

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 156**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2013 PCT/CA2013/001046**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14094122**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2013 E 13865442 (1)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2931752**

54 Título: **Tratamiento de células enfermas CD47+ con fusiones SIRP alfa-Fc**

30 Prioridad:

17.12.2012 US 201261738008 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.04.2020

73 Titular/es:

**TRILLIUM THERAPEUTICS INC. (100.0%)
 2488 Dunwin Drive
 Mississauga, Ontario L5L 1J9, CA**

72 Inventor/es:

**UGER, ROBERT ADAM;
 SLAVOVA-PETROVA, PENKA SLAVTCHEVA y
 PANG, XINLI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 755 156 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

Tratamiento de células enfermas CD47+ con fusiones SIRP alfa-Fc

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a proteínas terapéuticas de fusión de Fc útiles particularmente para el tratamiento de sujetos que presentan células enfermas CD47+. Las proteínas de fusión se basan en un dominio dentro de la región extracelular de SIRPα humana e incorporan una región Fc que mejora el efecto anticanceroso de la proteína de fusión.

Antecedentes de la invención

10 La proteína alfa reguladora de la señal (SIRPα) es una proteína transmembrana que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y es un receptor para CD47. La clonación y expresión de una forma humana de SIRPα ha sido descrita por Ullrich et al en el documento US 6541615. La participación de SIRPα y CD47 en la etiología del cáncer y otras enfermedades ha sido mencionada por Sarfati et al in WO1999/040940 y por Van den Berg et al en el documento WO00/66159, quienes sugieren el uso terapéutico de un inhibidor de SIRPα. Más recientemente, Jaiswal et al han sugerido el uso de anticuerpos contra CD47 para el tratamiento de cánceres hematopoyéticos, en el documento WO2009/091601. La interacción entre SIRPα y CD47 juega un papel importante en la regulación de la fagocitosis de las células leucémicas y las células madre leucémicas (LSC) por los macrófagos. Se ha demostrado que los anticuerpos de bloqueo contra CD47 promueven la fagocitosis de las LSC por los macrófagos. Además, Wang et al han sugerido tratamientos contra el cáncer basados en proteínas de fusión de SIRPα en el documento WO 2010/130053. Para el tratamiento de los trastornos inmunitarios, Smith et al han sugerido el uso de fusiones de Fc basadas en CD47, en el documento US2008/0131431. El tratamiento de los trastornos inflamatorios e inmunitarios también es ilustrado por Raymond et al, en el documento WO2010/070047.

Sería útil proporcionar agentes que inhibieran la señalización a través del eje SIRPα/CD47 para su uso en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades.

Compendio de la invención

25 La presente invención proporciona una proteína de fusión de SIRPα humana, composición farmacéutica, construcción de ADN, célula de producción de proteínas, método y proteína de fusión dimérica tal como se define en las reivindicaciones independientes adjuntas. Las características preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes.

30 En la presente memoria describe SIRPα como una proteína de fusión de Fc en la que los componentes se seleccionan para la inhibición óptima del eje CD47/SIRPα. Los autores de la presente invención han encontrado que un dominio particular y singular dentro de la región extracelular de SIRPα humana se une a CD47 con mayor afinidad que la región extracelular intacta de SIRPα humana. Asimismo, en la presente memoria se demuestra que la eficacia *en vivo* de las fusiones SIRPαFc mejora de manera sorprendente y drástica cuando la región constante (Fc) tiene una función efectora, a pesar de que la inhibición del eje CD47/SIRPα no debería requerir tal actividad, y a pesar de indicaciones *in vitro* de que debería preferirse una región Fc no efectora.

35 Las presentes proteínas de fusión SIRPαFc también demuestran un agonismo de CD47 insignificante, lo que les permite actuar como un inhibidor dedicado de la señalización mediada por SIRPα *in vivo*. Como un atributo adicional, la proteína de fusión exhibe una unión insignificante a los glóbulos rojos. Esto está en marcado contraste con otros inhibidores de este eje, tales como los anticuerpos contra CD47, que se unen fuertemente a los glóbulos rojos, en algunos casos causando hemaglutinación. Con la presente proteína de fusión, la dosificación no necesita tener en cuenta el efecto de "hundimiento" en el que el fármaco administrado queda secuestrado e inactivo en forma unida a los GR, o para tener en cuenta cualquier evento adverso causado por la interacción de los GR.

40 En la presente memoria se describe una proteína de fusión SIRPαFc útil para la inhibición de la estimulación mediada por SIRPα de CD47 unido a la célula, comprendiendo la proteína de fusión un componente de proteína SIRPα y, fusionada con el mismo, un componente de región constante de anticuerpo (Fc), en donde el componente de proteína SIRPα consiste en o comprende el dominio V de SIRPα humana y el componente Fc es la región constante de una IgG que tiene función efectora. El Fc se puede seleccionar de la región constante de un anticuerpo IgG1 o un anticuerpo IgG4.

45 En la presente memoria se describe un polinucleótido que codifica una forma secretable de la fusión SIRPαFc como un polipéptido de cadena sencilla. En la presente memoria se describe un anfitrión útil para producir la proteína de fusión SIRPαFc, teniendo el anfitrión el polinucleótido incorporado expresablemente en el mismo. En la presente memoria se describe un método para obtener la proteína de fusión SIRPαFc, que comprende cultivar o hacer crecer el anfitrión, y recuperar la fusión SIRPαFc como una proteína dimérica. El anfitrión puede ser un anfitrión eucariótico de cualquier especie que glicosila proteínas expresadas.

55

En la presente memoria se describe una composición farmacéutica útil para el tratamiento de un sujeto que presenta una célula enferma que es CD47+, comprendiendo la composición un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad de la proteína de fusión SIRPαFc eficaz para inhibir el crecimiento o la proliferación de la célula enferma CD47+.

- 5 En la presente memoria se describe un método para el tratamiento de un sujeto que presenta células enfermas CD47+, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión SIRPαFc eficaz para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de las células enfermas. En la presente memoria se describe el uso de la proteína SIRPαFc para el tratamiento del cáncer o cualquier otra enfermedad en la que estén presentes las células enfermas CD47+. En la presente memoria se describe la proteína SIRPαFc para la fabricación de un fármaco para el
- 10 tratamiento del cáncer u otra enfermedad en la que están presentes las células enfermas CD47+. De forma similar, se describe en la presente memoria una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una célula enferma CD47+, que comprende la proteína SIRPα-Fc y un portador farmacéuticamente aceptable. Las células enfermas pueden ser células cancerosas CD47+, incluyendo concretamente células de leucemia CD47+, tal como la AML.
- 15 Estos y otros aspectos de la presente invención se describen ahora con mayor detalle con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

Referencia a las figuras

- La Figura 1 compara la unión de las fusiones SIRPα denominadas TTI-602 y TTI-616 a CD47 humano utilizando un ensayo de unión directa (Figura 1A) y un ensayo de competición indirecta (Figura 1B). Más concretamente, se comparó la unión de SIRPαFc con un solo dominio V de SIRPα N-terminal (TTI-616) con una fusión que constaba de los tres dominios SIRPα extracelulares (V-C-C) (TTI-602). A) Ensayo de unión directa. Se incubaron células T Jurkat CD47+ humanas con cantidades tituladas de TTI-602 o TTI-616 y la unión se analizó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo policlonal anti-IgG. B) Ensayo de inhibición competitiva. Se incubaron células Jurkat con SIRPαFc biotinilada (TTI-601) en presencia de cantidades tituladas de competidor frío TTI-602 o TTI-616. La unión se midió por citometría de flujo, y los resultados se convirtieron en porcentaje de inhibición, definiéndose 0% como unión en ausencia de competidor.
- 20
- 25

- La Figura 2 muestra los perfiles de unión (Kd) para tres proteínas de fusión de SIRPα diferentes. Se revelan perfiles de unión muy similares, que producen valores de unión por afinidad (Kd) casi idénticos (2,3-2,4 nM). Esto era de esperar, ya que las tres proteínas contienen la misma región de SIRPα y no se predijo que la región Fc afectaría a la unión del ligando. Más concretamente, las células T Jurkat CD47+ humanas se incubaron con cantidades tituladas de proteínas de fusión y la unión se analizó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo policlonal anti-IgG. A continuación se normalizaron las medias geométricas y generaron las curvas de unión y los valores de Kd mediante Prism (Graphpad) utilizando una regresión no lineal que ajusta los datos a un modelo de unión de un sitio.
- 30

- La Figura 3 (véase también la Figura 6) muestra que TTI-621 y TTI-622 exhiben una actividad de fagocitosis similar, mientras que TTI-616 es claramente más débil (esto es particularmente evidente a la dosis 10 nM). Esto indica que se requiere una región Fc de IgG4 o IgG1 de tipo salvaje para la destrucción máxima por los macrófagos de células tumorales activada por SIRPαFc. Más concretamente, los macrófagos se generaron cultivando monocitos CD14+ de sangre periférica humana durante al menos 1 semana en presencia de factor estimulante de colonias de monocitos, y a continuación se activaron con interferón gamma (durante la noche) y LPS (1 hora). Las células OCI/AML-2 se marcaron con CFSE y se incubaron durante 30 minutos con fusiones SIRPαFc a las concentraciones indicadas o proteínas de control Fc (Fc de hlgG4 (TTI-401) o Fc hlgG1 (TTI-402) mutados) a 1 mM o no se trataron (UT). Las células AML-2 y los macrófagos se cultivaron conjuntamente durante 2 horas, y los macrófagos se tiñeron con producto conjugado de aglutinina de germen de trigo y Alexa Fluor® 555 y se analizaron por microscopía confocal. El índice de fagocitosis se define como el número de células de AML englobadas por 100 macrófagos, contando al menos 200 macrófagos por muestra. Las proteínas de fusión con una región Fc de hlgG4 mutada se muestran como barras de color blanco, la hlgG4 de tipo salvaje como barras de color gris y la IgG1 de tipo salvaje como barras de color negro. **p <0,05, *p <0,01 vs. control de isotipo (ANOVA de una vía y prueba posterior de Dunnett).
- 35
- 40
- 45

- La Figura 4 muestra que la proteína de fusión TTI-621 que porta una región Fc de IgG1 fue la única proteína capaz de mediar un efecto antileucémico en el sitio del trasplante (el fémur que recibió inyección). En la médula ósea que no recibió inyección, hubo un claro efecto dependiente de Fc, con TTI-621 (actividad completa de Fc) > TTI-622 (baja actividad de Fc) > TTI-616 (sin actividad de Fc). Se irradiaron de manera subletal ratones NOD/ShiLtJ-Prkdc^{scid} (NOD.SCID) (8-12 semanas de edad) con 275 cGy de un irradiador g de 137Cs y se trataron con anticuerpo anti-CD 122 (para agotar las células NK) antes de la inyección intrafemoral de células de AML recolectadas de un paciente humano con leucemia. Comenzando tres semanas después del trasplante, los ratones fueron tratados con proteínas de fusión SIRPαFc (8 mg/kg IP tres veces por semana) o dosis equimolares de proteínas Fc de control TTI-401 (IgG4 humana mutada) o TTI-402 (IgG1 humana). Después de 4 semanas de tratamiento, se sacrificaron los ratones y se detectaron células de leucemia humana en el fémur que había recibido la inyección, médula ósea y bazo que no habían recibido la inyección mediante análisis de citometría de flujo, tinción para la expresión de marcadores CD45 humanos y CD33 humanos. El injerto de AML se expresó como el porcentaje de células CD45+CD33+ humanas en cada compartimento.
- 50
- 55
- 60

Figura 5 Se incubaron células T Jurkat CD47+ humanas con proteínas de fusión SIRPαFc o Fc de control (3 M) o se dejaron sin tratar (UT) durante la noche y a continuación se tiñeron para determinar la anexina-V y se analizaron por citometría de flujo. El agente pro-apoptótico estaurosporina (Staur) a 1 M se incluyó como control positivo. Una muestra que contenía TTI-602 se trató previamente con B6H12, un anticuerpo de bloqueo de CD47.

5 La Figura 6 muestra los resultados obtenidos utilizando los protocolos descritos para la Figura 3, pero con un conjunto de datos más desarrollado.

Figura 7 A) Se tiñeron eritrocitos humanos con cantidades tituladas del anticuerpo anti-CD47 B6H12 o TTI-616 y se analizaron por citometría de flujo. B) Se tiñeron eritrocitos humanos con un panel de anticuerpos monoclonales anti-CD47 (2D3, B6H12, BRIC126 y CC2C6) o la proteína de fusión SIRPαFc TTI-622 y se analizaron por citometría de flujo. Cada reactivo se empleó a una concentración saturante identificada en los experimentos de optimización anteriores. Se utilizó TTI-401 como Fc de control. Los datos mostrados se agrupan a partir de seis donantes. C) Se tiñeron células tumorales AML-2 con anticuerpos CD47 o TTI-622 y se analizaron por citometría de flujo. Los datos se muestran para una sola dosis alta (660 nM) de cada reactivo.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a la proteína SIRPα humana, en una forma fusionada directa o indirectamente con una región constante de anticuerpo, o Fc. A menos que se indique lo contrario, el término "SIRPα humana", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una forma madura, endógena y de tipo salvaje de SIRPα humana. En seres humanos, la proteína SIRPα se encuentra en dos formas principales. Una forma, la variante 1 o la forma V1, tiene la secuencia de aminoácidos expuesta como RefSeq NP 542970.1 de NCBI (los residuos 27-504 constituyen la forma madura).

20 Otra forma, la variante 2 o forma V2, difiere en 13 aminoácidos y tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en GenBank como CAA71403.1 (los residuos 30-504 constituyen la forma madura). Estas dos formas de SIRPα constituyen aproximadamente 80% de las formas de SIRPα presentes en seres humanos, y ambas están incluidas en la presente memoria mediante el término "SIRPα humana". El término "SIRPα humana" también abarca las formas menores de la misma que son endógenas para los seres humanos y tienen la misma propiedad de desencadenar la transducción de señales a través de CD47 al unirse a las mismas. La presente invención se dirige más concretamente a la forma variante 2, o V2.

Las presentes proteínas de fusión SIRPαFc incorporan uno de los tres dominios de inmunoglobulina (Ig) que se encuentran dentro de la región extracelular de SIRPα humana. Más concretamente, las presentes proteínas SIRPαFc incorporan los residuos 32-137 de SIRPα humana (un polímero de 106 unidades), que constituyen y definen el dominio IgV de la forma V2 de acuerdo con la nomenclatura actual. Esta secuencia SIRPα, que se muestra a continuación, es referida en la presente memoria como SEQ ID No. 1.

EELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTT
VSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGGSPDTEFKSGA [SEQ ID No.1]

35 Las proteínas de fusión SIRPαFc pueden incorporar el dominio IgV como se define en SEQ ID No. 1, y residuos flanqueantes adicionales contiguos dentro de la secuencia SIRPα. Esta forma preferida del dominio IgV, representada por los residuos 31-148 de la forma V2 de SIRPα humana, es un polímero de 118 unidades que tiene SEQ ID No. 22 que se muestra a continuación:

EEELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVT
TVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
[SEQ ID No.22]

40 Se ha encontrado que la actividad de esta forma V2 de SIRPα humana es sorprendentemente mayor, en términos de afinidad de unión a CD47, con respecto a la afinidad de unión a CD47 de todo el dominio extracelular de SIRPα. Esta afinidad de unión es al menos dos veces mayor que la afinidad de unión de todo el dominio extracelular. La afinidad puede ser al menos 3 veces, 4 veces, 5 veces o mayor para el dominio V2 con respecto al dominio extracelular completo. En un ensayo de unión directa, como se informa en el Ejemplo 1 en la presente memoria, una proteína de fusión que incorpora este dominio SIRPα tiene una afinidad de unión aproximadamente 10 veces mayor que una proteína de fusión que incorpora todo el dominio extracelular de SIRPα. Del mismo modo, en un ensayo de competición indirecta también referido en el Ejemplo 1 de la presente memoria, la fusión de dominio único V2/IgV proporciona una afinidad de unión que es superior a la afinidad de unión a CD47 de una fusión que incorpora la región extracelular completa de SIRPα. Por consiguiente, las fusiones SIRPαFc basadas en este dominio V preferido tienen el potencial de una mayor potencia para inhibir la señalización de CD47 que se estimula al unirse con SIRPα.

50 Las presentes proteínas de fusión de SIRPα también incorporan una región Fc que tiene función efectora. La preferencia por la función efectora es completamente sorprendente y difícil de explicar con la información actual sobre el eje CD47/SIRPα. Podría esperarse que una región Fc sin efector tuviera actividad suficiente para inhibir este eje, y que no se ganara nada más integrando la función efectora. Sin embargo, los datos presentados en la presente memoria, particularmente en el Ejemplo 5, muestran claramente que se añade un beneficio a un Fc efector

activo, en términos de la actividad antileucémica *in vivo* de la fusión. Esto es particularmente sorprendente a la luz de los resultados mostrados en el Ejemplo 4, donde la actividad fagocítica de la fusión no parece mostrar *in vitro* una preferencia particular por las fusiones basadas en componentes Fc efectores activos o no efectores.

5 Para su uso en las fusiones SIRPαFc actuales, los componentes Fc adecuados son aquellos que tienen función efectora. Un componente Fc que tiene función efectora es un componente Fc que tiene al menos alguna función efectora, tal como al menos alguna contribución a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o alguna capacidad para fijar el complemento. Asimismo, el Fc al menos se unirá a los receptores de Fc. Estas propiedades se pueden revelar utilizando ensayos establecidos para este propósito. Los ensayos funcionales incluyen el ensayo convencional de liberación de cromo que detecta la lisis de células diana. Según esta definición, una región Fc que es IgG1 o IgG4 de tipo salvaje tiene una función efectora, mientras se considera que la región Fc de una IgG4 humana mutada para eliminar la función efectora, por ejemplo mediante la incorporación de una serie de alteraciones que incluye Pro233, Va1234, Ala235 y la delección de Gly236 (EU) no tiene función efectora. El Fc se puede basar en anticuerpos humanos del isotipo IgG1. La región Fc de estos anticuerpos será fácilmente identificable por los expertos en la técnica. En realizaciones, la región Fc incluye los dominios bisagra inferior-CH2-CH3.

La región Fc se puede basar en la secuencia de aminoácidos de una IgG1 humana expuesta como P01857 en UniProtKB/Swiss-Prot, residuos 104-330, y tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra a continuación y citada en la presente memoria como SEQ ID No. 2:

```
DK'THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
[SEQ ID No.2]
```

20 Por lo tanto, la región Fc puede tener una secuencia de tipo salvaje o consenso de una región constante de IgG1. Alternativamente, la región Fc incorporada en la proteína de fusión se obtiene de cualquier anticuerpo IgG1 que tenga una región constante efectora activa típica. Las secuencias de tales regiones Fc pueden corresponder, por ejemplo, a las regiones Fc de cualquiera de las siguientes secuencias de IgG1 (todas citadas en GenBank), por ejemplo: BAG65283 (residuos 242-473), BAC04226.1 (residuos 247-478), BAC05014.1 (residuos 240-471), CAC20454.1 (residuos 99-320), BAC05016.1 (residuos 238-469), BAC85350.1 (residuos 243-474), BAC85529.1 (residuos 244-475) y BAC85429.1 (residuos (238-469).

La región Fc puede tener una secuencia de una región constante de IgG4 humana de tipo salvaje.

30 Alternativamente, la región Fc incorporada en la proteína de fusión se obtiene de cualquier anticuerpo IgG4 que tenga una región constante con actividad efectora que esté presente pero, naturalmente, sea significativamente menos potente que la región Fc de IgG1. Las secuencias de tales regiones Fc pueden corresponder, por ejemplo, a las regiones Fc de cualquiera de las siguientes secuencias de IgG4: P01861 (residuos 99-327) de UniProtKB/Swiss-Prot y CAC20457.1 (residuos 99-327) de GenBank.

35 La región Fc se puede basar en la secuencia de aminoácidos de una IgG4 humana expuesta como P01861 en UniProtKB/Swiss-Prot, residuos 99-327, y tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra a continuación y citada en la presente memoria como SEQ ID No.23:

```
ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDSFFLYRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
[SEQ ID No.23]
```

40 La región Fc puede incorporar una o más alteraciones, generalmente no más de aproximadamente 5 de tales alteraciones, incluidas las sustituciones de aminoácidos que afectan a ciertas propiedades de Fc. En una realización específica y preferida, la región Fc incorpora una alteración en la posición 228 (numeración EU), en la que la serina en esta posición se sustituye por una prolina (S²²⁸P), para estabilizar de ese modo el enlace disulfuro dentro del dímero de Fc. Otras alteraciones dentro de la región Fc pueden incluir sustituciones que alteran la glicosilación, tal como la sustitución de Asn²⁹⁷ por glicina o alanina; alteraciones que mejoran la semivida tales como T²⁵²L, T²⁵³S y T²⁵⁶F como se ilustra en US62777375, y muchas otras. Particularmente útiles son aquellas alteraciones que mejoran las propiedades de Fc mientras permanecen silenciosas con respecto a la conformación, p. ej., conservando la unión al receptor de Fc.

En el caso en el que el componente Fc es un Fc de IgG4, el Fc puede incorporar al menos la mutación S²²⁸P, y tiene la secuencia de aminoácidos expuesta a continuación y citada en la presente memoria como SEQ ID No. 24:

ESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
[SEQ ID No.24]

5 En la presente memoria se describe una proteína de fusión útil para inhibir la unión de SIRPα humana y CD47 humano, para inhibir o reducir de ese modo la transmisión de la señal mediada a través de CD47 unido a SIRPα, la proteína de fusión que comprende un componente SIRPα humana y, unida a ella, un componente Fc, en donde el componente SIRPα comprende o consiste en un solo dominio IgV de SIRPα V2 humana y el componente Fc es la región constante de una IgG humana que tiene función efectora.

10 La proteína de fusión puede comprender un componente SIRPα que consiste al menos en los residuos 32-137 de la forma V2 de SIRPα humana de tipo salvaje, es decir, SEQ ID No. 1. El componente SIRPα puede consistir en los residuos 31-148 de la forma V2 de SIRPα humana, es decir, SEC ID No. 22. El componente Fc puede ser el componente Fc de IgG1 humana denominado P01857, y puede tener la secuencia de aminoácidos que incorpora la región bisagra inferior-CH2-CH3 de la misma, es decir, SEQ ID No. 2.

15 En la presente memoria se describe una proteína de fusión SIRPαFc, como un polipéptido de cadena sencilla expresado y como una fusión dimérica secretada del mismo, en donde la proteína de fusión incorpora un componente SIRPα que tiene SEC ID No. 1 y preferiblemente SEC ID No. 22 y, fusionada con el mismo, una región Fc que tiene función efectora y que tiene SEQ ID No. 2. Cuando el componente SIRPα es SEC ID No. 1, esta proteína de fusión comprende SEC ID No. 3, que se muestra a continuación:

EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTIVSEST
KRENMDFSISISNITPADAGTYICVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKITPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK* [SEQ ID No.3]

20 Cuando el componente SIRPα es SEC ID No. 22, esta proteína de fusión comprende SEC ID No. 25, que se muestra a continuación:

EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVT
TVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYICVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVRAKPSDKT
HTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK [SEQ ID No.25]

25 El componente Fc de la proteína de fusión puede basarse en una IgG4, y preferiblemente una IgG4 que incorpora la mutación S²²⁸P. En el caso en el que la proteína de fusión incorpora el dominio IgV de SIRPα preferido de SEQ ID No. 22, la proteína SIRPα-Fc basada en IgG4 resultante tiene SEQ ID No. 26, que se muestra a continuación:

EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVT
TVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYICVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVRAKPSKEY
GPPCPPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK [SEQ ID No.26]

La proteína de fusión puede comprender, como dominio IgV de SIRPα de la proteína de fusión, una secuencia que es SEC ID No. 22. La SIRPαFc preferida es SEC ID No. 25.

30 En la proteína de fusión SIRPαFc, el componente SIRPα y el componente Fc se fusionan, directa o indirectamente, para proporcionar un polipéptido de cadena sencilla que finalmente se produce como un dímero en el que los polipéptidos de cadena sencilla se acoplan a través de enlaces disulfuro intracatenarios formados dentro de la región Fc. La naturaleza de la región de fusión no es crítica. La fusión puede ser directa entre los dos componentes, constituyendo el componente SIRP el extremo N-terminal de la fusión y constituyendo el componente Fc el extremo

C-terminal. Alternativamente, la fusión puede ser indirecta, a través de un conector compuesto por uno o más aminoácidos, aminoácidos codificados genéticamente deseablemente, tales como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez aminoácidos, o cualquier número de aminoácidos entre 5 y 100 aminoácidos, tal como entre 5 y 50, 5 y 30 o 5 y 20 aminoácidos. Un conector puede comprender un péptido que está codificado por ADN que constituye un sitio de restricción, tal como un sitio BamHI, ClaI, EcoRI, HindIII, PstI, Sall y XhoI y similares.

Los aminoácidos del conector típicamente y de manera deseable proporcionarán cierta flexibilidad para permitir que los componentes Fc y SIRP adopten sus conformaciones activas. Los residuos que permiten tal flexibilidad típicamente son Gly, Asn y Ser, de modo que prácticamente cualquier combinación de estos residuos (y particularmente Gly y Ser) dentro de un conector puede proporcionar el efecto de enlace deseado. En un ejemplo, tal conector se basa en la denominada secuencia G₄S (Gly Gly-Gly-Gly-Ser) que se puede repetir como (G₄S)_n donde n es 1, 2, 3 o más, o se basa en (Gly)_n, (Ser)_n, (Ser Gly)_n o (Gly-Ser)_n y similares. El conector puede ser GTELSVRAKPS (SEQ ID No. 21). Esta secuencia constituye la secuencia de SIRPα que flanquea C-terminalmente el dominio IgV (entendiéndose que esta secuencia flanqueante se podría considerar un conector o una forma diferente del dominio de IgV cuando se acopla a la secuencia mínima de IgV descrita anteriormente). Solo es necesario que la región de fusión o el conector permitan que los componentes adopten sus conformaciones activas, y esto se puede lograr mediante cualquier forma de conector útil en la técnica.

La fusión SIRPαFc es útil para inhibir la interacción entre SIRPα y CD47, y así bloquear la señalización a través de este eje. Se sabe que la estimulación de SIRPα en los macrófagos por parte de CD47 inhibe la fagocitosis mediada por macrófagos al desactivar la miosina II y la actividad citoesquelética contráctil implicada en el arrastre de una diana hacia un macrófago. Por lo tanto, la activación de esta cascada es importante para la supervivencia de las células enfermas CD47+, y el bloqueo de esta vía permite a los macrófagos erradicar la población de células enfermas CD47+.

El término "CD47+" se emplea con referencia al fenotipo de células elegidas como diana para la unión a los presentes polipéptidos. Las células que son CD47+ se pueden identificar mediante citometría de flujo utilizando el anticuerpo contra CD47 como ligando de afinidad. Los anticuerpos contra CD47 que están marcados apropiadamente están disponibles comercialmente para este uso (por ejemplo, el clon B6H12 está disponible de Santa Cruz Biotechnology). Las células examinadas para el fenotipo CD47 pueden incluir muestras convencionales de biopsia tumoral, incluidas particularmente muestras de sangre tomadas del sujeto sospechoso de albergar células cancerosas CD47+ endógenas. Las células enfermas CD47 de particular interés como dianas para la terapia con las presentes proteínas de fusión son aquellas que "expresan en exceso" CD47. Estas células CD47+ típicamente son células enfermas y presentan CD47 a una densidad sobre su superficie que excede la densidad normal de CD47 para una célula de un tipo dado. La expresión en exceso de CD47 variará entre los diferentes tipos de células, pero en la presente memoria se hace referencia a cualquier nivel de CD47 que se determine, por ejemplo, mediante citometría de flujo como se ilustra en la presente memoria o mediante inmunotinción o análisis de expresión génica o similar, que es mayor que el nivel medible en una célula equivalente que tiene un fenotipo CD47 que es normal para ese tipo de célula.

Por consiguiente, para uso terapéutico, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de la presente proteína de fusión SIRPαFc. Como se emplea en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" significa cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles y útiles en la técnica de la formulación de proteínas/anticuerpos. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender adicionalmente cantidades mínimas de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la eficacia del agente farmacológico. En realizaciones, la fusión SIRPαFc se formula utilizando prácticas convencionales en la técnica de formulación de anticuerpos terapéuticos. Las soluciones que son adecuadas para la administración intravenosa, tales como por inyección o infusión, son particularmente útiles.

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 mencionados anteriormente, según sea necesario, seguido de microfiltración en condiciones estériles. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación, son el secado a vacío y el secado por congelación (liofilización) los que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada en condiciones estériles del mismo.

Como se emplea en la presente memoria, "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante un período de tiempo concreto necesario, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del agente farmacológico puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la

enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del agente farmacológico para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del agente farmacológico es compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

5 La proteína de fusión SIRPαFc se puede administrar al sujeto a través de cualquiera de las rutas expuestas para el suministro de proteínas, en particular inyección o infusión intravenosa, intradérmica y subcutánea, o mediante administración oral o nasal. La proteína de fusión se administrará típicamente a una dosis en el intervalo de 0,5 a 15 mg/kg de peso corporal del sujeto por día. Se apreciará que la dosis eficaz (una cantidad eficaz en el tratamiento de la enfermedad o afección, como se evidencia por una reducción en el crecimiento o la tasa de proliferación o tamaño de las células o masa cancerosas) variará de acuerdo con una serie de factores que incluyen la edad y la salud general del sujeto y la gravedad de la enfermedad que se vaya a tratar.

10 La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una sola forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se vaya a tratar y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo requerida para producir una única forma de dosificación unitaria generalmente será la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, p. ej., de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de ingrediente activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable.

15 Una composición de la presente invención se puede administrar a través de una o más vías de administración utilizando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas para las proteínas de fusión de la invención incluyen vías intravenosas, intramusculares, intradérmicas, intraperitoneales, subcutáneas, espinales u otras vías parenterales para la administración, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral" incluye inyección tal como inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

20 Alternativamente, una proteína de fusión de la invención se puede administrar a través de una vía no parenteral, tal como por instilación o por una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasalmente, oralmente, vaginalmente, rectalmente o sublingualmente.

25 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, o se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indique la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. "Forma de dosificación unitaria" como se emplea en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se vayan a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico concreto que se vaya a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

30 Para la administración de la proteína de fusión, la dosis unitaria estará dentro del intervalo de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, de peso corporal del anfitrión. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ilustrativo implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación preferidos para la proteína de fusión de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, administrándose la proteína de fusión utilizando uno de los siguientes programas de dosificación; (i) cada cuatro semanas durante seis dosificaciones, a continuación cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración de proteína de fusión en plasma de aproximadamente 1-1000 ug/ml y en algunos métodos de aproximadamente 25-300 ug/ml.

35 La presente proteína de fusión muestra una unión insignificante a los glóbulos rojos. Por lo tanto, no es necesario tener en cuenta un "sumidero" de GR cuando se establecen regímenes de dosificación eficaces. En relación con otros inhibidores de SIRPα/CD47 que están unidos por los GR, se estima que la fusión SIRP-Fc actual puede ser eficaz a dosis que son menos de la mitad de las dosis requeridas para los fármacos que se unen a los GR, tales como los anticuerpos contra CD47.

Además, la proteína de fusión SIRP α -Fc es un antagonista dedicado de la señal mediada por SIRP α , ya que muestra un agonismo de CD47 insignificante cuando se une a la misma. En consecuencia, no es necesario, al establecer regímenes de dosificación unitaria médicamente útiles, dar cuenta de cualquier estimulación inducida por el fármaco.

5 La proteína de fusión también se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían según la semivida de la proteína de fusión en el paciente. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente
10 baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca o termine, y preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, el paciente puede ser tratado con un régimen profiláctico.

15 Las proteínas SIRP α Fc de la presente invención son útiles para el tratamiento de una variedad de células enfermas CD47+. Estas incluyen particularmente las células cancerosas CD47+, incluyendo los tumores líquidos y sólidos. En una realización, las proteínas SIRP α Fc se utilizan para inhibir el crecimiento o la proliferación de cánceres hematológicos. Como se emplea en la presente memoria, "cáncer hematológico" se refiere a un cáncer de la sangre e incluye leucemia, linfoma y mieloma, entre otros. La "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
20 partes que forman la sangre, tales como las plaquetas y los glóbulos rojos. Se entiende que los casos de leucemia se clasifican como agudos o crónicos. Ciertas formas de leucemia pueden ser, a modo de ejemplo, leucemia linfocítica aguda (ALL); leucemia mieloide aguda (AML); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia mielógena crónica (CML); trastorno mieloproliferativo/neoplasia (MPDS); y síndrome mielodisplásico. El "linfoma" puede referirse al linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin tanto indolente como agresivo, el linfoma de Burkitt y el linfoma folicular (células pequeñas y células grandes), entre otros. El mieloma puede referirse a mieloma múltiple (MM),
25 mieloma de células gigantes, mieloma de cadena pesada y mieloma de cadena ligera o de Bence-Jones.

En algunas realizaciones, el cáncer hematológico tratado con la proteína SIRP α Fc es una leucemia CD47+, preferiblemente seleccionada entre leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica y síndrome mielodisplásico, preferiblemente, leucemia mieloide aguda humana.

30 En otras realizaciones, el cáncer hematológico tratado con la proteína SIRP α Fc es un linfoma o mieloma CD47+ seleccionado entre linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin tanto indolente como agresivo, linfoma de Burkitt, linfoma folicular (células pequeñas y células grandes), mieloma múltiple (MM), mieloma de células gigantes, mieloma de cadena pesada y mieloma de cadena ligera o de Bence-Jones, así como leiomiocarcinoma.

35 Los tumores sólidos también se pueden tratar con la presente proteína de fusión, para reducir el tamaño, el número o la tasa de crecimiento de los mismos y para controlar el crecimiento de células madre cancerosas. Tales tumores sólidos incluyen tumores CD47+ en vejiga, cerebro, mama, pulmón, colon, ovarios, próstata, hígado y también otros tejidos.

La proteína SIRP α Fc se puede administrar sola, como monoterapia, o combinada con cualquier otro agente útil en el tratamiento de la indicación elegida como diana.

40 La proteína SIRP α Fc también es útil para detectar la presencia de células CD47+. Esto se puede lograr indirectamente, incubando primero la proteína y las células de prueba con la proteína de fusión y a continuación sondeando con un agente detectable que se una a la proteína de fusión, o directamente proporcionando la proteína de fusión en forma marcada.

45 En otro aspecto, la presente invención presenta la proteína de fusión conjugada con un radical de diagnóstico o terapéutico, tal como un marcador detectable, una citotoxina, un fármaco o una radiotoxina. Los productos conjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas" o productos conjugados de fármacos. Una citotoxina o agente citotóxico incluyen cualquier agente que sea perjudicial para (p. ej., destruir) las células. Los ejemplos incluyen taxol, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, mitoxantrona, migramicina y actinomicina D. Los agentes terapéuticos también
50 incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina y citarabina), agentes alquilantes (p. ej., ciclofosfamida, busulfán, mitomicina C y cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorubicina y doxorubicina) y antibióticos (p. ej., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramycin (AMC) y agentes antimetabólicos (p. ej., vincristina y vinblastina)

55 Los ejemplos no limitantes de marcadores detectables con los que se puede conjugar una proteína de fusión incluyen fluoresceína, cianina, Cy-3, biotina, radioisótopos que incluyen I-¹²³ e I-¹²⁵, y similares. Las proteínas de fusión se pueden marcar con tales marcadores detectables mediante métodos conocidos en la técnica. Las citotoxinas se pueden conjugar con proteínas de fusión de la invención utilizando la tecnología de conectores disponible en la técnica. Los ejemplos de tipos de conector que se han empleado para conjugar una citotoxina con

una proteína de fusión incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y conectores que contienen péptidos.

Las proteínas de fusión de la presente invención también se pueden conjugar con un isótopo radiactivo para generar radiofármacos citotóxicos, también denominados productos radioconjugados. Los ejemplos de isótopos radiactivos que se pueden conjugar con proteínas de fusión para su uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰, y lutecio¹⁷⁷. Los métodos para preparar productos radioconjugados se establecen en la técnica.

En una realización, las proteínas de fusión se pueden emplear para detectar niveles de CD47, o niveles de células que contienen CD47 sobre su superficie de membrana. La detección de CD47 utilizando una proteína de fusión SIRPαFc se puede lograr, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra (tal como una muestra *in vitro*) y una muestra de control con la proteína de fusión en condiciones que permitan la formación de un complejo entre la proteína de fusión y CD47. Cualquier complejo formado entre la proteína de fusión y CD47 se detecta y compara en la muestra y el control. Por ejemplo, se pueden realizar métodos de detección convencionales, bien conocidos en la técnica, tales como ELISA y ensayos de citometría de flujo, utilizando las composiciones de la invención.

Por lo tanto, las proteínas de fusión son útiles para fines de diagnóstico, incluidas las pruebas de muestras y la generación de imágenes *in vivo*, y con fines terapéuticos para el tratamiento de enfermedades que tienen, como sello distintivo, células enfermas en las que CD47 está regulado por incremento.

Para cualquier propósito, la proteína de fusión se puede conjugar con un agente apropiado, para formar un producto conjugado con fármaco. Los agentes apropiados para el tratamiento de la enfermedad incluyen agentes citotóxicos tales como quimioterapéuticos y radioterapéuticos. Para fines de diagnóstico, los agentes apropiados son marcas detectables que incluyen radioisótopos, para generar imágenes de todo el organismo, y radioisótopos, enzimas, marcas fluorescentes y otras etiquetas de anticuerpos adecuadas para la prueba de muestras.

Para la detección de CD47, las marcas detectables pueden ser cualquiera de los diversos tipos utilizados actualmente en el campo del diagnóstico *in vitro*, incluidas las marcas particuladas que incluyen soles metálicos tales como oro coloidal, isótopos tales como I¹²⁵ o Tc⁹⁹ presentado, por ejemplo, con un agente quelante peptídico del tipo N2S2, N3S o N4, cromóforos que incluyen marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores fosforescentes y similares, así como marcas enzimáticas que convierten un sustrato dado en un marcador detectable y etiquetas polinucleotídicas que se revelan después de la amplificación, por ejemplo mediante reacción en cadena de la polimerasa. Las marcas enzimáticas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y similares. Por ejemplo, la marca puede ser la enzima fosfatasa alcalina, detectada midiendo la presencia o la formación de quimioluminiscencia después de la conversión de sustratos de 1,2-dioxetano tales como el adamantil metoxi fosforiloxi fenil dioxetano (AMPPD), 3-(4-(metoxiespiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-cloro)tricyclo{3,3,1,1,3,7}decan)-4-il)fenilfosfato disódico (CSPD), así como CDP y CDP-star® u otros sustratos luminiscentes bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, los quelatos de lantánidos adecuados tales como el Terbio (III) y el Europio (III). El medio de detección está determinado por la marca elegida. Se puede lograr la aparición de la marca o sus productos de reacción a simple vista, en caso de que la marca sea particulada y se acumule a niveles apropiados, o utilizando aparatos tales como un espectrofotómetro, un luminómetro, un fluorímetro y similares, todo de acuerdo con la práctica convencional.

Para la terapia basada en la proteína de fusión SIRPαFc, la citotoxina se puede conjugar con la proteína de fusión mediante interacción no covalente, pero más deseablemente, se acoplan mediante enlace covalente directamente o, más preferiblemente, a través de un conector adecuado. En una realización preferida, el producto conjugado comprende una citotoxina y una proteína de fusión. Los productos conjugados de la proteína de fusión y la citotoxina se preparan utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol), iminotiolano, derivados bifuncionales de imidoésteres tales como adipimidato dimetilo · HCl, ésteres activos tales como suberato de disuccinimidilo, aldehídos tales como glutaraldehído, compuestos de bis-azido tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilendiamina, diisocianatos tales como 2,6-diisocianato de tolueno y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). El ácido 1-isotiocianobencil-3-metildietilentiainopentaacético (MX-DTPA) marcado con C¹⁴ es un agente quelante adecuado para la conjugación de radionúclido con el anticuerpo.

El componente de citotoxina del producto inmunconjugado puede ser un agente quimioterapéutico, un anticuerpo terapéutico, una toxina tal como una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma, o una toxina de molécula pequeña, o un isótopo radiactivo tal como ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ¹¹¹In, ⁹⁰Y, y ¹⁸⁶Re, o cualquier otro agente que actúe para inhibir el crecimiento o la proliferación de una célula cancerosa.

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales productos conjugados de fármacos incluyen los maitansinoides, incluidos DM-1 y DM-4, auristatinas, adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxoides, p. ej. paclitaxel, y docetaxel, taxótero, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas, 5-FU, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, actinomicina D, VP-16, clorambucilo, melfalán y

5 otras mostazas nitrogenadas relacionadas. También se incluyen agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como el tamoxifeno y la onapristona. Las toxinas y fragmentos de las mismas que se pueden emplear incluyen la cadena A de la difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, toxina de cólera, toxina botulínica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, saporina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotcenos. Las toxinas de molécula pequeña incluyen, por ejemplo, caliqueamicinas, maitansinoides, patoxina y CC1065.

10 Las proteínas de fusión se unen selectivamente al antígeno diana, CD47, y se utilizan, de acuerdo con un aspecto de la invención, para escrutar células cancerosas y otras células enfermas para detectar aquellas que presentan el antígeno CD47 a alta densidad. En una realización preferida, el escrutinio se aplica a una muestra de células cancerosas tomadas de un sujeto que es candidato para la terapia de proteína de fusión SIRPαFc. Los sujetos que dan positivo para células cancerosas que presentan el antígeno CD47 a alta densidad pueden programarse a
15 continuación para la terapia con la presente proteína de fusión, o un híbrido conjugado de la misma. Las técnicas convencionales, combinadas con las proteínas de fusión descritas en la presente memoria, se pueden emplear para escrutar células cancerosas. Deseablemente, la proteína de fusión incorpora una marca detectable. La marca puede ser detectable por sí misma (p. ej., marcas radioisotópicas o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que sea detectable. Los radionúclidos que pueden servir como marcas detectables incluyen, por ejemplo, I-¹³¹, I-¹²³, I-¹²⁵, Y⁹⁰, Re-¹⁸⁸, Re-¹⁸⁶, At-²¹¹, Cu-⁶⁷, Bi-²¹² y Pd-¹⁰⁹.

20 La detección in situ de la unión a las células cancerosas CD47+ se puede realizar, utilizando el presente anticuerpo o fragmento, por inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica. Para este propósito, se retira una muestra histológica del paciente y se le aplica una forma marcada de la proteína de fusión, preferiblemente recubriendo la muestra biológica con el anticuerpo. Este procedimiento también permite examinar la distribución del antígeno CD47 dentro del tejido tumoral biopsiado. Será evidente para los expertos en la técnica que se encuentra fácilmente disponible una amplia variedad de métodos histológicos para la detección in situ.

25 Más concretamente, las proteínas de fusión SIRPαFc de la presente invención se pueden emplear para controlar la presencia o ausencia de reactividad de las proteínas de fusión en una muestra biológica (p. ej., una biopsia de tejido, una célula o un fluido) utilizando ensayos de detección convencionales. Los ensayos inmunológicos pueden implicar la detección directa, y son particularmente adecuados para escrutar grandes cantidades de muestras para detectar la presencia de células cancerosas que son CD47+. Por ejemplo, la proteína de fusión se puede emplear en el papel de cualquier anticuerpo en cualquier formato de inmunoensayo convencional (p. ej., ELISA, transferencia Western, inmunoprecipitación, citometría de flujo o ensayo RIA) para medir la formación de complejos. Se puede utilizar cualquier marca apropiada que se pueda visualizar directa o indirectamente en estos ensayos de detección, incluyendo, sin limitación, cualquier marca radiactiva, fluorescente, cromogénica (p. ej., fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante) o quimioluminiscente, o hapteno (por ejemplo, digoxigenina o biotina) que se pueda visualizar utilizando un anticuerpo marcado, específico de hapteno u otro compañero de unión (p. ej., avidina). Se describen inmunoensayos ilustrativos, p. ej., en Ausubel et al., *Supra*, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988) y Moynagh y Schimmel, *Nature* 400: 105, 1999. Por ejemplo, utilizando las proteínas de fusión descritas en la presente memoria, se detecta fácilmente CD47 de alta densidad en la superficie celular utilizando métodos de citometría de flujo convencionales. Las muestras que contienen complejo marcado en comparación con las muestras de control apropiadas se toman como indicativas de la presencia de CD47 de alta densidad y, por lo tanto, son indicativas de un cáncer u otra enfermedad susceptible de tratamiento con las presentes proteínas de fusión.

45 Se apreciará que las presentes proteínas de fusión comprenden dos moléculas, cada una de las cuales comprende un polipéptido de cadena sencilla que incorpora un componente de proteína SIRPα fusionado con un componente Fc.

50 La fusión de los polipéptidos de cadena sencilla para formar un dímero es el resultado de puentes disulfuro que se forman entre los componentes Fc cuando los polipéptidos de cadena sencilla son secretados por la célula anfitriona que los produce. Por lo tanto, el producto recuperado como una proteína de fusión es una proteína dimérica resultante del enlace disulfuro entre dos moléculas del polipéptido de cadena sencilla que incorpora tanto el componente Fc como el componente SIRPα.

55 Por lo tanto, la presente invención proporciona no solo los polipéptidos de cadena sencilla en los que el componente de proteína SIRPα se fusiona con la región Fc, es decir, el componente CH, sino que también proporciona una proteína de fusión dimérica en la que dos copias de estos polipéptidos de cadena sencilla se fusionan a través de sus componentes Fc respectivos. Las formas multiméricas, en las que se fusionan más de dos copias de cada polipéptido, también están dentro del alcance de la invención.

60 Para producir las presentes proteínas de fusión SIRPαFc, se obtiene el ADN que codifica una forma secretable del polipéptido de cadena sencilla, se incorpora dentro de un vector de expresión/secreción adecuado y a continuación se transfecta a un anfitrión de producción adecuado. El cultivo del transfectante resultante produce la proteína de

fusión dimérica como un producto secretado que a continuación se puede cosechar y purificar, todo en general de acuerdo con la práctica establecida, y como se ilustra en la presente memoria. Se puede obtener un polipéptido en forma de cadena sencilla de manera similar, pero se produce sin la ayuda de una señal de secreción y en un anfitrión tal como un procarionta para que no se produzca la dimerización y el polipéptido sea recuperable como una proteína intracelular.

En consecuencia, se describen en la presente memoria polinucleótidos, que incluyen ADN y ARN, que tras la expresión producen una forma secretable de los polipéptidos de cadena sencilla que forman las presentes proteínas de fusión. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de cadena sencilla preferido y secretable comprende la secuencia de ADN que tiene SEC ID No. 8, en la que los primeros 90 residuos codifican la señal de secreción del polímero de 30 unidades nativo de SIRP α humana, y los residuos restantes de ácido nucleico (SEQ ID No. 7) codifican el polipéptido FSIRP α Fc de cadena sencilla. Las realizaciones incluyen polinucleótidos en los que uno o más codones están sustituidos por codones sinónimos de los ilustrados.

En la presente memoria se describe un polinucleótido que codifica una forma secretable de la proteína de fusión basada en IgG1 que tiene SEC ID No. 25, comprendiendo el polinucleótido SEC ID No. 27. También se proporciona un polinucleótido que codifica una forma secretable de la proteína de fusión basada en IgG4 que tiene SEC ID No. 26, comprendiendo el polinucleótido SEC ID No. 28.

Se apreciará que los polinucleótidos se pueden sintetizar *de novo* utilizando síntesis génica y técnicas de clonación y amplificación convencionales para ensamblar los polinucleótidos intactos. Alternativamente, y por ejemplo, se puede obtener un polinucleótido que codifica el componente de la proteína SIRP α (p. ej., SEQ ID No. 5) y un polinucleótido que codifica el componente Fc seleccionado (p. ej., SEQ ID No. 6) mediante amplificación por PCR de fuentes de estos genes disponibles públicamente y los polinucleótidos amplificados se pueden unir mediante ligación, ya sea directamente o mediante un conector que codifica uno o más residuos de aminoácidos inocuos en términos de actividad biológica, todo de acuerdo con las técnicas expuestas, y como se ilustra en la presente memoria.

Para la expresión, se incorpora un polinucleótido que codifica el polipéptido de cadena sencilla en forma secretable dentro de vectores tales como plásmidos adecuados para expresar los polinucleótidos en el anfitrión de producción de proteína de fusión elegido. Tales vectores están disponibles comercialmente, y típicamente se construyen para permitir la introducción del polinucleótido que codifica la proteína de fusión secretable directamente bajo el control de un promotor eficaz para impulsar la expresión en el anfitrión elegido. Los procedimientos de transfección de anfitriones están bien establecidos en la técnica, y los sistemas de expresión que incluyen vectores y los anfitriones de expresión para tales vectores están disponibles comercialmente. Estos incluyen los vectores pcDNA adecuados para la cotransfección a anfitriones 293, CHO o NSO, para expresar los polinucleótidos que codifican la proteína de fusión bajo el control del promotor de CMV, disponible de Invitrogen, y el sistema de vector pTandem-1 para expresar cadenas de proteínas de fusión bajo el promotor de CMV y de ARN bicistrónico en anfitriones 293, CHO o NSO, también disponibles de Invitrogen. Otro sistema de expresión útil, descrito en los ejemplos en la presente memoria, hace uso del promotor de CMV y está disponible comercialmente en el Instituto de Investigación de Biotecnología en Montreal, Canadá.

Los anfitriones de producción adecuados para las proteínas de fusión de la invención son células que incorporan, de forma transitoria o estable, un polinucleótido que codifica el polipéptido de cadena sencilla formador de la fusión en forma secretable. La forma expresada de la proteína de fusión incorpora una secuencia señal que permite la secreción de cada cadena de proteína de fusión del anfitrión, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro deseados dentro y a través de las cadenas de proteína de fusión producidas, y proporciona una proteína de fusión funcional. La señal de secreción puede ser codificada por cualquiera de tales señales funcionales en el anfitrión elegido. En una realización, la señal de secreción es la señal de secreción normalmente asociada con el componente de proteína SIRP α .

Las células anfitrionas de mamífero adecuadas para expresar las proteínas de fusión recombinantes de la invención incluyen las de ovario de hámster chino (células CHO, que incluyen células dhfr-CHO y células CHOcTA), células de mieloma NSO, células SOS y células SP2. En una realización específica, el anfitrión es una línea celular CHO, tal como una línea celular CHO-S. Para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión del gen GS descrito en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841. Las proteínas de fusión se producen cultivando las células anfitrionas transfectadas durante un período de tiempo suficiente para permitir la secreción de la proteína de fusión al medio de cultivo en el que crecen las células anfitrionas. Las proteínas de fusión se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos convencionales de purificación de proteínas, todo como se ilustra a continuación.

Ejemplos

En la descripción del trabajo que sigue, se hace referencia a las proteínas de fusión por código. Por conveniencia, los componentes funcionales de las fusiones referenciadas se resumen a continuación:

Tabla 1

Proteína	Región SIRP α	Región Fc	Actividad efectora del FC
TTI-601	hSIRP α V1, 3 dominios (340 aa)	hIgG4 (mut)	Ninguna
TTI-602	hSIRP α V2, 3 dominios (339 aa)	hIgG4 (mut)	Ninguna
TTI-616	hSIRP α V2, 1 dominio (118 aa)	hIgG4 (mut)	Ninguna
TTI-620	hSIRP α V2, 1 dominio (114 aa)	hIgG4 (WT) *	Baja
TTI-621	hSIRP α V2, 1 dominio (118 aa)	hIgG1 (WT)	Alta
TTI-622	hSIRP α V2, 1 dominio (118 aa)	hIgG4 (WT)	Baja
TTI-623	hSIRP α V2, 1 dominio (118 aa) mutaciones FD6 [^]	hIgG4 (mut)	Ninguna
TTI-624	hSIRP α V2, 1 dominio (118 aa) mutaciones CV1 [^]	hIgG4 (mut)	Ninguna
R y D **	hSIRP α V1, 3 dominios (339 aa)	hIgG1 (WT)	Alta

Todas las regiones Fc de IgG4 humanas poseen la mutación S²²⁸ P estabilizadora de la bisagra, excepto donde se indique con un asterisco (*). Los Fc de IgG4 indicados como "mut" contienen mutaciones en las posiciones 233-236 (sistema de numeración EU) que reducen adicionalmente la unión de Fc γ R (Armor et al. 1999 *Eur. J. Immunol.* 29:2613). [^] Mutaciones FD6 (L4V, V6I, A27I, I31F, E47V, K53R, E54Q, H56P, V63I, L66T, K68R, V92I) y mutaciones CV1 (V6I, A27I, I31F, E47V, K53R, E54Q, H56P, L66T, V92I) descritas por Weiskopf et al. 2013 *Science* 341:88. ** Proteína comercialmente disponible comercializada por R&D Systems (Núm. de Cat 4546-SA-050).

1. Producción de proteína de fusión SIRP α -Fc

- 5 Las construcciones SIRP α Fc se generaron mediante un procedimiento de clonación de tres fases, utilizando los cebadores que se muestran a continuación:
- P#5863: GGCGCTAGCCACCATGGAGC SEQ ID No. 9
- P#5929: GGTGAAGCTCACTGTGTGCTG SEQ ID No. 10
- P#5930: CAGCACACAGTGAGCTTCACC SEQ ID No. 11
- 10 P#1035: CCGGATCCTCATTTACCCAG SEQ ID No. 12
- P#0874: GGACTCAGAGGGTTTGGCACGCACAGA SEQ ID No. 13
- P#0875: CCCTCTGAGTCCAAATATGGTCCCCA SEQ ID No. 14
- P#4197: AGTTTTGTGAGAGGGTTTGGCACGCACAGA SEQ ID No. 15
- P#4198: AAACCCTCTGACAAAACCTCACACATGCCCA SEQ ID No. 16
- 15 P#1737: CACGGATCCTCATTACCCGG SEQ ID No. 17
- P#4195: AGGTGCTGGGCATGGTGGGCATGGGGG SEQ ID No. 18
- P#4196: CCCCATGCCACCATGCCAGCACCT SEQ ID No. 19

ES 2 755 156 T3

P#2058: CACGGATCCTCATTTACCCAGAGACAGGG

SEQ ID No. 20

En la primera reacción de PCR, se amplificaron 100 ng de molde de ADN (SIRP α humana sintética GenBank #AAH26692, de Blue Heron Biotechnology) utilizando ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen) en MgSO₄ 1 mM, dNTP 0,4 mM cada uno y 20 pmoles de cada cebador, de acuerdo con las siguientes condiciones:

5 TTI-602: cebadores P#5863 y P#5929; fusión inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos que consisten en 94°C durante 1 min, 56°C durante 2 min y 68°C durante 2 min.

TTI-616: cebadores P#5863 y P#0874; fusión inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos que consisten en 94°C durante 1 min, 50°C durante 1,5 min y 63°C durante 3 min.

10 TTI-621: cebadores P#5863 y P#4197; fusión inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos que consisten en 94°C durante 0,5 min, 50°C durante 1,5 min y 63°C durante 3 min.

TTI-622: cebadores P#5863 y P#4195; fusión inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos que consisten en 94°C durante 0,5 min, 50°C durante 1,5 min y 63°C durante 3 min.

15 Las reacciones se mantuvieron a continuación a 72°C durante 10 min y se enfriaron a 4°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis a través de geles de agarosa al 1-1,4% y se visualizaron con bromuro de etidio.

A continuación, los fragmentos Fc de IgG se amplificaron en la reacción PCR2, utilizando ADN polimerasa Pfx (Invitrogen), en MgSO₄ 1 mM, dNTP cada uno 0,4 mM, 20 pmol de cada cebador y 100 ng de ADN molde (IgG1 humana e IgG4 humana, previamente clonadas) en las siguientes condiciones:

20 TTI-602: cebadores P#5930 y P#1035; fusión inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos que consisten en 94°C durante 1 min, 56°C durante 2 min y 72°C durante 2 min.

TTI-616: cebadores P#0875 y P#1035; fusión inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos que consisten en 94°C durante 1 min, 50°C durante 1,5 min y 63°C durante 3 min.

TTI-621: cebadores P#4198 y P#1737; fusión inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos que consisten en 94°C durante 0,5 min, 60°C durante 0,5 min y 68°C durante 0,5 min.

25 TTI-622: cebadores P#4196 y P#2058; fusión inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos que consisten en 94°C durante 0,5 min, 50°C durante 1,5 min y 63°C durante 3 min.

Las reacciones se mantuvieron a continuación a 72°C durante 10 min y se enfriaron a 4°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis a través de geles de agarosa al 1-1,4% y se visualizaron con bromuro de etidio.

30 Finalmente, el ADNc de SIRP α y Fc se ensambló mediante PCR solapante en la reacción PCR3. Los productos de PCR1 y PCR2 (100 ng) se incubaron con ADN polimerasa Pfx Platinum (Invitrogen), en MgSO₄ 1 mM y dNTP cada uno a 0,4 – 0,8 mM a 94°C durante 5 min, seguido de 10 ciclos que consistían en 94°C durante 30 seg - 1 min, a continuación 52-60°C durante 80 seg - 3 min, y enfriamiento a 4°C. A continuación se añadieron los cebadores (20 - 40 pmoles de cada uno) a la primera reacción y se ejecutó una reacción de segunda fase en las siguientes
35 condiciones: fusión a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos que consistían en 94°C durante 30 segundos - 1 minuto, 50-56°C durante 30 segundos - 3 minutos y 30 segundos. Los detalles de cada condición son los siguientes:

TTI-602: 10 ciclos a 94°C durante 1 min y 56°C durante 3 min, seguidos de 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 2,5 min y 72°C durante 3 min utilizando cebadores P#5863 y P#1035.

40 TTI-616: Sin primer ciclo de PCR; 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 50°C durante 2 min y 63°C durante 3,5 min utilizando los cebadores P#5863 y P#1035.

TTI-621: 10 ciclos a 94°C durante 1 min y 52°C durante 3 min, seguidos de 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 52°C durante 2 min y 63°C durante 4 min utilizando cebadores P#5863 y P#1737.

TTI-622: 10 ciclos a 94°C durante 1 min y 60°C durante 3 min, seguidos de 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 52°C durante 2 min y 63°C durante 4 min utilizando los cebadores P#5863 y P#2058.

45 Las reacciones se mantuvieron a continuación a 68-72°C durante 7-8 min y se enfriaron a 4°C. Los productos de reacción se separaron a través de geles de agarosa al 1-1,4% y se visualizaron con bromuro de etidio y se ligaron en el vector de expresión pMPG (Biotechnology Research Institute en Montreal, Canadá) de la siguiente manera: la banda de ADN de interés de la amplificación por PCR se escindió y se purificó del gel de agarosa utilizando el Kit de Extracción de Gel QIAquick (Qiagen). Este producto de PCR purificado se digirió con enzimas de restricción NheI y BamHI (New England BioLabs) y se purificó a partir de gel utilizando el Kit de Purificación de Gel QIAquick (Qiagen).
50 El fragmento fue a continuación ligado por la ADN ligasa de T4 (Invitrogen) en el plásmido de expresión pMPG que

había sido digerido de manera similar con las enzimas NheI y BamHI. El plásmido pMPG emplea un promotor de CMV y un terminador Poly A de TK y contiene un marcador de selección de resistencia a la higromicina. A continuación se transformaron 2 µl de la reacción de ligación en 25 µl de células *E. coli* DH5α competentes (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Los transformantes se diseminaron en placas de agar LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina (Sigma), seguido de incubación a 37°C durante 20 horas. El ADN plasmídico se extrajo y se purificó a partir de cultivos de *E. coli* a pequeña escala utilizando el kit QIAprep Spin mini-prep (Qiagen), y la secuencia de ADN se confirmó mediante secuenciación automática utilizando ddNTP conjugados con colorante fluorescente (Core Molecular Biology Facility, York University). Para las transfecciones, se prepararon grandes cantidades de ADN plasmídico utilizando el kit EndoFree Plasmid Maxi (Qiagen), a continuación la secuencia se volvió a confirmar mediante secuenciación automática utilizando ddNTP conjugados con colorante fluorescente (Core Molecular Biology Facility, York University).

Producción de la línea celular

Se generaron transfectantes estables utilizando la línea celular CHO-S (Invitrogen). Brevemente, el ADN plasmídico aislado se linealizó mediante XbaI (New England BioLabs) y se purificó utilizando columnas QIAGEN (Qiagen). Las células CHO-S que crecían en medio químicamente definido libre de suero (CD-CHO, Invitrogen) con un suplemento de L-glutamina 8 mM y suplemento 1xHT se transfectaron con el plásmido linealizado utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Después de 48 horas, las células se transfirieron a placas de 96 pocillos y se colocaron en placas a diferentes concentraciones (10000, 5000 o 2000 células/pocillo) en un medio que contenía 600 µg/ml de higromicina B (Invitrogen). El control de transfección simulada se llevó a cabo de manera idéntica sin ADN añadido a la mezcla. De dos a tres semanas después de la transfección, se recogió un panel de oligoclonos resistentes a los fármacos y los sobrenadantes de un estudio de expresión de 48 horas se escrutaron mediante ELISA de la siguiente manera: las placas de 96 pocillos se recubrieron con 0,1 µg/pocillo de Ab de captura (anti-IgGFc humano de cabra), y se incubaron durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron y bloquearon con 200 µl de BSA al 2% en PBST a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado, las muestras de 100 µl se diluyeron con BSA al 1% en PBST, se añadieron a los pocillos, se incubaron durante 1 hora, se lavaron y a continuación se incubaron con Ab de detección conjugado con HRP (anti-IgGFc humano de cabra conjugado con HRP), durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron los pocillos y se añadió sustrato TMB (Moss Inc.) y se incubó durante 3 a 5 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 450 nm/655 nm utilizando el lector de microplacas iMark (Biorad), y se construyó una curva patrón utilizando la cantidad conocida de proteína de fusión purificada. Se realizó una segunda dilución limitante de los 3 oligo-clones de mayor expresión a concentraciones celulares más bajas (0,1, 0,25 y 0,5 células/pocillo) en medio CD-CHO completo que contenía 600 µg/ml de higromicina B. Después de 2 a 3 semanas, los clones resistentes al fármaco se evaluaron nuevamente para determinar la producción de proteína recombinante mediante ELISA como se describe anteriormente. La productividad se expresó en pg/célula/día y estuvo en el intervalo de 1,4 – 23,9 pg/célula/día para las proteínas de fusión de SIRPα humanas. Los clones de células individuales de mayor expresión se emplearon para la producción por lotes de sobrenadante en un sistema WAVE Bioreactor. En algunos casos, antes de que se alcanzara la fase de clon único, se utilizó el mejor oligoclon para la producción.

Purificación de proteínas

Para la producción rápida de pequeños lotes de proteínas, se prepararon algunos lotes de SIRPα-Fc en células 293F transfectadas transitoriamente. Brevemente, las células 293F FreeStyle (Invitrogen) se cultivaron en medio para 293F (Invitrogen), se transfectaron con ADN plasmídico no linealizado y reactivo 293Fectin (Invitrogen) y se cultivaron en lotes de matraces agitadores en volúmenes de 80-100 ml/matraz a 37°C, 5% CO₂ durante 3-6 días. La densidad celular y la viabilidad se controlaron todos los días hasta que la viabilidad celular se redujo a ~90%. La viabilidad celular en la cosecha por lotes estuvo en el intervalo de 85-90%.

Para la purificación a partir de células CHO-S, se generaron 5 o 10 L de sobrenadante de cultivo a partir de oligos de alta expresión transfectados de forma estable o clones de células individuales en un sistema de biorreactor de bolsa desechable WAVE Base20/50 EHT (GE Healthcare). Brevemente, los transfectantes CHO-S se cultivaron en matraces T150 estáticos en medio de crecimiento completo (CD-CHO con suplemento de L-glutamina 8 mM, suplemento 1xHT y 600 µg/ml de higromicina B) a 37°C para producir el suficiente número de células para iniciar un cultivo de 1 L o 2 L a 0,5x10⁶ células/ml para una ronda de 5 L o 10 L respectivamente. La bolsa del biorreactor se inoculó y las células se incubaron a continuación a 37°C, 10% de CO₂, velocidad de balanceo de 15-20 rpm, ángulo de 7° y flujo de aire de 0,2-0,4 Lpm. Cuando el cultivo alcanzó una densidad de 2 a 2,5x10⁶ células/ml (generalmente en el plazo de los 2-3 días posteriores a la inoculación), el biorreactor se aumentó hasta 5 L o 10 L y se incubó adicionalmente a 37°C, 10% de CO₂, velocidad de balanceo 15-20, ángulo 7°, flujo de aire 0,2-0,4 Lpm. Cuando las células hubieron alcanzado una densidad de 1 – 1,5x10⁶ células/ml, la temperatura se redujo a 30°C y el cultivo se incubó adicionalmente durante 7 a 10 días adicionales en las condiciones especificadas anteriormente. A partir del día 0 a 30°C, los cultivos se alimentaron con suplemento de biorreactor de alimentación con CHO al 1% (Sigma) cada dos días y se recolectaron cuando la viabilidad celular cayó en torno al 90%. Se recogió el sobrenadante, se centrifugó a 3000 x g durante 40 minutos a 4°C y se congeló a -20°C hasta la purificación.

Todas las proteínas se purificaron mediante un procedimiento de dos etapas, primero utilizando cromatografía de proteína A. El sobrenadante intercambiado por tampón se diluyó 9 veces con tampón de unión (Na-P 20 mM y NaCl

3 M, pH 7,8) y se cargó en una columna rProtein A (GE Healthcare) a un caudal de 2-3 ml/min (dependiendo de volumen de carga y tiempo de carga) durante la noche a 4°C. La columna se lavó a continuación con tampón de unión (20 volúmenes a 3 ml/min), y la proteína se eluyó con ácido cítrico 0,1 M pH 4,0 y pH 2,2 a 3 ml/min. El material eluido se ajustó a pH neutro con 1 M y posteriormente se purificó utilizando un cromatógrafo HiTrap Phenyl HP. En resumen, las proteínas se diluyeron al menos 4 veces con sulfato de amonio 0,2 M pH 7,5 y se cargaron en la columna HiTrap Phenyl HP (GE Healthcare) a 2-3 ml/min (dependiendo del tamaño de la columna y el tiempo de carga). La proteína SIRPαFc no agregada se recogió en la fracción de flujo continuo. Se empleó filtración de flujo tangencial utilizando una membrana BioMax 10 (Millipore) para concentrar e intercambiar el tampón de la proteína a PBS de pH 7,4. La calidad de cada proteína se determinó mediante SDS-PAGE, transferencia Western utilizando anticuerpo anti-IgGFc de cabra y producto conjugado con HRP de anti-IgG de cabra de conejo, y análisis mediante HPLC. La identidad de todas las proteínas se confirmó por secuenciación N-terminal y espectrometría de masas.

1. Comparación de fusiones SIRPαFc de uno y tres dominios

SIRPα consiste en tres dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (Ig), sin embargo, la unión a CD47 se localiza en el dominio N-terminal. Para determinar la región SIRPα óptima para las fusiones SIRPαFc, los autores de la presente invención generaron proteínas que incorporaban los tres dominios SIRPα extracelulares (TTI-602) o el dominio N-terminal único (TTI-616).

Ambas proteínas se construyeron sobre una cadena principal de Fc de IgG4 humana mutada que carecía de función efectora. Los autores de la presente invención compararon la unión de TTI-602 y TTI-616 a CD47 humano utilizando un ensayo de unión directa (Figura 1A) y un ensayo de competición indirecta (Figura 1B). Para el ensayo de unión directa, se incubaron células Jurkat humanas CD47+ con las diversas concentraciones (como se indica) de proteínas hSIRPαFc sobre hielo durante 1 hora. Las células se lavaron a continuación para eliminar cualquier proteína no unida y a continuación se incubaron con un anticuerpo anti-Fcg de hIgG específico (Fab')₂ con FITC sobre hielo durante 1 hora. Las células se lavaron y fijaron a continuación incubando con una solución de paraformaldehído al 2% durante la noche. La solución de fijación se lavó y las células se analizaron por citometría de flujo (BD FACScan). Los datos se ajustaron a un modelo de unión de un sitio mediante regresión no lineal. Para el ensayo indirecto, se incubó una cantidad saturante fija de SIRPαFc humana biotinilada (TTI-601) sola o con cantidades tituladas de TTI-602 o TTI-616 durante 15 minutos sobre hielo. Esta mezcla se añadió a continuación a células Jurkat CD47+ humanas, se incubó sobre hielo durante 1 hora, se lavó para eliminar la proteína no unida y a continuación se incubó con una cantidad saturante de estreptavidina-PE sobre hielo en la oscuridad durante 1 hora. A continuación las células se lavaron, se fijaron y se analizaron por citometría de flujo como anteriormente. Las medias geométricas se normalizaron después, siendo una inhibición de 100% la media geométrica de estreptavidina-PE sola y siendo una inhibición de 0% la media geométrica de la TTI601 biotinilada sola. Se obtuvo una línea de mejor ajuste mediante análisis de regresión no lineal utilizando el ajuste de la curva dosis-respuesta sigmoidea (Prism, Graphpad).

Los datos en las Figuras 1A y 1B muestran claramente una diferencia de unión entre TTI-602 y TTI-616, teniendo la unión de TTI-616 mayor afinidad en ambos ensayos. En el ensayo de unión directa, TTI-616 se unió con una afinidad 10 veces mayor que TTI-602 (valores de CE₅₀: 13,4 nM frente a 139 nM). En el ensayo de unión indirecta, TTI-616 se unió con una afinidad 7 veces mayor que TTI-602 (valores de CE₅₀: 4,5 nM versus 32,1 nM). Estos resultados fueron inesperados, ya que los datos publicados previamente indican que el dominio N-terminal de SIRPα se unió a CD47 con afinidad comparable a SIRPα que contiene los tres dominios extracelulares (Hatherley et al. 2007 J. Biol. Chem 282:14567).

2. Diseño de fusiones SIRPαFc humanas con diferentes regiones Fc

Habiendo establecido una preferencia por una proteína de fusión que incorpora un solo dominio SIRPα, se realizaron estudios para determinar la región Fc óptima. Se generaron tres fusiones SIRPαFc humanas diferentes que contenían la misma región SIRPα (31-148) pero se construyeron sobre diferentes componentes Fc que tenían actividad efectora variable. Los detalles del diseño se resumen en la Tabla 2 a continuación. Las secuencias de ADN y proteínas anotadas se muestran en el Apéndice 1.

Tabla 2. Diseño de proteínas de fusión SIRPαFc humanas.

Proteína	Región SIRPα	Isotipo Fc	Actividad efectora
TTI-621	Dominio IgV de V2	IgG1 humana (dominios bisagra inferior-CH2-CH3)	Alta
TTI-622	Dominio IgV de V2	IgG4 humana (dominios bisagra-CH2-CH3) con mutación Ser-Pro en la posición 158*	Baja

Proteína	Región SIRPα	Isotipo Fc	Actividad efectora
TTI-616	Dominio V2 IgV	IgG4 humana (dominios bisagra-CH2-CH3) con mutaciones: Ser158Pro*; Glu163Pro; Phe164Val; Leu165Ala; y delección de Gly166**	Ninguna

* Corresponde a la posición 228 en el sistema de numeración EU y está destinada a estabilizar la región bisagra de IgG4 y evitar la formación de disulfuros intracatenarios que conducen a la formación de monómeros (Angal et al. 1993 Mol. Immunol 30:105)

** Corresponde a las posiciones 233-236 en el sistema de numeración EU, y está destinada a reducir adicionalmente la unión del receptor Fcγ (Armor et al. 1999 Eur. J. Immunol. 29:2613).

3. Unión de las fusiones SIRPαFc a CD47

Las tres fusiones SIRPαFc se compararon para determinar la unión a CD47 humano de la superficie celular. Brevemente, se incubaron células Jurkat humanas CD47+ con las diversas concentraciones (como se indica) de proteínas hSIRPαFc sobre hielo durante 1 hora. Las células se lavaron a continuación para eliminar cualquier proteína no unida y después se incubaron con un anticuerpo anti-Fcγ de hIgG específico (Fab')₂ con FITC sobre hielo durante 1 hora. Las células se lavaron y se fijaron a continuación incubando con una solución de paraformaldehído al 2% durante la noche. Después, la solución de fijación se lavó y las células se analizaron por citometría de flujo (BD FACScan). A continuación se normalizaron las medias geométricas y se generaron las curvas de unión y los valores de Kd mediante Prism (Graphpad) utilizando un ajuste de regresión no lineal de los datos a un modelo de unión de un sitio.

Como se muestra en la Figura 2, las tres proteínas de fusión mostraron perfiles de unión muy similares, produciendo valores de unión por afinidad (Kd) casi idénticos (2,3-2,4 nM). Esto era de esperar, ya que las tres proteínas contienen la misma región SIRPα y no se predijo que la región Fc afectaría a la unión del ligando.

4. Actividad pro-fagocitosis *in vitro* de fusiones SIRPαFc

El bloqueo de CD47 por SIRPαFc aumenta la fagocitosis de las células tumorales de leucemia mieloide aguda humana (AML) por macrófagos humanos activados. Se comparó la actividad pro-fagocítica de las tres proteínas de fusión *in vitro* para determinar si la región Fc afecta a la fagocitosis de AML. Los macrófagos humanos se generaron aislando primero monocitos CD14+ de células mononucleares de sangre periférica humana purificadas con Ficoll utilizando selección magnética. Los monocitos se cultivaron en medios X-vivo que contenían factor estimulante de colonias de monocitos humanos a 20 ng/ml durante al menos 1 semana para promover el desarrollo a macrófagos. Los macrófagos se sembraron a continuación sobre portaobjetos de vidrio en una placa de cultivo de 24 pocillos y se incubaron con interferón gamma humano durante la noche. Al día siguiente, se lavaron los pocillos y se añadió LPS durante al menos 1 hora. Las células de AML humana se contaron y se marcaron con CFSE. Después del marcaje, las células de AML se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT) con PBS, proteínas SIRPαFc o controles de isotipo. Las células de AML se añadieron a continuación a los pocillos individuales, se mezclaron y se incubaron en una incubadora celular humidificada con 5% de CO₂, a 37°C, durante 2 horas. Después de la incubación, los pocillos se lavaron y los macrófagos se marcaron con producto conjugado de aglutinina de germen de trigo y Alexa Fluor® 555 (Invitrogen, Núm. de cat W32464) durante 15 minutos a temperatura ambiente con balanceo. Los pocillos se lavaron y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se lavaron y se mantuvieron en la oscuridad a 4°C durante la noche. Los portaobjetos de vidrio se analizaron mediante microscopía confocal de barrido (Quorum Wave FX-X1 Spinning Disc Confocal System, Quorum Technologies, Guelph, ON, Canadá). La fagocitosis de las células de AML se cuantificó utilizando un índice de fagocitosis, como sigue: (número de células de AML dentro de macrófagos/número de macrófagos) x 100; contando al menos 200 macrófagos por muestra. Como se muestra en la Figura 3, TTI-621 y TTI-622 exhiben una actividad de fagocitosis similar, mientras que TTI-616 es claramente más débil (esto es particularmente evidente a la dosis de 10 nM). Esto indica que se requiere una región Fc de IgG4 o IgG1 de tipo salvaje para la destrucción máxima por los macrófagos de las células tumorales desencadenada por SIRPαFc.

Se evaluó un panel expandido de proteínas de fusión SIRPαFc para determinar la actividad de fagocitosis utilizando la línea celular AML OCI/AML-2 como dianas. Como se muestra en la Figura 6, los datos indican claramente que el nivel más alto de fagocitosis de AML-2 es inducido por proteínas de fusión que contienen un solo dominio SIRPα y una región Fc de IgG4 o IgG1 de tipo salvaje (es decir, TTI-622, -620 o TTI-621). Las proteínas de fusión que carecen de cualquier función efectora de Fc (por ejemplo, TTI-616) pueden desencadenar la fagocitosis, pero el efecto es considerablemente más débil. Esto es compatible con los datos referidos en la Figura 3. SIRPαFc con tres dominios extracelulares (TTI-601, TTI-602 y R y D) también exhiben solo un bajo nivel de actividad pro-fagocítica, y en el caso de la fusión R y D, esta escasa actividad no se puede superar con una región Fc IgG1. Además, las proteínas de fusión que contienen secuencias SIRPα mutadas que confieren una unión a CD47 sustancialmente mayor (TTI-623 y TTI-624) no dan como resultado una mayor actividad de fagocitosis en comparación con una SIRPαFc de tipo salvaje que tiene la misma región Fc (TTI-616). Estos resultados sugieren que el aumento de la

afinidad de unión a CD47 más allá del nivel alcanzado con un dominio SIRP α único de tipo salvaje no produce ningún beneficio adicional *in vitro*. Esta conclusión es inesperada, ya que se informó que SIRP α mutadas con FD6 y CV1 unido a Fc de IgG4 tienen una mayor actividad pro-fagocítica que SIRP α -IgG4 de tipo salvaje (Weiskopf et al. 2013 Science 341:88).

5. Actividad antileucémica *in vivo* de fusiones SIRP α Fc

Las tres proteínas de fusión SIRP α Fc se probaron para determinar su capacidad de controlar el crecimiento de células tumorales de AML humana en un modelo de xenotrasplante convencional. Los ratones NOD/ShiLtJ-Prkdcscid (NOD.SCID) (8-12 semanas de edad) fueron irradiados subletalmente con 275 cGy de un irradiador y de 137Cs 24 horas antes de la inyección intrafemoral de células de AML recolectadas de un paciente con leucemia humana. Comenzando tres semanas después del trasplante, los ratones fueron tratados con proteínas de fusión SIRP α Fc (8 mg/kg IP tres veces por semana) o dosis equimolares de proteínas de control Fc TTI-401 (IgG4 humana mutada) o TTI-402 (IgG1 humana). Después de 4 semanas de tratamiento, se sacrificaron ratones y se detectaron células de leucemia humana en el fémur inyectado, médula ósea y bazo no inyectados mediante análisis de citometría de flujo, tinción para la expresión de marcadores CD45 humano y CD33 humano. El injerto de AML se expresó como el porcentaje de células CD45+CD33+ humanas en cada compartimento.

Como se muestra en la Figura 4, la proteína de fusión TTI-621 con una región Fc de IgG1 fue la única proteína capaz de mediar un efecto antileucémico en el sitio del trasplante (el fémur inyectado). En la médula ósea no inyectada, hubo un claro efecto dependiente de Fc, con TTI-621 (actividad completa de Fc) > TTI-622 (baja actividad de Fc) > TTI-616 (sin actividad de Fc). Las tres proteínas de fusión exhibieron actividad antileucémica en el bazo, aunque este sitio es una prueba de actividad menos rigurosa, ya que el nivel general de injerto (como se observa en los ratones de control) es mucho más bajo que en la médula ósea inyectada o no inyectada. Colectivamente, estos resultados indican que una proteína SIRP α Fc que lleva una región Fc de IgG1 humana tiene la mayor actividad en un modelo de xenotrasplante de AML humana. La actividad *in vivo* superior de la fusión basada en IgG1 no se habría pronosticado en base a los datos de fagocitosis *in vitro* (Figura 2), en los que TTI-621 y TTI-622 mostraron una actividad similar.

6. Actividad de hemaglutinación de fusiones SIRP α Fc

Los glóbulos rojos humanos se prepararon utilizando sangre completa heparinizada de donantes sanos. Se pipetearon 4 ml de sangre completa en un tubo cónico de 15 ml, se completó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se centrifugó a 200 x g, temperatura ambiente durante 10 minutos para eliminar las plaquetas. Después de la aspiración de la fracción de plaquetas, el tubo se llenó hasta 15 ml con PBS, el contenido se mezcló bien invirtiendo el tubo y los GR se envasaron por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. Este lavado se repitió 3 veces más. Después del lavado final, se aspiró el sobrenadante y se añadió suficiente PBS a los eritrocitos empaquetados para preparar una solución de GR al 10% (por ejemplo, si se obtuvo 1 ml de GR empaquetados, se diluyó adicionalmente con 9 ml de PBS para preparar una solución de GR al 10%). La solución de GR al 10% almacenada a 4°C era utilizable en el plazo de una semana. Se preparó una solución de nueva aportación de GR al 1% inmediatamente antes del ensayo de hemaglutinación.

Las proteínas SIRP α Fc expresadas en células CHO o 293 se analizaron para determinar su capacidad de aglutinar los GR humanos como lo demuestra la agregación de GR y la prevención de la formación de gránulos de GR. El ensayo se realizó en placas de fondo redondo de 96 pocillos de baja unión a proteína, tratadas con cultivo no tisular. Se preparó una solución de nueva aportación de GR al 1% inmediatamente antes del ensayo de hemaglutinación. Se transfirieron 50 μ l de solución de GR al 1% a cada pocillo. Las proteínas de fusión SIRP α -Fc humanas diluidas seriadamente 3 veces a partir de una concentración final 3 μ M o control de vehículo se añadieron a 50 μ L por pocillo a los pocillos apropiados. Los pocillos se mezclaron suavemente y se incubaron durante la noche a 37°C, 5% de CO₂. Después de una incubación durante la noche, se fotografiaron las placas. En ausencia de entrecruzamiento, los eritrocitos ruedan hasta el fondo de los pocillos y aparecen como un sedimento denso. La evidencia de hemaglutinación se demuestra por la presencia de GR no sedimentados que aparecen como un halo en comparación con un sedimento de GR bien definido. Las proteínas de fusión de SIRP α que desencadenan la hemaglutinación evitarán la formación de un sedimento de GR y, por lo tanto, producirán un patrón difuso o brumoso. Los resultados indican que las proteínas de fusión SIRP α Fc de tres dominios TTI-601 y TTI-602 muestran una mayor propensión a inducir la hemaglutinación en comparación con las fusiones de dominio único. Esto sugiere que las SIRP α Fc de dominio único serían menos propensas a causar toxicidad por eritrocitos *in vivo*.

7. Actividad agonística de CD47 de fusiones SIRP α Fc

Se adquirieron células Jurkat T humanas Clon E6-1 de ATCC (Núm. de Cat. TIB-152) y se cultivaron en RPMI 1640 con un suplemento de FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 10 mM y 1,5 de g/L bicarbonato sódico. La expresión de CD47 se analizó mediante citometría de flujo demostrando la unión a la superficie celular de los clones de mAb anti-CD47 B6H12, 2D3, BRIC126 y CC2C6. El día anterior a un ensayo de agonista, las células Jurkat se sembraron a $\sim 3 \times 10^5$ células/mL en un medio de crecimiento completo en matraz de cultivo de tejidos T75/T150.

Se recolectaron células T Jurkat altamente viables (> 95%) y se sembraron en un medio de crecimiento completo a 2×10^5 células/200 μ l por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 pocillos. Las células se pretrataron con medio solo o con un clon de anticuerpo bloqueador de CD47 B6H12 a 12,5 μ g/20 μ L por pocillo durante 1 hora a 37°C, 5% de CO₂. Se añadieron proteínas de fusión SIRP α Fc o Fc de control a una concentración final 3 μ M en 20 μ l/pocillo y se empleó el agente pro-apoptótico estaurosporina como control positivo añadido a 1 μ M en 20 μ l/pocillo. Las células no tratadas (UT) recibieron 20 μ l/pocillo de medio solo. Las células se incubaron durante la noche a 37°C, 5% de CO₂. Después de una incubación durante la noche, las células se tiñeron con el kit de detección de apoptosis Annexin-V: FITC/7-AAD de eBiosciences (Núm. de Cat 88-8005-75) siguiendo las instrucciones del fabricante y se analizaron por medio de citometría de flujo en el plazo de las 4 horas posteriores a la tinción para evitar la progresión de la apoptosis

Como se muestra en la Figura 5, TTI-602, una fusión de tres dominios, indujo un nivel mucho mayor de apoptosis de Jurkat que las proteínas de fusión de dominio único TTI-616 y TTI-620. El efecto de TTI-602 fue claramente específico de CD47, ya que éste fue neutralizado pretratando las células con B6H12, un anticuerpo bloqueador de CD47. Estos resultados indican que se prefiere una proteína de fusión SIRP α Fc de dominio único sobre una SIRP α Fc de tres dominios para minimizar la actividad agonística de CD47.

8. Unión de eritrocitos

Una preocupación con las terapias basadas en CD47 es la expresión de la diana sobre la superficie de los glóbulos rojos (GR), que tiene el potencial de actuar como un gran sumidero de antígeno y causar toxicidad hematológica. De hecho, se ha informado sobre anemia en animales tratados con variantes de las SIRP α Fc de alta afinidad y anticuerpos específicos para CD47. Por lo tanto, la unión de las proteínas de fusión SIRP α Fc a los eritrocitos humanos se evaluó mediante citometría de flujo. Los GR humanos se prepararon utilizando sangre completa heparinizada. La sangre completa se centrifugó a 200 x g, temperatura ambiente durante 10 minutos para eliminar las plaquetas. Después de la aspiración de la fracción de plaquetas, el tubo se llenó hasta el volumen original con PBS, el contenido se mezcló bien invirtiendo el tubo y los GR se sedimentaron por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. Este lavado se repitió 3-5 veces más. Después del lavado final, se aspiró el sobrenadante y se llenó el tubo con PBS hasta el volumen sanguíneo original. Los GR se contaron utilizando un hemocitómetro y se resuspendieron a 5×10^8 células/mL antes del ensayo de unión a GR. La pureza de los eritrocitos se evaluó mediante citometría de flujo que demuestra anti-CD235a humano (eBiosciences Núm. de Cat. 12-9978).

Se observó que las proteínas de fusión que contienen secuencias SIRP α de tipo salvaje se unen muy mal a los eritrocitos humanos, produciendo una señal que está menos de 2 veces por encima del fondo, incluso a altas concentraciones. En contraste, los anticuerpos monoclonales contra CD47 típicamente se unen a > 100 veces por encima del fondo. La sorprendente diferencia en la unión de GR entre SIRP α Fc y los anticuerpos contra CD47 se muestra en la Figura 7A, que compara la unión de TTI-616 con el anticuerpo contra CD47 B6H12 a lo largo de un intervalo de concentraciones. Para demostrar que este fenómeno no es exclusivo de B6H12, se evaluaron tres anticuerpos contra CD47 adicionales (2D3, BRIC126 y CC2C6). Como se muestra en la Figura 7B, los cuatro anticuerpos se unieron a los GR humanos a niveles drásticamente más altos que SIRP α Fc. Obsérvese que las proteínas de fusión SIRP α Fc se unen poco a los GR humanos independientemente del isotipo de Fc o la estructura de uno o tres dominios (datos no mostrados). Además, la diferencia en la unión de eritrocitos entre SIRP α Fc y los anticuerpos contra CD47 no refleja simplemente una diferencia en la afinidad de CD47, ya que ambas clases de proteínas se unen de manera similar a una línea de células tumorales de AML (véase Figura 7C).

Se obtuvieron varios resultados inesperados de estos estudios. En primer lugar, la afinidad de unión superior del SIRP α Fc de dominio único en comparación con un SIRP α Fc de tres dominios no es compatible con la literatura publicada. En segundo lugar, el fuerte papel de la región Fc en la eliminación de las células leucémicas *in vivo* es incompatible con los datos publicados por otros, quienes han argumentado que la eficacia de los anticuerpos contra CD47 se debe al bloqueo de la interacción CD47-SIRP α . Asimismo, no se podría pronosticar la superior eficacia *in vivo* de TTI-621 (IgG1) en función de los datos de fagocitosis *in vitro*. Por otra parte, la unión muy baja de SIRP α Fc de dominio único a los eritrocitos, y la baja actividad agonística de CD47, apoyan el uso médico de SIRP α Fc ilustrado en la presente memoria con preferencia a otros inhibidores de CD47.

En conjunto, estos datos indican que una proteína de fusión SIRP α Fc humana óptima debe contener un solo dominio SIRP α (N-terminal) conectado a una región Fc competente efectora, tal como la región Fc de una IgG1 humana preferiblemente, o la región Fc de una IgG4 humana adecuadamente.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Trillium Therapeutics Inc.
 Uger, Robert Adam
 Slavova-Petrova, Penka Slavtcheva
 Pang, Xinli
- <120> Tratamiento de células enfermas CD47+ con fusiones SIRP alfa-Fc
- 10 <130> 056601-0084-02
- <140> PCT/CA2013/001046
 <141> 16-12-2013
- 15 <150> 61/738,008
 <151> 17-12-2012
- <160> 28
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
 <211> 106
 <212> PRT
- 25 <213> Homo sapiens
- <400> 1
 Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala Ala
 1 5 10 15
 Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Val Thr Ser Leu Ile Pro Val
 20 25 30
 Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Glu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser Glu
 50 55 60
 Ser Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn Ile
 65 70 75 80
 Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys Gly
 85 90 95
 Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala
 100 105
- 30 <210> 2
 <211> 227
 <212> PRT
- 35 <213> Homo sapiens
- <400> 2

ES 2 755 156 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 3
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

5

ES 2 755 156 T3

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

ES 2 755 156 T3

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 245 250 255

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 260 265 270

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 275 280 285

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 290 295 300

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 305 310 315 320

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 325 330 335

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340 345

<210> 4
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4
 Met Glu Pro Ala Gly Pro Ala Pro Gly Arg Leu Gly Pro Leu Leu Cys
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Ala Ser Cys Ala Trp Ser Gly Val Ala Gly Glu Glu
 20 25 30

Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala Ala Gly
 35 40 45

Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Val Thr Ser Leu Ile Pro Val Gly
 50 55 60

Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Glu Leu Ile Tyr
 65 70 75 80

Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser Glu Ser
 85 90 95

Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn Ile Thr
 100 105 110

10

ES 2 755 156 T3

Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys Gly Ser
 115 120 125

Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg
 130 135 140

Ala Lys Pro Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 145 150 155 160

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 165 170 175

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 180 185 190

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 195 200 205

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 210 215 220

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 225 230 235 240

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 245 250 255

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 260 265 270

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 275 280 285

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 290 295 300

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 305 310 315 320

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 325 330 335

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 340 345 350

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 355 360 365

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

5 <210> 5
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 5

ES 2 755 156 T3

	gaggagctgc aggtgattca gcctgacaag tccgtatcag ttgcagctgg agagtcggcc	60
	attctgcaact gcaactgtgac ctccctgata cctgtggggc ccatccagtg gttcagagga	120
	gctggaccag cccgggaatt aatctacaat caaaaagaag gccacttccc ccgggtaaca	180
	actgtttcag agtccacaaa gagagaaaac atggactttt ccatcagcat cagtaacatc	240
	accccagcag atgccggcac ctactactgt gtgaagttcc ggaaaggag ccctgacacg	300
	gagtttaagt ctggagca	318
	<210> 6	
	<211> 684	
5	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 6	
	gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	60
	ttctcttcc caccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120
	tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	180
	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	240
	cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300
	tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	360
	gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag	420
	aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	480
	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	540
	gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	600
	aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	660
10	ctctccctgt ctccgggtaa atga	684
	<210> 7	
	<211> 1035	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 7	
	gaggagctgc aggtgattca gcctgacaag tccgtatcag ttgcagctgg agagtcggcc	60

ES 2 755 156 T3

attctgcaact gcaactgtgac ctccctgatc cctgtggggc ccatccagtg gttcagagga 120
gctggaccag cccgggaatt aatctacaat caaaaagaag gccacttccc ccgggtaaca 180
actgtttcag agtccacaaa gagagaaaac atggactttt ccatcagcat cagtaacatc 240
accccagcag atgccggcac ctactactgt gtgaagttcc ggaaagggag ccctgacacg 300
gagtttaagt ctggagcagc cactgagctg tctgtgcgtg ccaaaccctc tgacaaaact 360
cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt cttcctcttc 420
ccacaaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgctgggtg 480
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagtccaact ggtacgtgga cggcgtggag 540
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 600
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 660
tccaacaaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 720
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 780
agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 840
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 900
ttcttctct atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggacgcaggg gaacgtcttc 960
tcatgctcgc tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1020
tctccgggta aatga 1035

<210> 8
<211> 1128
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5

<400> 8
atggagcccc ccggcccggc ccccggcccgc ctccggcccgc tgctctgcct gctgctcgcc 60
gcgctcctgcg cctgggtcagg agtggcgggt gaggaggagc tgcaggtgat tcagcctgac 120
aagtccgtat cagttgcagc tggagagtgc gccattctgc actgcactgt gacctccctg 180
atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga ggagctggac cagcccggga attaactctac 240
aatcaaaaag aaggccactt ccccgggta acaactgttt cagagtccac aaagagagaa 300
aacatggact tttccatcag catcagtaac atcaccccag cagatgccgg cacctactac 360
tgtgtgaagt tccggaaagg gagccctgac acggagttta agtctggagc aggcactgag 420
ctgtctgtgc gtgcaaacc ctctgacaaa actcacacat gccaccctg occagcacct 480
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc tcccaccaa aaccaagga caccctcatg 540
atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 600
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 660

10

ES 2 755 156 T3

gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 720
 tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 780
 gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 840
 ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 900
 tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 960
 accacgcctc cctgtctgga ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg 1020
 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1080
 cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaata 1128

5 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 9
 ggcgctagcc accatggagc 20

15 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 10
 ggtgaagctc actgtgtgct g 21

25 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 11
 cagcacacag tgagcttcac c 21

35 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> cebador

<400> 12
 ccggatcctc atttaccag 20

45 <210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> cebador

<400> 13
 ggactcagag ggttggcac gcacaga 27
 5 <210> 14
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 14
 15 ccctctgagt ccaaatatg tccccca 27
 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 15
 25 agttttgtca gagggtttg cacgcacaga 30
 <210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 16
 35 aaaccctctg acaaaactca cacatgccca 30
 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 17
 45 cacggatcct cattaccg g 21
 <210> 18
 <211> 27
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 18
 60 aggtgctggg catggtgggc atggggg 27
 <210> 19
 <211> 27
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial
 <220>

ES 2 755 156 T3

<223> cebador

<400> 19
 ccccatgcc caccatgccc agcacct 27

5

<210> 20
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> cebador

<400> 20
 cacggatcct cattaccca gagacaggg 29

15

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> conector de aminoácidos

<400> 21
 Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
 1 5 10

25

<210> 22
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 22
 Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala
 1 5 10 15

35

Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Val Thr Ser Leu Ile Pro
 20 25 30

Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Glu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
 50 55 60

Glu Ser Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn
 65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
 85 90 95

Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser
 100 105 110

Val Arg Ala Lys Pro Ser
 115

<210> 23
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

ES 2 755 156 T3

<400> 23

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225

5

<210> 24

<211> 229

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 24

ES 2 755 156 T3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
 225

- 5 <210> 25
- <211> 345
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 10 <400> 25

ES 2 755 156 T3

Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala
1 5 10 15

Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Val Thr Ser Leu Ile Pro
20 25 30

Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Glu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
50 55 60

Glu Ser Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn
65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
85 90 95

ES 2 755 156 T3

Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser
 100 105 110

Val Arg Ala Lys Pro Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 115 120 125

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 130 135 140

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 145 150 155 160

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 165 170 175

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 180 185 190

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 195 200 205

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 210 215 220

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 225 230 235 240

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 245 250 255

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 260 265 270

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 275 280 285

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 290 295 300

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 305 310 315 320

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 325 330 335

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340 345

5 <210> 26
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 26

ES 2 755 156 T3

Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Gly Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Val Thr Ser Leu Ile Pro
 20 25 30
 Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Glu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
 50 55 60
 Glu Ser Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn
 65 70 75 80
 Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
 85 90 95
 Gly Ser Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser
 100 105 110
 Val Arg Ala Lys Pro Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 115 120 125
 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 130 135 140
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 145 150 155 160
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 165 170 175
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 180 185 190
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 195 200 205
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser

ES 2 755 156 T3

gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 720
 tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 780
 gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 840
 ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 900
 tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 960
 accacgcctc cctgtctgga ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg 1020
 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct cctgatgca tgaggctctg 1080
 cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatga 1128

<210> 28
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 28
 atggagcccg ccggcccggc ccccgccgcg ctcgggccgc tgctctgcct gctgctcgcc 60
 gcgtcctgcg cctggtcagg agtggcgggt gaggaggagc tgcaggtgat tcagcctgac 120
 aagtccgtat cagttgcagc tggagagtcg gccattctgc actgcaactgt gacctccctg 180
 atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga ggagctggac cagcccggga attaactac 240
 aatcaaaaag aaggccactt cccccggta acaactgttt cagagtccac aaagagagaa 300
 aacatggact tttccatcag catcagtaac atcaccocag cagatgccgg cacctactac 360
 tgtgtgaagt tccggaaagg gagccctgac acggagttaa agtctggagc aggcactgag 420
 ctgtctgtgc gtgccaaacc ctctgagtcc aatatggtc ccccatgccc accatgccc 480
 gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact 540
 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgctggtgg tggacgtgag ccaggaagac 600
 cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat ggctggagg tgcataatgc caagacaaag 660
 ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 720
 caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc 780
 tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc 840
 ctgccccat cccaggagga gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctggtaag 900
 ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 960
 tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggtcct tcttctcta cagcaggcta 1020
 accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1080
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctctgggtaa atga 1134

10

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión de SIRPα humana útil para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de una célula enferma CD47+, en donde la proteína de fusión de SIRPα humana comprende SEC ID No. 25.
- 5 2. La proteína de fusión de SIRPα humana según la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión de SIRPα humana consiste en SEC ID No. 25.
3. La proteína de fusión de SIRPα humana según la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente una marca detectable.
- 10 4. Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad de una proteína de fusión de SIRPα humana eficaz para inhibir el crecimiento o la proliferación de una célula enferma CD47+, en donde la proteína de fusión de SIRPα humana comprende SEC ID No. 25.
5. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, en donde la proteína de fusión SIRPα humana consiste en SEC ID No. 25.
6. Una proteína de fusión de SIRPα humana que comprende SEC ID No. 25, para su uso en la inhibición del crecimiento de células enfermas CD47+ en un sujeto que lo necesite.
- 15 7. La proteína de fusión de SIRPα humana para su uso según la reivindicación 6, en donde la célula enferma es una célula cancerosa CD47+.
8. La proteína de fusión de SIRPα humana para su uso según la reivindicación 6 o 7, en donde la célula enferma es una célula de cáncer hematológico CD47+.
- 20 9. La proteína de fusión de SIRPα humana para su uso según la reivindicación 8, en donde la célula enferma es una célula de leucemia CD47+.
10. La proteína de fusión de SIRPα humana para su uso según la reivindicación 7, en donde la célula enferma es un tumor sólido que comprende células cancerosas CD47+.
11. La proteína de fusión de SIRPα humana para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en donde la proteína de fusión de SIRPα humana consiste en SEC ID No. 25.
- 25 12. Una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión de SIRPα humana según la reivindicación 1 o 2.
13. Una célula anfitriona de producción de proteínas, que comprende una construcción de ADN incorporada expresablemente según la reivindicación 12.
- 30 14. Un método para producir una proteína de fusión de SIRPα humana, que comprende cultivar una célula anfitriona de producción de proteína que incorpora para su expresión un polinucleótido que codifica una proteína de fusión SIRPαFc humana que comprende o consiste en SEC ID No. 25.
15. Una proteína de fusión dimérica que comprende dos polipéptidos de cadena sencilla fusionados a través de sus respectivos componentes Fc, siendo cada polipéptido de cadena sencilla una proteína de fusión de SIRPα humana de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 35 16. Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad de una proteína de fusión de SIRPα humana dimérica según la reivindicación 15, eficaz para inhibir el crecimiento o la proliferación de una célula enferma CD47+.
17. Una proteína de fusión de SIRPα humana dimérica según la reivindicación 15, para su uso en la inhibición del crecimiento de células enfermas CD47+ en un sujeto que lo necesite.
- 40 18. La proteína de fusión de SIRPα humana dimérica para su uso según la reivindicación 17, en donde la célula enferma es una célula cancerosa CD47+.
19. La proteína de fusión de SIRPα humana dimérica para su uso según la reivindicación 17, en donde la célula enferma es una célula de cáncer hematológico CD47+.
- 45 20. Un método para producir la proteína de fusión de SIRPα humana dimérica según la reivindicación 15, que comprende cultivar una célula anfitriona de producción de proteína que incorpora para su expresión un polinucleótido que codifica una forma secretable de proteína de fusión SIRPαFc humana que comprende o consiste en SEC ID No. 25.

Figura 1

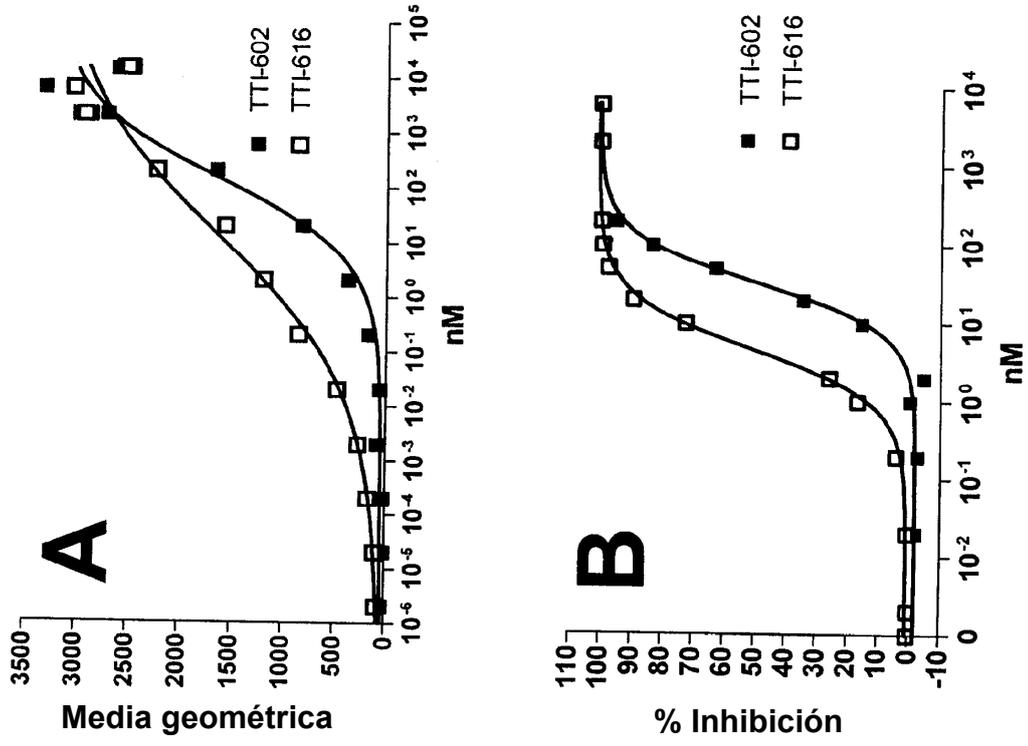


Figura 2

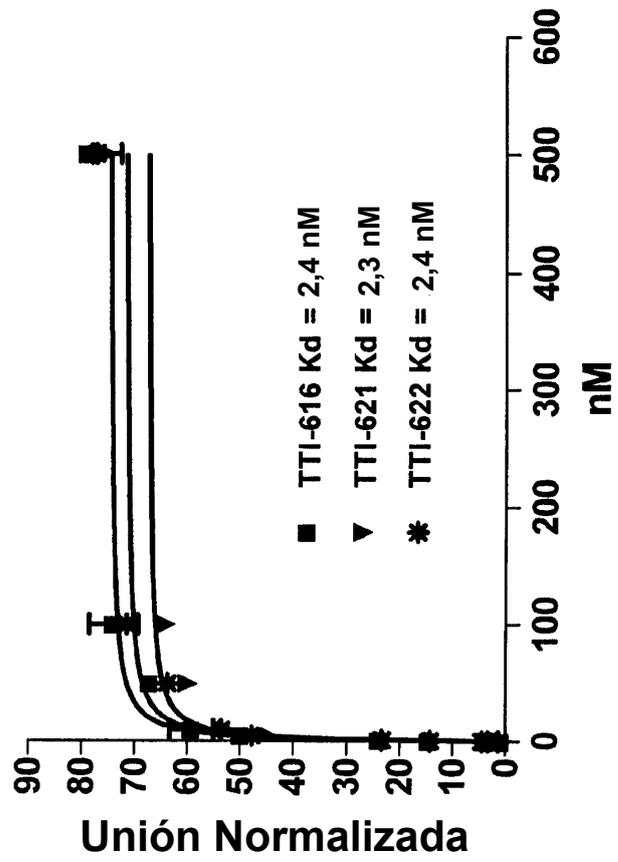


Figura 3

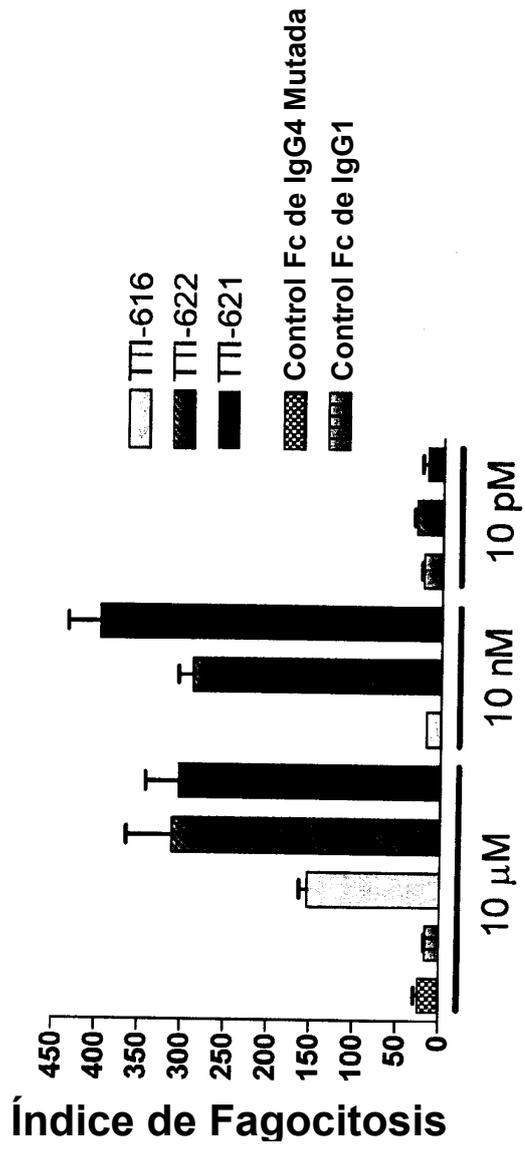


Figura 4

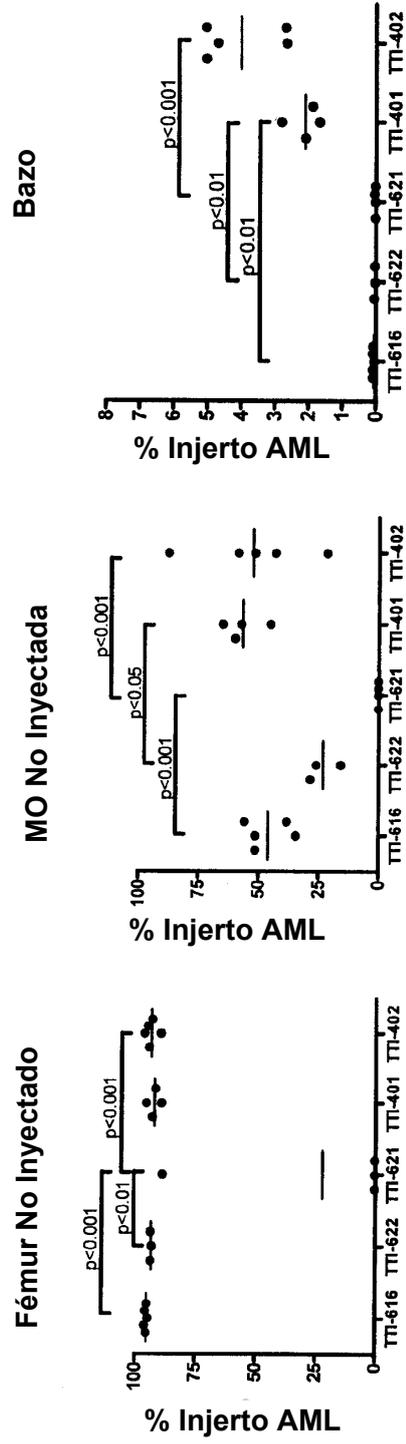
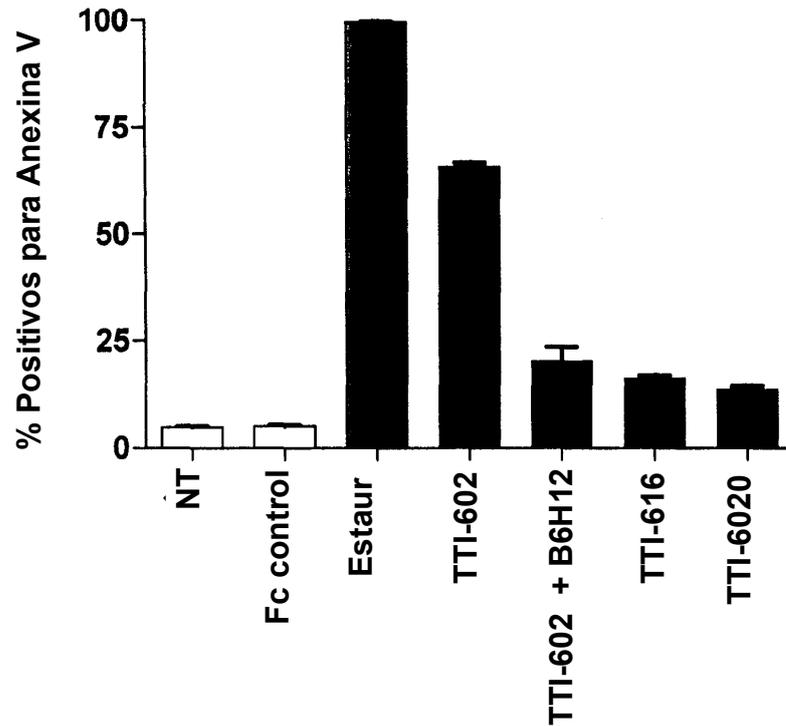


Figura 5

Las células T Jurkat humanas CD47+ se incubaron con proteínas de fusión SIRP α Fc o Fc de control (3 μ M) o se dejaron sin tratar (NT) durante la noche y a continuación se tiñeron para Anexina-V y 7-AAD y se analizaron mediante citometría de flujo. Se incluyó el agente pro-apoptótico estaurosporina (Estaur) a 1 μ M como control positivo. Una muestra que contenía TTI-602 se trató previamente con B6H12, un anticuerpo de bloqueo de CD47 [Datos de Exp. Núm.280]

Figura 6

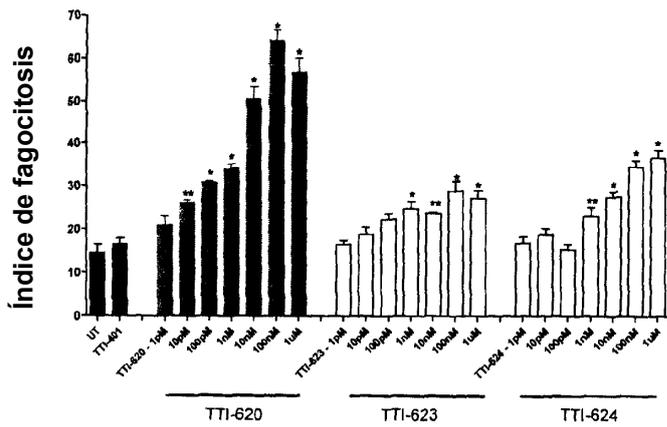
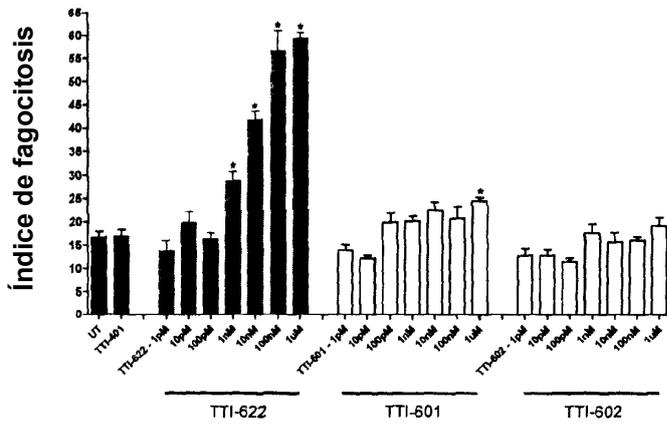
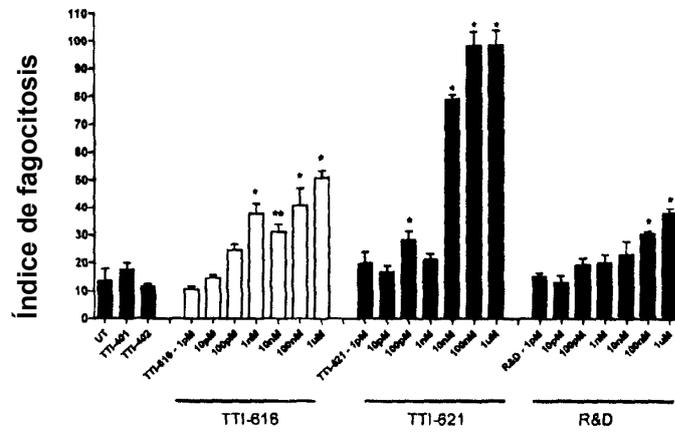


Figura 7

