplo, los expertos en la técnica reconocerán que el nivel de hemaglutinación se determina midiendo el área de un punto de RBC después de realizar un ensayo de hemaglutinación en presencia de los anticuerpos CD47 de la invención, como se describe en los ejemplos más adelante. En algunos casos, el área del punto de RBC en presencia del anticuerpo CD47 de la invención se compara con el área del punto de RBC en ausencia de un anticuerpo CD47, es decir, en presencia de hemaglutinación cero. De esta manera, la hemaglutinación se cuantifica respecto de un control de referencia. Un área de puntos de RBC más grande corresponde a un nivel más alto de hemaglutinación. Alternativamente, la densitometría del punto de RBC también puede utilizarse para cuantificar la hemaglutinación.

Los anticuerpos CD47 de la invención se unen a CD47 humano y bloquean su interacción con SIRP α (Figuras 1B, 3 y 7J). Estos anticuerpos no causan un nivel significativo de hemaglutinación de eritrocitos humanos (Figura 4). Estos anticuerpos son capaces de promover la fagocitosis de las células tumorales por los macrófagos (Figura 9). Además, los anticuerpos CD47 muestran una potente actividad antitumoral en un modelo de ratón de linfoma humano (Figura 10). Por lo tanto, los anticuerpos CD47 de la invención evitan un factor limitante importante para el objetivo terapéutico de CD47. Por consiguiente, los anticuerpos CD47 de la invención pueden ser de gran importancia en el tratamiento de una multitud de cánceres.

Los anticuerpos de la invención que se unen específicamente a CD47 humano bloquean, inhiben, interrumpen o modulan de otro modo la interacción entre CD47 humano y SIRP α humana, sin causar un nivel significativo o de otra manera modular la hemaglutinación de eritrocitos.

Los anticuerpos de la presente invención se unen a un epítipo de CD47 con una constante de unión (K_d) en equilibrio de $\leq 1 \mu\text{M}$, por ejemplo, $\leq 100 \text{ nM}$, preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$, y más preferiblemente $\leq 1 \text{ nM}$. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 proporcionados en la presente memoria presentan una K_d en el rango aproximadamente entre $\leq 1 \text{ nM}$ a aproximadamente 1 pM .

Los anticuerpos CD47 de la invención sirven para modular, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar, neutralizar o interferir de otro modo con la actividad funcional del CD47 ampliamente distribuido. Las actividades funcionales de CD47 incluyen, por ejemplo, la señalización a través de la interacción con SIRP α , la modulación, por ejemplo, el aumento de la concentración de calcio intracelular tras la adhesión celular a la matriz extracelular, la interacción con el dominio de unión celular C-terminal de la trombospondina, la interacción con el fibrinógeno y la interacción con varias integrinas. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 inhiben total o parcialmente la actividad funcional de CD47 modulando, bloqueando, inhibiendo, reduciendo la antagonización, neutralizando o interfiriendo de otro modo con la unión de CD47 a SIRP α .

Se considera que los anticuerpos CD47 modulan, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o interfieren de otra manera con la actividad funcional de CD47 cuando el nivel de actividad funcional de CD47 en presencia del anticuerpo CD47 disminuye al menos en un 95%, por ejemplo, en un 96%, 97%, 98%, 99% o 100% en comparación con el nivel de actividad funcional de CD47 en ausencia de unión con un anticuerpo CD47 descrito en la presente memoria. Se considera que los anticuerpos CD47 bloquean, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o interfieren de otra manera con la actividad funcional de CD47 cuando el nivel de actividad de CD47 en presencia del anticuerpo CD47 disminuye al menos en un 50%, por ejemplo, 55%, 60%, 75%, 80%, 85% o 90% en comparación con el nivel de actividad de CD47 en ausencia de unión con un anticuerpo CD47 descrito en la presente memoria. Se considera que los anticuerpos CD47 modulan, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o interfieren de otra manera con la actividad funcional de CD47 cuando el nivel de actividad de CD47 en presencia del anticuerpo CD47 disminuye a menos del 95%, por ejemplo, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% o 90% en comparación con el nivel de actividad de CD47 en ausencia de unión con un anticuerpo CD47 descrito en la presente memoria.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán el plural, y los términos en plural incluirán el singular. En general,

- las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular y química e hibridación de oligo y polinucleótidos descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas habituales se utilizan para el ADN recombinante, la síntesis de oligonucleótidos y el cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de, laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica y medicinal descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas habituales se utilizan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.
- Según se utilizan de acuerdo con la presente descripción, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:
- Tal como se usan en la presente memoria, los términos CD47, proteína asociada a integrina (IAP), antígeno de cáncer ovárico OA3, antígeno relacionado con Rh y MER6 son sinónimos y se pueden usar indistintamente.
- Los términos glóbulo(s) rojo(s) y eritrocito(s) son sinónimos y se usan indistintamente en la presente memoria.
- El término aglutinación se refiere a la agregación celular, mientras que el término hemaglutinación se refiere a la agregación de un subconjunto específico de células, es decir, glóbulos rojos. Así, la hemaglutinación es un tipo de aglutinación.
- Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente (inmunorreaccionan con) un antígeno. Por "unirse específicamente" o "inmunorreacciona con" "o dirigido contra" se entiende que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona con otros polipéptidos o se une con una afinidad mucho menor ($K_d > 10^{-6}$). Los anticuerpos incluyen, pero sin limitación, los policlonales, monoclonales, quiméricos, dAb (anticuerpo de dominio), de cadena simple, Fab, fragmentos Fab y $F(ab)_2$, F_v , scFvs y una biblioteca de expresión de Fab.
- Se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares de cadenas polipeptídicas idénticas, y cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento de antígenos. La parte carboxiterminal de cada cadena define una región constante que es la principal responsable de la función efectora. En general, las moléculas de anticuerpos obtenidas de humanos se relacionan con cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Algunas clases también tienen subclases, como IgG₁, IgG₂ y otras. Además, en los seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.
- El término "anticuerpo monoclonal" (MAb) o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie molecular de una molécula de anticuerpo que consiste en un único producto génico de cadena ligera y un único producto génico de cadena pesada. En particular, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los MAb contienen un sitio de unión al antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única hacia él.
- En general, las moléculas de anticuerpos obtenidas de humanos se relacionan con cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Algunas clases también tienen subclases, como IgG₁, IgG₂ y otras. Además, en los seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.
- El término "sitio de unión al antígeno" o "porción de unión" se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables N-terminales ("V") de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera, denominadas "regiones hipervariables", se interponen entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como "regiones estructurales" o "FRs". Por lo tanto, el término "FR" se refiere a las secuencias de aminoácidos que se encuentran naturalmente entre las regiones hipervariables y las adyacentes a ellas en las inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada se disponen entre sí en un espacio tridimensional para formar una superficie de unión al antígeno. La superficie de unión al antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas

pesada y ligera se denominan "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDRs". La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de las secuencias de Kabat de Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987), Chothia et al. Nature 342: 878-883 (1989).

- 5 Como se usa en la presente memoria, el término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o fragmento de la misma, o un receptor de células T. El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupamientos de moléculas químicamente activas en la superficie, tales como aminoácidos o cadenas laterales de carbohidratos, y por lo general tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$; por ejemplo, $\leq 100 \text{ nM}$, preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$ y más preferiblemente $\leq 1 \text{ nM}$.

- 15 Como se usa en la presente memoria, los términos "unión inmunológica" y "propiedades de unión inmunológica" se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el cual la inmunoglobulina es específica. La fuerza o afinidad de las interacciones de unión inmunológica se pueden expresar en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, en la que una K_d más pequeña representa una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunológica de polipéptidos seleccionados pueden cuantificarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de estos métodos implica medir las velocidades de formación y disociación del complejo sitio de unión al antígeno/antígeno, en donde esas velocidades dependen de las concentraciones de las moléculas que forman el complejo, la afinidad de la interacción y los parámetros geométricos que influyen igualmente en la velocidad en ambas direcciones. Por lo tanto, la "constante de velocidad de asociación" (k_{on}) y la "constante de velocidad de disociación" (k_{off}) pueden determinarse mediante el cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación. (Véase Nature 361: 186-87 (1993)). La relación de k_{off}/k_{on} permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación K_d . (Véase, en general, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59: 439-473). Se dice que un anticuerpo de la presente invención se une específicamente a CD47 cuando la constante de unión (K_d) en equilibrio es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$, más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$, y lo más preferiblemente $\leq 100 \text{ pM}$ a aproximadamente 1 pM , medida mediante ensayos tales como ensayos de unión a radioligandos, resonancia de plasmón superficial (SPR), ensayo de unión por citometría de flujo o ensayos similares conocidos por los expertos en la técnica.

- 30 El término "polinucleótido aislado", como se usa en la presente memoria, significará un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen el "polinucleótido aislado" (1) no está asociado con todo o una parte de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está unido de forma operable a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (3) no se da en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

- 35 El término "proteína aislada" mencionado en la presente memoria significa una proteína de ADNc, ARN recombinante u origen sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen, o fuente de procedencia, la "proteína aislada" (1) no está asociada con proteínas halladas en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de proteínas marinas, (3) se expresa en una célula de una especie diferente, o (4) no se da en la naturaleza.

- 40 El término "polipéptido" se usa en la presente memoria como término genérico para referirse a una proteína nativa, fragmentos, o análogos de una secuencia polipeptídica. Por lo tanto, los fragmentos de proteínas nativas y los análogos son especies del género polipeptídico.

- 45 El término "que se da de manera natural", como se usa en la presente memoria cuando se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluidos los virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que el hombre no ha modificado intencionadamente en el laboratorio o de otra manera se da de manera natural.

- 50 El término "unido de forma operable", como se usa en la presente memoria, se refiere a las posiciones de los componentes así descritos que están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia de control "unida de forma operable" a una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control.

- 55 El término "secuencia de control", como se usa en la presente memoria, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped en procariontas, y tales secuencias de control generalmente incluyen el promotor, el sitio de unión ribosomal y la secuencia de terminación de la transcripción en eucariotas, y, en general, tales secuencias de control incluyen los promotores y la secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, las secuencias líder y las secuencias de

moléculas de fusión. El término "polinucleótido", como se menciona en la presente memoria, se refiere a una molécula polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN monocatenarias y bicatenarias.

5 El término "oligonucleótido" al que se hace referencia en la presente memoria incluye nucleótidos naturales y modificados unidos entre sí por enlaces oligonucleotídicos naturales y artificiales. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que generalmente comprenden una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente, los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases, y lo más preferiblemente de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos suelen ser monocatenarios, por ejemplo, para sondas, aunque los oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, por ejemplo, para su uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos de la invención son oligonucleótidos directos o inversos.

10 El término "nucleótidos naturales" al que se hace referencia en la presente memoria incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" al que se hace referencia en la presente memoria incluye nucleótidos con grupos carbohidrato modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces oligonucleotídicos" al que se hace referencia en la presente memoria incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforoniladato, fosforoamidato y similares. Véase, por ejemplo, LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein et al. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon et al. Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (1991)); Stec et al. Patente de EE.UU. nº 5.151.510; Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir una etiqueta para la detección, si se desea.

15 El término "hibridar selectivamente" mencionado en la presente memoria significa unir de manera detectable y específica. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención hibridan selectivamente con cadenas de ácido nucleico en condiciones de hibridación y lavado que minimizan las cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos inespecíficos. Se pueden usar condiciones de alta rigurosidad para lograr condiciones de hibridación selectivas como se conocen en la técnica y se discuten en la presente memoria. En general, la homología de la secuencia de ácido nucleico entre los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de la invención y una secuencia de ácido nucleico de interés será de al menos el 80%, y más típicamente con homologías cada vez mayores preferiblemente de al menos el 85%, 90%, 95%, 99%, y 100%. Dos secuencias de aminoácidos son homólogos si hay una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, una homología del 85% significa que el 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias están alineadas para conseguir la máxima coincidencia. Se permiten huecos (en cualquiera de las dos secuencias que se están haciendo coincidir) para maximizar la coincidencia, y se prefieren longitudes de huecos de 5 o menos, y se prefieren 2 o menos. Como alternativa y preferiblemente, dos secuencias de proteínas (o secuencias polipeptídicas derivadas de ellas de al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, como se usa este término en la presente memoria, si tienen una puntuación de alineación de más de 5 (en unidades de desviación estándar) usando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización por hueco de 6 o más. Véase Dayhoff, M.O., en Atlas of Protein Sequence and Structure, págs. 101-110 (Volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y el Suplemento 2 de este volumen, págs. 1-10. Las dos secuencias o partes de las mismas son más preferiblemente homólogas si sus aminoácidos son idénticos en un valor mayor o igual al 50% cuando se alinean de manera óptima utilizando el programa ALIGN. El término "corresponde a" se usa en la presente memoria para indicar que una secuencia de polinucleótidos es homóloga (es decir, es idéntica, no está estrictamente relacionada evolutivamente) a toda o una parte de una secuencia de polinucleótidos de referencia, o que una secuencia polipeptídica es idéntica a una secuencia polipeptídica de referencia. En contraposición, el término "complementaria a" se usa en la presente memoria para indicar que la secuencia complementaria es homóloga a toda o una parte de una secuencia de polinucleótidos de referencia. Como ilustración, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

20 Los siguientes términos se utilizan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de polinucleótidos o aminoácidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida que se usa como base para una comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de un ADNc de longitud completa o secuencia de genes proporcionada en una lista de secuencias, o puede comprender una secuencia completa de un ADNc o gen. En general, una secuencia de referencia tiene una longitud de al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos, frecuentemente de al menos 24 nucleótidos u 8 aminoácidos, y con frecuencia de al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos. Dado que dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia completa de polinucleótidos o aminoácidos) que es similar entre las dos moléculas, y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre las dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) moléculas se realizan típicamente comparando las secuencias de las dos moléculas en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como se usa en la presente memoria, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones contiguas de nucleótidos o de 6 aminoácidos en donde una secuencia de polinucleótidos o una secuencia de aminoácidos puede compararse con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos, y en la que la porción de la secuencia de polinucleótidos en la

ventana de comparación puede comprender adiciones, deleciones, sustituciones y similares (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman *Proc. Natl Acad Sci. (EE.UU.)* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del paquete informático Wisconsin Genetics Software, versión 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks, o el paquete informático MacVector), o mediante inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, la que da como resultado el porcentaje más alto de homología en la ventana de comparación) generada por los diversos métodos.

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos son idénticas (es decir, nucleótido a nucleótido o residuo a residuo) en la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparece la misma base de ácido nucleico (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) o residuo en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial", como se usa en la presente memoria, denota una característica de una secuencia de polinucleótidos o aminoácidos, en donde el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene al menos un 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos de un 90 a un 95 por ciento de identidad de secuencia, más generalmente al menos un 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia en una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótidos (6 aminoácidos), con frecuencia en una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótidos (8-16 aminoácidos), en donde el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir deleciones o adiciones que suman un 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia en la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

Como se usa en la presente memoria, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology - A Synthesis* (2ª edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland 7 Mass. (1991)). Los estereoisómeros (p. ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, los aminoácidos no naturales como los aminoácidos α , α -disustituidos, los N-alkil aminoácidos, el ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4 hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N, N, N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmietionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxislisina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos utilizada en la presente memoria, la dirección a la izquierda es la dirección amino terminal, y la dirección a la derecha es la dirección carboxi terminal, de acuerdo con el uso y la convención habitual.

De manera similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias polinucleotídicas monocatenarias es el extremo 5', la dirección izquierda de las secuencias polinucleotídicas bicatenarias se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' de los transcritos de ARN nacientes se denomina regiones de secuencia en la dirección de la transcripción en la cadena de ADN que tiene la misma secuencia que el ARN, y las que están en 5' respecto del extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias anteriores", y las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 3' respecto del extremo 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias posteriores".

Cuando se aplica a los polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están alineadas de manera óptima, como con los programas GAP o BESTFIT que usan las penalizaciones por hueco predeterminadas, comparten al menos un 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia, y lo más preferiblemente al menos un 99 por ciento de identidad de secuencia.

Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticas se diferencian por sustituciones conservativas de aminoácidos.

Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren a la posibilidad de intercambios de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones conservativas de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutámico-aspartico y asparagina-glutamina.

Como se analiza en la presente memoria, las variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos o las moléculas de inmunoglobulina se consideran abarcadas por la presente invención, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos se mantengan en al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 80%, 90%, 95%, y lo más preferiblemente un 99%. En particular, se contemplan sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados por sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente generalmente se dividen en familias: (1) los aminoácidos ácidos son aspartato, glutamato; (2) los aminoácidos básicos son lisina, arginina, histidina; (3) los aminoácidos apolares son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano y (4) los aminoácidos polares sin carga son glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Los aminoácidos hidrófilos incluyen arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina. Los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina. Otras familias de aminoácidos incluyen (i) serina y treonina, que son la familia alifática-hidroxilo; (ii) asparagina y glutamina, que son la familia que contiene amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que son la familia alifática; y (iv) fenilalanina, triptófano y tirosina, que son la familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente no tendrá un efecto importante sobre la unión o las propiedades de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no implica un aminoácido dentro de un sitio estructural. Se puede determinar fácilmente si un cambio de aminoácido produce un péptido funcional analizando la actividad específica del derivado polipeptídico. Los ensayos se describen con detalle en la presente memoria. Los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina. Los extremos amino y carboxilo preferidos de los fragmentos o análogos se encuentran cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales se pueden identificar mediante la comparación de los datos de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con las bases de datos de secuencias públicas o comerciales. Preferiblemente, se usan métodos de comparación computarizados para identificar motivos de secuencia o dominios predichos de conformación de proteínas que existen en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie et al. *Science* 253: 164 (1991). Por lo tanto, los ejemplos anteriores demuestran que los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que pueden usarse para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con la invención.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alteran las afinidades de unión, y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos análogos. Los análogos pueden incluir varias mutaciones de una secuencia distinta de la secuencia peptídica que se da de manera natural. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia que se da de manera natural (preferiblemente en la porción del polipéptido fuera de el/los dominio(s) que forma(n) los contactos intermoleculares. Una sustitución conservativa de aminoácidos no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia principal (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debería tender a romper una hélice que existe en la secuencia original, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan a la secuencia original). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidos en la técnica en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton et al. *Nature* 354: 105 (1991).

El término "fragmento de polipéptido", como se usa en la presente memoria, se refiere a un polipéptido que tiene una delección aminoterminal y/o carboxiterminal, pero cuando la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia natural deducida, por ejemplo, a partir de una secuencia de ADN de longitud completa. Los fragmentos típicamente tienen una longitud de al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos, preferiblemente una longitud de al menos 14 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de al menos 20 aminoácidos, usualmente una longitud de al menos 50 aminoácidos, e incluso más preferiblemente una longitud de al menos 70 aminoácidos. El término "análogo", como se usa en la presente memoria, se refiere a polipéptidos que comprenden un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene una identidad sustancial con una porción de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene una unión específica a CD47, en condiciones de unión adecuadas. Típicamente, los análogos de polipéptidos comprenden una sustitución de aminoácido conservativa (o adición o delección) con respecto a la secuencia que se da de manera natural. Los análogos típicamente tienen al menos 20 aminoácidos de largo, preferiblemente al menos 50 aminoácidos de largo o más, y a menudo pueden ser tan largos como un polipéptido natural de longitud completa.

Los análogos de péptidos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido original. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "moléculas miméticas de péptidos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986), Veber y Freidinger *TINS* p. 392 (1985); y Evans et al. *J. Med. Chem.* 30: 1229 (1987). Tales compuestos se desarrollan a menudo con la ayuda de modelización molecular computarizada. Las moléculas miméticas de péptidos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un

polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH₂-, CH(OH)CH₂-, y -CH₂SO-, mediante métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) se puede usar para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de una secuencia consenso sustancialmente idéntica pueden generarse mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992)); por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

El término "agente" se usa en la presente memoria para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "etiqueta" o "marcado" se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de restos de biotín que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar mediante métodos ópticos o calorimétricos). En ciertas situaciones, la etiqueta o marcador también puede ser terapéutico. Se conocen diversos métodos para marcar polipéptidos y glicoproteínas en la técnica y se pueden usar. Los ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, entre otros, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcadores fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, lantánidos, fósforos), marcadores enzimáticos (p. ej., peroxidasa de rábano, p-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscentes, biotínulos, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un marcador secundario (p. ej., secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopo). En algunas realizaciones, las etiquetas están unidas por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el potencial impedimento estérico. El término "agente farmacéutico o fármaco", como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente.

El término "agente antineoplásico" se usa en la presente memoria para referirse a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir el desarrollo o la progresión de una neoplasia en un ser humano, particularmente una lesión maligna (cancerosa), como un carcinoma, sarcoma, linfoma o leucemia. La inhibición de la metástasis es frecuentemente una propiedad de los agentes antineoplásicos.

Se usan otros términos de química en la presente memoria de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como se ejemplifica en el Dictionary of Chemical Terms de McGraw-Hill (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Como se usa en la presente memoria, "sustancialmente pura" significa que una especie objetivo es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual de la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objetivo comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes.

En general, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente el 85%, 90%, 95% y 99%. Más preferiblemente, la especie objetivo se purifica hasta una homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales), en donde la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular.

Anticuerpos CD47

Los anticuerpos monoclonales de la invención tienen la capacidad de unirse a CD47, inhibir la unión de SIRPα a CD47, disminuir la señalización mediada por CD47-SIRPα, promover la fagocitosis e inhibir el crecimiento y/o la migración de tumores. La inhibición se determina, por ejemplo, utilizando el ensayo celular descrito en la presente memoria en los Ejemplos.

Los ejemplos de anticuerpos de la invención incluyen el anticuerpo 2A1, la versión quimérica de 2A1 y las variantes humanizadas de 2A1. Los anticuerpos ejemplares de la invención incluyen un anticuerpo que tiene una cadena pesada variable (VH) seleccionada de las SEQ ID N°: 5-30, y que tiene una cadena ligera variable (VL) seleccionada de las SEQ ID N°: 31-47. Específicamente, los anticuerpos ejemplares incluyen aquellos proporcionados en la Tabla 1.

Tabla 1.

Anticuerpo	Cadena pesada variable (VH)	Cadena ligera variable (VL)
2A1	SEQ ID N°: 5	SEQ ID N°: 31
2A1-xi	SEQ ID N°: 5	SEQ ID N°: 32
AB2.03	SEQ ID N°: 7	SEQ ID N°: 33
AB2.04	SEQ ID N°: 7	SEQ ID N°: 34
AB2.05	SEQ ID N°: 7	SEQ ID N°: 35
AB2.06	SEQ ID N°: 7	SEQ ID N°: 36
AB2.07	SEQ ID N°: 7	SEQ ID N°: 37
AB2.08	SEQ ID N°: 7	SEQ ID N°: 38
AB2.09	SEQ ID N°: 7	SEQ ID N°: 39
AB2.13	SEQ ID N°: 7	SEQ ID N°: 43
AB3.09	SEQ ID N°: 8	SEQ ID N°: 39
AB6.12	SEQ ID N°: 11	SEQ ID N°: 42
AB6.13	SEQ ID N°: 11	SEQ ID N°: 43
AB6.14	SEQ ID N°: 11	SEQ ID N°: 44
AB6.17	SEQ ID N°: 11	SEQ ID N°: 47
AB10.13	SEQ ID N°: 15	SEQ ID N°: 43
AB10.14	SEQ ID N°: 15	SEQ ID N°: 44
AB11.05	SEQ ID N°: 16	SEQ ID N°: 35
AB12.05	SEQ ID N°: 17	SEQ ID N°: 35
AB15.05	SEQ ID N°: 20	SEQ ID N°: 35
AB16.05	SEQ ID N°: 21	SEQ ID N°: 35
AB17.05	SEQ ID N°: 22	SEQ ID N°: 35
AB22.05	SEQ ID N°: 27	SEQ ID N°: 35
AB23.05	SEQ ID N°: 28	SEQ ID N°: 35
AB24.05	SEQ ID N°: 29	SEQ ID N°: 35
AB25.05	SEQ ID N°: 30	SEQ ID N°: 35

5 También se incluyen en la invención los anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los anticuerpos pueden unirse específicamente a un epítipo que incluye uno o más residuos de aminoácidos en el CD47 humano (véase, por ejemplo, el número de registro de GenBank Q08722.1).

La secuencia de aminoácidos de un CD47 humano ejemplar se proporciona a continuación (número de registro de GenBank Q08722.1 (GI: 1171879). La secuencia señal (aminoácidos 1-18) está subrayada.

```

1 mwplvaalll gsaccgsaql lfnktsvef tfcndtvvip cfvtnmeaqn
ttevyykwkf
61 kgrdiytdfg alnkstvptd fssakievsg llkgdaslkm dksdavshgt
nytcevtelt
121 regetiiek yrsvswfspn enilivifpi faillfwgqf giktlkyrsg
gmdektiall
181 vaglvitviv ivgailfvpg eyslknatgl glivtstgil illhyvfst
aigltsfvia
241 ilviqviayi lavvglslci aacipmhgpl lisglasilal aqllglvymk
fvasnqktiq
301 prkaveepl nafkeskgmm nde (SEQ ID N°: 48)

```

Para mayor claridad, a continuación se proporciona la secuencia de aminoácidos de un CD47 humano ejemplar que excluye la secuencia señal.

```

1 qllfnktskv eftfcndtvv ipcfvtnmea qnttevyvkw kfkgrdiytf
dgalnkstvp
61 tdfssakiev sqllkgdasl kmdksdavsh tgnytceve ltregetiie
lkyrvvswfs
121 pnenilivif pifaillfwg qfgiktlkyr sggmdektia llvaglvitv
ivivgailfv
181 pgeyslknat glglivtstg ilillhyyvf staigltsfv iailviqvia
yilavvglsl

241 ciaacipmhg pllisglsl alaqlglvy mkfvasnqkt iqpprkavee
plnafkeskg
301 mmnde (SEQ ID N°: 147)

```

5 La secuencia de aminoácidos de un dominio CD47-IgV humano ejemplar se proporciona a continuación:

```

19 qllfnktskv eftfcndtvv ipcfvtnmea qnttevyvkw kfkgrdiytf
dgalnkstvp
79 tdfssakiev sqllkgdasl kmdksdavsh tgnytceve ltregetiie lkyrvv
(SEQ ID N°: 49)

```

Los anticuerpos monoclonales ejemplares de la invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanizados que tienen una región de la cadena pesada variable (VH) y/o una región de la cadena ligera variable (VL) mostrada en las secuencias a continuación.

10 A continuación se proporcionan regiones de la cadena pesada variable (VH) de los anticuerpos CD47. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de la cadena VH de los anticuerpos CD47 se destacan a continuación. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de CDR1 de VH es GFNIKDYLLH (SEQ ID N°: 50), GYTFTYYLH (SEQ ID N°: 57), GFTFTYYLH (SEQ ID N°: 58), GYNFTYYLL (SEQ ID N°: 59), GYTITYYYH (SEQ ID N°: 60), GYTFKYLLH (SEQ ID N°: 61), GYTFT-DYYLH (SEQ ID N°: 62), GFTFTDYYLH (SEQ ID N°: 63), GFTITYLLH (SEQ ID N°: 64), GYTFKDYYLH (SEQ ID N°: 65), o GFTFKDYLLH (SEQ ID N°: 66). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de VH es WIDPDNGDTE (SEQ ID N°: 51), WIDPDQGDTE (SEQ ID N°: 72), WIDPDYGDTE (SEQ ID N°: 73), WIDPDSGDTE (SEQ ID N°: 74) WIDPDNADTE (SEQ ID N°: 75), o WIDPDNTDTE (SEQ ID N°: 76). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de CDR3 de VH es NAAYGSSSPMDY (SEQ ID N°: 52) o NAAYGSSPMDY (SEQ ID N°: 77).

```

20 EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPDNGDTEFAPKFQGGKATMTADT
SSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTSTVTV (SEQ ID N°: 5)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVSGFNIDYLLHWVQAPGKLEWVGWIDPDNGDTEYAEKFGQGRVTITADT
STDTAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTITVTV (SEQ ID N°: 6)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWVGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTITVTV (SEQ ID N°: 7)

EVQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWVGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTITVTV (SEQ ID N°: 8)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWVGWIDPDNGDTEYAQKFQGRVIMTADT
SSNTAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTITVTV (SEQ ID N°: 9)

25 QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWVGWIDPDNGDTEYAQKFQGRVIMTEDT
STDTAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTITVTV (SEQ ID N°: 10)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWVGWIDPDQGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTITVTV (SEQ ID N°: 11)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWVGWIDPDYGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTITVTV (SEQ ID N°: 12)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWVGWIDPDSGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTITVTV (SEQ ID N°: 13)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWVGWIDPDNADTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDYAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQGTITVTV (SEQ ID N°: 14)

```

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 15)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 16)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGYTFTYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 17)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFTFTYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 18)

5 QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFNFTYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 19)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGYTITYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 20)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGYTFKYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 21)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGYTFTDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 22)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFTFTDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 23)

10 QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFTITDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 24)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGYTFKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 25)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFTFKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 26)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYLQLSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 27)

QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSKASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLTSED TAVYYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 28)

15 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 29)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDYLLHWVQAPGKLEWMGWIDPDNDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYCNAAYGSSSPMDYWGQTTTV (SEQ ID N°: 30)

20 A continuación se proporcionan regiones de la cadena ligera variable (VL) de los anticuerpos CD47. Las CDRs de la
cadena VL de los anticuerpos CD47 se resaltan a continuación. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos
de CDR1 de VL es KASQDIIRYLS (SEQ ID N°: 53), RASQDIIRYLA (SEQ ID N°: 67), o RARQGIIRYLS (SEQ ID N°:
68). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de CDR2 de VL es RANRLVD (SEQ ID N°: 54), RANRLQS
(SEQ ID N°: 69), RANRRAT (SEQ ID N°: 70) o RANRLVS (SEQ ID N°: 71). En algunas realizaciones, la secuencia de
aminoácidos de CDR3 de VL es LQYDEFPYT (SEQ ID N°: 55).

DIKMTQSPSSLYASLGERVTITCKASQDIHRYLSWFQKPKGSPKILYRANRLVDGVP SRFSGSGSGQDYSLT
ISSLEYEDMGIIYYCLQYDEFPYTFGGGTRLEMK (SEQ ID N°: 31)

DIKMTQSPSSLYASLGERVTITCKASQDIHRYLSWFQKPKGSPKILYRANRLVDGVP SRFSGSGSGQDYSLT
ISSLEYEDMGIIYYCLQYDEFPYTFGGGTRLEIK (SEQ ID N°: 32)

25 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDIHRYLSWYQKPKGKAPKLLIYRANRLVDGVP SRFSGSGSGTDFTF
ISSLQPEDIATYYCLQYDEFPYTFGGGTRKVEIK (SEQ ID N°: 33)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDIHRYLSWFQKPKGKAPKSLIYRANRLVDGVP SRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTRKVEIK (SEQ ID N°: 34)

NIQMTQSPSAMSASVGDVRTITCKASQDIHRYLSWFQKPKGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID N°: 35)

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQDIHRYLSWFQKPKGKAPKRLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID N°: 36)

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDIHRYLAWYQKPKGKVPKLLIYRANRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDVATYYCLQYDEFPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID N°: 37)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHRYLAWYQKPKGQAPRLLIYRANRRATGIPARFSGSGSGTDFTLT
ISSLEPEDFAVYYCLQYDEFPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID N°: 38)

5 DIQMTQSPSAMSASVGDVRTITCKASQDIHRYLSWFQKPKGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID N°: 39)

NIQMTQSPSAMSASVGDVRTITCRARQGIHRYLSWFQKPKGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID N°: 40)

NIQMTQSPSAMSASVGDVRTITCKASQDIHRYLSWFQKPKGKVPKILIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID N°: 41)

NIQMTQSPSAMSASVGDVRTITCKASQDIHRYLSWFQKPKGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID N°: 42)

NIQMTQSPSAMSASVGDVRTITCRARQGIHRYLSWFQKPKGKVPKILIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID N°: 43)

10 NIQMTQSPSAMSASVGDVRTITCRARQGIHRYLSWFQKPKGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID N°: 44)

NIQMTQSPSAMSASVGDVRTITCKASQDIHRYLSWFQKPKGKVPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID N°: 45)

NIQMTQSPSAMSASVGDVRTITCKASQDIHRYLSWFQKPKGKVPKLLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID N°: 46)

NIQMTQSPSAMSASVGDVRTITCRARQGIHRYLSWFQKPKGKVPKLLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID N°: 47)

15 En algunos casos, los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria comprenden una región de la cadena pesada variable seleccionada de las SEQ ID N°: 5-30 y una región de la cadena ligera variable seleccionada de las SEQ ID N°: 31-47. Un anticuerpo CD47 ejemplar comprende una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 5 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 31; una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 7 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 35; una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 11 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 42, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 5 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 32, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 7 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 33, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 7 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 34, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 7 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 36, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 7 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 37, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 7 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 38, una región de la cadena pesada variable la expuesta en la SEQ ID N°: 29 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 35, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 30 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 35, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 7 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 43, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 11 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 43, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 11 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 47, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 15 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 43, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 15 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 44, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 11 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 44, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 22 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 35, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 7 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 39, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 8 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 39,

una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 16 y una la región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 35, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 20 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 35, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 21 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 35, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 17 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 35, una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 28 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 35, o una región de la cadena pesada variable expuesta en la SEQ ID N°: 27 y una región de la cadena ligera variable expuesta en la SEQ ID N°: 35.

Los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria comprenden cualquiera de las regiones VH proporcionadas en las SEQ ID N°: 5-30 emparejadas con cualquiera de las regiones VL proporcionadas en las SEQ ID N°s: 31-47. Específicamente, los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria comprenden una cualquiera de las regiones VH proporcionadas en las SEQ ID N°s: 5, 7, 8, 11, 15-17, 20-22 y 27-30 emparejadas con cualquiera de las regiones VL proporcionadas en las SEQ ID N°s: 31-39, 42, 43, 44 y 47.

Los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria comprenden cualquiera de las regiones CDR1 de VH proporcionadas en la SEQ ID N°: 50, SEQ ID N°: 57, SEQ ID N°: 58, SEQ ID N°: 59, SEQ ID N°: 60, SEQ ID N°: 61, SEQ ID N°: 62, SEQ ID N°: 63, SEQ ID N°: 64, SEQ ID N°: 65, y SEQ ID N°: 66, cualquiera de las regiones CDR2 de VH proporcionadas en la SEQ ID N°: 51, SEQ ID N°: 72, SEQ ID N°: 73, SEQ ID N°: 74, SEQ ID N°: 75, y SEQ ID N°: 76, cualquiera de las regiones CDR3 de VH proporcionadas en la SEQ ID N°: 52 y SEQ ID N°: 77, cualquiera de las regiones CDR1 de VL proporcionadas en la SEQ ID N°: 53, SEQ ID N°: 67 y SEQ ID N°: 68, cualquiera de las regiones CDR2 de VL proporcionadas en la SEQ ID N°: 54, SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, y SEQ ID N°: 71, y la región CDR3 de VL proporcionada en la SEQ ID N°: 55.

Los expertos en la técnica reconocerán que es posible determinar, sin excesiva experimentación, si un anticuerpo monoclonal tiene la misma especificidad que un anticuerpo monoclonal de la invención (por ejemplo, el anticuerpo 2A1 o un anticuerpo que tiene una cadena pesada variable seleccionada de SEQ ID N°s: 5-31, y una cadena ligera variable seleccionada de SEQ ID N°s: 31-47) determinando si la primera evita que la última se una a CD47. Si el anticuerpo monoclonal que se está ensayando compite con el anticuerpo monoclonal de la invención, como se muestra por una disminución en la unión del anticuerpo monoclonal de la invención, entonces los dos anticuerpos monoclonales se unen al mismo epítipo, o a uno muy relacionado.

Un método alternativo para determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la especificidad del anticuerpo monoclonal de la invención es preincubar el anticuerpo monoclonal de la invención con la proteína CD47 soluble (con la que normalmente es reactivo) y luego agregar el anticuerpo monoclonal que se está ensayando para determinar si el anticuerpo monoclonal que se está ensayando se inhibe en su capacidad de unirse a CD47. Si se inhibe el anticuerpo monoclonal que se está ensayando, entonces, con toda probabilidad, tiene la misma especificidad epítópica, o funcionalmente equivalente, que el anticuerpo monoclonal de la invención.

Anticuerpos de la presente invención

El cribado de los anticuerpos monoclonales de la invención también se puede llevar a cabo, por ejemplo, midiendo la señalización mediada por CD47 y/o CD47/SIRPα y determinando si el anticuerpo monoclonal de ensayo es capaz de modular, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar, neutralizar o interferir con la señalización mediada por CD47 y/o CD47/SIRPα. Estos ensayos pueden incluir ensayos de unión competitiva. Además, estos ensayos pueden medir una lectura biológica, por ejemplo, la capacidad de promover la fagocitosis de una célula que expresa CD47 por un macrófago, como se describe en el Ejemplo 9 (Figura 9).

Se pueden usar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD47, o contra derivados, fragmentos, análogos, homólogos u ortólogos de los mismos. (Véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E, y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Los anticuerpos completamente humanos son moléculas de anticuerpos en las que la secuencia completa tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, incluidas las CDRs, provienen de genes humanos. Dichos anticuerpos se denominan "anticuerpos humanos" o "anticuerpos completamente humanos" en la presente memoria. Los anticuerpos monoclonales humanos se preparan, por ejemplo, utilizando los procedimientos descritos en los ejemplos que se proporcionan a continuación. Los anticuerpos monoclonales humanos también pueden prepararse utilizando la técnica de trioma; la técnica de hibridoma de células B humanas (véase Kozbor, et al., 1983 *Immunol Today* 4: 72); y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, et al., 1985 En: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Pueden utilizarse anticuerpos monoclonales humanos y pueden producirse utilizando hibridomas humanos (véase Cote, et al., 1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030) o transformando células B humanas con el virus de Epstein Barr *in vitro* (véase Cole, et al., 1985 En: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96).

Los anticuerpos se purifican mediante técnicas bien conocidas, como la cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G, que proporcionan principalmente la fracción de IgG del suero inmune. Posteriormente, o alternativamente, el antígeno específico que es el objetivo de la inmunoglobulina buscada, o un epítipo del mismo, puede inmovilizarse

en una columna para purificar el anticuerpo inmune específico mediante cromatografía de afinidad. La purificación de las inmunoglobulinas la discute, por ejemplo, D. Wilkinson (The Scientist, publicado por The Scientist, Inc., Filadelfia, PA, Vol. 14, N° 8 (17 de abril de 2000), págs. 25-28).

5 Los anticuerpos CD47 de la invención son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales que modulan, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o de otra manera interfieren con la señalización celular mediada por CD47 y/o CD47/SIRP α , se generan, por ejemplo, inmunizando un animal con CD47 unido a membranas y/o soluble, tal como, por ejemplo, CD47 humano o un fragmento inmunogénico, derivado o variante del mismo. Alternativamente, el animal se inmuniza con células transfectadas con un vector que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica CD47, de manera que se expresa CD47 y se asocia con la superficie de las células transfectadas. Alternativamente, los anticuerpos se obtienen cribando una biblioteca que contiene el anticuerpo o las secuencias del dominio de unión al antígeno en función de la unión a CD47. Esta biblioteca se prepara, por ejemplo, en bacteriófagos como fusiones proteicas o peptídicas a una proteína de cubierta de bacteriófago que se expresa en la superficie de las partículas de fagos ensambladas y las secuencias de ADN codificantes contenidas dentro de las partículas de fagos (es decir, "biblioteca de presentación en fagos"). Los hibridomas resultantes de las fusiones de mieloma/células B luego se criban para determinar la reactividad hacia CD47.

15 Los anticuerpos monoclonales se preparan, por ejemplo, utilizando métodos de hibridoma, como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256: 495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, típicamente se inmuniza con un agente inmunizante para generar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*.

20 El agente inmunizante incluirá típicamente el antígeno proteico, un fragmento del mismo o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se usan linfocitos de sangre periférica si se desean células de origen humano, o células de bazo o ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Luego, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) págs. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas suelen ser células de mamíferos transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Usualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de las células deficientes de HGPRT.

25 Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, mantienen un alto nivel de expresión estable del anticuerpo mediante las células seleccionadas productoras de anticuerpos, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son las líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales. (Véase Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) págs. 51-63)).

30 El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede ensayarse para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Tales técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980). Además, en las aplicaciones terapéuticas de anticuerpos monoclonales, es importante identificar los anticuerpos que tienen un alto grado de especificidad y una alta afinidad de unión por el antígeno objetivo.

35 Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante, y cultivarlos mediante métodos habituales. (Véase Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) págs. 59-103). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, el medio de Eagle modificado de Dulbecco y el medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como ascitis en un mamífero.

40 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o líquido ascítico mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas como, por ejemplo, la proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

45 Los anticuerpos monoclonales también pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante, como los descritos en la patente de EE.UU. n° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas

de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped, como las células de ovario de hámster chino (CHO), células 293 de riñón embrionario humano (HEK), células COS de simio, PER.C6®, células NS0, SP2/0, YB2/0, o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de la secuencia codificante en lugar de las secuencias murinas homólogas (véase la patente de EE.UU. n° 4.816.567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina todo o parte de la secuencia codificante de un polipéptido distinto de inmunoglobulina. Dicho polipéptido distinto de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación con el antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Anticuerpos humanos y humanización de anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales de la invención incluyen anticuerpos completamente humanos o anticuerpos humanizados. Estos anticuerpos son adecuados para la administración a seres humanos sin generar una respuesta inmune por parte del ser humano contra la inmunoglobulina administrada.

Se genera un anticuerpo CD47, por ejemplo, utilizando los procedimientos descritos en los ejemplos que se proporcionan a continuación. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención se identifican utilizando una estrategia de inmunización modificada de RIMMS (sitios múltiples de inmunización repetitiva) en ratones y la posterior generación de hibridomas.

En otros métodos alternativos, se desarrolla un anticuerpo CD47, por ejemplo, utilizando métodos de expresión en fagos que usan anticuerpos que contienen solo secuencias humanas. Tales enfoques son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, en el documento WO92/01047 y la patente de EE.UU. n° 6.521.404. En este enfoque, se criba una biblioteca combinatoria de fagos que portan pares aleatorios de cadenas ligeras y pesadas utilizando una fuente natural o recombinante de CD47 o fragmentos del mismo. En otro enfoque, puede producirse un anticuerpo CD47 mediante un proceso en el que al menos una etapa del proceso incluye la inmunización de un animal transgénico no humano con proteína CD47 humana. En este enfoque, algunos de los loci de cadena ligera kappa y/o pesada endógena de este animal no humano xenogénico se han inhabilitado y son incapaces de llevar a cabo la reordenación necesaria para generar genes que codifiquen inmunoglobulinas en respuesta a un antígeno. Además, al menos el locus de la cadena pesada humana y al menos el locus de la cadena ligera humana se han transfectado de manera estable en el animal. Por lo tanto, en respuesta a un antígeno administrado, los loci humanos se reorganizan para proporcionar genes que codifican regiones variables humanas inmunoespecíficas para el antígeno. Por lo tanto, tras la inmunización, el xenotratón produce células B que secretan inmunoglobulinas totalmente humanas.

Se conoce bien una variedad de métodos en la técnica para producir animales no humanos xenogénicos. Por ejemplo, véanse las patentes de EE.UU. n° 6.075.181 y n° 6.150.584. Esta estrategia general se demostró en relación con la generación de las primeras cepas XenoMouse™ publicadas en 1994. Véase Green et al. Nature Genetics 7: 13-21 (1994). Véanse también las patentes de EE.UU. n°s 6.162.963; 6.150.584; 6.114.598; 6.075.181; y 5.939.598 y las patentes japonesas n°s 3 068 180 B2, 3 068 506 B2, y 3 068 507 B2, y la patente europea n° EP 0 463 151 B1 y las solicitudes de patente internacional n°s WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 y miembros de familias relacionadas.

En un enfoque alternativo, otros han utilizado un enfoque de "minilocus" en el que se imita un locus de Ig exógeno a través de la inclusión de piezas (genes individuales) del locus de Ig. Por lo tanto, uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu, y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) se forman en una construcción para la inserción en un animal. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n°s 5.545.806, 5.545.807; 5.591.669; 5.612.205; 5.625.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.643.763; 5.661.016; 5.721.367; 5.770.429; 5.789.215; 5.789.650; 5.814.318; 5.877.397; 5.874.299; 6.023.010; y 6.255.458; y la patente europea n° 0 546 073 B1; y las solicitudes de patente internacional n°s WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, y WO 98/24884 y miembros de familias relacionadas.

También se ha demostrado la generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los que, a través de la fusión de microcélulas, se han introducido grandes fragmentos de cromosomas, o cromosomas completos. Véanse las solicitudes de patentes europeas n°s 773 288 y 843 961.

Las respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) han llevado a la industria a preparar anticuerpos quiméricos o humanizados de otra manera. Si bien los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable inmunitaria, se espera que se observen ciertas respuestas de anticuerpos anti-quiméricos humanos (HACA), particularmente en aplicaciones crónicas o de dosis múltiples del anticuerpo. Por lo tanto, sería deseable proporcionar anticuerpos completamente humanos contra CD47 para reducir o mitigar las preocupaciones y/o los efectos de la respuesta de HAMA o HACA.

La producción de anticuerpos con una inmunogenicidad reducida también se realiza mediante técnicas de humanización, quimerización y expresión utilizando bibliotecas apropiadas. Se apreciará que los anticuerpos murinos o anticuerpos de otras especies pueden humanizarse o primatizarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Winter y Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) y Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992). El anticuerpo de interés puede diseñarse mediante técnicas de ADN recombinante para sustituir CH1, CH2, CH3, los dominios de la bisagra y/o el dominio estructural con la secuencia humana correspondiente (véase el documento WO 92102190 y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.792; 5.714.350; y 5.777.085). Además, el uso de ADNc de Ig para la construcción de genes de inmunoglobulina quiméricos se conoce en la técnica (Liu et al. *P.N.A.S.* 84: 3439 (1987) y *J. Immunol.* 139: 3521 (1987)). El ARNm se aísla de un hibridoma u otra célula que produce el anticuerpo y se usa para producir ADNc. El ADNc de interés puede amplificarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores específicos (patentes de EE.UU. n.ºs 4.683.195 y 4.683.202). Alternativamente, se crea una biblioteca y se criba para aislar la secuencia de interés. La secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo se fusiona luego con las secuencias de la región constante humana. Las secuencias de los genes de las regiones constantes humanas se pueden encontrar en Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, publicación del NIH n.º 91-3242. Los genes de la región C humana están fácilmente disponibles a partir de clones conocidos. La elección del isotipo se guiará por las funciones efectoras deseadas, como la fijación del complemento o la actividad en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Los isotipos preferidos son IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Se puede usar cualquiera de las regiones constantes de la cadena ligera humana, kappa o lambda. El anticuerpo quimérico humanizado se expresa luego mediante métodos convencionales.

Los fragmentos de anticuerpos, tales como Fv, F(ab')₂ y Fab se pueden preparar mediante la escisión de la proteína intacta, por ejemplo, mediante escisión con proteasas o escisión química. Alternativamente, se diseña un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción del fragmento F(ab')₂ incluiría secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y la región de la bisagra de la cadena H, seguido de un codón de terminación de la traducción para producir la molécula truncada.

Se pueden usar secuencias consenso de las regiones H y L J para diseñar oligonucleótidos para el uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para la unión posterior de los segmentos de la región V a los segmentos de la región C humana. El ADNc de la región C puede modificarse por mutagénesis dirigida para colocar un sitio de restricción en la posición análoga en la secuencia humana.

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, YACs, episomas derivados de EBV y similares. Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completa, con los sitios de restricción apropiados diseñados para que cualquier secuencia VH o VL pueda insertarse y expresarse fácilmente. En tales vectores, el corte y empalme usualmente ocurre entre el sitio donante de corte y empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de corte y empalme que precede a la región C humana, y también en las regiones de corte y empalme que ocurren dentro de los exones CH humanos. La poliadenilación y la terminación de la transcripción se producen en los sitios cromosómicos nativos posteriores a las regiones codificantes. El anticuerpo quimérico resultante se puede unir a cualquier promotor fuerte, incluidas las LTRs retrovirales, por ejemplo, el promotor temprano de SV-40, (Okayama et al. *Mol. Cell. Bio.* 3: 280 (1983), LTR del virus del sarcoma de Rous (Gorman et al. *P.N.A.S.* 79: 6777 (1982)), y LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (Grosschedl et al. *Cell* 41: 885 (1985)). También, como se apreciará, pueden usarse promotores nativos de Ig y similares.

Además, los anticuerpos humanos o anticuerpos de otras especies pueden generarse a través de tecnologías de expresión, que incluyen, sin limitación, la expresión en fagos, la expresión retroviral, la expresión ribosomal y otros métodos, utilizando métodos bien conocidos en la técnica, y las moléculas resultantes pueden someterse a maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que tales métodos son muy conocidos en la técnica. Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992), Hanes y Pluckthun *PNAS USA* 94: 4937-4942 (1997) (presentación ribosómica), Parmley y Smith *Gene* 73: 305-318 (1988) (presentación en fagos), Scott, *TIBS*, vol. 17: 241-245 (1992), Cwirla et al. *PNAS USA* 87: 6378-6382 (1990), Russel et al. *Nucl. Acids Research* 21: 1081-1085 (1993), Hoganboom et al. *Immunol. Reviews* 130: 43-68 (1992), Chiswell y McCafferty *TI-BTECH*; 10: 80-8A (1992), y la patente de EE.UU. n.º 5.733.743. Si se utilizan tecnologías de visualización para producir anticuerpos que no son humanos, dichos anticuerpos pueden humanizarse como se describe anteriormente.

Usando estas técnicas, se pueden generar anticuerpos hacia células que expresan CD47, formas solubles de CD47, epítopos o péptidos de los mismos, y sus bibliotecas de expresión (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.703.057) que luego se pueden cribar como se describió anteriormente en función de las actividades descritas en la presente memoria.

Los anticuerpos CD47 de la invención se pueden expresar mediante un vector que contiene un segmento de ADN que codifica el anticuerpo de cadena única descrito anteriormente.

Estos pueden incluir vectores, liposomas, ADN desnudo, ADN asistido por adyuvante, pistola de genes, catéteres, etc. Los vectores incluyen conjugados químicos tales como los descritos en el documento WO 93/64701, que tienen un grupo selectivo (por ejemplo, un ligando hacia un receptor de la superficie celular), y un resto de unión a ácido nucleico (por ejemplo, polilisina), un vector viral (por ejemplo, un vector viral de ADN o ARN), proteínas de fusión como las

descritas en el documento PCT/US95/02140 (WO 95/22618) que es una proteína de fusión que contiene un resto objetivo (por ejemplo, un anticuerpo específico para una célula objetivo) y un resto de unión a ácido nucleico (por ejemplo, una protamina), plásmidos, fagos, etc. Los vectores pueden ser cromosómicos, no cromosómicos o sintéticos.

5 Los vectores preferidos incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen los virus de la leucemia murina de Moloney. Se prefieren los vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores de viruela tales como vectores ortopox o avipox, vectores de herpesvirus tales como un vector del virus herpes simple I (HSV) (véase Geller, A. I. et al., *J. Neurochem*, 64: 487 (1995); Lim, F., et al., en *DNA Cloning: Mammalian Systems*, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford, Inglaterra) (1995); Geller, A. I. et al., *Proc. Nacional. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 7603 (1993); Geller, A. I., et al., *Proc Natl. Acad. Sci USA* 87: 1149 (1990), vectores de adenovirus (véase LeGal LaSalle et al., *Science*, 259:988 (1993); Davidson, et al., *Nat. Genet* 3:219 (1993); Yang, et al., *J. Virol.* 69:2004 (1995) y vectores de virus adenoasociados (véase Kapliitt, M. G., et al., *Nat. Genet.* 8: 148 (1994).

10 Los vectores virales de viruela introducen el gen en el citoplasma de las células. Los vectores de virus Avipox dan como resultado solo una expresión a corto plazo del ácido nucleico. Se prefieren vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados y vectores de virus herpes simple (HSV) para introducir el ácido nucleico en células neuronales. El vector de adenovirus da como resultado una expresión a más corto plazo (aproximadamente 2 meses) que el virus adenoasociado (aproximadamente 4 meses), que a su vez es más corta que los vectores de HSV. El vector particular elegido dependerá de la célula objetivo y de la afección a tratar. La introducción puede ser mediante técnicas habituales, por ejemplo, infección, transfección, transducción o transformación. Los ejemplos de modos de transferencia de genes incluyen, por ejemplo, ADN desnudo, precipitación con CaPO_4 , DEAE dextrano, electroporación, fusión de protoplastos, lipofección, microinyección celular y vectores virales.

15 El vector puede emplearse para dirigirse esencialmente a cualquier célula objetivo deseada. Por ejemplo, la inyección estereotáxica se puede usar para dirigir los vectores (por ejemplo, adenovirus, HSV) a una ubicación deseada. Además, las partículas pueden administrarse mediante infusión intracerebroventricular (ICV) utilizando un sistema de infusión con una minibomba, como un sistema de infusión SynchroMed. Un método basado en el flujo en masa, denominado convección, también ha demostrado ser eficaz para administrar moléculas grandes en áreas extensas del cerebro, y puede ser útil para administrar el vector a la célula objetivo. (Véase Bobo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2076-2080 (1994); Morrison et al., *Am. J. Physiol.* 266: 292-305 (1994)). Otros métodos que se pueden usar incluyen catéteres, inyección intravenosa, parenteral, intraperitoneal y subcutánea, y vía oral u otras vías de administración conocidas.

20 Estos vectores se pueden usar para expresar grandes cantidades de anticuerpos que se pueden usar de varias maneras. Por ejemplo, para detectar la presencia de CD47 en una muestra. El anticuerpo también se puede usar para tratar de unirse e interrumpir la interacción de CD47 y/o la interacción CD47/SIRP α y la señalización mediada por CD47/SIRP α .

25 Las técnicas pueden adaptarse para la producción de anticuerpos de cadena única específicos para una proteína antigénica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.946.778). Además, los métodos pueden adaptarse para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (véase, por ejemplo, Huse, et al., 1989 *Science* 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y efectiva de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada hacia una proteína o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la misma. Los fragmentos de anticuerpos que contienen los idiotipos de un antígeno proteico pueden producirse mediante métodos conocidos en la técnica, que incluyen, entre otros: (i) un fragmento F(ab')_2 producido mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento Fab generado por la reducción de los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')_2 ; (iii) un fragmento Fab generado mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor y (iv) fragmentos F_v .

30 La invención también incluye los fragmentos de CD47 F_v , Fab, Fab' y F(ab')_2 , anticuerpos CD47 de cadena única, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, nanocuerpos o VIIIIs), anticuerpos CD47 biespecíficos y anticuerpos CD47 heteroconjugados.

35 Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión hacia al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es hacia CD47. El segundo objetivo de unión es cualquier otro antígeno, y ventajosamente es una proteína de la superficie celular o un receptor o subunidad del receptor.

40 Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta generalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

45 Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-

antígeno) pueden fusionarse con secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión distintos y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, se puede diseñar la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo al reemplazar las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero respecto de otros productos finales indeseados, como los homodímeros.

Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando un enlace químico. Brennan et al., *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiole arsenito de sodio para estabilizar los ditioles cercanos e impedir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten luego en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte luego en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Además, los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a las células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y las células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos contra objetivos de tumores de mama humanos.

También se han descrito varias técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región de la bisagra para formar monómeros y luego se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión al antígeno. También se ha informado sobre otra estrategia para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena única (sFv). Véase, Gruber et al., *J. Immunol.* 152: 5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt et al., *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítomos diferentes, al menos uno de los cuales se origina en el antígeno proteico descrito en la presente memoria. Alternativamente, un brazo antigénico de una molécula de inmunoglobulina se puede combinar con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7) o receptores Fc para IgG (FcγR), como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para enfocar los mecanismos de defensa celular hacia la célula que expresa el antígeno. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para dirigir agentes citotóxicos hacia células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclidos, como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al antígeno proteico descrito en la presente memoria y además se une al factor tisular (TF).

Los anticuerpos heteroconjugados también se describen en la presente memoria. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para seleccionar como objetivo las células del sistema inmunitario hacia células no deseadas (véase la patente de EE.UU. nº 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por HIV (véanse los documentos WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* utilizando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluidos los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 4.676.980.

5 Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, para mejorar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con una señalización anormal de CD47. Por ejemplo, se pueden introducir residuos de cisteína en la región Fc, lo que permite la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o un aumento de la destrucción celular mediada por el complemento, y una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). (Véase Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Alternativamente, puede diseñarse un anticuerpo para que tenga regiones Fc dobles y, por lo tanto, puede tener capacidades mejoradas de lisis y ADCC. (Véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

10 La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

15 Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden usar incluyen la cadena A de la difteria, los fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de modicina, la cadena alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restriccina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Una variedad de radionucleidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

20 Los conjugados del anticuerpo y del agente citotóxico se fabrican utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (como el suberato de disuccinimidilo), aldehídos (como el glutaraldehído), compuestos bis-azido (como la bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como el bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor activos (como el 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminopentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. (Véase el documento WO94/11026).

25 Los expertos en la técnica reconocerán que puede acoplarse una gran variedad de restos posibles a los anticuerpos resultantes de la invención. (Véase, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, JM Cruse y RE Lewis, Jr (eds), Carger Press, Nueva York, (1989)).

30 El acoplamiento puede realizarse mediante cualquier reacción química que una las dos moléculas, siempre que el anticuerpo y el otro resto conserven sus actividades respectivas. Esta unión puede incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo, unión covalente, unión de afinidad, intercalación, unión coordinada y complejación. La unión preferida es, sin embargo, la unión covalente. La unión covalente se puede lograr mediante la condensación directa de las cadenas laterales existentes o mediante la incorporación de moléculas puente externas. Muchos agentes de unión bivalente o polivalente son útiles para acoplar moléculas de proteínas, tales como los anticuerpos de la presente invención, a otras moléculas. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametilen diaminas. Este listado no pretende ser exhaustivo de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la técnica, sino que es un ejemplo de los agentes de acoplamiento más comunes. (Véase Killen y Lindstrom, Jour. Immun. 133: 1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62: 185-216 (1982); y Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987)).

35 Los enlazadores preferidos se describen en la bibliografía. (Véase, por ejemplo, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44: 201-208 (1984) que describe el uso de MBS (éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida). Véase también la patente de EE.UU nº 5.030.719, que describe el uso de un derivado de acetil hidrazida halogenado acoplado a un anticuerpo por medio de un enlazador oligopeptídico. Los enlazadores particularmente preferidos incluyen: (i) clorhidrato de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida; (ii) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (succinimidil-6 [3-(2-piridilditio) propionamido] hexanoato (Pierce Chem. Co., nº de cat. 21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidil 6 [3-(2-piridilditio) -propianamida] hexanoato (Pierce Chem. Co. nº de cat. 2165-G); y (v) sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida: Pierce

Chem. Co., nº de cat. 24510) conjugado a EDC.

Los enlazadores descritos anteriormente contienen componentes que tienen atributos diferentes, lo que conduce a conjugados con propiedades fisicoquímicas diferentes. Por ejemplo, los ésteres sulfo-NHS de los carboxilatos de alquilo son más estables que los ésteres sulfo-NHS de los carboxilatos aromáticos. Los enlazadores que contienen NHS-éster son menos solubles que los ésteres sulfo-NHS. Además, el enlazador de SMPT contiene un enlace disulfuro limitado estéricamente, y puede formar conjugados con mayor estabilidad. Los enlaces disulfuro son, en general, menos estables que otros enlaces debido a que el enlace disulfuro se escinde *in vitro*, dando como resultado menos conjugado disponible. Sulfo-NHS, en particular, puede mejorar la estabilidad de los acoplamientos de carbodiimida. Los acoplamientos de carbodiimida (como el EDC) cuando se usan junto con sulfo-NHS, forman ésteres que son más resistentes a la hidrólisis que la reacción de acoplamiento de carbodiimida sola.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y las patentes de EE.UU. nºs 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con un tiempo de circulación mejorado se describen en la patente de EE.UU. nº 5.013.556.

Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse con los liposomas como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro.

Uso de anticuerpos contra CD47

Se apreciará que la administración de entidades terapéuticas de acuerdo con la invención se administrará con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan en formulaciones para proporcionar una transferencia, administración, tolerancia y similares mejorados. Una multitud de formulaciones apropiadas se pueden encontrar en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences (15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularmente el Capítulo 87 de Blaug, Seymour, en el mismo. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (como Lipofectin™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones aceite en agua y agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, siempre que el ingrediente activo en la formulación no sea inactivado por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véase también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32 (2): 210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203 (1-2): 1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci. 89 (8): 967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52: 238-311 (1998) y sus citas para obtener información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

En una realización, los anticuerpos de la invención, que incluyen un anticuerpo monoclonal de la invención, pueden usarse como agentes terapéuticos. Dichos agentes generalmente se emplearán para diagnosticar, pronosticar, monitorear, tratar, aliviar y/o prevenir una enfermedad o patología asociada con la expresión, actividad y/o señalización anormales de CD47 en un sujeto. Un régimen terapéutico se lleva a cabo identificando a un sujeto, por ejemplo, un paciente humano que sufre (o está en riesgo de desarrollar) una enfermedad o trastorno asociado con la expresión, actividad y/o señalización anormal de CD47, por ejemplo, un cáncer u otro trastorno neoplásico, utilizando métodos habituales. Se administra al sujeto una preparación de anticuerpo, preferiblemente uno que tiene alta especificidad y alta afinidad por su antígeno objetivo, y generalmente tendrá un efecto debido a su unión con el objetivo. La administración del anticuerpo puede anular o inhibir o interferir con la expresión, actividad y/o función de señalización del objetivo (por ejemplo, CD47). La administración del anticuerpo puede anular o inhibir o interferir con la unión del objetivo (por ejemplo, CD47) con un ligando endógeno (por ejemplo, SIRPα) al que se une de manera natural. Por ejemplo, el anticuerpo se une al objetivo y modula, bloquea, inhibe, reduce, antagoniza, neutraliza o de otra manera interfiere con la expresión, actividad y/o señalización de CD47.

Las enfermedades o trastornos relacionados con la expresión, actividad y/o señalización anormales de CD47 incluyen, a modo de ejemplo no limitante, cáncer hematológico y/o tumores sólidos. Los cánceres hematológicos incluyen, por ejemplo, leucemia, linfoma y mieloma. Ciertas formas de leucemia incluyen, a modo de ejemplo no limitante, la leucemia linfocítica aguda (LLA); leucemia mielóide aguda (LMA); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia mielógena crónica (LMC); trastorno mieloproliferativo/neoplasia (MPDS); y síndrome de mielodisplasia. Ciertas formas de linfoma incluyen, a modo de ejemplo no limitante, el linfoma de Hodgkin, el linfoma no Hodgkin de escasa malignidad y agresivo, el linfoma de Burkitt y el linfoma folicular (células pequeñas y células grandes). Ciertas formas de mieloma incluyen, a modo de ejemplo no limitante, el mieloma múltiple (MM), el mieloma de células gigantes, el mieloma de cadena pesada y el mieloma de cadenas ligeras o de Bence-Jones. Los tumores sólidos incluyen, por

ejemplo, tumores de mama, tumores de ovario, tumores de pulmón, tumores pancreáticos, tumores de próstata, tumores de melanoma, tumores colorrectales, tumores de pulmón, tumores de cabeza y cuello, tumores de vejiga, tumores de esófago, tumores de hígado y tumores de riñón.

5 Los síntomas asociados con cánceres y otros trastornos neoplásicos incluyen, por ejemplo, inflamación, fiebre, malestar general, fiebre, dolor, a menudo localizado en el área inflamada, pérdida de apetito, pérdida de peso, edema, dolor de cabeza, fatiga, erupción cutánea, anemia, debilidad muscular, fatiga muscular y síntomas abdominales como, por ejemplo, dolor abdominal, diarrea o estreñimiento.

10 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención se refiere en general a la cantidad necesaria para lograr un objetivo terapéutico. Como se señaló anteriormente, esta puede ser una interacción de unión entre el anticuerpo y su antígeno objetivo que, en ciertos casos, interfiere con el funcionamiento del objetivo. La cantidad requerida a administrar dependerá además de la afinidad de unión del anticuerpo por su antígeno específico, y también dependerá de la velocidad a la que un anticuerpo administrado se agota del volumen libre del sujeto al que se administra. Los intervalos comunes para la dosificación terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención pueden ser, a modo de ejemplo no limitante, de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Las frecuencias de dosificación comunes pueden variar, por ejemplo, de dos veces al día a una vez por semana.

La eficacia del tratamiento se determina en asociación con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar el trastorno inflamatorio relacionado en particular. El alivio de uno o más síntomas del trastorno relacionado con la inflamación indica que el anticuerpo confiere un beneficio clínico.

20 Los métodos para el cribado de anticuerpos que poseen la especificidad deseada incluyen, pero sin limitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y otras técnicas mediadas inmunológicamente conocidas en la técnica.

25 En otra realización, los anticuerpos dirigidos contra CD47 pueden usarse en métodos conocidos en la técnica relacionados con la localización y/o cuantificación de CD47 (por ejemplo, para el uso en la medición de niveles de CD47 y/o de CD47 y SIRP α en muestras fisiológicas apropiadas, para el uso en métodos de diagnóstico, para el uso en imagenología de proteínas, y similares). En una realización concreta, los anticuerpos específicos para CD47, o derivado, fragmento, análogo u homólogo del mismo, que contienen el dominio de unión al antígeno derivado del anticuerpo, se utilizan como compuestos farmacológicamente activos (denominados en lo sucesivo "Terapéuticos").

30 En otra realización, puede usarse un anticuerpo específico para CD47 para aislar un polipéptido CD47, mediante técnicas habituales, tales como inmovilización, cromatografía o inmunoprecipitación. Los anticuerpos dirigidos contra la proteína CD47 (o un fragmento de los mismos) se pueden utilizar de manera diagnóstica para controlar los niveles de proteína en el tejido como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento concreto. La detección se puede facilitar mediante el acoplamiento (es decir, la unión física) del anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, p-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos con grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aecurina, y los ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S o ³H.

35 En otra realización más, un anticuerpo de acuerdo con la invención puede usarse como agente para detectar la presencia de CD47 y/o ambas proteínas CD47 y SIRP α (o un fragmento de proteína del mismo) en una muestra. En algunas realizaciones, el anticuerpo contiene una etiqueta detectable. Los anticuerpos son policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Se utiliza un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab, scFv o F(ab')₂). El término "marcado", con respecto a la sonda o el anticuerpo, pretende abarcar el marcaje directo de la sonda o el anticuerpo mediante el acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable a la sonda o el anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo mediante la reactividad con otro reactivo que está directamente marcado. Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y el marcaje final de una sonda de ADN con biotina, de manera que se puede detectar con estreptavidina marcada con fluorescencia. El término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Includido dentro del uso del término "muestra biológica", por lo tanto, está la sangre y una fracción o componente de la sangre que incluye suero sanguíneo, plasma sanguíneo o linfa. Es decir, el método de detección de la invención se puede usar para detectar un analito de ARNm, una proteína o un ADN genómico en una muestra biológica tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de un analito de ARNm incluyen las hibridaciones de Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de una proteína analítica incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencias de Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de un analito de ADN genómico incluyen hibridaciones de Southern. Los procedimientos para realizar inmunoensayos se describen, por ejemplo, en "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", vol. 42, JR Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay",

E. Diamandis y T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; y "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Ámsterdam, 1985. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de un analito proteico incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo anti-analito proteico marcado. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radioactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto se pueden detectar mediante técnicas habituales de imagenología.

Administración terapéutica y formulaciones de anticuerpos CD47

Los anticuerpos de la invención (también denominados en la presente memoria "compuestos activos"), y los derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Los principios y consideraciones involucrados en la preparación de tales composiciones, así como una guía en la elección de los componentes, se proporcionan, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science And Practice Of Pharmacy 19 ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., Editores) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; y Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, Nueva York.

Tales composiciones comprenden típicamente el anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibitorio más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína objetivo. Por ejemplo, en función de las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que conservan la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína objetivo. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. (Véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)).

Tal como se usa en la presente memoria, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los vehículos adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia habitual en este campo. Los ejemplos preferidos de tales vehículos o diluyentes incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y 5% de albúmina de suero humano. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Una composición farmacéutica de la invención está formulada para ser compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones estériles inyectables. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una capacidad de inyección fácil. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida

en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son el secado al vacío y la liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada y filtrada del mismo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden incluirse en cápsulas de gelatina o comprimirse en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo líquido para el uso como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el vehículo líquido se aplica oralmente y se enjuaga y se expectora o se traga. Pueden incluirse agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante, como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o esteroides; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de un aerosol desde un recipiente o dispensador a presión que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan agentes penetrantes apropiados para la barrera a permeabilizar. Dichos agentes penetrantes se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa se puede lograr mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales, como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, como las formulaciones de liberación sostenida/controlada, que incluyen implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica.

Por ejemplo, los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxiétilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. n° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-glicólico degradables como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli(ácido D-(-)-3-hidroxi-butírico). Mientras que los polímeros como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos.

Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposomales (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales hacia antígenos virales) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. n° 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosis unitaria, como se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosis unitarias de la invención está

dictada por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se va a lograr, y las limitaciones inherentes a la técnica de composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de los individuos.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración.

10 La formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente que mejora su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citocina, agente quimioterapéutico o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito previsto.

15 En una realización, los compuestos activos se administran en una terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, que son útiles para tratar afecciones o trastornos patológicos, tales como diversas formas de cáncer, trastornos autoinmunes y enfermedades inflamatorias. El término "en combinación" en este contexto significa que los agentes se administran sustancialmente a la vez, ya sea simultánea o secuencialmente. Si se administra secuencialmente, al inicio de la administración del segundo compuesto, el primero de los dos compuestos es preferiblemente aún detectable a concentraciones efectivas en el sitio de tratamiento.

20 Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir uno o más anticuerpos de la invención coformulados con, y/o coadministrados con, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más inhibidores de factores de crecimiento y citoquinas, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores de enzimas y/o agentes citotóxicos o citostáticos, como se describe con más detalle a continuación. Dichas terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosis más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

25 Los agentes terapéuticos preferidos utilizados en combinación con un anticuerpo de la invención son aquellos agentes que interfieren en diferentes etapas en una respuesta inflamatoria. En una realización, uno o más anticuerpos descritos en la presente memoria pueden coformularse, y/o coadministrarse, con uno o más agentes adicionales, como otras citoquinas o antagonistas de factores de crecimiento (por ejemplo, receptores solubles, inhibidores peptídicos, moléculas pequeñas, fusiones de ligandos); o anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a otros objetivos (por ejemplo, anticuerpos que se unen a otras citoquinas o factores de crecimiento, sus receptores u otras moléculas de la superficie celular); y citoquinas antiinflamatorias o agonistas de las mismas.

30 Los anticuerpos pueden usarse como adyuvantes de vacunas contra trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias, etc. La combinación de adyuvantes para el tratamiento de estos tipos de trastornos es adecuada para el uso en combinación con una amplia variedad de antígenos de antígenos propios específicos, es decir, autoantígenos, involucrados en la autoinmunidad, por ejemplo, proteína básica de mielina; autoantígenos inflamatorios, por ejemplo, proteína peptídica amiloide, o antígenos de trasplante, por ejemplo, aloantígenos. El antígeno puede comprender péptidos o polipéptidos derivados de proteínas, así como fragmentos de cualquiera de los siguientes: sacáridos, proteínas, polinucleótidos u oligonucleótidos, autoantígenos, proteína peptídica amiloide, antígenos de trasplante, alérgenos u otros componentes macromoleculares. En algunos casos, se incluye más de un antígeno en la composición antigénica.

Diseño y generación de otras terapias

40 De acuerdo con la presente invención y basándose en la actividad de los anticuerpos que se producen y se caracterizan en la presente memoria con respecto a CD47, se facilita el diseño de otras modalidades terapéuticas más allá de los restos de anticuerpo. Tales modalidades incluyen, sin limitación, terapias de anticuerpos avanzadas, tales como anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas y agentes terapéuticos radiomarcados, generación de terapias peptídicas, terapias genéticas, particularmente intracuerpos, terapias antisentido y moléculas pequeñas.

45 Por ejemplo, en relación con los anticuerpos biespecíficos, se pueden generar anticuerpos biespecíficos que comprenden (i) dos anticuerpos, uno con una especificidad hacia CD47 y otro con una segunda molécula que se conjugan entre sí, (ii) un único anticuerpo que tiene una cadena específica hacia CD47 y una segunda cadena específica de una segunda molécula, o (iii) un anticuerpo de cadena única que tiene especificidad hacia CD47 y una segunda molécula. Dichos anticuerpos biespecíficos se generan utilizando técnicas que se conocen bien, por ejemplo, en relación con (i) y (ii) Véase, por ejemplo, Fanger et al. *Immunol Methods* 4: 72-81 (1994) y Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12125-168 (1992), y en relación con (iii) véase, por ejemplo, Trauneker et al. *Int. J. Cancer (Supl.)* 7: 51-52 (1992).

55 En relación con las inmunotoxinas, los anticuerpos pueden modificarse para actuar como inmunotoxinas utilizando técnicas que se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Vitetta *Immunol Today* 14: 252 (1993). Véase también la patente de EE.UU. n° 5.194.594. En relación con la preparación de anticuerpos radiomarcados, dichos anticuerpos modificados también pueden prepararse fácilmente utilizando métodos que se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Junghans et al. en *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Véanse también las patentes de EE.UU. n°s 4.681.581, 4.735.210, 5.101.827, 5.102.990

(RE 35.500), 5.648.471 y 5.697.902. Cada una de las inmunotoxinas y moléculas radiomarcadas es probable que destruya las células que expresan CD47.

En relación con la generación de péptidos terapéuticos, a través de la utilización de información estructural relacionada con CD47 y sus anticuerpos, tales como los anticuerpos de la invención o el cribado de bibliotecas de péptidos, se pueden generar péptidos terapéuticos que se dirigen contra CD47. El diseño y el cribado de la terapia con péptidos se discute en relación con Houghten et al. *Biotechniques* 13: 412-421 (1992), Houghten *PNAS USA* 82: 5131-5135 (1985), Pinalla et al. *Biotechniques* 13: 901-905 (1992), Blake y Litz-Davis *BioConjugate Chem.* 3: 510-513 (1992). Las inmunotoxinas y las moléculas radiomarcadas también pueden prepararse, y de manera similar, en relación con restos peptídicos como se discutió anteriormente en relación con los anticuerpos. Suponiendo que la molécula CD47 (o una forma, como una variante de corte y empalme o una forma alternativa) sea funcionalmente activa en un proceso de enfermedad, también será posible diseñar terapias genéticas y antisentido a través de técnicas convencionales. Tales modalidades se pueden utilizar para modular la función de CD47. En relación con esto, los anticuerpos de la presente invención facilitan el diseño y uso de ensayos funcionales relacionados con los mismos. Un diseño y una estrategia para la terapia antisentido se discuten con detalle en la solicitud de patente internacional n° WO 94/29444. El diseño y las estrategias para la terapia génica son muy conocidos. Sin embargo, en particular, el uso de técnicas de terapia génica que implican intracuerpos podría resultar particularmente ventajoso. Véase, por ejemplo, Chen et al. *Human Gene Therapy* 5: 595-601 (1994) y Marasco *Gene Therapy* 4: 11-15 (1997). El diseño general y las consideraciones relacionadas con la terapia génica también se analizan en la solicitud de patente internacional n° WO 97/38137.

El conocimiento obtenido a partir de la estructura de la molécula CD47 y sus interacciones con otras moléculas de acuerdo con la presente invención, como SIRP α y/o los anticuerpos de la invención, y otros pueden utilizarse para diseñar racionalmente modalidades terapéuticas adicionales. En este sentido, se pueden utilizar técnicas de diseño racional de medicamentos como la cristalografía de rayos X, la modelización molecular asistida por computadora (CMM), la relación estructura-actividad cuantitativa o cualitativa (QSAR) y tecnologías similares para enfocar los esfuerzos de descubrimiento de medicamentos. El diseño racional permite la predicción de proteínas o estructuras sintéticas que pueden interactuar con la molécula o formas específicas de la misma que se pueden usar para modificar o modular la actividad de IL-6Rc. Dichas estructuras pueden sintetizarse químicamente o expresarse en sistemas biológicos. Este enfoque ha sido revisado en Capsey et al. *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs* (Stockton Press, NY (1988)). Además, las bibliotecas combinatorias pueden diseñarse y sintetizarse y usarse en programas de cribado, como los esfuerzos de cribado de alto rendimiento.

Métodos de cribado

En la presente memoria se describen métodos (también llamados "ensayos de cribado") para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes candidatos o de ensayo (por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que modulan o interfieren con la unión de CD47 a SIRP α , o compuestos o agentes candidatos o de ensayo que modulan o interfieren con la función de señalización de CD47 y/o CD47-SIRP α . También se proporcionan métodos para identificar compuestos útiles para tratar trastornos asociados con la expresión, actividad y/o señalización anormales de CD47 y/o CD47-SIRP α . Los métodos de cribado pueden incluir los conocidos o utilizados en la técnica o los descritos en la presente memoria. Por ejemplo, CD47 puede inmovilizarse en una placa de microtitulación e incubarse con un compuesto candidato o compuesto de ensayo, por ejemplo, un anticuerpo CD47, en presencia de SIRP α . Posteriormente, la SIRP α unida puede detectarse utilizando un anticuerpo secundario, y la absorbancia puede detectarse en un lector de placas.

También se proporcionan métodos para identificar compuestos capaces de promover la fagocitosis de células tumorales por los macrófagos. Estos métodos pueden incluir los conocidos o utilizados en la técnica o los descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los macrófagos se incuban con células tumorales marcadas en presencia de un compuesto candidato, por ejemplo, un anticuerpo CD47. Después de un período de tiempo, se puede observar en los macrófagos la internalización de la etiqueta tumoral para identificar la fagocitosis. En los ejemplos se proporcionan detalles adicionales con respecto a estos métodos, por ejemplo, ensayos de bloqueo de SIRP α y ensayos de fagocitosis.

Los compuestos identificados en los ensayos de cribado se describen en la presente memoria.

En la presente memoria se describen ensayos para seleccionar compuestos de ensayo o candidatos que modulan la función de señalización de CD47. Los compuestos de ensayo pueden obtenerse utilizando cualquiera de los numerosos enfoques de los métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, que incluyen: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase sólida o de fase de disolución paralelas direccionables espacialmente; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren la deconvolución; el método de la biblioteca de "una perla, un compuesto"; y métodos de bibliotecas sintéticas que utilizan la selección mediante cromatografía de afinidad. El enfoque de la biblioteca biológica se limita a las bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a las bibliotecas de compuestos peptídicos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas. (Véase, por ejemplo, Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145).

Una "molécula pequeña", como se usa en la presente memoria, se refiere a una composición que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 5 kD, y lo más preferiblemente inferior a aproximadamente 4 kD. Las moléculas

pequeñas pueden ser, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, moléculas peptidomiméticas, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. Las bibliotecas de mezclas químicas y/o biológicas, tales como extractos de hongos, bacterias o algas, se conocen en la técnica y pueden cribarse con cualquiera de los ensayos descritos en la presente memoria.

5 Se pueden encontrar ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares en la técnica, por ejemplo en: DeWitt, et al., 1993. Proc. Natl Acad Sci. U.S.A. 90: 6909; Erb, et al., 1994. Proc. Natl Acad Sci. U.S.A. 91: 11422; Zuckermann, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 2678; Cho, et al., 1993. Science 261: 1303; Carrell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; y Gallop, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 1233.

10 Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en disolución (véase, por ejemplo, Houghten, 1992. Biotechniques 13: 412-421), o en esferas (véase Lam, 1991. Nature 354: 82-84), en chips (véase Fodor, 1993. Nature 364: 555-556), bacterias (véase la patente de EE.UU. nº 5.223.409), esporas (véase la patente de EE.UU. 5.233.409), plásmidos (véase Cull, et al., 1992. Proc. Natl Acad Sci. USA 89: 1865-1869) o en fagos (véase Scott y Smith, 1990). Science 249: 386-390; Devlin, 1990. Science 249: 404-406; Cwirla, et al., 1990. Proc. Natl Acad Sci. U.S.A. 87: 6378-6382; Felici, 1991. J. Mol. Biol. 222: 301-310; y la patente de EE.UU. nº 5.233.409).

15 Se puede introducir un compuesto candidato en un complejo anticuerpo-antígeno y determinar si el compuesto candidato altera el complejo anticuerpo-antígeno, en donde una alteración de este complejo indica que el compuesto candidato modula la función de señalización de CD47 y/o la interacción entre CD47 y SIRP α . En otro aspecto, un CD47 soluble y/o ambas proteínas CD47 y SIRP α se exponen a al menos el anticuerpo monoclonal neutralizante. Se detecta la formación de un complejo anticuerpo-antígeno, y se introducen uno o más compuestos candidatos en el complejo. Si el complejo anticuerpo-antígeno se altera después de la introducción de uno o más compuestos candidatos, los compuestos candidatos son útiles para tratar los trastornos asociados con la señalización anormal de CD47 y/o CD47-SIRP α .

20 La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de interferir o interrumpir el complejo antígeno-anticuerpo se puede lograr, por ejemplo, mediante el acoplamiento del compuesto de ensayo con un radioisótopo o un marcador enzimático tal que la unión del compuesto de ensayo al antígeno o a la parte biológicamente activa del mismo puede determinarse detectando el compuesto marcado en un complejo. Por ejemplo, los compuestos de ensayo pueden marcarse con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^3H , ya sea directa o indirectamente, y el radioisótopo puede detectarse mediante recuento directo de radioemisión o mediante recuento de centelleo. Alternativamente, los compuestos de ensayo pueden marcarse enzimáticamente, por ejemplo, con peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o luciferasa, y el marcador enzimático se detecta mediante la determinación de la conversión de un sustrato apropiado en un producto.

25 En un aspecto, el ensayo comprende poner en contacto un complejo anticuerpo-antígeno con un compuesto de ensayo, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo de interactuar con el antígeno o alterar de otro modo el complejo existente anticuerpo-antígeno. En este aspecto, determinar la capacidad del compuesto de ensayo de interactuar con el antígeno y/o alterar el complejo anticuerpo-antígeno comprende determinar la capacidad del compuesto de ensayo de unirse preferentemente al antígeno o a una parte biológicamente activa del mismo, en comparación con el anticuerpo.

30 En otro aspecto, el ensayo comprende poner en contacto un complejo anticuerpo-antígeno con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo de modular el complejo anticuerpo-antígeno. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo de modular el complejo anticuerpo-antígeno se puede lograr, por ejemplo, determinando la capacidad del antígeno de unirse o interactuar con el anticuerpo, en presencia del compuesto de ensayo.

35 Los expertos en la técnica reconocerán que, en cualquiera de los métodos de cribado descritos en la presente memoria, el anticuerpo puede ser un anticuerpo neutralizante, que modula o de otra manera interfiere con la actividad y/o señalización de CD47.

40 Los métodos de selección descritos en la presente memoria pueden realizarse como un ensayo basado en células o como un ensayo sin células. Los ensayos sin células son susceptibles de usar la forma soluble o la forma unida a membranas de CD47 y sus fragmentos. En el caso de los ensayos sin células que comprenden la forma de CD47 unida a membranas, puede ser deseable utilizar un agente solubilizante de modo que la forma de las proteínas unidas a membranas se mantenga en disolución. Los ejemplos de dichos agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecopolí(etilenglicol éter) $_n$, sulfonato de N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano, sulfonato de 3-(3-colamidopropil) dimetilamonio-1-propano (CHAPS), o sulfonato de 3-(3-colamidopropil) dimetilamonio-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO).

45 En más de un ejemplo, puede ser deseable inmovilizar el anticuerpo o el antígeno para facilitar la separación de las formas complejadas de las formas sin complejar de uno o ambos después de la introducción del compuesto candidato, así como para adaptar la automatización del ensayo. La observación del complejo anticuerpo-antígeno en presencia y ausencia de un compuesto candidato puede realizarse en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos.

Los ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. En un aspecto, se puede proporcionar una proteína de fusión que agrega un dominio que permite que una o ambas proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión GST-anticuerpo o las proteínas de fusión GST-antígeno se pueden adsorber en esferas de glutatión-seferosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que luego se combinan con el compuesto de ensayo, y la mezcla se incuba en condiciones propicias para la formación de complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de salinidad y pH). Después de la incubación, las esferas o los pocillos de la placa de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente sin unir, la matriz se inmoviliza en el caso de las perlas, y el complejo se determina directa o indirectamente. Alternativamente, los complejos pueden disociarse de la matriz, y el nivel de formación de complejos anticuerpo-antígeno puede determinarse utilizando técnicas habituales.

También se pueden usar otras técnicas para inmovilizar proteínas en matrices en los ensayos de cribado. Por ejemplo, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo 2A1 o un anticuerpo que tiene una cadena pesada variable seleccionada de las SEQ ID N°: 5-30 y una cadena ligera variable seleccionada de las SEQ ID N°s: 31-47) o el antígeno (por ejemplo, la proteína CD47) se puede inmovilizar utilizando la conjugación con biotina y estreptavidina. El anticuerpo biotinilado o las moléculas de antígeno se pueden preparar a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, un kit de biotilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), e inmovilizarlas en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertos de estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, otros anticuerpos reactivos con el anticuerpo o el antígeno de interés, pero que no interfieren con la formación del complejo anticuerpo-antígeno de interés, pueden derivatizarse en los pocillos de la placa, y el anticuerpo o antígeno sin unir se atrapa en los pocillos mediante conjugación con los anticuerpos. Los métodos para detectar tales complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen la inmunodetección de complejos usando otros anticuerpos reactivos con el anticuerpo o el antígeno.

Los nuevos agentes pueden identificarse mediante cualquiera de los ensayos de cribado mencionados anteriormente y pueden usarse para los tratamientos como se describe en la presente memoria.

25 Formulaciones de diagnóstico y profilácticas

Los MAb CD47 de la invención se usan en formulaciones de diagnóstico y profilácticas. En una realización, un MAb CD47 de la invención se administra a pacientes que tienen riesgo de desarrollar una o más de las enfermedades mencionadas anteriormente, tales como, por ejemplo, sin limitación, cáncer u otra afección neoplásica. La predisposición de un paciente o de un órgano a uno o más de los cánceres mencionados anteriormente u otras afecciones neoplásicas se puede determinar utilizando marcadores genotípicos, serológicos o bioquímicos.

En otra realización de la invención, el anticuerpo CD47 se administra a individuos humanos diagnosticados con una indicación clínica asociada con una o más de las enfermedades mencionadas anteriormente, tales como, por ejemplo, sin limitación, cáncer u otra afección neoplásica. En el momento del diagnóstico, el anticuerpo CD47 se administra para mitigar o revertir los efectos de la indicación clínica asociada con una o más de las enfermedades mencionadas anteriormente.

Los anticuerpos de la invención también son útiles en la detección de CD47 y/o SIRP α en muestras de pacientes y, por consiguiente, son útiles como agentes de diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos CD47 de la invención se usan en ensayos *in vitro*, por ejemplo, ELISA, para detectar los niveles de CD47 y/o SIRP α en una muestra de un paciente.

En una realización, un anticuerpo CD47 de la invención se inmoviliza sobre un soporte sólido (por ejemplo, el/los pocillo(s) de una placa de microtitulación). El anticuerpo inmovilizado sirve como anticuerpo de captura para cualquier CD47 y/o SIRP α que pueda estar presente en una muestra de ensayo. Antes de poner en contacto el anticuerpo inmovilizado con una muestra del paciente, el soporte sólido se lava y se trata con un agente bloqueante, como proteína de la leche o albúmina, para evitar la adsorción inespecífica del analito.

Posteriormente, los pocillos se tratan con una muestra de ensayo sospechosa de contener el antígeno, o con una disolución que contiene una cantidad habitual del antígeno. Dicha muestra es, por ejemplo, una muestra de suero de un sujeto sospechoso de tener niveles de antígeno circulante considerados como diagnósticos de una patología. Después de lavar la muestra de ensayo o el patrón, el soporte sólido se trata con un segundo anticuerpo que está marcado de manera detectable. El segundo anticuerpo marcado sirve como un anticuerpo de detección. Se mide el nivel de etiqueta detectable, y la concentración de CD47 y/o SIRP α en la muestra de ensayo se determina mediante la comparación con una curva patrón desarrollada a partir de las muestras de patrones.

Se apreciará que, basándose en los resultados obtenidos utilizando los anticuerpos CD47 de la invención en un ensayo de diagnóstico *in vitro*, es posible clasificar una enfermedad (por ejemplo, una indicación clínica asociada con isquemia, un trastorno autoinmune o inflamatorio) en un sujeto basándose en los niveles de expresión de CD47 y/o SIRP α . Para una enfermedad concreta, se toman muestras de sangre de sujetos diagnosticados en varias etapas de progresión de la enfermedad y/o en varios puntos del tratamiento terapéutico de la enfermedad. Usando una población de muestras que proporciona resultados estadísticamente significativos para cada etapa de progresión o terapia, se designa un rango de concentraciones del antígeno que puede considerarse característico de cada etapa.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluidos los experimentos realizados y los resultados obtenidos, se proporcionan solo con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

EJEMPLO 1: Generación y selección de anticuerpos contra CD47

- 5 Los anticuerpos CD47 se generaron inmunizando ratones con una proteína recombinante que representa CD47-IgV (tipo variable similar a inmunoglobina), implementando una estrategia de inmunización rápida modificada en múltiples sitios (Kilpatrick et al. (1997) Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies using RIMMS. Hybridoma 16, 381-389). Además, la mitad de los ratones del grupo inmunizado recibió una única inyección del anticuerpo agonista de anti-GITR de ratón, DTA-1. Siguiendo el programa de inmunización, los ganglios linfáticos de todos los ratones (tratados con DTA-1 y sin tratar) se recolectaron y se disociaron, lo que permitió el aislamiento de las células B y la posterior fusión con una línea celular de mieloma de ratón. Los sobrenadantes de hibridoma se cribaron para determinar su unión a CD47 mediante ELISA y mediante citometría de flujo en células Daudi (ATCC n° CCL-213) (Figura 1A). Los sobrenadantes de los hibridomas también se analizaron con respecto a la capacidad de bloquear la interacción CD47-SIRP α (Figura 1B). El CD47 recombinante se inmovilizó en una placa de microtitulación Medisorp (NUNC) y posteriormente se incubó con los sobrenadantes de hibridoma en presencia de SIRP α -ECD humana recombinante fusionada con un dominio Fc de IgG humana. La SIRP α unida se detectó utilizando un anticuerpo secundario específico anti-Fc de IgG humana conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch), y se detectó la absorbancia a 650 nm en el lector de placas.

EJEMPLO 2: Caracterización de los anticuerpos CD47

- 20 Los ejemplos de anticuerpos CD47 murinos de la presente invención se muestran en la Figura 2. La clasificación de afinidad de los anticuerpos CD47 bloqueantes de SIRP α se realizó mediante citometría de flujo con células Raji (ATCC n° CCL-86) (Figura 2A) y CCRF-CEM (ATCC n° CCL-119) (Figura 2B). Los anticuerpos CD47 unidos se detectaron utilizando un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch). El anticuerpo CD47 conocido en la técnica, B6H12, se incluyó como control positivo (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.057.604). En la Figura 2B, tanto el B6H12 como el 2D3, un anticuerpo no bloqueante de SIRP α disponible en el mercado, se compararon con los anticuerpos generados en la presente memoria. Los anticuerpos de la presente invención muestran una mayor afinidad hacia la forma endógena (de la superficie celular) de CD47 en comparación con los anticuerpos B6H12 y 2D3.

EJEMPLO 3: Actividad bloqueante de SIRP α de los anticuerpos CD47

- 30 La potencia del bloqueo de SIRP α por los anticuerpos CD47 se midió mediante un ELISA en el que se inmovilizó el CD47-IgV recombinante etiquetado con His en una placa de microtitulación Medisorp. La unión de SIRP α recombinante fusionada a un dominio Fc de IgG humana se monitorizó en presencia de cantidades crecientes de los anticuerpos CD47. La SIRP α unida se determinó utilizando un anticuerpo secundario anti-IgG humana (específico de Fc) conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch). Los anticuerpos de la presente invención muestran una potencia mejorada del bloqueo de SIRP α en comparación con el anticuerpo B6H12. La Figura 3A muestra datos representativos del ensayo de bloqueo de SIRP α basado en ELISA.

- Los anticuerpos CD47 se analizaron mediante citometría de flujo para determinar su capacidad de bloquear la unión de SIRP α recombinante a CD47 de la superficie celular. Se usaron células CCRF-CEM (ATCC n° CCL-119) como fuente de CD47 en el ensayo y se controló la unión de SIRP α recombinante fusionada a un dominio Fc de IgG humana en presencia de cantidades crecientes de los anticuerpos CD47. La SIRP α unida se determinó utilizando un anticuerpo secundario anti-IgG humana (específico de Fc) conjugado con APC (Jackson ImmunoResearch) (Figura 3B). B6H12 y el anticuerpo CD47 no bloqueante de SIRP α , 2D3, disponible en el mercado se usaron como controles positivos y negativos, respectivamente.

EJEMPLO 4: Interacciones homotípicas mediadas por anticuerpos CD47

- 45 Los anticuerpos CD47 bloqueantes de SIRP α se analizaron para determinar su capacidad de inducir la agrupación celular, conocida como interacciones homotípicas, entre células positivas para CD47. Se utilizaron células Daudi y Raji como líneas celulares de expresión de CD47 candidatas. Entre los anticuerpos examinados, el anticuerpo 2A1 de la presente invención fue el único anticuerpo bloqueante de SIRP α que no promovió las interacciones homotípicas de las células que expresaban CD47.

- 50 EJEMPLO 5: Actividad de hemaglutinación de los anticuerpos CD47

- Un ejemplo de una interacción homotípica es la hemaglutinación, como lo demuestra la agregación de RBCs. Los anticuerpos CD47 se cribaron en función de la aglutinación de RBCs, como se observa por la capacidad de un anticuerpo de impedir la sedimentación de RBCs humanos. Inesperadamente, se descubrió que el anticuerpo 2A1 era único entre los otros anticuerpos CD47 por su incapacidad de promover la hemaglutinación, mientras que tenía una alta afinidad y la capacidad de bloquear SIRP α . Otros anticuerpos que mostraron una hemaglutinación reducida no bloquearon la unión de SIRP α a CD47.

Para evaluar la capacidad hemaglutinante de los anticuerpos CD47, los RBCs humanos se diluyeron al 10% en PBS y se incubaron a 37 °C durante 2 a 6 horas con una titulación de anticuerpos CD47 en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. La evidencia de hemaglutinación se demuestra por la presencia de glóbulos rojos no sedimentados, que aparecen como una turbidez en comparación con un punto rojo punteado de glóbulos rojos no hemaglutinados. Inesperadamente, como se muestra en la Figura 4A, los anticuerpos CD47 de la invención, en particular el anticuerpo al que se hace referencia en la presente memoria como 2A1, no mostraron actividad hemaglutinante. El gráfico muestra la cuantificación del ensayo de hemaglutinación, denominado "índice de hemaglutinación" determinada mediante la cuantificación del área del sedimento de RBCs en presencia del anticuerpo, normalizada respecto de la que se da en ausencia del anticuerpo.

- 5 El anticuerpo murino 9E4 causó la hemaglutinación más profunda a todas las concentraciones probadas. Por lo tanto, el anticuerpo 9E4 se une a CD47 y bloquea la interacción de CD47 con SIRP α ; sin embargo, el anticuerpo 9E4 causa una hemaglutinación profunda.

La región de la cadena VH del anticuerpo 9E4 se proporciona a continuación.

EVQLRQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYMYWVKQSRVRS¹LAWIGRINPYTGATGYDQNF²KDKASLIVDK
SSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGRNR³YDGFAYWGQGLVTV (SEQ ID N°: 78)

- 15 La región de la cadena VL del anticuerpo 9E4 se proporciona a continuación.

EIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLT
ISNLDQEDIATYFCQQGNALPPTFGGGTNLEIK (SEQ ID N°: 79)

El anticuerpo de control B6H12 causó hemaglutinación como se espera para los anticuerpos CD47 bloqueantes de SIRP α .

- 20 Con el fin de investigar la singularidad de la actividad no hemaglutinante del anticuerpo 2A1, muchos otros anticuerpos CD47 se cribaron en el ensayo de hemaglutinación de glóbulos rojos (Figura 4B). En este ensayo se incluyó la versión quimérica del anticuerpo 2A1 (2A 1-xi), que consiste en la región de la cadena pesada variable murina de 2A1, la región de la cadena ligera variable murina de 2A1 modificada en el aminoácido 106 (es decir, M106I), y las regiones constantes de IgG1 humana e Igkappa humana. Las secuencias de las regiones VH y VL del anticuerpo 2A1 y el anticuerpo 2A1-xi se proporcionan en la Tabla 1. Los anticuerpos se probaron a 12,5, 25, 50 y 100 nM. Inesperadamente, el 2A1 es raro entre los anticuerpos CD47 examinados en la Figura 4B, ya que fue el único anticuerpo de la Figura 4B con actividades hemaglutinantes inexistentes o reducidas. La Figura 4E muestra que 2A1, 2A1 quimérico (2A1-xi) y las variantes humanizadas no causan hemaglutinación.

- 30 La Figura 4C muestra los resultados del cribado de anticuerpos CD47 adicionales en el ensayo de hemaglutinación de RBCs. Como se muestra en la Figura 4C, el anticuerpo monoclonal CD47 disponible en el mercado, 2D3, que no bloquea SIRP α , no provocó hemaglutinación. Sin embargo, otros anticuerpos CD47 disponibles comercialmente (por ejemplo, CC2C6, BRIC126 y B6H12) que bloquean SIRP α provocaron hemaglutinación (Figura 4C). Por lo tanto, antes de la invención descrita en la presente memoria, los anticuerpos existentes que bloqueaban SIRP α provocaban hemaglutinación, mientras que los anticuerpos existentes, como 2D3, que no bloquearon SIRP α no provocaron hemaglutinación. Tomados en conjunto, los anticuerpos de la invención (por ejemplo, el anticuerpo 2A1 y sus derivados humanizados) son únicos entre los anticuerpos CD47 existentes por su capacidad de bloquear SIRP α , pero no causar hemaglutinación.

- 35 Se volvió a probar un rango de alta concentración de anticuerpos CD47 seleccionados en el ensayo de hemaglutinación (Figura 4D). Este ensayo reveló un efecto prozona de la hemaglutinación mediante B6H12 y 9E4, en donde la hemaglutinación se redujo en los extremos alto y bajo del rango de concentración ensayado. La representación gráfica del índice de hemaglutinación también resalta el efecto prozona. El efecto prozona también fue evidente en las Figuras 4C y 4E. Es importante destacar que los anticuerpos CD47 2A1 de ratón y 2A1 quiméricos no tuvieron actividad hemaglutinante a ninguna de las concentraciones.

Como se muestra en la Figura 4E, el anticuerpo murino 1134 mostró un rango estrecho de hemaglutinación.

La región de la cadena VH del anticuerpo 1B4 se proporciona a continuación.

QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYIHWVKQRPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNERFKGKATLVAT
45 SSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCARREEDYFDYWGQGLVTV (SEQ ID N°: 80)

La región de la cadena VL del anticuerpo 1B4 se proporciona a continuación.

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLTWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSG
TDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID N°: 81)

La capacidad hemaglutinante de los anticuerpos humanizados derivados del 2A1 murino se ensayó como se indicó anteriormente. Es importante destacar que el anticuerpo humanizado representativo AB6.12 en numerosos isotipos de IgG humana (IgG1, IgG4-S228P e IgG4-S228P/L235E) no causó hemaglutinación de RBCs. 2A1 y 2A1-xi se incluyeron como controles para anticuerpos no hemaglutinantes, mientras que B6H12 y 9E4 se incluyeron como controles positivos para la hemaglutinación (Figura 4F).

EJEMPLO 6: Unión a CD47 de mono cynomolgus

Se evaluó la capacidad del 2A1 murino de unirse al CD47 de mono cynomolgus (cyno). Se ha informado previamente que el anticuerpo B6H12 tiene reactividad cruzada con CD47 cyno, y se usó como control positivo para la presencia en CD47 cyno en el ensayo. El experimento para medir la unión de 2A1 a CD47 de mono cynomolgus se diseñó para comparar la unión de 2A1 a CD47 en células B de mono cynomolgus y células humanas, en donde se usó la línea celular Raji como célula humana positiva para CD47. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de mono cynomolgus se aislaron de la sangre completa de mono cynomolgus mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque. Las células B de mono cynomolgus y humanas (Raji) se marcaron con el anticuerpo humano CD20 ofatumumab (Arzerra) a 10 µg/ml, y reaccionaron con una serie de diluciones del anticuerpo CD47 murino 2A1 o B6H12. Las células B marcadas con anticuerpo CD20 humano se detectaron con anticuerpo policlonal anti-humano conjugado con DyLite 649, mientras que los anticuerpos murinos CD47 se detectaron con anticuerpo policlonal anti-ratón conjugado con DyLite 488. Las células se analizaron mediante citometría de flujo, primero se seleccionaron en células vivas mediante FSC y SSC, luego en células positivas para FL4 (CD20 positivas), y finalmente se midió la FL1 mediana (CD47 positivas). Los datos se normalizaron dividiendo la señal a cada concentración por la señal máxima para cada anticuerpo en cada población celular. Los resultados normalizados que se muestran en la Figura 5 revelan que 2A1 reacciona de forma cruzada con CD47 cyno, y tiene una afinidad idéntica en comparación con CD47 humano. De acuerdo con los resultados presentados anteriormente, B6H12 tuvo una menor afinidad por CD47 de la superficie celular tanto en las células B Raji como en las de mono cynomolgus en comparación con los anticuerpos de la presente invención.

EJEMPLO 7: Generación de anticuerpos quiméricos

Con el fin de identificar las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) del anticuerpo murino 2A1, se aisló el ácido ribonucleico (ARN) del hibridoma y se utilizó en la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (Phusion RT-PCR Kit Thermo Scientific) para generar la primera cadena de ADNc. Se usó un conjunto de cebadores degenerativos que cubren el repertorio completo de secuencias líder murinas de anticuerpos tanto de VH como de VL en una PCR en la que la primera cadena de ADNc sirvió como molde.

Los cebadores directos (líder de IgG murina) se proporcionan a continuación.

Nombre	Secuencia
VH1-1	CACTGCAGGTRTCCACTCC (SEQ ID N°: 82)
VH1-2	CATAGCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID N°: 83)
VH1-3	CRCTACAGGTGTCCACTCC (SEQ ID N°: 84)
VH1-4	GCYACAGMTGTCCACTCC (SEQ ID N°: 85)
VH1-5	CACTGCAGGTGTCCWMTCC (SEQ ID N°: 86)
VH1-6	CRCTRCAGGTGKCACTCC (SEQ ID N°: 87)
VH1-7	GCTAWMGGTGTCCACTCC (SEQ ID N°: 88)
VH1-8	CCTCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID N°: 89)
VH1-9	GCTACAGGTGCTCACTCC (SEQ ID N°: 90)
VH1-10	CACTGCAGGTGTCCTCTCT (SEQ ID N°: 91)
VH1-11	CAYTGCAGGTGTCCAYTGC (SEQ ID N°: 92)
VH1-12	GCTAMMGGTGTCCACTTC (SEQ ID N°: 93)
VH1-13	CTCCTGTCAKTAACKCAGGT (SEQ ID N°: 94)
VH1-14	CAACTGCAGGTGTCTCTCTCT (SEQ ID N°: 95)
VH1-15	CRCTRCAGGYGTCCACTCT (SEQ ID N°: 96)

ES 2 743 203 T3

VH2-1	CCAAGCTGTATCCTTTCC (SEQ ID N°: 97)
VH2-2	CCAAGCTGTGCCTRTCC (SEQ ID N°: 98)
VH3-1	CTTGACAGYCVTTCKGGT (SEQ ID N°: 99)
VH3-2	CTTCACAGCCTTTCTGGT (SEQ ID N°: 100)
VH4	CTTAAAAGGGTCCAGTGT (SEQ ID N°: 101)
VH5-1	CAYTTTAAAARGTGTCMAGTGT (SEQ ID N°: 102)
VH5-2	GTTTTAAAAGGTGCCTGTG (SEQ ID N°: 103)
VH6	CTYTTAAAAGGKGTCAGWG (SEQ ID N°: 104)
VH7-1	CYTTTAMATGGTATCCAGTGT (SEQ ID N°: 105)
VH7-2	CTTTTACATGGTTTCAAGTGT (SEQ ID N°: 106)
VH8	GTCCCTGCATATGTCYT (SEQ ID N°: 107)
VH9	GATGGCAGCWGCYCAAAG (SEQ ID N°: 108)
VH10	CTATCAAGGTGTGCATTGT (SEQ ID N°: 109)
VH11	CTTTTAAAAGWTGTCCAGKGT (SEQ ID N°: 110)
VH12	GTGACAGTCCTTCTGGTAG (SEQ ID N°: 111)
VH14	CTTCCTGATGGCAGTGGTT (SEQ ID N°: 112)
VH15	GCTACAGGTATCCAATCC (SEQ ID N°: 113)

El cebador inverso (constante de IgG murina) se proporciona a continuación.

Nombre	Secuencia
HC-Rev	GCGTCTAGAACTCCACACACAGGRRCCAGTGGATAGAC (SEQ ID N°: 114)

Los cebadores directos (líder de Ig Kappa murina) se proporcionan a continuación.

Nombre	Secuencia
VK1-1	CTGWTGTTCTGGATTCCTG (SEQ ID N°: 115)
VK1-2	GGTCAGACAGTCAGCAGT (SEQ ID N°: 116)
VK2	GTGCTCTGGATTCGGGAA (SEQ ID N°: 117)
VK4/5-1	CAGCTTCYTGCTAATCAGTG (SEQ ID N°: 118)
VK4/5-2	CTAATCAGTGCTTCAGGA (SEQ ID N°: 119)
VK8-1	GTGGGTATCTGGTRCSTGTG (SEQ ID N°: 120)
VK8-2	GGAAATTTAAAAGTACCTGTGGG (SEQ ID N°: 121)
VK9A/9B-1	GGTTTCMAGGTRCCAGATGT (SEQ ID N°: 122)
VK9A/9B-2	CTCTGGTTYCCAGGTATC (SEQ ID N°: 123)
VK10	CTGTTTTCAAGGTRCCAGATGT (SEQ ID N°: 124)
VK11	GTTGTAATGTCCAGAGGA (SEQ ID N°: 125)
VK12/13-1	CTTACAGGTGCCAGATGT (SEQ ID N°: 126)
VK12/13-2	CTCAATTGTAGRTGCCAGATGT (SEQ ID N°: 127)

VK12/13-3	CACAGTAGGTGTCAGATGT (SEQ ID N°: 128)
VK12/13-4	GTCGTAGTTGTCAGATGT (SEQ ID N°: 129)
VK12/13-5	CCTCCTTCTTGGCCAAGA (SEQ ID N°: 130)
VK19/28-1	CTTATATGGAGCTGATGGG (SEQ ID N°: 131)
VK19/28-2	GTGTCTGGTGCTCATGGG (SEQ ID N°: 132)
VK19/28-3	CTSTGGTTGTCTGGTGTGA (SEQ ID N°: 133)
VK20	GTCTCTGATTCTAGGGCA (SEQ ID N°: 134)
VK21-1	CTKCKCTGGGTTCCAG (SEQ ID N°: 135)
VK21-2	GCAGGTGTTGACGGA (SEQ ID N°: 136)
VK22-1	CAGGTGCCTCGTGAC (SEC ID N.º: 137)
VK22-2	CTCTGGTGCCTGTGCA (SEQ ID N°: 138)
VK23	CTGGAYTYCAGCCTCCAGA (SEQ ID N°: 139)
VK24/25-1	GWTCTCTRGAGTCAGTGGG (SEQ ID N°: 140)
VK24/25-2	CTGGATCCCTGGAKCYACT (SEQ ID N°: 141)
VK32	GTTCTGCTTTTTAGGTGTG (SEQ ID N°: 142)
VK33/34	GATCCCAGGCATGATATGT (SEQ ID N°: 143)
VK31/38C	CTTCATGGTGCTCAGTGT (SEQ ID N°: 144)
VKRF	CCATATCAGGTGCCAGTGT (SEQ ID N°: 145)

El cebador inverso (constante de IgG Kappa murina) se proporciona a continuación

Nombre	Secuencia
LC -rev	GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG (SEQ ID N°: 146)

5 Las VH y VL amplificadas se clonaron posteriormente en el marco de lectura en vectores que contenían secuencias de secreción de anticuerpos apropiadas y regiones constantes de IgG1 e Igkappa humana, respectivamente, para generar construcciones de ADN quimérico murino:humano. Estas construcciones se cotransfectaron en células 293Freestyle (Life Technologies) y el anticuerpo resultante se purificó a partir del sobrenadante del cultivo celular mediante cromatografía de proteína A. Para determinar que se habían identificado las secuencias VH y VL correctas, se comparó el 2A1 quimérico (denominado 2A1-xi) con el anticuerpo 2A1 original murino y el ensayo de unión a CD47 mediante citometría de flujo con células Raji (Figura 6). B6H12 también se incluyó como control positivo en este ensayo. El 2A1-xi unido se detectó utilizando un anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado con FITC. Los 2A1 y B6H12 unidos se detectaron utilizando un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con FITC. Las afinidades aparentes se determinaron mediante ajustes no lineales (Prism Graphpad Software) de las intensidades de fluorescencia medias a diversas concentraciones de anticuerpos (Tabla 2). El anticuerpo 2A1-xi tiene una afinidad de unión similar a la del anticuerpo 2A1 murino hacia CD47 de la superficie celular, lo que demuestra que las secuencias VH y VL se habían identificado correctamente.

15

Tabla 2.

	KD (aparente) (pM)	Error estándar	R ²
2A1-mlgG1	93,6	±10,1	0,9977
2A1-xi	78	±14,9	0,9922
B6H12	3786	±310	0,9998

EJEMPLO 8: Humanización de anticuerpos.

El anticuerpo 2A1 CD47 murino se humanizó para reducir el potencial de inmunogenicidad cuando se administra a un paciente humano. Las secuencias de la región VH y VL de 2A1 se compararon con las secuencias de anticuerpos

humanos del banco de datos IMGT. Posteriormente, se generó un modelo estructural de las regiones VH y VL de 2A1 utilizando las estructuras conocidas de los anticuerpos humanizados y humanos más estrechamente relacionados del Banco de Datos de Proteínas (PDB). Las 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 2A1 estuvieron fijas, y las regiones estructurales murinas se reemplazaron con numerosas regiones estructurales humanas que tenían la mayor posibilidad de mantener la orientación adecuada de las CDRs. Las construcciones correspondientes a cada una de las variantes de 2A1 humanizadas se generaron mediante síntesis génica, y se clonaron en el marco de lectura en vectores que contenían una secuencia de secreción apropiada y regiones constantes de IgG1 e Igkappa humanas. Varias combinaciones de cadenas pesadas y ligeras humanizadas se cotransfectaron en células 293Freestyle (Life Technologies), y los anticuerpos resultantes se purificaron del sobrenadante de cultivo celular mediante cromatografía de proteína A.

Los anticuerpos humanizados se ensayaron con respecto a su capacidad de unirse a las células Raji mediante citometría de flujo (Figura 7). El anticuerpo 2A1-xi se utilizó como control en la mayoría de estos ensayos para establecer el punto de referencia para la afinidad de unión. Los anticuerpos humanizados se optimizaron aún más para mejorar la expresión y reducir los sitios problemáticos, incluidos los sitios potenciales de isomerización y desamidación. Un ejemplo de un anticuerpo humanizado optimizado derivado del anticuerpo 2A1 murino se denomina anticuerpo AB6.12, que muestra una afinidad de unión muy similar al anticuerpo 2A1-xi (Figura 7H; Tabla 3). Las afinidades aparentes se determinaron mediante ajustes no lineales (Prism Graphpad Software) de las intensidades de fluorescencia medias a diversas concentraciones de anticuerpos.

Tabla 3.

	KD (aparente) (pM)	Error estándar	R ²
2A1-xi	36,4	±8,54	0,9908
AB6.12	39,9	±5,54	0,9964

El anticuerpo AB6.12 se convirtió posteriormente de una IgG1 a otros isotipos de IgG humana reemplazando el dominio constante de la cadena pesada. Como se muestra en la Figura 7I, cambiar el isotipo de IgG a una versión estabilizada de la bisagra de IgG4 (IgG4P: S228P), y la variante de unión al receptor de Fc reducida de la IgG4 estabilizada de la bisagra (IgG4PE: S228P/L235E) no alteró la afinidad de unión del anticuerpo humanizado hacia CD47 de la superficie celular (Figura 7I; Tabla 4). Las afinidades aparentes se determinaron mediante ajustes no lineales (Prism Graphpad Software) de las intensidades de fluorescencia medias a diversas concentraciones de anticuerpos.

Tabla 4.

	KD (aparente) (pM)	Error estándar	R ²
AB6.12-IgG1	38,6	±10,5	0,9798
AB6.12-IgG4P	35,7	±8,4	0,9841
AB6.12-IgG4PE	34,6	±10,9	0,9727

A lo largo del proceso de humanización, los anticuerpos CD47 se ensayaron para garantizar que la funcionalidad de bloqueo de SIRPα estuviera intacta. Como se muestra en la Figura 7J, múltiples isotipos de IgG del anticuerpo humanizado, AB6.12, bloquearon la interacción SIRPα:CD47, utilizando el método basado en citometría de flujo descrito anteriormente en el Ejemplo 3. Los anticuerpos CD47 ejemplares y sus correspondientes regiones VH y VL incluyen los que se proporcionan en la Tabla 1.

Durante el proceso de humanización, se determinó que en algunas realizaciones, un motivo de secuencia de aminoácidos, "NA", al comienzo de CDR3 de VH (SEQ ID N°: 52 o SEQ ID N°: 77) es importante para la unión de los anticuerpos CD47 descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, en ausencia de residuos de aminoácidos "NA" al comienzo de la CDR3 de VH (SEQ ID N°: 52 o SEQ ID N°: 77), los anticuerpos CD47 de la invención no se unen a su objetivo ni se unen a su objetivo con menor afinidad de lo que lo harían en presencia de residuos de aminoácidos "NA". Por ejemplo, cuando el motivo "NA" se cambió a más motivos canónicos de "AR" o "AT", la unión se redujo sustancialmente (es decir, más de diez veces). En otras realizaciones, en ausencia de residuos de aminoácidos "NA" al comienzo de CDR3 de VH (SEQ ID N°: 52 o SEQ ID N°: 77), los anticuerpos CD47 de la invención se unen a su objetivo con una afinidad equivalente en comparación con la unión en presencia de residuos de aminoácidos "NA".

Los expertos en la técnica reconocerán que es posible determinar, sin experimentación excesiva, si una sustitución de aminoácido en las secuencias de los anticuerpos CD47 de la invención dará como resultado un anticuerpo con sustancialmente la misma función, por ejemplo, un anticuerpo CD47 con la capacidad de bloquear SIRPα y no causar un nivel significativo de hemaglutinación.

En la Figura 8A se muestra una imagen del trazo de la cromatografía de exclusión por tamaño utilizando un FLPC AKTA con una columna de superdex200. Se muestran las variantes IgG1, IgG4P e IgG4PE del anticuerpo AB6.12. Las tres variantes son monoméricas en más de un 98%. La Figura 8B es una fotografía de un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de numerosas variantes humanizadas de 2A1 en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR).

EJEMPLO 9: Los anticuerpos CD47 promueven la fagocitosis de líneas celulares tumorales

El CD47 es un receptor de la superficie celular que está incrementado en las células tumorales, y también se cree que contribuye a la evasión inmunológica a través de su interacción con su ligando natural SIRP α . La ligadura de CD47 a SIRP α en macrófagos produce una disminución de la actividad fagocítica. Como se describe con detalle a continuación, se determinó si la unión a CD47 y la actividad de bloqueo de SIRP α del anticuerpo 2A1, y sus variaciones, promueven la fagocitosis de las células tumorales en presencia de macrófagos humanos.

Las PBMCs se aislaron de sangre humana y los monocitos se diferenciaron en macrófagos incubándolos en medio AIM-V (Life Technologies) durante 7 días. Estos macrófagos derivados de monocitos (MDMs) se vuelven adherentes y permiten que otras células se eliminen mediante lavado. Los MDMs se rasparon y se volvieron a colocar en placas de 12 pocillos y se dejaron adherir durante 24 horas. La línea celular de tumor humano CCRF-CFM se eligió como un tipo de célula objetivo debido a su alta expresión de CD47. Las células CCRF-CEM se marcaron con CFSE 0,3 μ M a 37 °C durante 15 minutos, luego se lavaron y se añadieron a MDM en una proporción de 4:1 células tumorales por fagocito, y se añadió anticuerpo CD47 a diversas concentraciones. Se permitió la fagocitosis de las células objetivo durante 3 horas. Posteriormente, las células objetivo no fagocitadas se lavaron con PBS. Los fagocitos restantes se rasparon, se tiñeron con un anticuerpo hacia el marcador de macrófagos CD14 conjugado con DyLite 649 (Biolegend) y se analizaron mediante citometría de flujo. La fagocitosis se midió seleccionando las células vivas que eran positivas a FL4 (CD14+) y luego se evaluó el porcentaje de células positivas para FL1 (CFSE+).

La Figura 9 muestra que el anticuerpo CD47 2A1 y sus variantes humanizadas demostraron un aumento dependiente de la dosis en la fagocitosis de células tumorales por MDM. El anticuerpo 2A1 y la variante humanizada A132.05 fueron únicos por su capacidad de inducir la fagocitosis de células tumorales a 66,7 pM, mientras que B6H12 no tuvo actividad a esa concentración (Figura 9A). La Figura 9B muestra cómo 2A1, y las variantes humanizadas AB2.05, AB6.12-IgG1, AB6.12-IgG4P y AB6.12-IgG4PE, inducen la fagocitosis máxima a 0,3 μ g/ml o 2 nM, mientras que B6H12 requiere concentraciones más altas. Estos datos demuestran que el anticuerpo CD47, 2A1 (y las variantes humanizadas derivadas de él), inducen la fagocitosis mediada por macrófagos de células tumorales positivas para CD47. En este ejemplo, se utilizaron células CCRF-CEM como células objetivo positivas para CD47.

EJEMPLO 10: Actividad antitumoral de los anticuerpos CD47

La actividad antitumoral de los anticuerpos CD47 murinos se evaluó en un modelo de linfoma de Raji. Las células Raji se implantaron por vía subcutánea en ratones NOD/SCID y se asignaron al azar en 5 grupos (10 ratones por grupo, día 0). Grupo 1: Vehículo (solo tampón); Grupo 2: B6H12 (control positivo); Grupo 3: 1B4; Grupo 4: 2A1; y Grupo 5: 9E4. El tratamiento con cada anticuerpo o vehículo (solo tampón) comenzó cuando los tumores fueron palpables (50 mm³, día 13) y los ratones se sacrificaron cuando sus volúmenes tumorales alcanzaron ~1500 mm³. Los volúmenes tumorales se midieron 3 veces por semana. Los anticuerpos se administraron por vía intravenosa (IV) con 200 μ g 3 veces por semana durante 3 semanas (9 dosis totales por ratón). El tratamiento comenzó el día 13 y terminó el día 32.

Como se muestra en la Figura 10A, los anticuerpos CD47 de la invención, particularmente el anticuerpo 2A1, demostraron actividad antitumoral en este modelo animal de linfoma. Para alcanzar un volumen tumoral de 1500 mm³, el Grupo 1 (solo vehículo) requirió ~25 días; el Grupo 2 (B6H 12.2) requirió ~45 días; el Grupo 3 (1B4) requirió ~37 días; el Grupo 4 (2A1) requirió ~85 días; y el Grupo 5 (9E4) requirió ~40 días para alcanzar un volumen tumoral de ~1500 mm³. Estos datos indican que el anticuerpo 2A1 fue significativamente más potente que todos los anticuerpos de unión a CD47 analizados, incluido el B6H12 que se sabe que se une a CD47, bloquea la interacción de CD47 con SIRP α e inhibe la formación de tumores en modelos de cáncer humano en ratones. Inesperadamente, la actividad de inhibición tumoral de estos anticuerpos CD47 no se correlacionó con su potencia de unión a CD47 o el bloqueo de la interacción de CD47 con SIRP α , lo que sería esperable según los datos publicados.

Como se describe en los Ejemplos 2 y 3, 2A1, 1B4 y 9E4 tuvieron una afinidad similar hacia CD47 y una potencia similar para bloquear la interacción de CD47 con SIRP α . Además, la eficacia mejorada de 2A1 no se puede explicar por las diferencias en el dominio Fc de los anticuerpos descritos, ya que todos los anticuerpos utilizados en este estudio estaban compuestos por dominios IgG1 de ratón idénticos. Por lo tanto, además de la composición única de la materia, el anticuerpo 2A1 posee características inesperadas y únicas que incluyen la incapacidad de inducir interacciones homotípicas entre las células que expresan CD47, por ejemplo, los glóbulos rojos, y una mayor actividad de inhibición tumoral que no puede explicarse por la unión mejorada a CD47 o una capacidad mejorada de bloquear la interacción de CD47 con SIRP α .

Para confirmar que los anticuerpos 2A1 humanizados mantuvieron su actividad antitumoral, se realizó un estudio de tumor Raji similar. El diseño del estudio fue el mismo que el descrito anteriormente. Las células Raji se implantaron

por vía subcutánea en ratones NOD/SCID y se asignaron al azar en 5 grupos (10 ratones por grupo, día 0). En este estudio, los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal (IP) con 200 µg 3 veces por semana durante 3 semanas (9 dosis totales por ratón), y los volúmenes tumorales se midieron 3 veces por semana. Sin embargo, para este estudio, el anticuerpo IgG1 2A1 de ratón (grupo 2) se comparó con un derivado humanizado, AB6.12. Para este estudio, AB6.12 se construyó (como se describe en el EJEMPLO 8) en IgG1 humana (Grupo 3), IgG4P humana (Grupo 4) e IgG4PE humana (Grupo 4). Por lo tanto, este experimento se diseñó para abordar la influencia de la humanización de 2A1 en su actividad de inhibición tumoral y el papel potencial de la función efectora del dominio Fc que se sabe en la técnica que contribuye a las actividades antitumorales de muchos anticuerpos. Está bien documentado que la IgG1 humana posee una función efectora significativamente mayor en comparación con la IgG4P humana. IgG4PE fue desarrollado para reducir aún más la función efectora. Como se puede ver en la Figura 10B, la humanización de 2A1 no disminuyó la actividad antitumoral de 2A1 y, de hecho, puede haberla mejorado. AB6.12-hlgG1, AB6.12-hlgG4P y AB6.12-hlgG4PH mostraron una actividad antitumoral similar que parece significativamente mayor que la del 2A1 de ratón (2A1 mlgG). Este resultado es inesperado, ya que 2A1mlgG1, AB6.12-hlgG1, AB6.12-hlgG4P y AB6.12-hlgG4PE tienen actividades similares de unión a CD47 y de bloqueo de SIRPα. Además, dado que AB6.12-hlgG1, AB6.12-hlgG4P y AB6.12-hlgG4PE tienen actividades antitumorales similares, parece que la función efectora desempeña un papel en la eficacia del anticuerpo 2A1 humanizado AB6.12.

EJEMPLO 11: Cocrystalización de anticuerpos CD47 con CD47

CD47 es una proteína transmembrana de 5 pasos con un único dominio extracelular de IgV (tipo variable similar a inmunoglobina) que está altamente glicosilada en 6 sitios. La estructura del dominio CD47-IgV se resolvió en complejo con el dominio IgV de SIRPα, su ligando natural (referencia del Banco de Datos de Proteínas (PDB) n° 2JJS; Hatherley et al., 2008 Mol Cell, 25; 31 (2) : 266-77 (Figura 11A)). La estructura muestra la unión de SIRPα-IgV a CD47-IgV en un epítipo apical que incluye el piroglutamato N-terminal de CD47. Esta estructura explica suficientemente cómo ambas proteínas transmembrana de la superficie celular pueden interactuar productivamente desde células adyacentes en una orientación cabeza-cabeza. La estructura cristalográfica de rayos X de CD47-IgV en complejo con el Fab B6H12 se presenta en la Figura 11B. Para mayor claridad, las regiones constantes del Fab (CH1 y CL) se omitieron en la Figura, y solo se presenta el Fv (VH y VL). Esto reveló un sitio de unión apical, colocando este anticuerpo en una superficie extremadamente distal de la membrana celular (Figura 11B). El mecanismo de bloqueo de SIRPα por B6H12 es evidente a partir de esta estructura. La ubicación relativa de los propósitos de orientación de la membrana celular se muestra como una línea discontinua en la Figura 11.

Para determinar el epítipo objetivo de los anticuerpos de la presente invención, se determinó la estructura cristalográfica de rayos X del co-complejo del dominio CD47-IgV y el Fab de 2A1-xi (anticuerpo quimérico con dominios CHI y CL humanos) (Figura 11C). Para mayor claridad, las regiones constantes del Fab (CHI y CL) se omitieron en la Figura, y solo se presenta el Fv (VH y VL). A diferencia de la estructura previamente determinada de CD47 que se une a SIRPα en una orientación cabeza-cabeza (Figura 11A), y que el anticuerpo B6H12 se posiciona apicalmente lejos de la membrana (Figura 11B), la estructura de 2A1 en el complejo con CD47 reveló la unión del anticuerpo a CD47 cerca de la membrana en una orientación inesperada y única de cabeza-lado (Figura 11C). El epítipo 2A1 de CD47 es discontinuo e incluye los residuos Y37, K39, K41, el bucle KGRD (SEQ ID N°: 56) (residuos 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104 y F106 de CD47 cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 147 (es decir, la SEQ ID N°: 48 excluyendo la secuencia señal (aminoácidos 1-18)). La estructura de 2A1 unido a CD47 también revela que la VH está involucrada principalmente en la unión al bucle KGRD (SEQ ID N°: 56) de CD47, mientras que el dominio VK interactúa con los residuos apicales, incluidos Y37, T102 y E104, que están involucrados en la unión de SIRPα. Por lo tanto, es principalmente el dominio VK el que impide físicamente la unión de SIRPα a CD47. Estos estudios estructurales sugieren que el epítipo único al que se une 2A1 está en el lateral de CD47. En contraste con los anticuerpos CD47 conocidos en la técnica, la orientación de la región VH de 2A1 en una posición proximal a la membrana son características críticas de este anticuerpo, que previenen un nivel significativo de hemaglutinación de los glóbulos rojos al restringir el anticuerpo de tal manera que no se puede conectar a las moléculas de CD47 en células adyacentes.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento inmunológicamente activo del mismo que se une a CD47 humano, en donde el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo se une a un epítipo discontinuo en CD47, en donde el epítipo discontinuo comprende los residuos de aminoácidos Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104 y E106 de CD47 cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 147, y en donde el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo evita que el CD47 interactúe con la proteína reguladora de señal α (SIRP α), y no causa un nivel significativo de aglutinación de las células después de la administración.
2. El anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo es quimérico o humanizado.
3. El anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo promueve la fagocitosis mediada por macrófagos de una célula que expresa CD47.
4. El anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo es un isotipo de IgG seleccionado del grupo que consiste en isotipo IgG1, isotipo IgG2, isotipo IgG3 e isotipo IgG4.
5. El anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo es un isotipo de IgG seleccionado de IgG4P e IgG4PE.
6. El anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende:
- (i) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 72,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 71, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
 - (ii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
 - (iii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 67,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 69, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
 - (iv) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 67,

- una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 70, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (v) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
5 una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (vi) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
10 una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 72,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (vii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
15 una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 72,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 71, y
20 una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (viii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 76,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,
25 una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (ix) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 76,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
30 una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 68,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 71, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55
- (x) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 50,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
35 una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 77,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y

- una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (xi) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 57,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
5 una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (xii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 60,
una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
10 una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55;
- (xiii) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 61,
15 una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55; o
- (xiv) una secuencia de CDR1 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 62,
20 una secuencia de CDR2 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 51,
una secuencia de CDR3 de VH expuesta en la SEQ ID N°: 52,
una secuencia de CDR1 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 53,
una secuencia de CDR2 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 54, y
25 una secuencia de CDR3 de VL expuesta en la SEQ ID N°: 55.

7. El anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo comprende:

- (i) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 5, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 31;
- 30 (ii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 5, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 32;
- (iii) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 33;
- (iv) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
35 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 34;
- (v) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;

- (vi)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 36;
- (vii)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 37;
- (viii)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 38;
- (ix)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 39;
- (x)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 7, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 43;
- (xi)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 8, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 39;
- (xii)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 11, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 42;
- (xiii)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 11, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 43;
- (xiv)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 11, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 44;
- (xv)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 11, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 47;
- (xvi)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 15, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 43;
- (xvii)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 15, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 44;
- (xviii)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 16, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xix)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 17, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xx)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 20, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xxi)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 21, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xxii)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 22, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xxiii)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 27, y
 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xxiv)

 una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 28, y

- una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35;
- (xxv) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 29, y
una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35; o
- (xxvi) una secuencia de VH expuesta en la SEQ ID N°: 30, y
- 5 una secuencia de VL expuesta en la SEQ ID N°: 35.
8. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo.
9. Un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el uso en un método para aliviar un síntoma de un cáncer u otra afección neoplásica en un sujeto.
- 10 10. El anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo para el uso de la reivindicación 9, en el que el sujeto es un ser humano.
11. El anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo para el uso de la reivindicación 9 o 10, en el que el método comprende además administrar quimioterapia.
- 15 12. El anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo del mismo para el uso de la reivindicación 9 o 10, en el que el método comprende además administrar radioterapia.

FIG. 1A

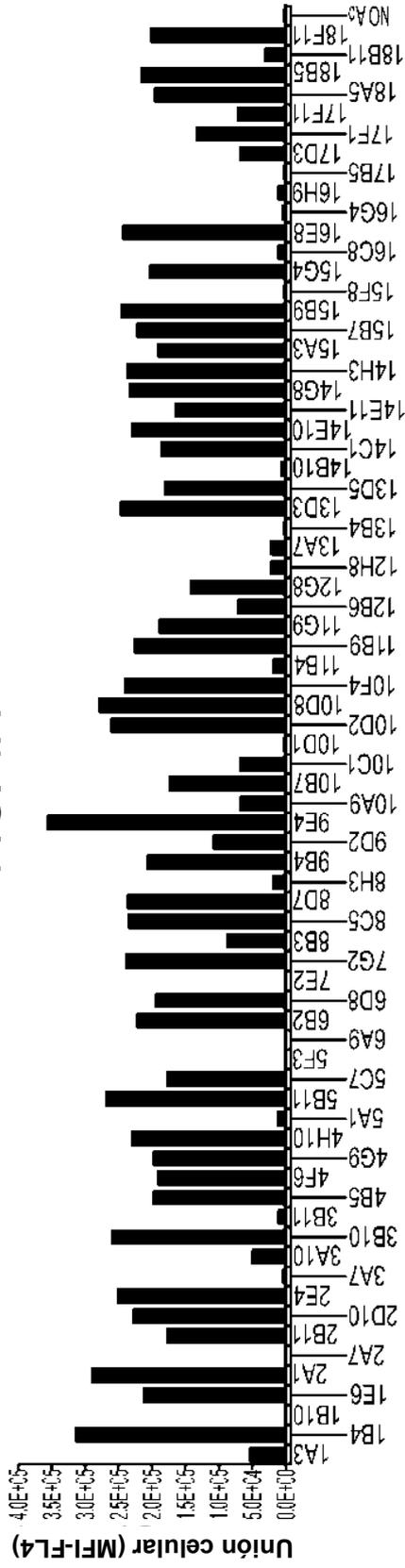
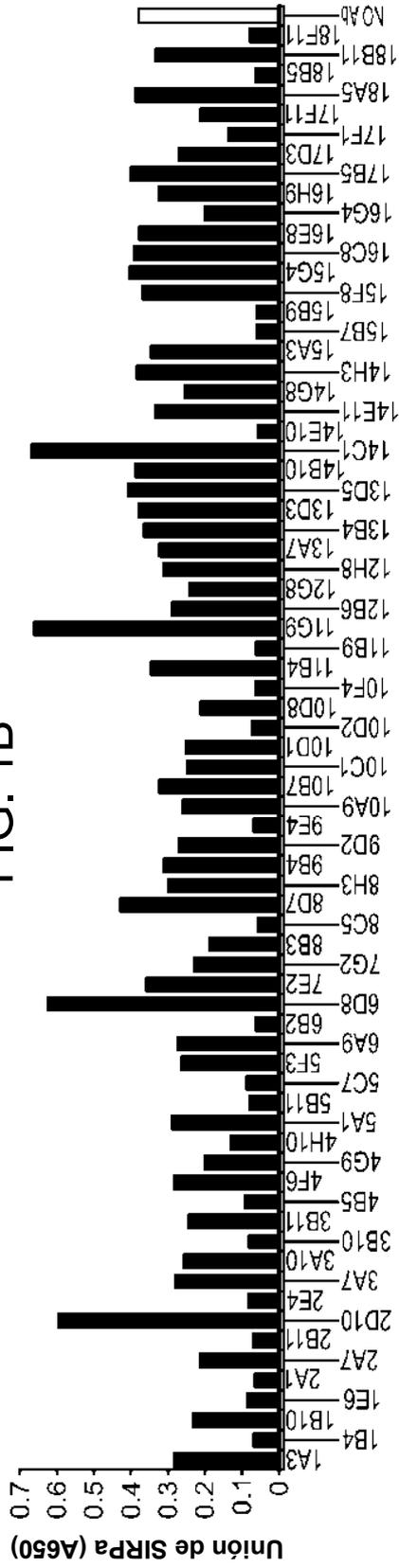


FIG. 1B



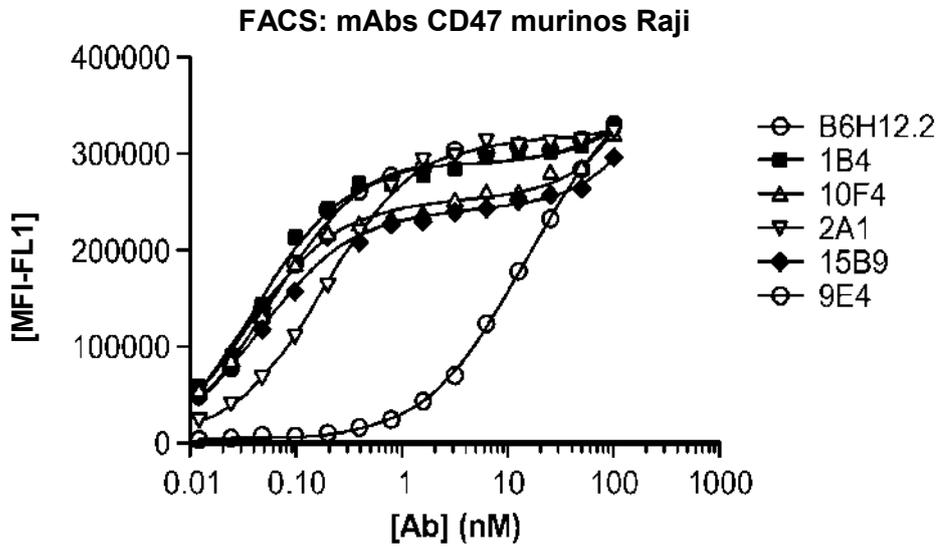


FIG. 2A

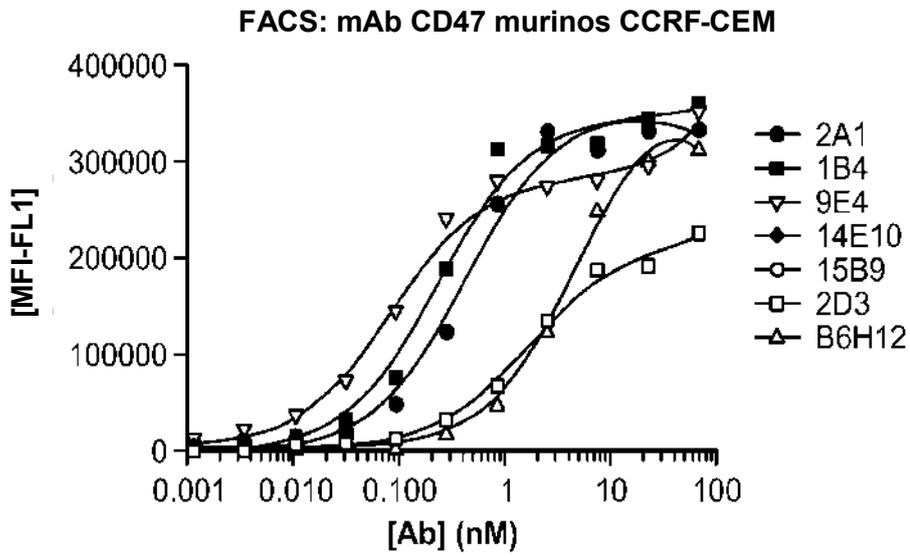


FIG. 2B

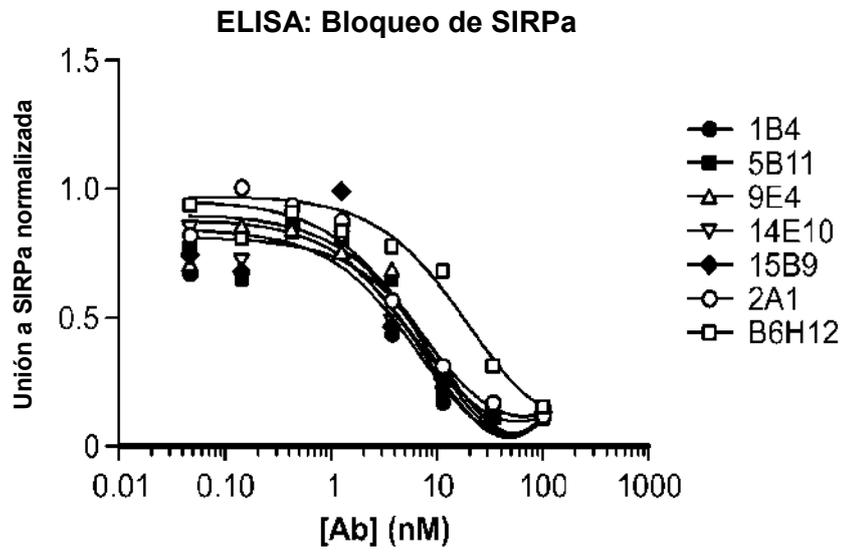


FIG. 3A

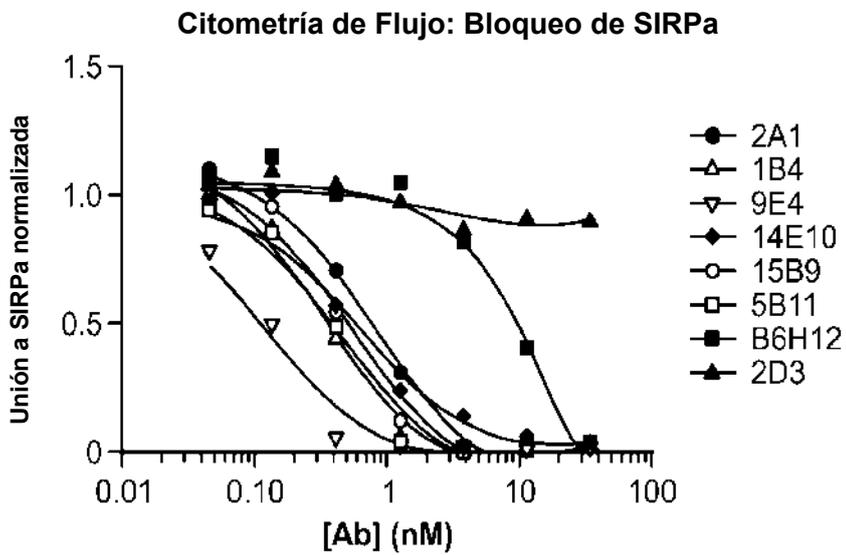


FIG. 3B

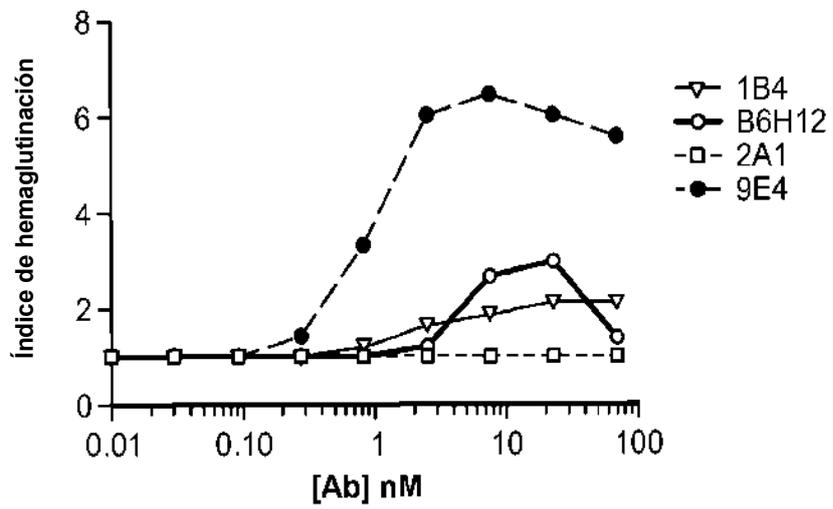
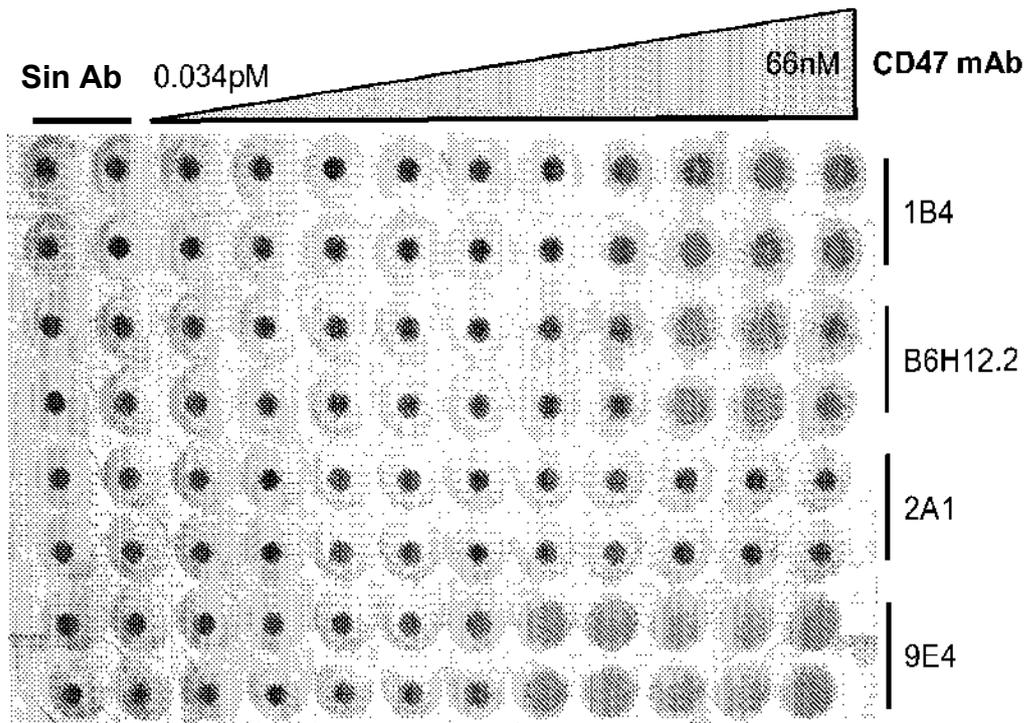


FIG. 4A

[Ab] (nM)	100	50	25	12,5	100	50	25	12,5	100	50	25	12,5
A	9E4	9E4	9E4	9E4	11B9	11B9	11B9	11B9	15B9	15B9	15B9	15B9
B	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	10F4	10F4	10F4	10F4	18F11	18F11	18F11	18F11
C	B6H12	B6H12	B6H12	B6H12	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	18B5	18B5	18B5	18B5
D	2A1	2A1	2A1	2A1	3B10	3B10	3B10	3B10	17F11	17F11	17F11	17F11
E	2A1-XI	2A1-XI	2A1-XI	2A1-XI	15B7	15B7	15B7	15B7	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
F	6B2	6B2	6B2	6B2	2B11	2B11	2B11	2B11	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
G	14E10	14E10	14E10	14E10	5B11	5B11	5B11	5B11	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
H	Blanco											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

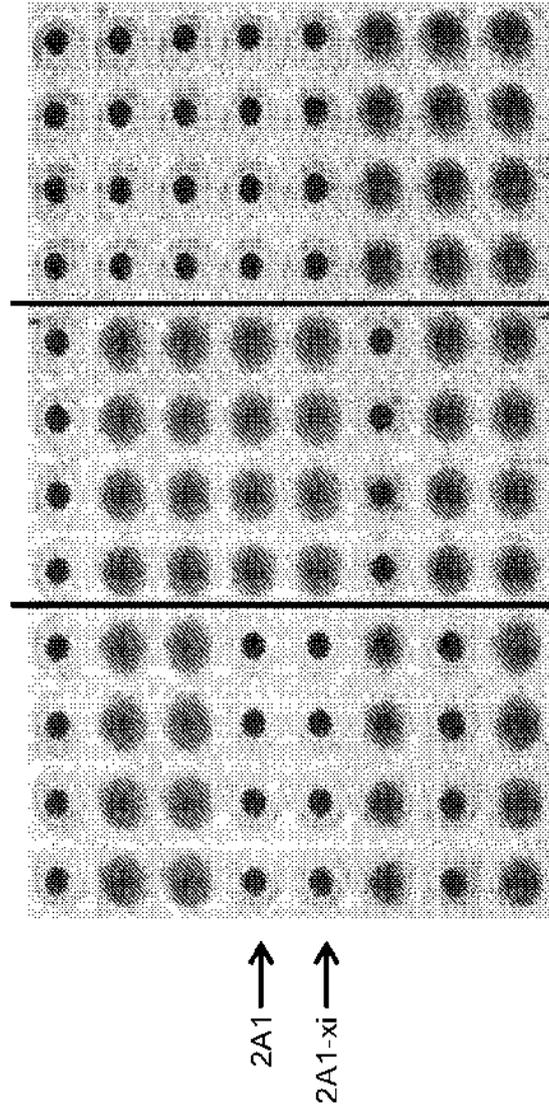


FIG. 4B

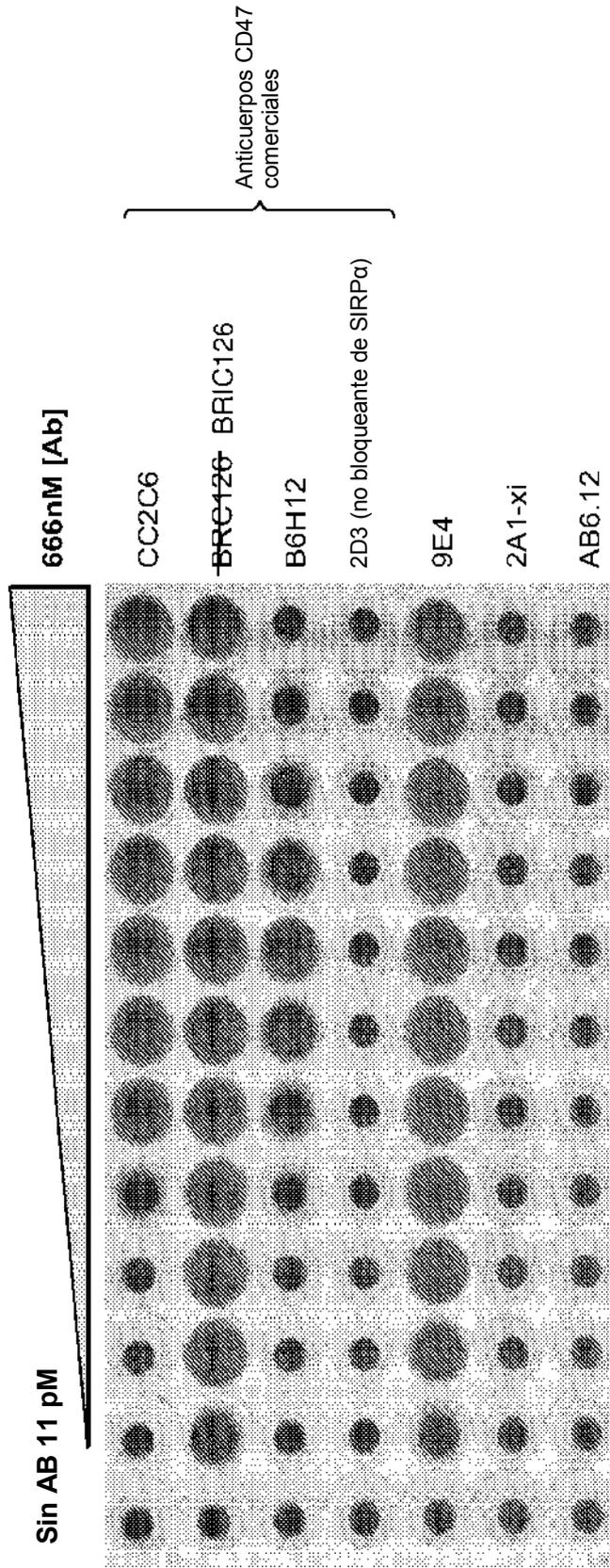


FIG. 4C

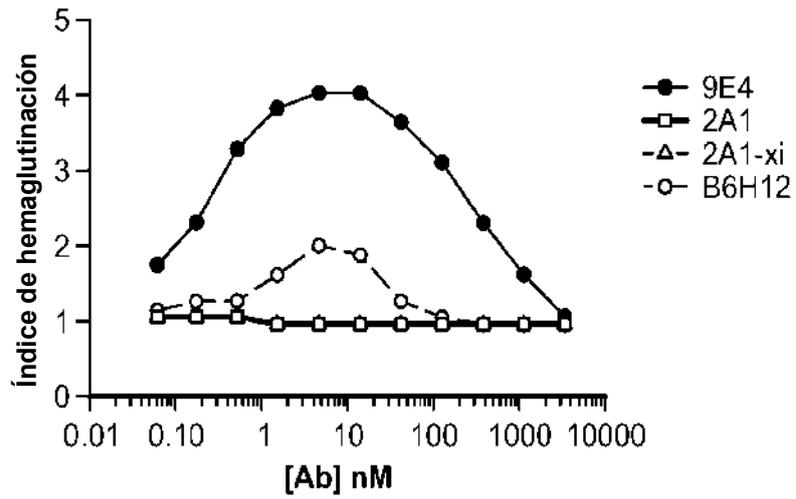
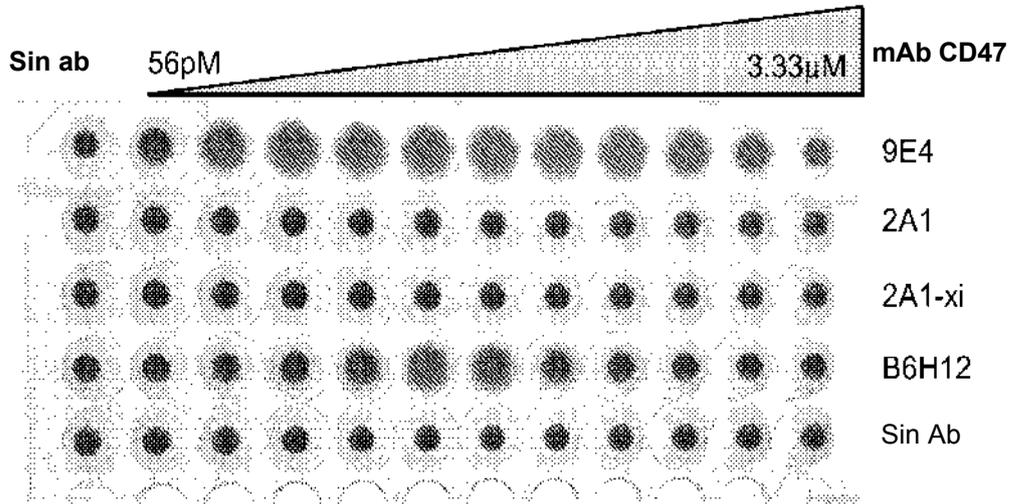


FIG.4D

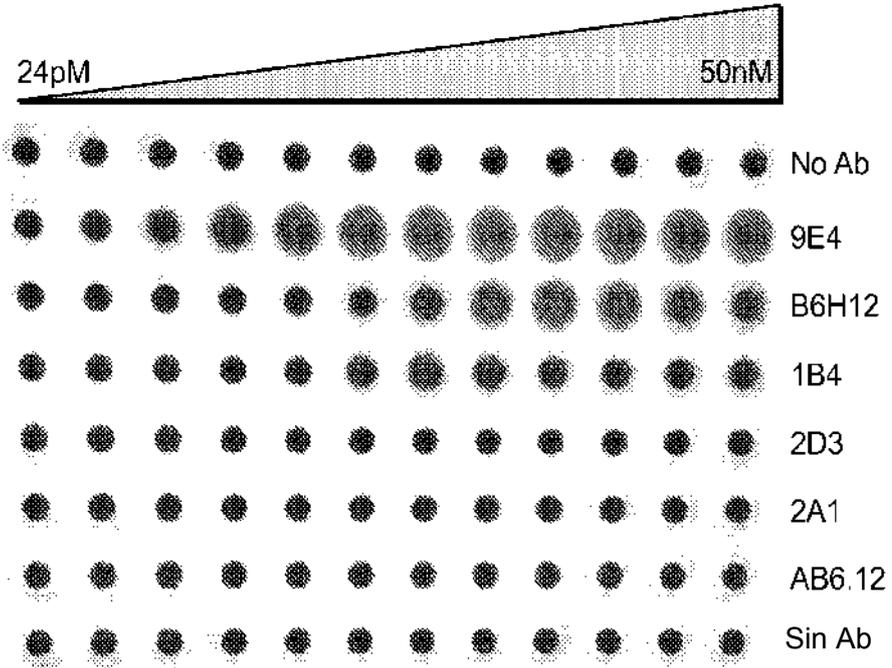


FIG. 4E

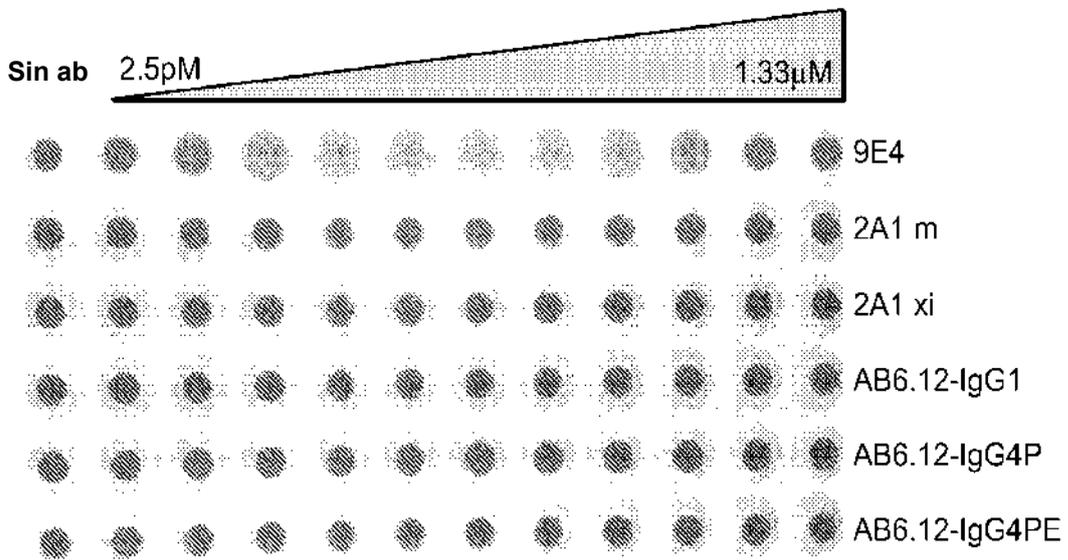


FIG. 4F

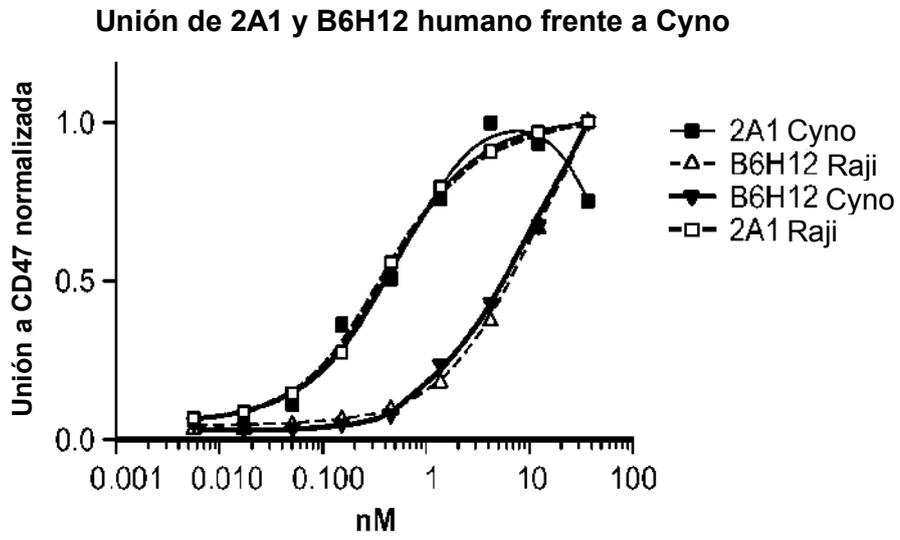


FIG. 5

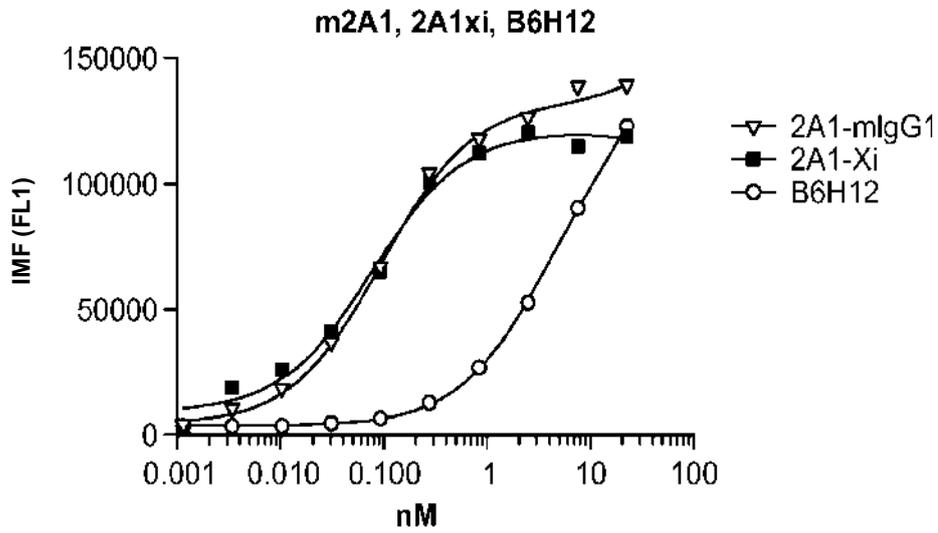


FIG. 6

FIG. 7A

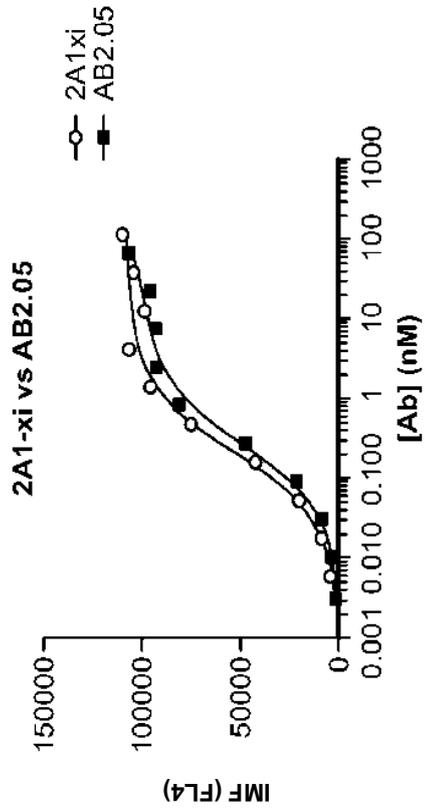


FIG. 7B

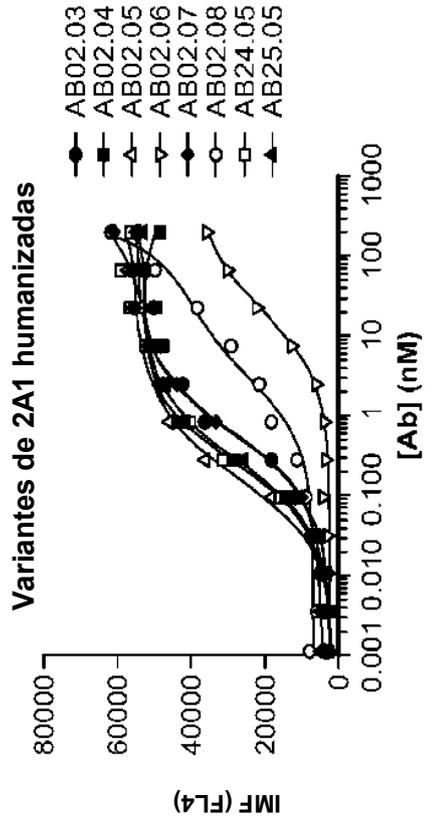


FIG. 7C

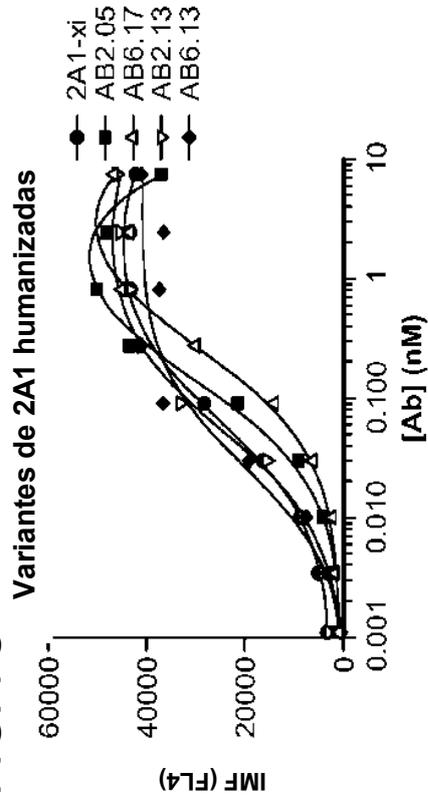


FIG. 7D

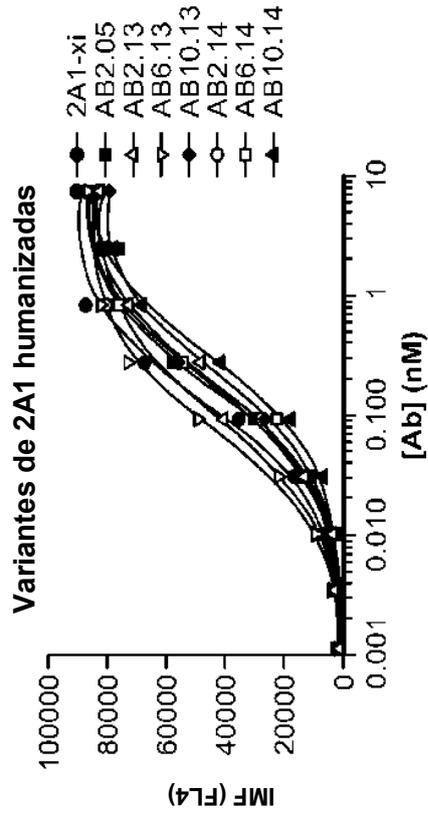


FIG. 7E

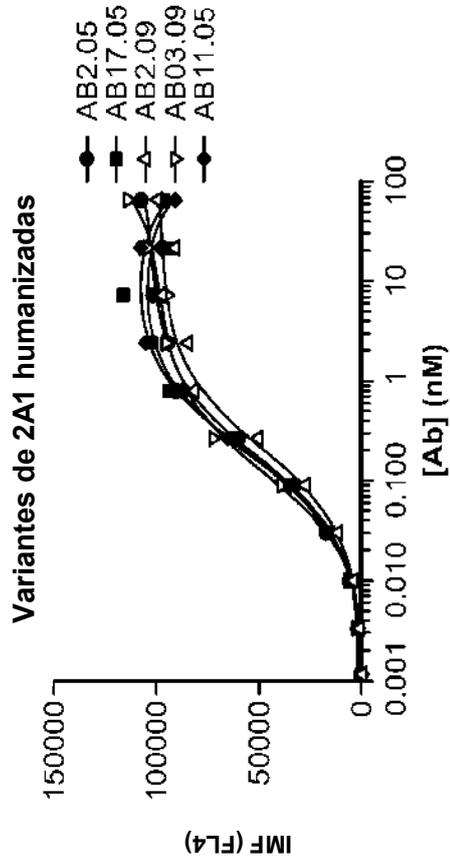


FIG. 7F

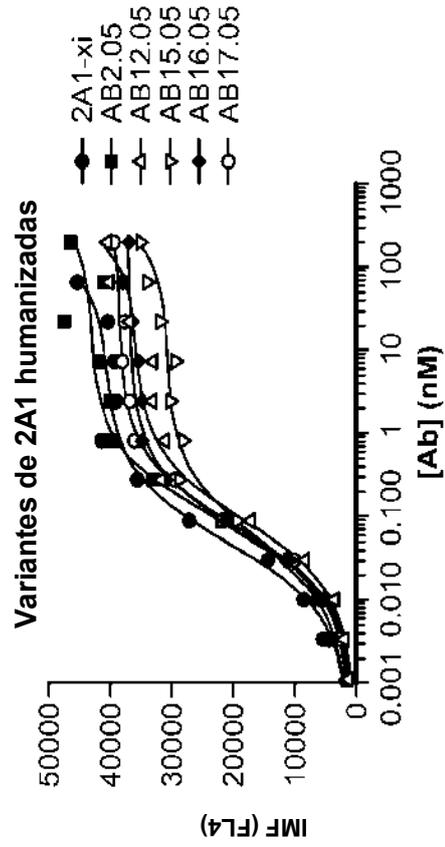


FIG. 7G

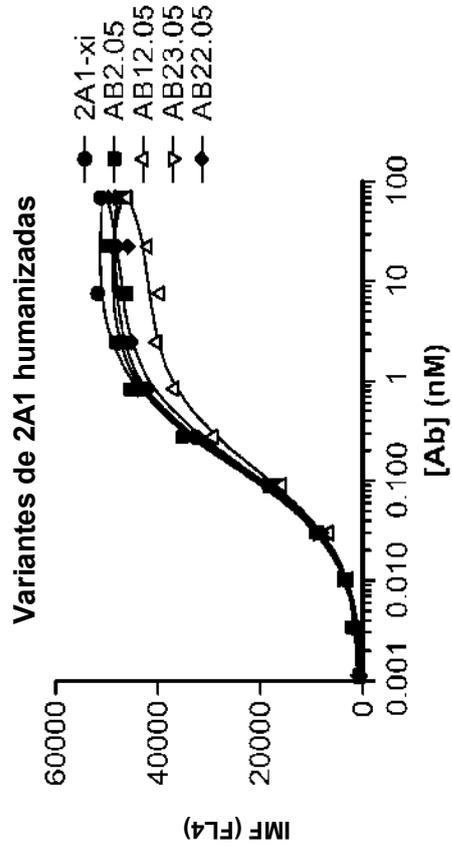
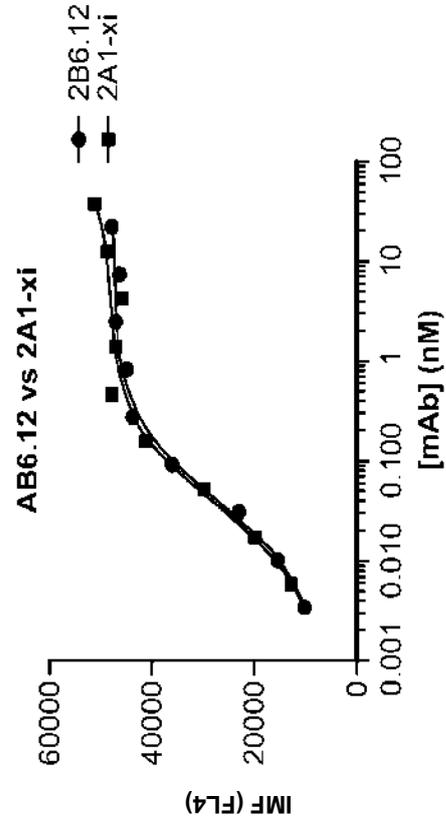


FIG. 7H



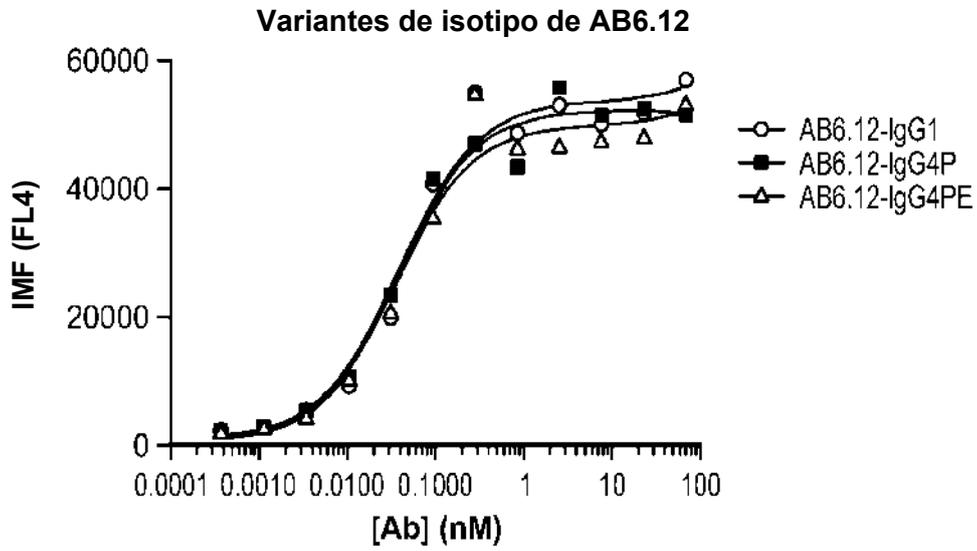


FIG. 7I

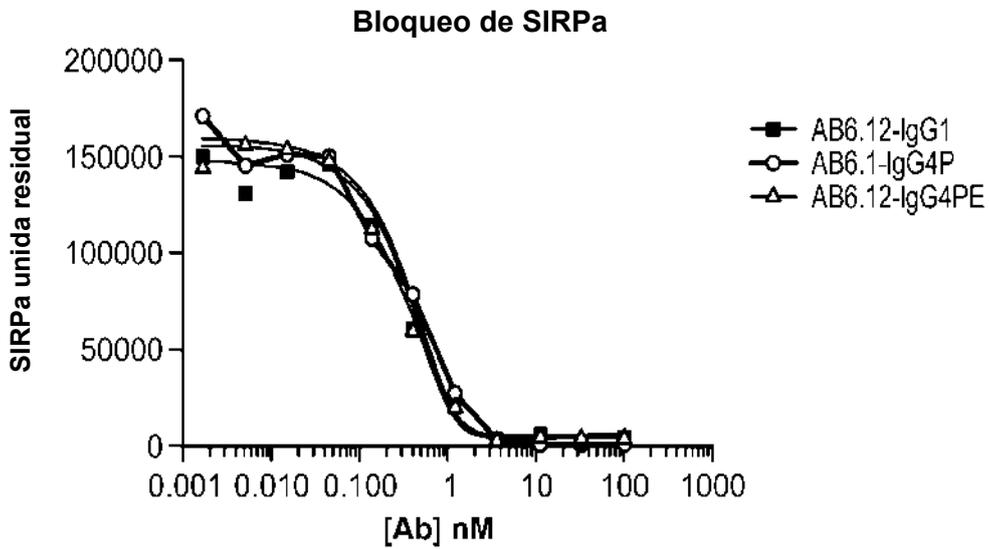
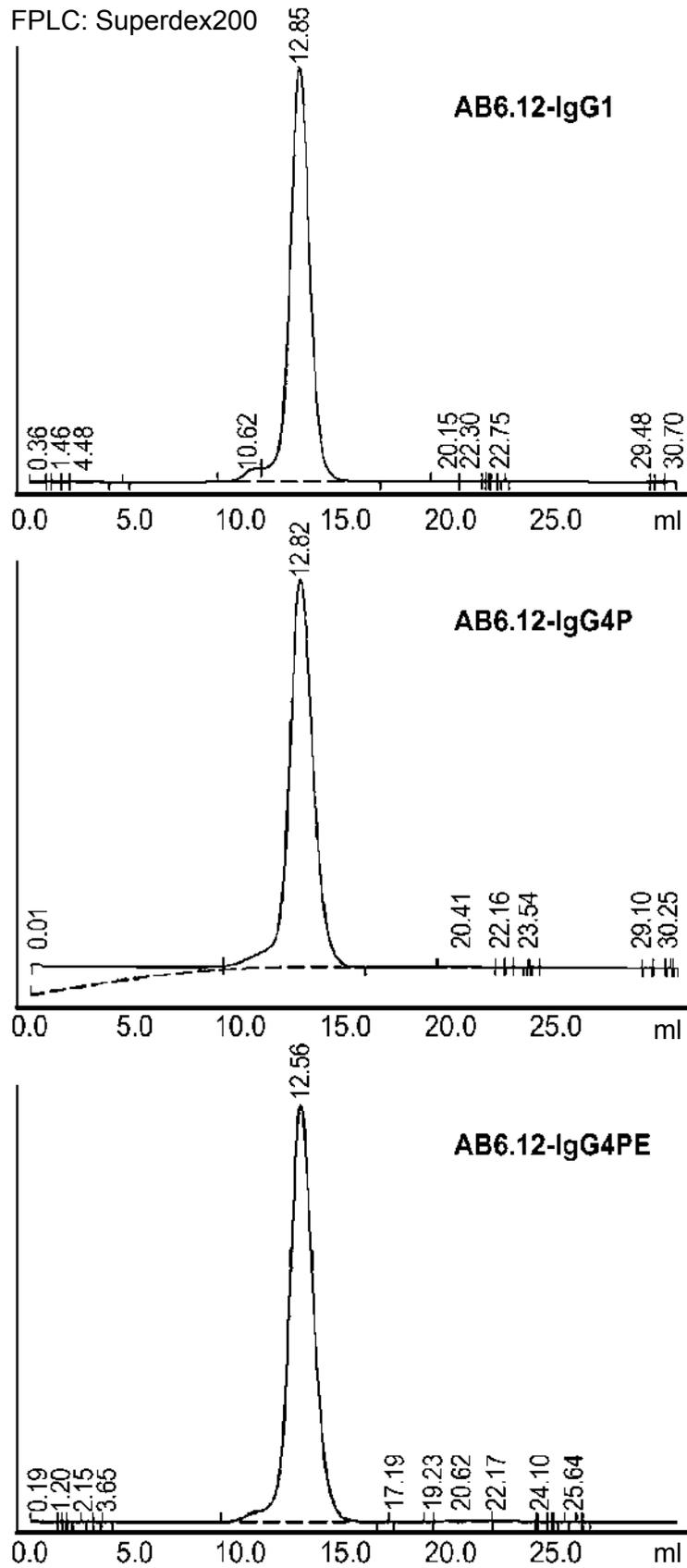


FIG. 7J

FIG. 8A



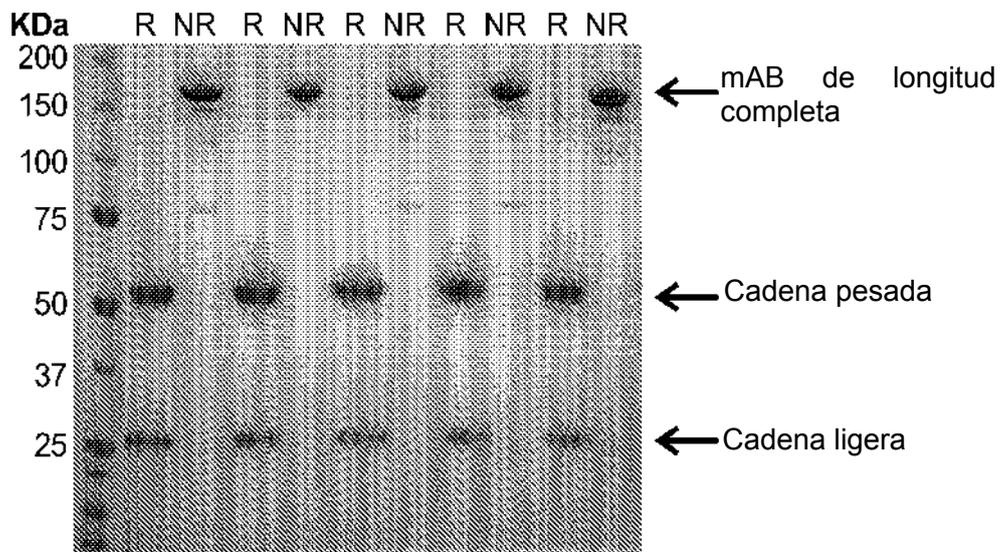


FIG. 8B

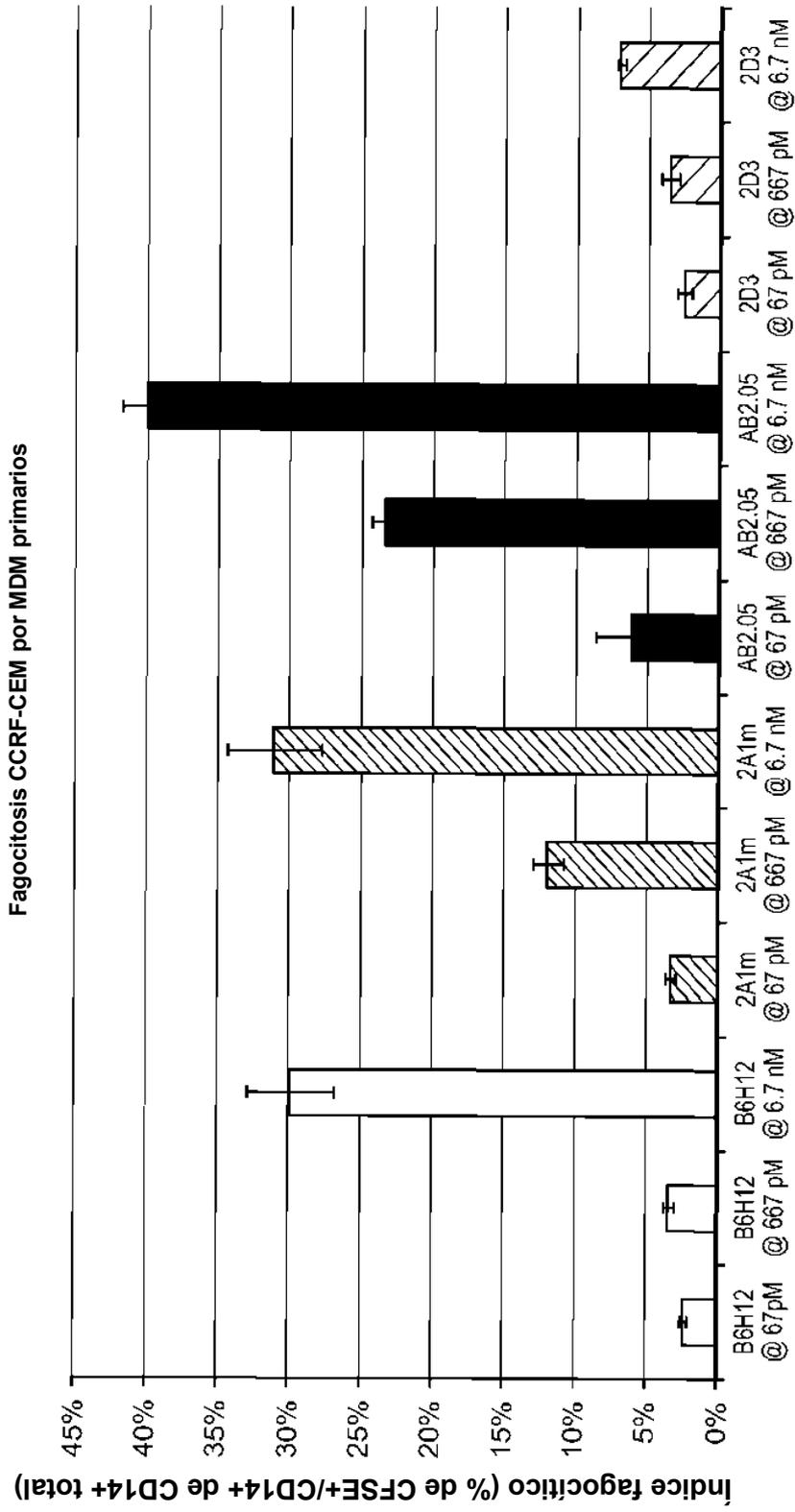


FIG. 9A

FIG. 9B

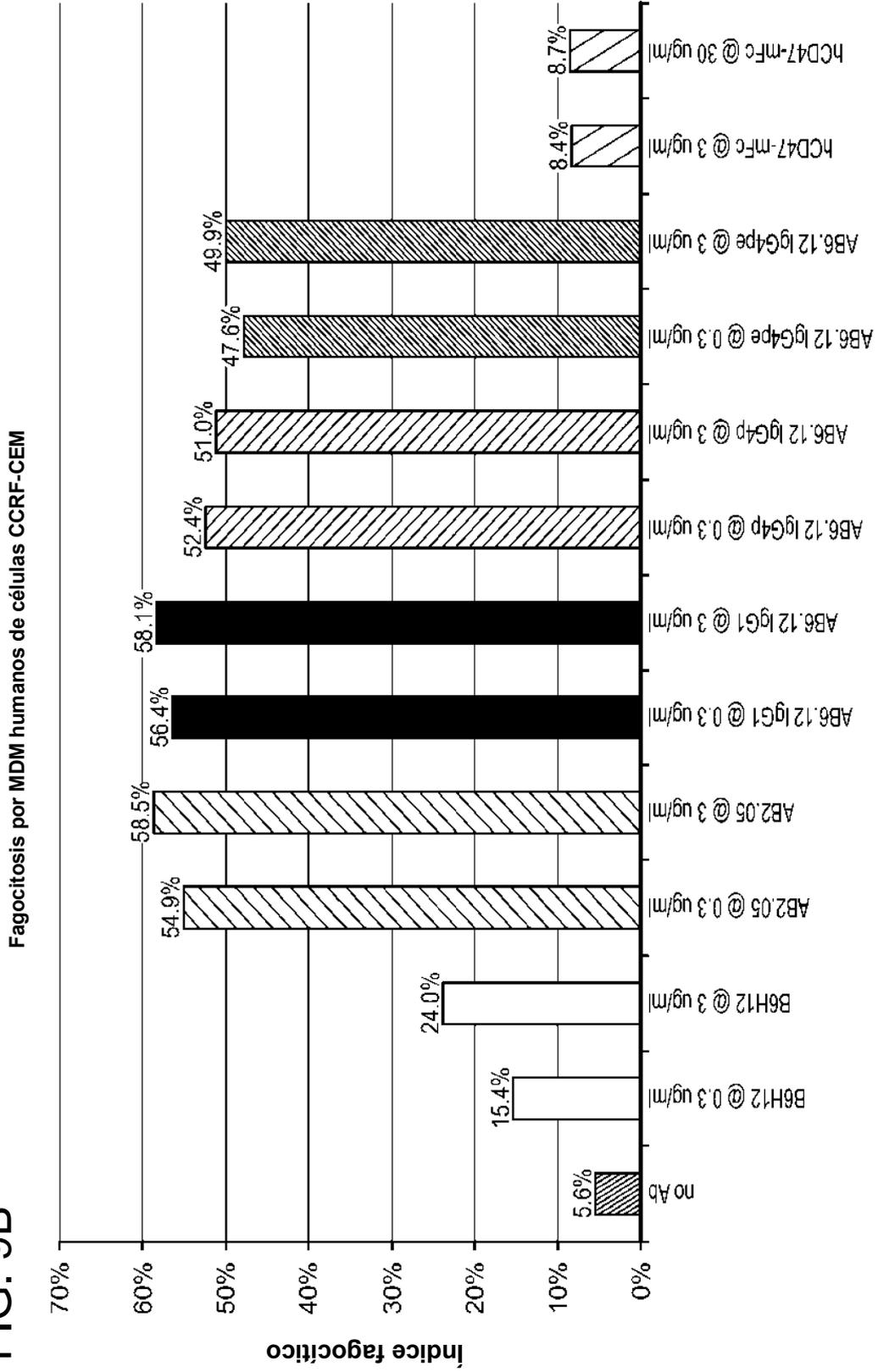


FIG. 10A

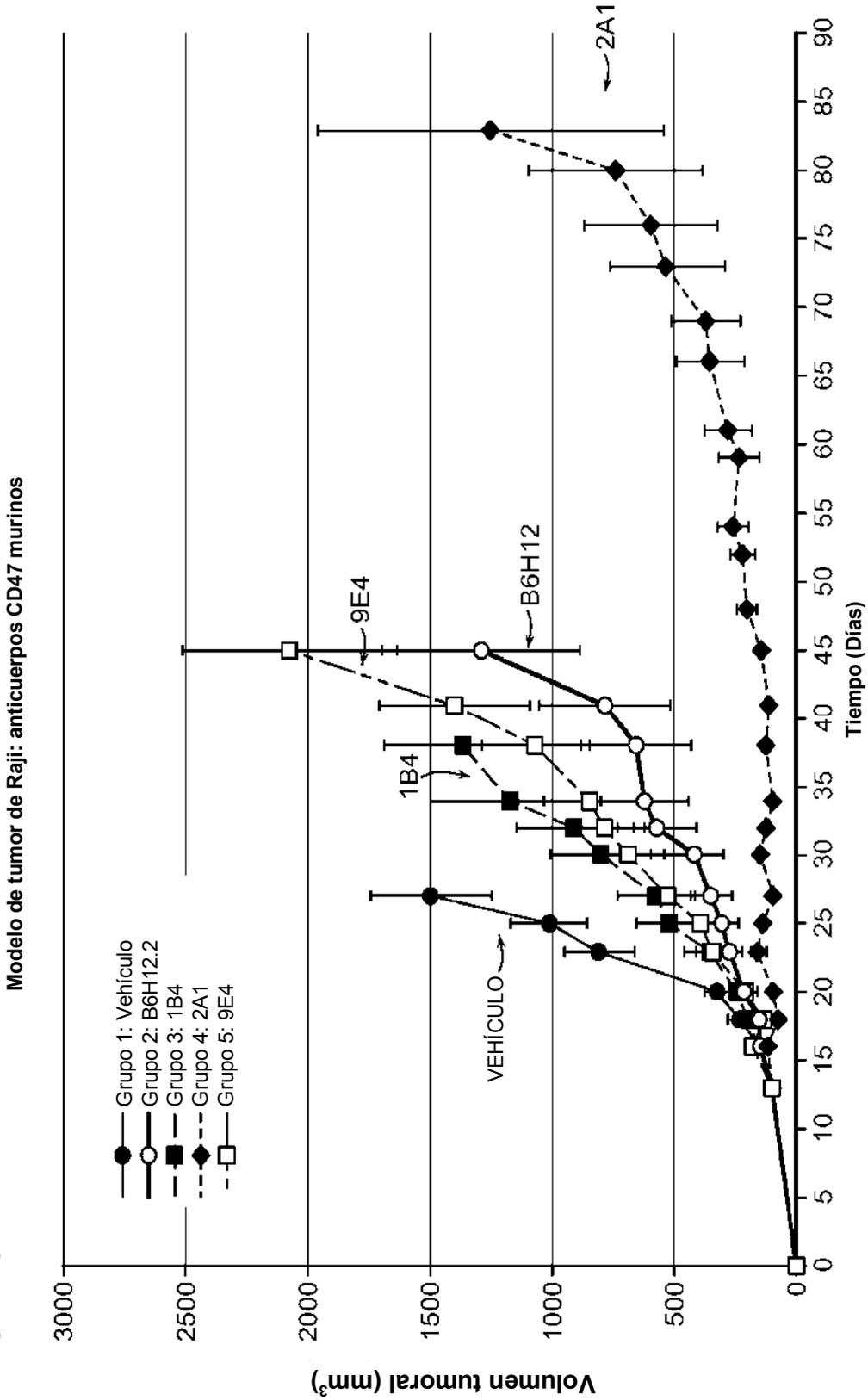
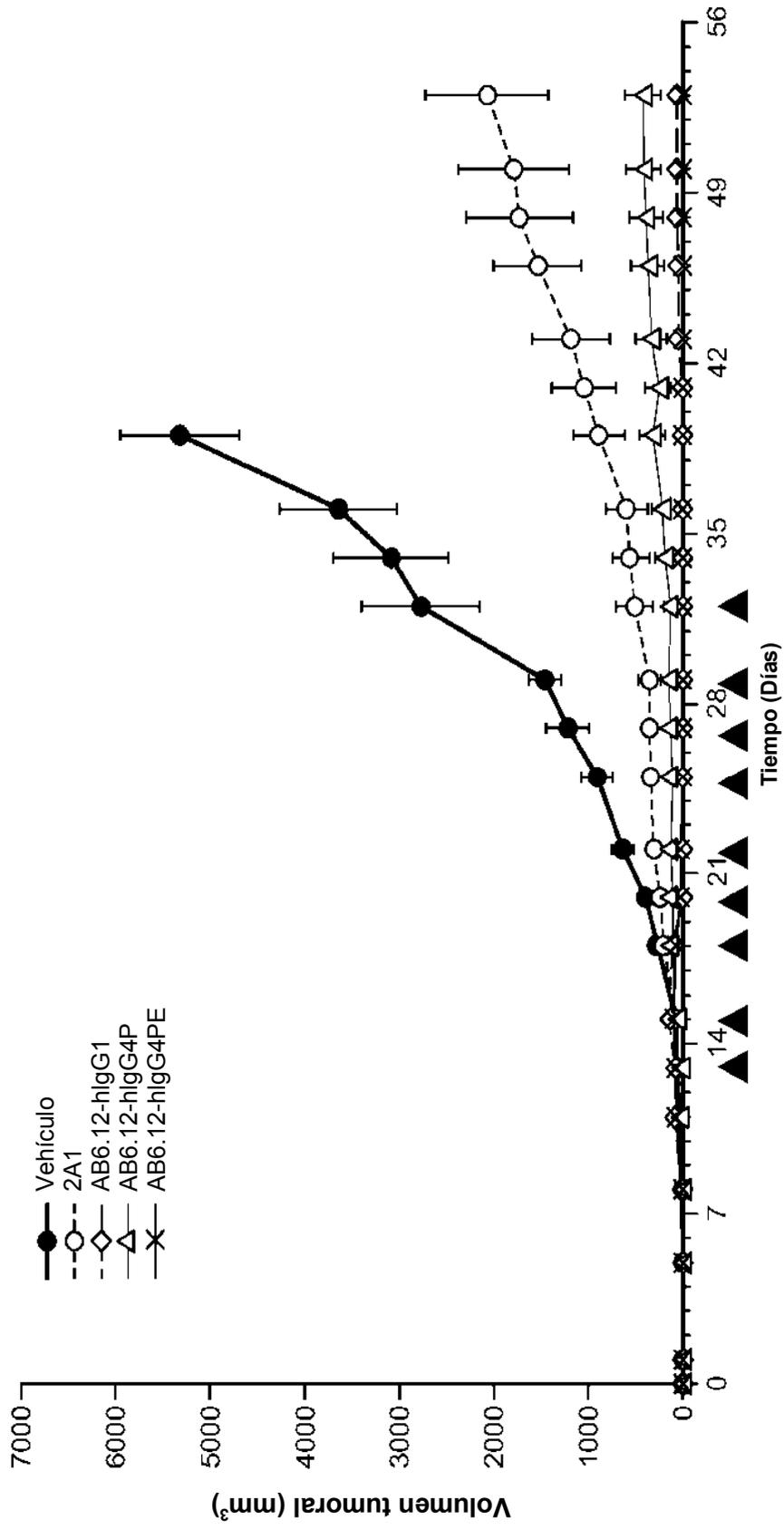


FIG. 10B



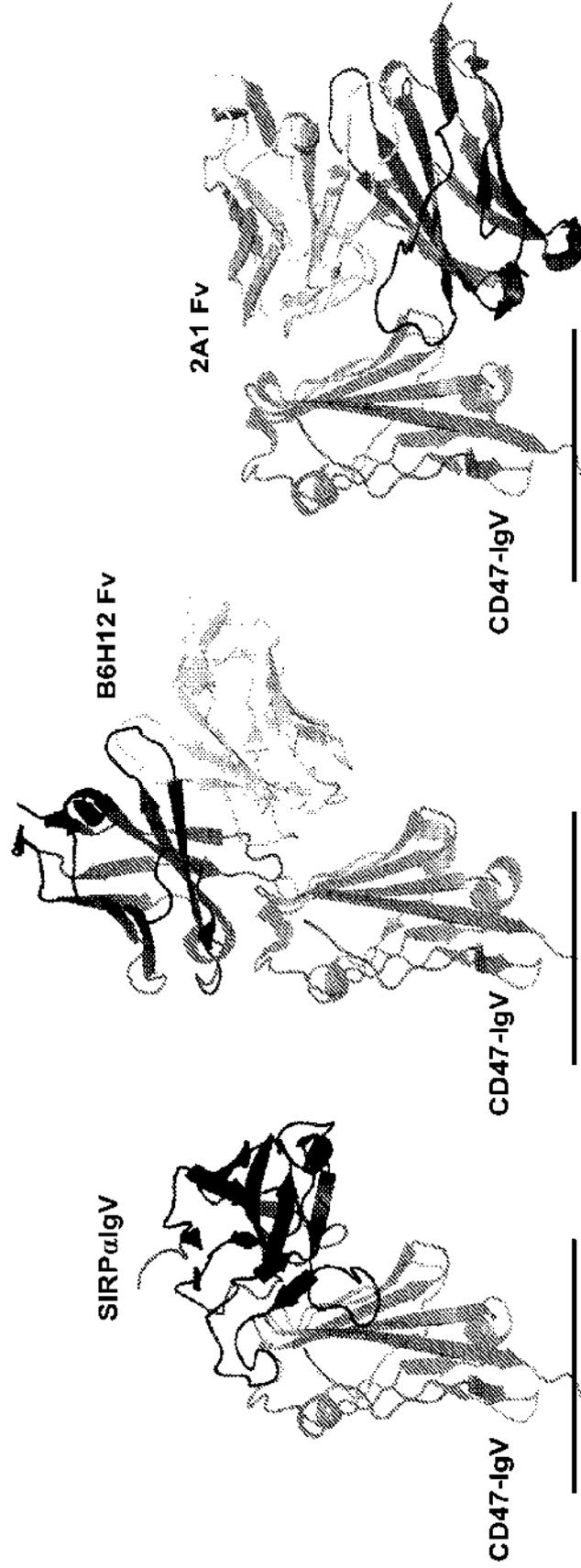


FIG. 11A

FIG. 11B

FIG. 11C