(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 761 861**

(51) Int. CI.:

***A61P 35/00*** (2006.01) ***C12N 5/0786*** (2010.01)
***A61K 39/395*** (2006.01)
***A61K 39/00*** (2006.01)
***A61K 31/33*** (2006.01)
***A61K 35/15*** (2015.01)
***A61K 45/06*** (2006.01)
***A61P 7/00*** (2006.01)
***A61K 31/4745*** (2006.01)
***A61K 31/713*** (2006.01)
***A61K 31/519*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2016 PCT/US2016/014334**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2016 WO16118754**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2016 E 16740762 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 3247464**

(54) Título: **Uso de agonistas de TLR y agente anti-CD47 para mejorar la fagocitosis de las células cancerosas**

(30) Prioridad:

**21.01.2015 US 201562106050 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**21.05.2020**

(73) Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)**
**Office of the General Counsel, Building 170, 3rd Floor, Main Quad, P.O. Box 20386**
**Stanford, CA 94305-2038, US**

(72) Inventor/es:

**WEISSMAN, IRVING L.;**
**FENG, MINGYE y**
**VOLKMER, JENS-PETER**

(74) Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

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

Uso de agonistas de TLR y agente anti-CD47 para mejorar la fagocitosis de las células cancerosas

ANTECEDENTES

El sistema reticuloendotelial (RES) es una parte del sistema inmune. El RES consiste de las células fagocíticas localizadas en el tejido conectivo reticular, principalmente monocitos y macrófagos. El RES consiste de 1) monocitos circulantes; 2) macrófagos residentes en el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos, el timo, los tejidos submucosos de las vías respiratorias y alimentarias, la médula ósea y los tejidos conectivos; y 3) células similares a macrófagos, incluyendo las células dendríticas en los ganglios linfáticos, las células de Langerhans en la piel y las células microgliales en el sistema nervioso central. Estas células se acumulan en los ganglios linfáticos y el bazo. El RES funciona para eliminar patógenos, materia particulada en circulación, y células hematopoyéticas envejecidas o dañadas.

Para eliminar células o partículas extrañas en la respuesta inmune innata, se induce la fagocitosis mediada por macrófagos cuando el receptor de fosfatidilserina (PSR) reacciona a la fosfatidilserina (PS), que puede externalizarse desde las membranas de las células muertas, como células apoptóticas y necróticas. A su vez, la interacción entre PS y PSR desempeña un papel crucial en la depuración de las células apoptóticas por los macrófagos. Una vez que los macrófagos han realizado la fagocitosis, la respuesta inflamatoria se regula por disminución mediante un aumento de factores como IL-10, TGF-β y prostaglandina E2 (PGE2). El equilibrio estricto entre las respuestas inflamatorias y antiinflamatorias tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis celular y en la protección de un huésped de la invasión extrínseca.

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

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

La transformación celular maligna se produce a través de una progresión de mutaciones genéticas y reprogramación epigenética que activan los oncogenes e inactivan las vías supresoras de tumores que llevan a la herencia de varias características comunes compartidas por la mayoría de las células cancerosas, incluyendo: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anti-crecimiento, invasión de tejidos y metástasis, potencial replicativo pobremente regulado, angiogénesis sostenida, y evasión de la muerte celular por una variedad de vías, incluyendo la apoptosis. Además de estas propiedades intrínsecas de las células, la evidencia reciente sugiere que muchos cánceres también son capaces de evadir el sistema inmune mediante varios mecanismos distintos.

La US 2014/271683 describe métodos terapéuticos y de diagnóstico para manipular la fagocitosis a través de la calreticulina y el receptor relacionado con las lipoproteínas de baja densidad. La US 2013/309244 describe métodos y composiciones que combinan inmunoterapia con activación de monocitos. Tseng et al. (2013) PNAS USA 110 (27):11103-11108 informa que la fagocitosis mediada por anticuerpos anti-CD47 del cáncer por los macrófagos prepara una respuesta antitumoral eficaz de células T. Long et al. (2013) Oncoimmunology 2(12):1-10 describe el aprovechamiento del potencial antitumoral de los macrófagos para la inmunoterapia contra el cáncer. La US 2013/336922 describe péptidos de unión a HLA derivados de moléculas antigénicas asociadas a la próstata y métodos de uso de los mismos. Feng et al. (2015) PNAS USA 112(7):2145-2150 informa que los macrófagos comen células cancerosas usando su propia calreticulina como guía. Byrne et al. (2013) Journal of Immunology 190(10):5207-5215 informa que se requiere la tirosina quinasa de Bruton para la captación de células apoptóticas mediante la regulación de la fosforilación y localización de calreticulina. Weiskopf et al. (2013) Science 341(6141):88-91 describe las variantes de SIRP diseñadas como adyuvantes inmunoterapéuticos para los anticuerpos anticancerosos. Chao et al. (2012) Current Opinion in Immunology 24(2):225-232 describe la vía CD47-SIRPα en la evasión inmune del cáncer y las posibles implicaciones terapéuticas. Cyrus (2013) Yale Medicine Thesis Digital Library 1784 describe el papel de los macrófagos asociados a tumores en el cáncer de piel humano. La US 2011/070269 describe el lipopolisacárido aislado del tejido de pirularia y/o las bacterias asociadas a la pirularia y usos de los mismos. La WO 2011/136828 describe composiciones inmunogénicas y métodos para tratar la neoplasia.

La exploración de los mecanismos por los cuales las células evitan ser depuradas por la fagocitosis puede proporcionar información sobre maneras de mejorar el éxito del trasplante de células madre hematopoyéticas y progenitoras, y métodos mejorados para eliminar las células cancerosas del cuerpo. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona un método *in vitro* para aumentar la fagocitosis de células cancerosas, el método comprendiendo:

poner en contacto una población de células fagocíticas con un agonista de TLR en una dosis eficaz para aumentar la expresión de calreticulina en la superficie de las células fagocíticas; y con una dosis eficaz de un agente de bloqueo de CD47;
en donde se aumenta la eliminación celular programada de células cancerosas por las células fagocíticas.

La invención proporciona además un agonista de TLR para su uso en un método para aumentar la fagocitosis de células cancerosas, el método comprendiendo:

poner en contacto una población de células fagocíticas con un agonista de TLR en una dosis eficaz para aumentar la expresión de calreticulina en la superficie de las células fagocíticas; y con una dosis eficaz de un agente de bloqueo de CD47;
en donde se aumenta la eliminación celular programada de células cancerosas por las células fagocíticas, y en donde:

(a) el contacto se realiza *in vivo,* o
(b) el contacto se realiza *in vitro,* en donde las células fagocíticas se introducen en un sujeto después del contacto con un agonista de TLR y un agente de bloqueo de CD47.

La invención proporciona además un agente de bloqueo de CD47 para su uso en un método para aumentar la fagocitosis de células cancerosas, el método comprendiendo:

poner en contacto una población de células fagocíticas con un agonista de TLR en una dosis eficaz para aumentar la expresión de calreticulina en la superficie de las células fagocíticas; y con una dosis eficaz de un agente de bloqueo de CD47;
en donde se aumenta la eliminación celular programada de células cancerosas por las células fagocíticas, y en donde:

(a) el contacto se realiza *in vivo,* o
(b) el contacto se realiza *in vitro,* en donde las células fagocíticas se introducen en un sujeto después del contacto con un agonista de TLR y un agente de bloqueo de CD47.

Se proporcionan métodos terapéuticos y de diagnóstico, tales métodos se relacionan con la eliminación celular programada mediada por macrófagos (PrCR). En la presente se muestra que las células fagocíticas, por ejemplo macrófagos, en respuesta a la señalización de TLR regulan por incremento la expresión de calreticulina (CRT) en la superficie de células fagocíticas. La CRT en la superficie de la célula fagocítica interactúa con las células objetivo, por ejemplo, las células cancerosas, para iniciar la PrCR. Se muestra que la regulación por incremento de CRT por la célula fagocítica implica una vía de señalización de tirosina quinasa de Bruton (BTK), y la inhibición de BTK regula por disminución la calreticulina en la superficie celular de fagocitos, reduciendo de este modo la PrCR. Los métodos de la invención aumentan la PrCR poniendo en contacto una célula fagocítica con un agonista de TLR. Los métodos de la divulgación regulan por disminución la PrCR poniendo en contacto una célula fagocítica con un inhibidor de BTK. El contacto puede realizarse in vitro, por ejemplo, para cebar células fagocíticas con propósitos terapéuticos; o puede realizarse in vivo con propósitos terapéuticos. La expresión de CRT en la superficie celular fagocítica proporciona un biomarcador para determinar la capacidad fagocítica de la célula.

En una realización de la invención, se proporciona un activador de señalización de TLR en combinación con el bloqueo de CD47, donde la PrCr se incrementa con respecto a la eliminación celular en presencia de cualquiera de los agentes como monoterapia. En algunas realizaciones, una población de células que comprende macrófagos se pone *en* contacto *in vitro* o *in vivo* con una dosis de un agonista de TLR o un agonista de BTK que sea eficaz para aumentar la CRT en la superficie celular del macrófago en por lo menos aproximadamente un 25%, por lo menos aproximadamente un 50%, por lo menos aproximadamente un 75%, y puede aumentar la expresión 2 veces, 3 veces, 5 veces o más, con respecto a una célula no estimulada. El nivel de fagocitosis en una célula tratada de este modo puede ser por lo menos aproximadamente un 25%, por lo menos aproximadamente un 50%, por lo menos aproximadamente un 75%, y puede aumentar la fagocitosis 2 veces, 3 veces, 5 veces o más, con respecto a una célula no estimulada En presencia de un agente que bloquea la interacción de CD47 con SIRPα, el aumento incremental de la fagocitosis para una célula tratada con una dosis eficaz de un agonista de TLR o un agonista de

BTK puede ser por lo menos aproximadamente un 25%, por lo menos aproximadamente un 50%, por lo menos aproximadamente un 75%, y puede aumentar la fagocitosis 2 veces, 3 veces, 5 veces o más, con respecto a una célula tratada con un agonista de TLR en ausencia de bloqueo de CD47. En algunas realizaciones, el antagonista de CD47 es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es hu5F9-G4.

Para el tratamiento *in vivo*, puede administrarse un agonista de TLR o un agonista de BTK en una dosis eficaz y durante un período de tiempo suficiente para aumentar la PrCr en el recipiente, por ejemplo, como se determina por la fagocitosis de las células tumorales por células fagocíticas. El agonista de TLR o un agonista de BTK puede coadministrarse o administrarse concurrentemente con una dosis eficaz de un agente que bloquea la interacción de CD47 con SIPα. El agonista de TLR o un agonista de BTK puede coadministrarse o administrarse simultáneamente con un agente que se dirige específicamente a una célula cancerosa, por ejemplo, un anticuerpo dirigido a un objetivo selectivo de tumor.

Las células fagocíticas que se han tratado *in vitro* con un agonista de TLR o un agonista de BTK pueden administrarse a un individuo para el tratamiento del cáncer, donde las células se administran sistémicamente o localmente, por ejemplo, en un sitio tumoral. Las células pueden coadministrarse o administrarse simultáneamente con una dosis eficaz de un agente que bloquea la interacción de CD47 con SIPα. Las células pueden ponerse en contacto con una célula tumoral o antígeno de células tumorales *in vitro* antes de la administración. Las células pueden coadministrarse o administrarse simultáneamente con un agente que se dirige específicamente a una célula cancerosa, por ejemplo, un anticuerpo dirigido a un objetivo selectivo de tumor.

La capacidad fagocítica de un fagocito, por ejemplo, un macrófago, puede determinarse midiendo la expresión de CRT en la superficie celular, donde un aumento en CRT corresponde a un aumento en la capacidad fagocítica. En algunas realizaciones, se mide la expresión de calreticulina en una superficie celular de macrófagos, incluyendo sin limitación, poner en contacto la célula con un anticuerpo específico para CRT y determinar la cantidad de anticuerpo que está unido, por ejemplo, mediante citometría de flujo, ELISA, inmunohistoquímica y similares, como se conoce en la técnica. En algunas de tales realizaciones, el paso de medición se realiza después de tratar las células con un agonista de TLR in vitro. En algunas realizaciones, la medición se compara con un nivel predeterminado, o una célula de control que no está tratada con un agonista de TLR. En algunas realizaciones, las células que tienen un nivel predeterminado de CRT se administran a un individuo para el tratamiento del cáncer, donde las células se administran sistémicamente o localmente, por ejemplo en un sitio tumoral.

En otras realizaciones de la divulgación, se proporciona un inhibidor de BTK que incluye, sin limitación, ibrutinib, anticuerpo anti-BTK, etc., en una dosis terapéutica a un individuo que padece de PrCR excesivo o indeseable, incluyendo sin limitación un individuo que padece síndrome mielodisplásico (MDS), anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica inmune (PTI), enfermedades autoinmunes que incluyen artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, *etc.* La dosis de inhibidor de BTK es suficiente para regular por disminución la expresión de CRT en células fagocíticas, por ejemplo, disminuir en por lo menos aproximadamente un 25%, por lo menos aproximadamente un 50%, por lo menos aproximadamente un 75%, y puede disminuir la expresión 2 veces, 3 veces, 5 veces o más, con respecto a una célula no estimulada. El nivel de fagocitosis en una célula tratada de este modo puede reducirse por lo menos aproximadamente un 25%, por lo menos aproximadamente un 50%, por lo menos aproximadamente un 75%, y puede disminuir la fagocitosis 2 veces, 3 veces, 5 veces o más, con respecto a una célula no estimulada.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Fig. 1. La activación de la señalización de TLR lleva a una PrCR mejorada de las células cancerosas vivas. (A) Izquierda, un esquema que muestra PrCR de células tumorales vivas por macrófagos. El bloqueo de CD47 lleva a un desequilibrio de las vías "cómeme" sobre "no me comas", lo que provoca la fagocitosis de las células tumorales, ya sea dependientes de Fc (provocadas por la interacción Fc-FcR) o independientes de Fc (marcadas en rojo, representando señales específicas de "cómeme" específicas del cáncer que no sean Fc). Derecha, un ensayo de fagocitosis que muestra el bloqueo de la fagocitosis inducida por CD47, con células SW620 (tratadas con IgG de control, tratadas con anticuerpo anti-CD47 (B6H12) o $CD47^{KO}$) como células objetivo y BMDM de ratones $RAG2^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$. Fagocitosis inversa del bloqueador del receptor de Fc (FcRB) de células tratadas con B6H12 al mismo nivel que el de las células $CD47^{KO}$. **, P <0,01, prueba t. (*B*) Un ensayo de fagocitosis que muestra una selección de agonistas de TLR, con células SW620 (tratadas con PBS, tratadas con anticuerpo anti-CD47 (Hu5F9-G4) o con $CD47^{KO}$) como células objetivo y BMDM de ratones BALB/c. Los agonistas de TLR usados en la selección fueron: Pam3CSK4 (Pam, TLR1/2), *Listeria monocytogenes* matados por calor (HKLM, TLR2), Poli (I:C) HMW (Poli (I:C), TLR3), Lipopolisacárido (LPS, TLR4), Flagelina de *S. typhimurium* (FLA-ST, TLR5), Pam2CGDPKHPKSF (FSL-1, TLR6/2), Imiquimod (Imi, TLR7), oligonucleótido CpG Clase B (ODN 1826, TLR9). Las líneas discontinuas indican fagocitosis de 2 veces de cada afección (tratadas con PBS, tratadas con anticuerpo anti-CD47 (Hu5F9-G4) o con $CD47^{KO}$) en el grupo de macrófagos de control. Las barras de error representan la desviación estándar (*A* y *B*).

Fig. 2. Btk es la molécula de señalización clave que regula la PrCR de las células cancerosas;. (*A*) Un ensayo de fagocitosis que muestra una selección con agonistas de TLR combinados y varios inhibidores dirigidos a

las moléculas de señalización en sentido descendente, con células SW620 (control o $CD47^{KO}$) como células objetivo y BMDM de ratones $RAG2^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$. Los inhibidores usados en la selección fueron: PD98059 (PD, inhibidor de MEK), LY294002 (LY, inhibidor de PI3K), Ibrutinib (inhibidor de Ibr, Btk), YVAD (YVAD, inhibidor de caspasa-1). **, P<0,01 (prueba t; Comparación entre muestras en grupos control o $CD47^{KO}$, Imi-ctrl frente a otras condiciones). (*B*) inmunotransferencias que muestran la fosforilación de Btk inducida por agonistas de TLR (Poli (I:C) HMW, LPS, imiquimod). Cuando las células se trataron con agonistas de TLR e Ibrutinib simultáneamente, se atenuó la inducción de la fosforilación de Btk. El Btk total no mostró cambios. (*C*) y (*D*) Efectos temporales del activador de Btk (imiquimod) (*C*) y el inhibidor (ibrutinib) (*D*) sobre la fagocitosis, con células SW620 $^{CD47KO}$ como células objetivo y BMDM de ratones NSG. Las barras de error representan la desviación estándar (*A*, *C* y *D*).

Fig. 3. Btk controla la exposición en la superficie celular de CRT en los macrófagos para regular la PrCR de células cancerosas. (*A*) La expresión de CRT en macrófagos se examinó mediante un ensayo de biotinilación de la superficie celular. Las inmunotransferencias mostraron que la CRT de la superficie celular aumentó tras la activación de Btk y disminuyó con la inhibición de Btk. Imi: imiquimod; Ibr: ibrutinib. (*B*) Exposición de la superficie celular aumentada de CRT en macrófagos inducida por agonistas de TLR (Poli (I:C) HMW, LPS, imiquimod), como se examina por análisis de citometría de flujo. Las líneas discontinuas indican índices fagocíticos normalizados de cada afección (tratadas con PBS, tratadas con anticuerpo anti-CD47 (Hu5F9-G4) o $CD47^{KO}$) en el grupo de macrófagos de control. (*D*) La sobreexpresión de CRT en células J774 promovió la fagocitosis. La expresión de CRT se examinó por inmunotransferencia. Se usaron células SW620 (IgG de control o tratadas con anticuerpo anti-CD47 (B6H12)) como células objetivo. *P<0,05, **P <0,01 (prueba t). Las barras de error representan la desviación estándar (*C* y *D*).

Fig. 4. La CRT es un efector clave en los macrófagos en la mediación de PrCR de las células cancerosas. (*A*) Un ensayo de fagocitosis que muestra los efectos del bloqueo de CRT sobre los macrófagos o células cancerosas. Izquierda, un esquema que muestra el diseño de los experimentos. Los macrófagos, las células objetivo o ambas se pretrataron con anticuerpo de CRT y luego se sometieron a un ensayo de fagocitosis. Derecha, fue necesario un ensayo de fagocitosis que mostrara la CRT en macrófagos para la fagocitosis de células cancerosas, con células SW620 (control o $CD47^{KO}$) como células objetivo y BMDM de ratones $RAG2^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$. (*B*) Capacidad fagocítica de macrófagos con niveles de expresión de CRT de superficie diferencial. La definición de poblaciones de $CRT^{Baja}$, $CRT^{Media}$ y $CRT^{Alta}$ se describe en la Fig. S8 *A-B.* (*C*) Se representó la fagocitosis de células tumorales normalizada (eje Y) frente a la expresión de CRT de la superficie celular normalizada (Log2; eje X) en macrófagos, con células SW620 ($CD47^{KO}$) como células objetivo y BMDM de ratones $RAG2^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$ o NSG. ■: BMDM de ratones NSG tratados con imiquimod durante 0, 1, 6, 16, 24 h; ▲ BMDM de ratones $RAG2^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$ (Poblaciones de $CRT^{Baja}$, $CRT^{Media}$, $CRT^{Alta}$ y en general); ● BMDM de ratones NSG (Poblaciones de $CRT^{Baja}$, $CRT^{Media}$, $CRT^{Alta}$ y en general). Las barras de error representan la desviación estándar (*A* y *B*).

Figura 5. La exclusión de CD47 mediada por TALEN en células SW620. (*A*) y (*B*) Examen de CD47 de la superficie celular en células $SW620^{WT}$ y $SW620^{CD47KO}$ mediante análisis de citometría de flujo. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD47 conjugado con ficoeritrina (PE) (B6H12) o control de isotipo conjugado con PE. Los análisis de citometría de flujo se mostraron en el histograma (*A*) o en el contorno (*B*).

Figura 6. Selección de señalización de TLR para PRCR de células tumorales con agonistas de TLR. (*A*) y (*B*) Ensayos de fagocitosis que muestran el tratamiento de macrófagos con agonistas de TLR (Poli (I:C) HMW, LPS, imiquimod) promovieron la fagocitosis de células tumorales, con células SW620 (tratadas con PBS, tratadas con anticuerpo anti-CD47 (Hu5F9- G4) o $CD47^{KO}$) como células objetivo y BMDM de ratones $RAG2^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$ (*A*) o ratones NSG (*B*). Las líneas discontinuas indican fagocitosis doble de cada afección (SW620+PBS, SW620+Hu5F9-G4 o $SW620^{CD47KO}$+PBS) en el grupo control de macrófagos. (*C*) Representaciones de citometría de flujo representativas que muestran que los agonistas de TLR mejoraron la fagocitosis. Un ensayo de fagocitosis que muestra que los agonistas de TLR mejoraron la fagocitosis de células cancerosas, con células SW620 (tratadas con PBS o Hu5F9-G4) como células objetivo y BMDM de ratones NSG. La fagocitosis se examinó mediante análisis de citometría de flujo. Los macrófagos se tiñeron con anticuerpo anti-F4/80 conjugado con PE cy7 y las células SW620 se marcaron con GFP. Las células en el cuadrado de las esquinas superior derecha eran células F4/80+GFP+, que representaban macrófagos que tenían células cancerosas fagocitadas. El tratamiento de los macrófagos con LPS mejoró fuertemente su capacidad fagocítica. Las barras de error representan la desviación estándar (*A* y *B*).

Figura 7. La fagocitosis de HL60, Raji, PC-3, MDA-MB-231 se mejora por los agonistas de TLR. Los ensayos de fagocitosis muestran que los agonistas de TLR aumentaron la fagocitosis de múltiples células cancerosas humanas, con diferentes células hematopoyéticas (HL60 y Raji) y tumorales sólidas (PC3 y MDA-MB-231) (tratadas con PBS- o Hu5F9-G4-) como células objetivo y BMDM de Ratones NSG (HL60, Raji y PC3) o $RAG2^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$ (MDA-MB-231). HL60: leucemia promielocítica; Raji: linfoma de Burkitt; PC3: cáncer de próstata; MDA-MB-231: Cáncer de mama. Las barras de error representan la desviación estándar (*A-D*).

Figura 8. Los agonistas de TLR mejoran la eficacia del anticuerpo de bloqueo CD47 para inhibir el crecimiento de tumores *in vivo.* (*A*) Crecimiento tumoral monitorizado por imágenes bioluminiscentes. Las células de cáncer de próstata PC3 se injertaron en ratones NSG. Los ratones se trataron con agonistas de PBS, Hu5F9-G4 o Hu5F9-G4 + TLR (Poli (I:C) HMW + LPS) (n = 5 en cada grupo; 1 ratón en el grupo de control de PBS murió debido a la progresión tumoral en la semana 8) Los agonistas de TLR mejoraron significativamente la eficacia de Hu5F9-G4 para inhibir el crecimiento tumoral. (*B*) Análisis de especímenes

tumorales por citometría de flujo. Se recogieron especímenes tumorales de cada grupo en el experimento descrito en (*A*) y se disociaron para lograr la suspensión de células individuales. Las células se analizaron mediante citometría de flujo. Se usaron anticuerpos anti-CD31 y anti-Gr-1 para excluir células endoteliales (CD31) y neutrófilos (Gr-1). Los macrófagos se marcaron con anticuerpo anti-F4/80. a4 (GFP+F4/80-) representa células tumorales, a1 (GFP-F4/80+) representa macrófagos y a2 (GFP+F4/80+) representa macrófagos que tenían células tumorales fagocitadas. Se observaron menos células tumorales en el grupo de Hu5F9-G4 (40%) en comparación con el grupo de PBS (56%), mientras que las células tumorales casi se depuraron en el grupo de agonistas de Hu5F9-G4 + TLR (1,06%). El grupo de Hu5F9-G4 mostró fagocitosis en curso (a2) (39,3%, frente al 2,18% en el grupo de PBS), mientras que el grupo de agonistas de Hu5F9-G4 + TLR mostró fagocitosis completada en gran medida de las células tumorales (con 94,7% de macrófagos (a1 + a2), frente al 46,26 % en el grupo de Hu5F9-G4 y el 23,8% en el grupo de PBS). Estos resultados sugirieron que Hu5F9-G4 mejoró la eficacia de Hu5F9-G4 para inducir la PrCR de células tumorales *in vivo.*

Figura 9. Expresión de Btk en el sistema hematopoyético. Un esquema que muestra la expresión de Btk en el sistema hematopoyético, generado por Gene Expression Commons (5). La actividad de expresión génica se marcó con azul (bajo) o rojo (alto). Btk se expresa en todos los linajes excepto en las células T y las células NK. HSC: Células madre hematopoyéticas; MPP: Progenitor multipotencial; GMLP: Progenitor Granulo/Macrófago/Linfoide; pMEP/MEP: Progenitor pre-/megacariocito-eritroide; CMP: Progenitor mieloide común; CLP: Progenitor linfoide común; Plt: Plaquetas; Ery: eritroide; pGMP/GMP: Progenitor pre/granulocito-macrófago; MkP: Progenitor comprometido con megacariocitos; pCFU-E: preCFU-E; Gra: Granulocito; Mono: Monocito; BLP: Progenitor de linfocitos B; iNK/mNK: Célula asesina natural intermedia/madura; BM: médula ósea; Spl: Bazo.

Figura 10. Btk media PrCR regulando la exposición en la superficie celular de CRT en macrófagos. (*A*) Inhibición del nivel de referencia de PrCR (macrófagos en reposo) por antagonismo de Btk. Un ensayo de fagocitosis que muestra que el bloqueo de Btk inhibió la fagocitosis de las células tumorales por los macrófagos en reposo (no estimulados por la señalización de TLR), con células SW620 (tratadas con IgG de control, tratadas con anticuerpo anti-CD47 (B6H12) o $CD47^{KO}$) como células objetivo y BMDM de ratones $RAG2^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$. Los macrófagos y las células cancerosas objetivo se cocultivaron durante 16 horas a las condiciones indicadas, con o sin bloqueador de Btk ibrutinib. Las células se examinaron por análisis de citometría de flujo. Las células objetivo restantes se usaron para evaluar la eficacia de la fagocitosis, con menos células objetivo restantes que representan una fagocitosis más fuerte. Tanto la fagocitosis dependiente de F como independiente de Fc inducida por el bloqueo de CD47 (anticuerpo anti-CD47 o $CD47^{KO}$) se invirtieron en gran medida por el antagonismo de Btk. (*B*) La expresión de la superficie celular de CRT se examinó mediante análisis de citometría de flujo. Los macrófagos (ctrl, imiquimod o imiquimod+ibrutinib) se analizaron con anticuerpo anti-CRT. El imiquimod aumentó la expresión en la superficie celular de la CRT en los macrófagos y este efecto se invirtió por el ibrutinib. (*C*) Respuesta a la dosis del anticuerpo de CRT en el bloqueo de la fagocitosis. Las curvas de respuesta a la dosis del antagonismo de CRT con anticuerpo de CRT o IgG de conejo (control) en el bloqueo de la fagocitosis. El ensayo de fagocitosis se realizó con $SW620^{CD47KO}$ como células objetivo y BMDM de ratones $RAG2^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$. (*D*) Un ensayo de fagocitosis que muestra que el anticuerpo de CRT o el ibrutinib inhibió la fagocitosis de las células cancerosas, con células SW620 (tratadas con IgG de control o anticuerpo anti-CD47 (B6H12)) como células objetivo y macrófagos humanos derivados de PBMC. **, P<0,01 (prueba t). (*E*) Fosforilación de CRT por Btk. Inmunotransferencia que muestra la fosforilación de CRT tras la activación de Btk. La CRT marcada con Myc se expresó en células J774 y se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-myc después del tratamiento con imiquimod. La CRT fosforilada se detectó con anticuerpo anti-fosfotirosina. Las barras de error representan la desviación estándar (*A, C* y *D*).

Figura 11. La inducción de CRT de la superficie celular por la activación de Btk es específica en los macrófagos. (A) Inmunotransferencia de expresión de Btk en macrófagos y células cancerosas. Btk se expresó en macrófagos pero no en células tumorales sólidas. 620: SW620; 231: MDA-MB-231. (B-D) Expresión de la superficie celular de CRT con o sin activación de Btk, como se examina por citometría de flujo, en células de macrófagos (B), cáncer de colon (SW620, C) y cáncer de mama (MDA-MB-231, D). Imi, imiquimod.

Figura 12. La expresión de CRT de superficie en macrófagos se correlaciona con sus capacidades fagocíticas. (*A*) y (*B*) Subpoblaciones de macrófagos con expresión de CRT en la superficie celular diferencial. Gráficos de FACS que muestran la expresión de CRT en BMDM de ratones $RAG2^{-/-}$, $\gamma c^{-/-}$ (*A*) o NSG (*B*), bajo condiciones de control o tratamiento con imiquimod. Las poblaciones de $CRT^{Baja}$, $CRT^{Media}$ y $CRT^{Alta}$ se definieron y etiquetaron como áreas a, b y c. Capacidad fagocítica de diferentes grupos de macrófagos no tratados (Población general - completa; Las $CRT^{Baja}$ - células en la región a; $CRT^{Media}$ - células en la región b; $CRT^{Alta}$ - células en las regiones c) se mostraron en la Fig. 4B. (*C*) Efectos temporales de imiquimod (tratamiento de 0, 1, 6, 16, 24 horas) sobre la expresión en la superficie celular de CRT en BMDM de ratones NSG, según se examinó por análisis de citometría de flujo con anticuerpo anti-CRT. (*D*) Los valores de intensidad de fluorescencia medios de CRT en diferentes puntos temporales después del tratamiento con imiquimod se normalizaron al valor de 0 h y se transformaron los log (Log2).

Figura 13. Expresión de la superficie celular de CRT en macrófagos humanos M1 y M2. (*A*) y (*B*) La diferenciación de los macrófagos M1 (*A*) y M2 (*B*) se examinó con marcadores específicos (CD80 para M1 y CD163 para M2). (*C*) y (*D*) gráfico FACS que muestra la expresión de la superficie celular de CRT en

macrófagos M1 y M2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

Antes de que se describa la presente invención adicionalmente, debe entenderse que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que tales, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no se pretende que sea limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

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

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque también puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente en la puesta en práctica o prueba de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos.

DEFINICIONES

*Calreticulina* La calreticulina es una proteína multifuncional de 417 aminoácidos, con un peso molecular de 48 kDa, que se une a los iones de $Ca^{2+}$, dejándolos inactivos. El $Ca^{2+}$ está vinculado con baja afinidad, pero alta capacidad, y puede liberarse en una señal. La calreticulina puede localizarse en compartimentos de almacenamiento asociados con el retículo endoplásmico, donde se une a proteínas mal plegadas y evita que se exporten al aparato de Golgi. La calreticulina también se encuentra en el núcleo, lo que sugiere que puede tener un papel en la regulación de la transcripción. La calreticulina se une al péptido sintético KLGFFKR, que es casi idéntico a una secuencia de aminoácidos en el dominio de unión al ADN de la superfamilia de receptores nucleares. El símbolo genético para la calreticulina es CALR, y se puede acceder a las secuencias humanas en Pubmed de la siguiente manera: Nº de acceso a la proteína NP_004334; Número de acceso de nucleótidos: NM_004343.

*Agente anti-CD47.* Como se usa en la presente, el término "agente anti-CD47" se refiere a cualquier agente que reduce la unión de CD47 (por ejemplo, en una célula objetivo) a SIRPα (por ejemplo, en una célula fagocítica). Ejemplos no limitativos de reactivos anti-CD47 adecuados incluyen reactivos de SIRPα que incluyen, sin limitación, polipéptidos de SIRPα de alta afinidad, anticuerpos anti-SIRPa, polipéptidos de CD47 solubles y anticuerpos anti-CD47, fragmentos de anticuerpos, péptidos, moléculas pequeñas, peptidomiméticos y similares.. En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 adecuado (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47, un reactivo de SIRPα, etc.) se une específicamente a CD47 para reducir la unión de CD47 a SIRPα. En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 adecuado (por ejemplo, un anticuerpo anti-SIRPa, un polipéptido de CD47 soluble, etc.) se une específicamente a SIRPα para reducir la unión de CD47 a SIRPα. Un agente anti-CD47 adecuado que se une a SIRPα no activa SIRPα (por ejemplo, en la célula fagocítica que expresa SIRPα).

La eficacia de un agente anti-CD47 adecuado puede evaluarse analizando el agente. En un ensayo ejemplar, las células objetivo se incuban en presencia o ausencia del agente candidato. Un agente para su uso en los métodos de la invención regulará por incremento la fagocitosis y la posterior activación de las células T en por lo menos un 10% (por ejemplo, por lo menos un 20%, por lo menos un 30%, por lo menos un 40%, por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 90%, por lo menos un 100%, por lo menos un 120%, por lo menos un 140%, por lo menos un 160%, por lo menos un 180% o por lo menos un 200%) en comparación a la fagocitosis y posterior activación de células T en ausencia del agente. Del mismo modo, un ensayo *in vitro* de los niveles de fosforilación de tirosina de SIRPα mostrará una disminución en la fosforilación de por lo menos un 5% (por ejemplo, por lo menos un 10%, por lo menos un 15%, por lo menos un 20%, por lo menos un 30%, por lo menos un 40%, por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 90% o 100%) en comparación con la fosforilación observada en ausencia del agente candidato.

En algunas realizaciones, el agente anti-CD47 no activa CD47 tras la unión. Cuando se activa CD47, puede tener lugar un proceso parecido a la apoptosis (es decir, muerte celular programada) (Manna y Frazier (2004) Cancer Research 64:1026-1036). Por tanto, en algunas realizaciones, el agente anti-CD47 no induce directamente la muerte celular de una célula que expresa CD47.

*Reactivo SIRPα.* Un reactivo SIRPα comprende la porción de SIRPα que es suficiente para unirse a CD47 con una afinidad reconocible, que normalmente se encuentra entre la secuencia señal y el dominio transmembrana, o un fragmento de los mismos que retiene la actividad de unión. Un reactivo de SIRPα adecuado reduce (por ejemplo, bloquea, evita, etc.) la interacción entre las proteínas nativas SIRPα y CD47. El reactivo de SIRPα comprenderá habitualmente por lo menos el dominio d1 de SIRPα. En algunas realizaciones, un reactivo de SIRPα es una proteína de fusión, por ejemplo, fusionado en marco con un segundo polipéptido. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es capaz de aumentar el tamaño de la proteína de fusión, por ejemplo, para que la proteína de fusión no se depure de la circulación rápidamente. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina. La región Fc ayuda a la fagocitosis proporcionando una señal de "cómeme", que mejora el bloqueo de la señal de "no me comas" proporcionada por el reactivo de SIRPα de alta afinidad. En otras realizaciones, el segundo polipéptido es cualquier polipéptido adecuado que sea sustancialmente similar a Fc, por ejemplo, que proporcione un tamaño aumentado, dominios de multimerización y/o unión o interacción adicional con moléculas de Ig.

En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 sujeto es un "reactivo de SIRPα de alta afinidad", que incluye polipéptidos derivados de SIRPα y análogos de los mismos. Los reactivos de SIRPα de alta afinidad se describen en la solicitud internacional WO 2013/109752. Los reactivos de SIRPα de alta afinidad son variantes de la proteína de SIRPα nativa. En algunas realizaciones, un reactivo de SIRPα de alta afinidad es soluble, cuando el polipéptido carece del dominio transmembrana de SIRPα y comprende por lo menos un cambio de aminoácidos con respecto a la secuencia de SIRPα de tipo salvaje, y en donde el cambio de aminoácidos aumenta la afinidad del polipéptido de SIRPα que se une a CD47, por ejemplo, disminuyendo la tasa de disociación en por lo menos 10 veces, por lo menos 20 veces, por lo menos 50 veces, por lo menos 100 veces, por lo menos 500 veces, o más.

Un reactivo de SIRPα de alta afinidad comprende la porción de SIRPα que es suficiente para unir CD47 a una afinidad reconocible, por ejemplo, alta afinidad, que normalmente se encuentra entre la secuencia señal y el dominio transmembrana, o un fragmento de la misma que retiene la actividad de unión. El reactivo de SIRPα de alta afinidad comprenderá habitualmente por lo menos el dominio d1 de SIRPα con residuos de aminoácidos modificados para aumentar la afinidad. En algunas realizaciones, una variante de SIRPα de la presente invención es una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada en marco con un segundo polipéptido. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es capaz de aumentar el tamaño de la proteína de fusión, por ejemplo, para que la proteína de fusión no se depure de la circulación rápidamente. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina. La región Fc ayuda a la fagocitosis proporcionando una señal de "cómeme", que mejora el bloqueo de la señal de "no me comas" proporcionada por el reactivo de SIRPα de alta afinidad. En otras realizaciones, el segundo polipéptido es cualquier polipéptido adecuado que sea sustancialmente similar a Fc, por ejemplo, proporcionando un tamaño aumentado, dominios de multimerización y/o unión o interacción adicional con moléculas de Ig. Los cambios de aminoácidos que proporcionan una afinidad aumentada se localizan en el dominio d1 y, por tanto, los reactivos de SIRPα de alta afinidad comprenden un dominio d1 de SIRPα humano, con por lo menos un cambio de aminoácidos con respecto a la secuencia de tipo salvaje dentro del dominio d1. Tal reactivo de SIRPα de alta afinidad comprende opcionalmente secuencias de aminoácidos adicionales, por ejemplo secuencias de anticuerpos Fc; porciones de la proteína de SIRPα humana de tipo salvaje distintas del dominio d1 que incluyen, sin limitación, los residuos 150 a 374 de la proteína nativa o fragmentos de los mismos, habitualmente fragmentos contiguos con el dominio d1; y similares. Los reactivos de SIRPα de alta afinidad pueden ser monoméricos o multiméricos, es decir, dímero, trímero, tetrámero, etc.

*Anticuerpos anti-CD47.* En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 sujeto es un anticuerpo que se une específicamente a CD47 (es decir, un anticuerpo anti-CD47) y reduce la interacción entre CD47 en una célula (por ejemplo, una célula infectada) y SIRPα en otra célula (por ejemplo, una célula fagocítica). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD47 adecuado no activa CD47 tras la unión. Ejemplos no limitativos de anticuerpos adecuados incluyen los clones B6H12, 5F9, 8B6 y C3 (por ejemplo, como se describe en la Publicación de patente internacional WO 2011/143624). Los anticuerpos anti-CD47 adecuados incluyen versiones completamente humanas, humanizadas o quiméricas de tales anticuerpos. Los anticuerpos humanizados (por ejemplo, Hu5F9-G4) son especialmente útiles para aplicaciones in vivo en humanos debido a su baja antigenicidad. De manera similar, los anticuerpos caninizados, felinizados, etc. son especialmente útiles para aplicaciones en perros, gatos y otras especies, respectivamente. Los anticuerpos de interés incluyen anticuerpos humanizados, o anticuerpos caninizados, felinizados, equinizados, bovinizados, porcinizados, etc., y variantes de los mismos.

*Anticuerpos anti-SIRPα.* En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 sujeto es un anticuerpo que se une específicamente a SIRPα (es decir, un anticuerpo anti-SIRPa) y reduce la interacción entre CD47 en una célula y SIRPα en otra célula. Los anticuerpos anti-SIRPα adecuados pueden unirse a SIRPα sin activar o estimular la señalización a través de SIRPα, ya que la activación de SIRPα inhibiría la fagocitosis. En cambio, los anticuerpos anti-SIRPα adecuados facilitan la fagocitosis de las células objetivo. Por tanto, un anticuerpo anti-SIRPα adecuado se une específicamente a SIRPα (sin activar/estimular lo suficiente una respuesta de señalización para inhibir la fagocitosis) y bloquea una interacción entre SIRPα y CD47. Los anticuerpos anti-SIRPα adecuados incluyen versiones completamente humanas, humanizadas o quiméricas de tales anticuerpos. De manera similar, los anticuerpos caninizados, felinizados, etc. son especialmente útiles para aplicaciones en perros, gatos, y otras

especies respectivamente. Los anticuerpos de interés incluyen anticuerpos humanizados, o anticuerpos caninizados, felinizados, equinizados, bovinizados, porcinizados, etc., y variantes de los mismos.

*Polipéptidos de CD47 solubles.* En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 sujeto es un polipéptido de CD47 soluble que se une específicamente a SIRPα y reduce la interacción entre CD47 en una célula y SIRPα en otra célula. Un polipéptido de CD47 soluble adecuado puede unirse a SIRPα sin activar o estimular la señalización a través de SIRPα. Los polipéptidos de CD47 solubles adecuados facilitan la fagocitosis de las células objetivo. Por tanto, un polipéptido de CD47 soluble adecuado se une específicamente a SIRPα sin activar/estimular lo suficiente una respuesta de señalización para inhibir la fagocitosis.

En algunos casos, un polipéptido de CD47 soluble adecuado puede ser una proteína de fusión (por ejemplo, como se describe estructuralmente en la Publicación de Patente de Estados Unidos US20100239579). Sin embargo, solo las proteínas de fusión que no activan/estimulan SIRPα son adecuadas para los métodos proporcionados en la presente. Los polipéptidos de CD47 solubles adecuados también incluyen cualquier péptido o fragmento de péptido que comprende secuencias de CD47 variantes o existentes de forma natural (por ejemplo, secuencias del dominio extracelular o variantes de dominio extracelular) que pueden unirse específicamente a SIRPα e inhibir la interacción entre CD47 y SIRPα sin estimular lo suficiente la actividad de SIRPα para inhibir la fagocitosis.

En ciertas realizaciones, el polipéptido de CD47 soluble comprende el dominio extracelular de CD47, incluyendo el péptido señal (SEQ ID NO: 2), de tal manera que la porción extracelular de CD47 tiene típicamente 142 aminoácidos de longitud, y tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 3. Los polipéptidos de CD47 solubles descritos en la presente también incluyen variantes del dominio extracelular de CD47 que comprenden una secuencia de aminoácidos por lo menos un 65%-75%, 75%-80%, 80-85%, 85%-90% o 95%-99% (o cualquier porcentaje de identidad no enumerado específicamente entre el 65% y el 100%), tales variantes retienen la capacidad de unirse a SIRPα sin estimular la señalización de SIRPα.

En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del péptido señal puede estar sustituida con una secuencia de aminoácidos del péptido señal que se deriva de otro polipéptido (por ejemplo, una inmunoglobulina o CTLA4). Por ejemplo, a diferencia de CD47 de longitud completa, que es un polipéptido de la superficie celular que atraviesa la membrana celular externa, los polipéptidos de CD47 solubles se secretan; por consiguiente, un polinucleótido que codifica un polipéptido de CD47 soluble puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que está asociado con un polipéptido que normalmente se secreta de una célula.

En otras realizaciones, el polipéptido de CD47 soluble comprende un dominio extracelular de CD47 que carece del péptido señal. En una realización ejemplar, el dominio extracelular de CD47 que carece del péptido señal tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 1 (124 aminoácidos). Como se describe en la presente, los péptidos señal no están expuestos en la superficie celular de una proteína secretada o transmembrana ya que el péptido señal se escinde durante la translocación de la proteína o el péptido señal permanece anclado en la membrana celular externa (a dicho péptido también se le denomina señal de anclaje). Se cree que la secuencia del péptido señal de CD47 se escinde del polipéptido de CD47 precursor in vivo.

En otras realizaciones, un polipéptido de CD47 soluble comprende una variante del dominio extracelular de CD47. Dicho polipéptido de CD47 soluble retiene la capacidad de unirse a SIRPα sin estimular la señalización de SIRPα. La variante del dominio extracelular de CD47 puede tener una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 65%-75%, 75%-80%, 80-85%, 85%-90% o 95%-99% idéntica (que incluye cualquier porcentaje de identidad entre cualquiera de los intervalos descritos) a la SEQ ID NO: 1.

*Inmunidad innata.* El sistema inmune innato es una respuesta celular primitiva que proporciona una defensa de las células contra antígenos patógenos. El reconocimiento de estos antígenos por el sistema inmune innato puede dar como resultado una respuesta inflamatoria caracterizada por la producción de citoquinas como TNF, IL-1, IL-6 e IL-8; así como la activación génica de ICAM-1 y E-selectina, entre otros.

Las amplias clases de patógenos, por ejemplo, virus, bacterias y hongos, pueden expresar constitutivamente un conjunto de moléculas resistentes a las mutaciones específicas de la clase denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Estos marcadores moleculares microbianos pueden estar compuestos de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y/o combinaciones de los mismos, y pueden estar localizados interna o externamente. Los ejemplos incluyen lipopolisacárido de endotoxina (LPS), ARN de cadena sencilla o doble, y similares.

Típicamente, los receptores PAMP (PRR) no son clonales, es decir, se expresan en todas las células de un tipo dado, y están codificados en la línea germinal, o son independientes de la memoria inmunológica. Una vez unidos, los PRR tienden a agruparse, reclutar otras proteínas extracelulares e intracelulares para el complejo, e iniciar cascadas de señalización que finalmente afectan a la transcripción. Además, los PRR están involucrados en la activación de funciones del complemento, coagulación, fagocitosis, inflamación y apoptosis en respuesta a la

detección de patógenos. Existen varios tipos de PRR, incluyendo los receptores del complemento, glucano, manosa, captador y tipo toll, cada uno con ligandos, patrones de expresión, vías de señalización y respuestas antipatógenas específicos de PAMP.

Los receptores tipo Toll son PRR transmembrana (TM) tipo I que poseen un número variable de motivos de repetición rica en leucina N-terminal extracelular (LRR), seguidos por una región rica en cisteína, un dominio TM y un motivo intracelular Toll/IL-1 R (TIR). El dominio LLR es importante para la unión del ligando y la señalización asociada y es una característica común de los PRR. El dominio de TIR es importante en las interacciones proteína-proteína y está típicamente asociado con la inmunidad innata. El dominio de TIR también une una superfamilia IL-1 R/TLR más grande que está compuesta por tres subgrupos. La familia TLR humana está compuesta por al menos 10 miembros, TLR1 a 10. Cada TLR es específico en sus patrones de expresión y sensibilidades a PAMP.

*El receptor 3 tipo Toll (TLR3)* reconoce el ARN de cadena doble (ARNdc) y miméticos del mismo, un patrón molecular asociado con la infección viral. Mapea el cromosoma 4q35 y su secuencia codifica una posible proteína 904 aa con 24 LRR N-terminales y un peso molecular calculado de 97 kDa. El TLR3 está más estrechamente relacionado con TLR5, TLR7 y TLR8, cada uno con un 26% de identidad de secuencia aa total. El ARNm de TLR3 se eleva después de la exposición a bacterias Gram-negativas y en mayor medida en respuesta a bacterias Gram-positivas.

El TLR3 reconoce específicamente el ARN de cadena doble (ARNdc) e induce múltiples eventos intracelulares responsables de la inmunidad antiviral innata contra una serie de infecciones virales. La proteína de TLR3 de 904 aminoácidos prevista contiene los motivos de Toll característicos: un dominio de repetición rico en leucina extracelular (LRR) y una región similar al receptor 1 de interleucina citoplasmática.

La exposición al ARN de cadena doble (ARNdc) o al ácido poliinosina-policitidílico (poli (I:C)), un análogo sintético de ARNdc, induce la producción de interferón α y β y mediante la señalización a través de TLR3 activa NFκB. IRF3 es inducido específicamente por la estimulación de TLR3 o TLR4, que media un programa genético específico responsable de respuestas antivirales innatas. El TRIF es necesario para la activación de NFKB dependiente de TLR3. Sirve como una proteína adaptadora que enlaza RIP1 y TLR3 para mediar la activación de NFKB inducida por TLR3.

*El receptor 4 tipo Toll* es una proteína que en los humanos está codificada por el gen de *TLR4*. Detecta lipopolisacárido de bacterias Gram negativas y es por tanto importante en la activación del sistema inmune innato. Este receptor se expresa más abundantemente en la placenta y en la subpoblación mielomonocítica de los leucocitos. Se puede acceder al gen de TLR4 humano en el Genbank NM_003266.3 y a la proteína se puede acceder en el Genbank NP_003257.1.

La activación de TLR4 lleva a la liberación en sentido descendente de moduladores inflamatorios que incluyen TNF-α e Interleucina-1. Los agonistas incluyen morfina, oxicodona, fentanilo, metadona, lipopolisacáridos (LPS), carbamazepina, oxcarbazepina, etc.

*Agonista de TLR.* Los agonistas de TLR activan los TLR, incluyendo sin limitación, TLR3, TLR4 y RIG1. Los ejemplos de agonistas de TLR incluyen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y miméticos de los mismos. Estos marcadores moleculares microbianos pueden estar compuestos de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y/o combinaciones de los mismos, y pueden estar localizados interna o externamente, como se conoce en la técnica. Los ejemplos incluyen LPS, zimosano, peptidoglucanos, flagelina, agonista de TLR2 sintético Pam3cys, Pam3CSK4, MALP-2, Imiquimod, CpG ODN, y similares.

Los agonistas de TLR3 incluyen ARN de cadena doble; Poli(I:C), Poli(A.U), etc., donde tales ácidos nucleicos habitualmente tienen un tamaño de por lo menos aproximadamente 10 pb, por lo menos aproximadamente 20 pb, por lo menos aproximadamente 50 pb y pueden tener un peso molecular alto de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 kb, habitualmente no más de aproximadamente 50 a 100 kb. Los agonistas de TLR3 alternativos pueden unirse directamente a la proteína, por ejemplo, anticuerpos o moléculas pequeñas que se unen selectivamente y activan TLR3. Otros agonistas de TLR3 incluyen retrovirus, por ejemplo, un retrovirus diseñado para carecer de la capacidad de integrarse en el genoma.

La dosis de agonista que es eficaz en los métodos de la invención es una dosis que aumenta la expresión de CRT en una célula fagocítica o población celular, con respecto a la misma población en ausencia del agonista de TLR.

Por ejemplo, cuando el agonista de TLR es poli I:C o un análogo del mismo, una dosis eficaz puede ser por lo menos aproximadamente 10 ng/ml, por lo menos aproximadamente 50 ng/ml, por lo menos aproximadamente 100 ng/ml, por lo menos aproximadamente 250 ng/ml, por lo menos aproximadamente 500 ng/ml. La dosis de un agonista de TLR que no sea poli I:C puede calcularse en base a la provisión de actividad equivalente a la dosis optimizada de poli I:C.

Los agonistas de TLR3, 4, 7/8 y 9 son de particular interés como agentes inmunoterapéuticos para tratar el cáncer. En el grupo se incluyen, sin limitación: 852A: imidazoquinolina sintética que simula ARNmc viral; VTX-2337: agonista selectivo de TLR8 de moléculas pequeñas que imita el ARNmc viral; BCG: Bacilo de Calmette-Guerin, Mycobacterium bovis; CpG ODN: oligodesoxinucleótido de CpG; Imiquimod: imidazoquinolina sintética que imita el ARNmc viral; LPS: lipopolisacárido; MPL: monofosforil lípido A; Poli I:C: ácido poliriboinosinico-poliribocitidílico; PolyICLC: Poli I:C-poli-I-lisina; Resiquimod: imidazoquinolina sintética que imita el ARNmc viral.

El imiquimod es una imidazoquinolina sintética que se dirige a TLR7. Un agonista de TLR7 de imidazoquinolina más nuevo, 852A, administrado parenteralmente en monoterapia, ha demostrado una eficacia clínica modesta con la estabilización de la enfermedad como monoterapia. El resiquimod es un agonista de TLR7/8 de imidazoquinolina en humanos.

Los CpG son oligodesoxinucleótidos de cadena sencilla (ODN), caracterizados por motivos que contienen citosinas y guaninas. En base a sus efectos inmunológicos, los ODN de CpG se dividen en tres clases diferentes: CpG-A, un potente estimulador de células NK debido a su efecto productor de IFN-α en los pDC; CpG-B, un inductor de IFN-α moderado, y potenciador de respuestas inmunes específicas de antígeno (regula por incremento las moléculas coestimuladoras sobre pDC y células B, induce la producción de citoquinas Th1 y estimula la presentación de antígenos por pDC); y CpG-C, que combina la capacidad estimuladora de tanto CpG-A como CpG-B. Se ha evaluado CpG 7909 (PF-3512676, un CpG tipo B y agonista de TLR9) en varios tipos de tumores incluyendo el carcinoma de células renales, glioblastoma, melanoma, linfoma cutáneo de células T y linfoma no de Hodgkin.

El ácido polirriboinosinico-poliribocitidílico (Poli I:C) es un análogo sintético del ARNdc viral que estimula el gen 5 asociado a la diferenciación endosómico (TLR3) y/o melanoma citosólico (*MDA5*), lo que lleva a una producción aumentada de IFN de tipo I.

Las moléculas de lípido A que se dirigen al complejo TLR4 incluyen monofosforil lípido A (MPL), un derivado del lípido A de *Salmonella minnesota.*

La tirosina quinasa de Bruton (Btk) contiene un dominio de PH que se une al fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). La unión de PIP3 induce a Btk para que fosforile fosfolipasa C, que a su vez hidroliza PIP2, un fosfatidilinositol, en dos segundos mensajeros, inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), que luego modulan la actividad de las proteínas en sentido descendente durante la señalización de células B. Las mutaciones en el gen BTK están implicadas en la agammaglobulinemia ligada a X de la enfermedad de inmunodeficiencia primaria (agammaglobulinemia de Bruton). Los pacientes con XLA tienen poblaciones normales de células pre-B en su médula ósea, pero estas células no maduran ni entran en la circulación. El ibrutinib (PCI-32765), es un inhibidor selectivo de la tirosina quinasa de Bruton.

El ibrutinib (1-[(3R)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]prop-2-en-1-ona) es un inhibidor específico de Btk. En los métodos divulgados en la presente, puede administrarse, por ejemplo, en una forma de dosificación oral, a una dosis de aproximadamente 10 mg/día, aproximadamente 50 mg/día, aproximadamente 100 mg/día, aproximadamente 250 mg/día, aproximadamente 350 mg/día, aproximadamente 420 mg/día, aproximadamente 500 mg/día, aproximadamente 600 mg/día y no más de aproximadamente 1000 mg/día. La administración puede continuarse hasta una toxicidad inaceptable o progresión de la enfermedad.

*Célula presentadora de antígeno fagocítico.* Los términos "células fagocíticas" y "fagocitos" se usan indistintamente en la presente para referirse a una célula que es capaz de fagocitosis, es decir, que engloba una masa particulada grande, por ejemplo de aproximadamente 0,1 µm de diámetro hasta aproximadamente 2 mm o aproximadamente 1 mm de diámetro; de aproximadamente 0,5 µm de diámetro a aproximadamente 1 mm de diámetro, etc., incluyendo particularmente hasta el tamaño de una célula de mamífero, por ejemplo, una célula tumoral. La fagocitosis en este contexto se define por la envoltura de células, patógenos y varias partículas rodeándola con la membrana celular efectora.

Hay varias categorías de fagocitos: macrófagos; células mononucleares (histiocitos y monocitos); leucocitos polimorfonucleares; (neutrófilos) y células dendríticas. Los macrófagos son de particular interés. Las respuestas celulares asociadas a la fagocitosis incluyen respuestas inmunomoduladoras como la generación y liberación de mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios, y también respuestas celulares de naturaleza destructiva como el estallido respiratorio, y la liberación de moléculas tóxicas y microbicidas por desgranulación. Los fagocitos profesionales son capaces de reconocer una amplia variedad de objetivos fagocíticos, y de ingerirlos a una velocidad mayor que las células no fagocíticas.

Los neutrófilos y los macrófagos son representativos de fagocitos completamente diferenciados. Mientras que los neutrófilos que salen de la médula ósea están completamente diferenciados, los macrófagos se diferencian de los monocitos circulantes en los tejidos extravasculares. Los monocitos muestran una respuesta fagocítica más baja, en comparación con los neutrófilos y los macrófagos, y deben responder a las señales de activación y diferenciación para lograr una capacidad fagocítica óptima. El proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos

ha sido bien caracterizado y puede realizarse *in vitro* o *in vivo.*

Una "dosis terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéutica" es una cantidad suficiente para lograr los resultados clínicos deseados (es decir, lograr la eficacia terapéutica). Para algunos propósitos en la presente invención, una dosis eficaz de un agente anti-CD47 es la dosis que aumenta la fagocitosis en por lo menos aproximadamente un 10%, por lo menos aproximadamente un 20%, por lo menos aproximadamente un 50%, por lo menos aproximadamente un 75%, por lo menos aproximadamente un 100%, hasta 2 veces, 3 veces o más.

Para los propósitos de esta invención, una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47 es una cantidad que es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, prevenir, ralentizar o retrasar la progresión del estado de la enfermedad (por ejemplo, cáncer o infección crónica) aumentando la muerte mediada por macrófagos de una célula objetivo. Por tanto, una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47 puede disminuir la población de células objetivo a través de una respuesta inmune in vivo en por lo menos aproximadamente un 10%, por lo menos aproximadamente un 20%, por lo menos aproximadamente un 50%, por lo menos aproximadamente un 75%, por lo menos aproximadamente un 90% o más, con respecto al efecto en ausencia de administración a una población cargada de phAPC.

Síndromes mielodisplásicos. Los síndromes mielodisplásicos (también conocidos como MDS o mielodisplasia) son afecciones médicas hematológicas (es decir, relacionadas con la sangre) con desarrollo ineficaz (o "displasia") de las células sanguíneas. Los pacientes con MDS pueden desarrollar anemia grave y requieren transfusiones de sangre. En algunos casos, la enfermedad empeora y el paciente desarrolla citopenias (recuentos sanguíneos bajos) provocados por insuficiencia progresiva de la médula ósea. El pronóstico en MDS depende del tipo y la gravedad.

Como tipos de MDS que pueden tratarse se incluyen la anemia refractaria; anemia refractaria con sideroblastos en el anillo; anemia refractaria con exceso de blastos; citopenia refractaria con displasia multilinaje; citopenia refractaria con displasia unilinaje; síndrome mielodisplásico no clasificable; síndrome mielodisplásico asociado con una anomalía cromosómica del(5q) aislada; leucemia mielomonocítica crónica (CMML).

La anemia hemolítica autoinmune (AIHA) se define como una destrucción aumentada de los eritrocitos debido a la presencia de autoanticuerpos anti-eritrocitos (AEA) y puede clasificarse como autoinmune, aloinmune o inducida por fármacos, dependiendo del tipo de antígeno que origina la respuesta inmune. Se estima que la anemia hemolítica general tiene lugar en aproximadamente 4 casos por 1000 por año, pero para AIHA la incidencia anual se estima en aproximadamente 1-3 casos por 100.000 por año. La AIHA puede aparecer como una enfermedad primaria o, en aproximadamente el 20-80% de los casos, secundaria a otras enfermedades autoinmunes, enfermedades malignas linfoides, infecciones, inmunodeficiencias o tumores, donde las enfermedades malignas linfoides son las razones más comunes para la AIHA secundaria. Los AEA se clasifican como autoanticuerpos fríos o calientes, ya que reaccionan de manera óptima a temperaturas inferiores a 30º C o de 35º C a 40º C, respectivamente. Los AEA cálidos son en su mayoría IgG, pero algunas veces también están presentes IgA y/o IgM, y son responsables de aproximadamente el 50-70% de los casos de AIHA. La unión de AEA de IgG caliente a los eritrocitos no daña en sí misma los eritrocitos, ya que la IgG unida a los eritrocitos, al contrario que la IgM unida a la superficie, es un activador pobre de la vía clásica del complemento. En cambio, la IgG unida a la superficie es reconocida habitualmente por los receptores Fcγ de las células del sistema fagocítico monocito-macrófago, preferiblemente en el bazo y el hígado, lo que da como resultado la captación y destrucción de los eritrocitos opsonizados por IgG. Sin embargo, la eliminación de eritrocitos mediada por macrófagos en AIHA es probable que esté mediada por la actividad sinérgica de los receptores de complemento Fcγ y macrófagos (que reconocen los factores del complemento C3b y $C3b_i$), ya que los eritrocitos opsonizados con niveles muy bajos de IgG no se eliminan in vivo en ausencia del complemento. Además, los bajos niveles de opsonización del complemento no dan como resultado la fagocitosis de eritrocitos en ausencia de IgG, mientras que los bajos niveles de opsonización de tanto el complemento como de IgG pueden inducir una fagocitosis eritrocitaria eficiente tanto in vivo como in vitro.

La púrpura trombocitopénica inmune (PTI) es una enfermedad autoinmune caracterizada por recuentos de plaquetas bajos debido a la destrucción mediada por anticuerpos de plaquetas por los macrófagos. La PTI se clasifica como aguda o crónica, donde la PTI aguda tiene un inicio rápido con petequias y hematomas típicos, a menudo va precedida de una enfermedad infecciosa, afecta principalmente a niños pequeños, y normalmente se resuelve espontáneamente en el plazo de seis meses. La PTI crónica tiene a menudo un inicio en la edad adulta que es más insidiosa que la forma aguda y es aproximadamente dos o tres veces más común entre las mujeres que entre los hombres.

Una prueba positiva de autoanticuerpos antiplaquetarios se encuentra en aproximadamente el 70-80% de los adultos con PTI y en los niños con PTI crónica. Los autoanticuerpos plaquetarios son del tipo IgG y se dirigen principalmente a las glucoproteínas de la membrana de las plaquetas, incluyendo GPIIb/IIIa, GPIb-IX y GPIa-IIa. Las plaquetas recubiertas con autoanticuerpos IgG se someten a una depuración acelerada a través de la fagocitosis mediada por el receptor Fcγ por los macrófagos, preferiblemente en el bazo y el hígado. La mayoría de los pacientes tienen anticuerpos dirigidos a varias proteínas diferentes de la superficie de las plaquetas. Los adultos con

diagnóstico de PTI se tratan inicialmente de manera convencional con corticosteroides. La gammaglobulina intravenosa (IGIV) es otro enfoque común en el tratamiento de la PTI, particularmente para el tratamiento de hemorragias internas. La IVIG tiene efectos antiinflamatorios bien conocidos, generalmente atribuidos al dominio Fc de inmunoglobulina G (IgG), que se piensa que bloquea los receptores Fc pro-fagocíticos en los macrófagos.

Se pretende que el término "anticuerpo" o "fracción de anticuerpo" incluya cualquier estructura molecular que contenga cadenas de polipéptidos con una forma específica que se ajuste y reconozca un epítopo, donde una o más interacciones de unión no covalentes estabilizan el complejo entre la estructura molecular y el epítopo. Los anticuerpos utilizados en la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales, aunque se prefieren los anticuerpos monoclonales ya que pueden reproducirse mediante cultivo celular o recombinantemente, y pueden modificarse para reducir su antigenicidad.

La frase "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo sintético o recombinante que reconoce más de una proteína. Los ejemplos incluyen anticuerpos biespecíficos 2B1, 520C9xH22, mDX-H210 y MDX447. Los anticuerpos biespecíficos dirigidos contra una combinación de epítopos permitirán dirigirlos y/o el agotamiento de las poblaciones celulares que expresan la combinación de epítopos.

Los anticuerpos policlonales pueden producirse mediante un protocolo estándar inyectando a un animal de producción una composición antigénica. Ver, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Cuando se utiliza una proteína completa, o una sección más grande de la proteína, los anticuerpos pueden producirse inmunizando al animal de producción con la proteína y un adyuvante adecuado (por ejemplo, de Freund, completa de Freund, emulsiones aceite en agua, etc.). Cuando se usa un péptido más pequeño, es ventajoso conjugar el péptido con una molécula más grande para hacer un conjugado inmunoestimulador. Las proteínas conjugadas utilizadas comúnmente que están disponibles comercialmente para dicho uso incluyen la albúmina de suero bovino (BSA) y la hemocianina de lapa californiana (KLH). Para producir anticuerpos contra epítopos particulares, pueden utilizarse péptidos derivados de la secuencia completa. Alternativamente, para generar anticuerpos contra porciones de péptidos relativamente cortas de la proteína objetivo, puede producirse una respuesta inmune superior si el polipéptido se une a una proteína portadora, como ovoalbúmina, BSA o KLH.

Alternativamente, para anticuerpos monoclonales, pueden formarse hibridomas aislando las células inmunes estimuladas, como las del bazo del animal inoculado. Estas células luego se fusionan con células inmortalizadas, como células de mieloma o células transformadas, que son capaces de replicarse indefinidamente en cultivo celular, produciendo de este modo una línea celular secretora de inmunoglobulinas inmortal. Además, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden producirse mediante ingeniería genética. Para su uso en la presente invención se prefieren los anticuerpos humanizados, quiméricos o humanos xenogénicos, que producen menos de una respuesta inmune cuando se administran a humanos.

Para su uso en la invención se prefieren los anticuerpos que tienen una propensión reducida para inducir una respuesta inmune violenta o perjudicial en humanos (como un shock anafiláctico), y que también muestran una propensión reducida para cebar una respuesta inmune que evitaría la dosificación repetida con el agente terapéutico o de obtención de imágenes del anticuerpo. Estos anticuerpos se prefieren para todas las vías de administración. Por tanto, para su uso en la presente invención se prefieren los anticuerpos humanizados, quiméricos o humanos xenogénicos, que producen menos de una respuesta inmune cuando se administran a humanos.

Los anticuerpos quiméricos pueden prepararse mediante medios recombinantes combinando las regiones de cadena ligera y pesada variables murinas (VK y VH), obtenidas de un clon de hibridoma murino (u otro derivado de animal), con las regiones de cadena ligera y pesada constantes humanas, para producir un anticuerpo con dominios predominantemente humanos. La producción de tales anticuerpos quiméricos es bien conocida en la técnica, y puede lograrse mediante medios estándar (como se describe, por ejemplo, en la Patente de estados Unidos Nº 5.624.659). Los anticuerpos humanizados están diseñados para contener incluso más dominios de inmunoglobulina similares a los humanos, e incorporan solo las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo derivado de animal. Esto se logra examinando cuidadosamente la secuencia de los giros hipervariables de las regiones variables del anticuerpo monoclonal, y ajustándolos a la estructura de las cadenas de anticuerpos humanos. Aunque aparentemente complejo, el proceso es sencillo en la práctica. Ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 6.187.287. Alternativamente, pueden producirse anticuerpos de cadena sencilla (Fv, como se describe a continuación) a partir de bibliotecas de fagos que contienen regiones variables humanas. Ver Patente de Estados Unidos Nº 6.174.708.

Además de las inmunoglobulinas completas (o sus contrapartidas recombinantes), los fragmentos de inmunoglobulina que comprenden el sitio de unión al epítopo (por ejemplo, Fab', $F(ab')_2$ u otros fragmentos) son útiles como fracciones de anticuerpos en la presente invención. Tales fragmentos de anticuerpos pueden generarse a partir de inmunoglobulinas completas mediante la escisión de ficina, pepsina, papaína u otra proteasa. El "fragmento" o las inmunoglobulinas mínimas pueden diseñarse utilizando técnicas de inmunoglobulina recombinante. Por ejemplo, las inmunoglobulinas "Fv" para su uso en la presente invención pueden producirse enlazando una

región de cadena ligera variable con una región de cadena pesada variable mediante un conector peptídico (por ejemplo, poliglicina u otra secuencia que no forma una hélice alfa o motivo de lámina beta).

Los fragmentos Fv son heterodímeros del dominio de la cadena pesada variable ($V_H$) y el dominio de la cadena ligera variable ($V_L$). Los heterodímeros de los dominios de la cadena pesada y ligera que se producen en la IgG completa, por ejemplo, están conectados por un enlace disulfuro. Los Fv recombinantes en los que $V_H$ y $V_L$ están conectadas por un conector peptídico son típicamente estables, ver, por ejemplo, Huston et al., Proc. Natl. Acad, Sci. USA 85:5879-5883 (1988) y Bird et al., Science 242:423-426 (1988) Estos son Fv de cadena sencilla que se ha descubierto que retienen la especificidad y la afinidad y han demostrado ser útiles para obtener imágenes de tumores y para elaborar inmunotoxinas recombinantes para terapia tumoral. En la presente invención puede utilizarse cualquiera de estos anticuerpos mínimos, y para su uso en realizaciones de la invención se prefieren aquellos que se humanizan para evitar reacciones HAMA.

Además, pueden utilizarse inmunoglobulinas derivatizadas con conectores químicos añadidos, fracciones detectables, por ejemplo, colorantes fluorescentes, enzimas, radioisótopos, sustratos, fracciones quimioluminiscentes o fracciones de unión específicas, por ejemplo estreptavidina, avidina, biotina, etc., en los métodos y composiciones de los presente invención Por conveniencia, el término "anticuerpo" o "fracción de anticuerpo" se usará en todas partes para referirse de manera general a moléculas que se unen específicamente a un epítopo de la proteína objetivo, aunque el término abarcará todas las inmunoglobulinas, derivados, fragmentos, inmunoglobulinas recombinantes o modificadas genéticamente, e inmunoglobulinas modificadas, como se ha descrito anteriormente.

Pueden probarse los agentes de unión candidatos para su actividad mediante cualquier medio estándar adecuado. Como una primera selección, pueden probarse los anticuerpos para su unión contra el antígeno objetivo utilizado para producirlos. Como una segunda selección, los agentes candidatos pueden probarse para su unión a una célula apropiada, por ejemplo, células cancerosas, células hematopoyéticas, etc. Para estas selecciones, el anticuerpo candidato puede marcarse para detección (por ejemplo, con fluoresceína u otra fracción fluorescente, o con una enzima como la peroxidasa de rábano picante). Después de que se establece la unión selectiva con el objetivo, el agente candidato puede probarse para determinar la actividad apropiada (es decir, la capacidad de disminuir el crecimiento de células tumorales y/o ayudar a visualizar las células tumorales) en un modelo *in vivo*.

Por "manipulación de la fagocitosis" se entiende una regulación por incremento o una regulación por disminución en la fagocitosis en por lo menos aproximadamente un 10%, o hasta un 20%, o un 50%, o un 70% o un 80% o hasta aproximadamente el 90% en comparación con el nivel de fagocitosis observada en ausencia de intervención. Por tanto, en el contexto de disminuir la fagocitosis de las células hematopoyéticas circulantes, particularmente en un contexto de trasplante, la manipulación de la fagocitosis significa una regulación por disminución en la fagocitosis en por lo menos aproximadamente un 10%, o hasta un 20%, o un 50%, o un 70% u un 80% o hasta aproximadamente un 90% en comparación con el nivel de fagocitosis observado en ausencia de intervención.

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

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

Los términos "cáncer", "neoplasia" y "tumor" se usan indistintamente en la presente para referirse a células que muestran un crecimiento autónomo y no regulado, de tal manera que muestran un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control sobre la proliferación celular. Las células de interés para detección, análisis o tratamiento en la presente solicitud incluyen células precancerosas (por ejemplo, benignas), malignas, premetastásicas, metastásicas y no metastásicas. Se conocen cánceres de prácticamente cada tejido. La frase "carga de cáncer" se refiere a la cantidad de células cancerosas o el volumen de cáncer en un sujeto. Por consiguiente, reducir la carga de cáncer se refiere a reducir el número de células cancerosas o el volumen de cáncer en un sujeto. El término "célula cancerosa" como se usa en la presente se refiere a cualquier célula que es una célula cancerosa o se deriva de una célula cancerosa, por ejemplo, un clon de una célula cancerosa. Los expertos en la técnica conocen muchos tipos de cánceres, incluyendo los tumores sólidos como carcinomas, sarcomas, glioblastomas, melanomas, linfomas, mielomas, etc., y cánceres circulantes como las leucemias. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no están limitados a, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer

de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de cerebro.

La "patología" del cáncer incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anormal o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de las células circundantes, liberación de citoquinas u otros productos secretores a niveles anormales, supresión o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, neoplasia, premalignidad, malignidad, invasión de tejidos u órganos circundantes o distantes, como los ganglios linfáticos, etc.

Como se usa en la presente, los términos "recurrencia del cáncer" y "recurrencia tumoral", y las variantes gramaticales de los mismos, se refieren al crecimiento adicional de células neoplásicas o cancerosas después del diagnóstico de cáncer. Particularmente, la recurrencia puede tener lugar cuando se produce un crecimiento de células cancerosas adicional en el tejido canceroso. La "diseminación tumoral", de manera similar, tiene lugar cuando las células de un tumor se diseminan en tejidos y órganos locales o distantes; por lo tanto, la diseminación tumoral abarca metástasis tumorales. La "invasión tumoral" tiene lugar cuando el crecimiento tumoral se disemina localmente para comprometer la función de los tejidos involucrados por compresión, destrucción o prevención de la función normal de los órganos.

Como se usa en la presente, el término "metástasis" se refiere al crecimiento de un tumor canceroso en un órgano o parte del cuerpo, que no está directamente conectado con el órgano del tumor canceroso original. Se entenderá que la metástasis incluye micrometástasis, que es la presencia de una cantidad indetectable de células cancerosas en un órgano o parte del cuerpo que no está directamente conectado con el órgano del tumor canceroso original. La metástasis también puede definirse como varios pasos de un proceso, como la salida de las células cancerosas del sitio original del tumor y la migración y/o invasión de las células cancerosas a otras partes del cuerpo.

Los términos "tratamiento", "tratado", "tratar" y similares se usan en la presente para referirse de manera general a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una estabilización o cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento" tal como se usa en la presente cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un humano, e incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad o síntoma en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o síntoma pero al que aún no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir el síntoma de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar el síntoma de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o síntoma.

Los términos "receptor", "individuo", "sujeto", "huésped" y "paciente", se usan indistintamente en la presente y se refieren a cualquier sujeto mamífero para el que se desea diagnóstico, tratamiento o terapia, particularmente humanos.

Una "célula huésped", como se usa en la presente, se refiere a un microorganismo o una célula eucariota o línea celular cultivada como una entidad unicelular que puede usarse, o se ha usado, como un receptor para un vector recombinante u otros polinucleótidos de transferencia, e incluye el progenie de la célula original que ha sido transfectada. Se entiende que la progenie de una sola célula puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en el complemento genómico o de ADN como el progenitor original, debido a una mutación natural, accidental o deliberada.

"Objetivo terapéutico" se refiere a un gen o producto génico que, tras la modulación de su actividad (por ejemplo, mediante la modulación de la expresión, la actividad biológica y similares), puede proporcionar la modulación del fenotipo canceroso. Como se usa en todas partes, se pretende que "modulación" se refiera a un aumento o una disminución en el fenómeno indicado (por ejemplo, la modulación de una actividad biológica se refiere a un aumento en una actividad biológica o una disminución en una actividad biológica).

"Reducir el crecimiento de células cancerosas" incluye, pero no está limitado a, reducir la proliferación de células cancerosas, y reducir la incidencia de que una célula no cancerosa se convierta en una célula cancerosa. Se puede determinar fácilmente si se ha logrado una reducción en el crecimiento de células cancerosas usando cualquier ensayo conocido incluyendo, pero no limitado a, la incorporación de [$^3$H]-timidina; contar el número de células durante un período de tiempo; detectar y/o medir un marcador asociado con el cáncer, etc.

Se puede evaluar si una sustancia, o una cantidad específica de la sustancia, es eficaz en el tratamiento del cáncer usando cualquiera de una variedad de ensayos de diagnóstico conocidos para el cáncer incluyen, pero no limitados a, biopsia, estudios radiográficos de contraste, tomografía axial computarizada y detección de un marcador tumoral asociado con cáncer en la sangre del individuo. La sustancia puede administrarse sistémicamente o localmente, habitualmente sistémicamente.

En ciertas realizaciones, puede usarse un anticuerpo biespecífico. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico en el que un dominio de unión al antígeno se dirige contra CTR y el otro dominio de unión al antígeno se dirige contra un marcador de células cancerosas como CD47, EGFR; HER2; CD96, CD97, CD99, PTHR2, HAVCR2, etc.

Para la administración, los agentes activos se mezclarán, antes de la administración, con una sustancia portadora no tóxica farmacéuticamente aceptable. Habitualmente, esta será una solución acuosa, como solución salina normal o solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución de Ringer, solución de lactato-Ringer o cualquier solución isotónica fisiológicamente aceptable para la administración por los medios elegidos. Preferiblemente, la solución es estéril y libre de pirógenos, y se fabrica y envasa bajo los Good Manufacturing Processes (GMPs) actuales, aprobados por la FDA. El practicante clínico con experiencia en la técnica está familiarizado con los intervalos apropiados de pH, tonicidad y aditivos o conservantes cuando formula composiciones farmacéuticas para administración por inyección intravascular, inyección intratecal, inyección en el líquido cefalorraquídeo, inyección directa en el tumor, o por otras vías. Además de aditivos para ajustar el pH o la tonicidad, los anticuerpos-agentes terapéuticos y los anticuerpos-agentes de obtención de imágenes pueden estabilizarse contra la agregación y la polimerización con aminoácidos y detergentes no iónicos, polisorbato y polietilenglicol. Opcionalmente, los estabilizadores adicionales pueden incluir varios carbohidratos y sales fisiológicamente aceptables. También, puede añadirse polivinilpirrolidona además del aminoácido. Las soluciones de inmunoglobulina terapéuticas adecuadas que se estabilizan para el almacenamiento y la administración a humanos se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 5.945.098. A la composición terapéutica o de obtención de imágenes pueden añadirse otros agentes, como albúmina de suero humano (HSA), para estabilizar los conjugados de anticuerpos.

Las composiciones de la invención pueden administrarse usando cualquier procedimiento médicamente apropiado, por ejemplo, administración intravascular (intravenosa, intraarterial, intracapilar), inyección en el líquido cefalorraquídeo, intracavidad, subcutáneamente, o inyección directa en el tumor. Para las composiciones de obtención de imágenes de la invención, se prefiere la administración por inyección intravascular para la visualización preoperatoria del tumor.

La cantidad eficaz de los agentes activos que se administrarán a un paciente en particular dependerá de una variedad de factores, varios de los cuales serán diferentes de un paciente a otro. Un practicante clínico competente será capaz de determinar una cantidad eficaz a administrar a un paciente para retrasar el crecimiento y promover la muerte de las células tumorales, o una cantidad eficaz de una composición de obtención de imágenes a administrar a un paciente para el tratamiento del síndrome mielodisplásico. La dosificación dependerá del tratamiento del tumor, la vía de administración, la naturaleza de los agentes terapéuticos, la sensibilidad del tumor a los agentes terapéuticos, etc. Utilizando los datos de animales de $LD_{50}$ y otra información disponible para los agentes, un practicante clínico puede determinar la dosis máxima segura para un individuo, dependiendo de la vía de administración. Por ejemplo, una dosis administrada por vía intravenosa puede ser más que una dosis administrada por vía intratecal, dado el mayor cuerpo de fluido en el que se está administrando la composición terapéutica. De manera similar, las composiciones que se depuran rápidamente del cuerpo pueden administrarse a dosis más altas, o en dosis repetidas, para mantener una concentración terapéutica. Las fracciones de obtención de imágenes son típicamente menos tóxicas que las fracciones citotóxicas y pueden administrarse a dosis más altas en algunas realizaciones. Utilizando el conocimiento ordinario, el practicante clínico competente será capaz de optimizar la dosificación de una composición terapéutica particular en el curso de ensayos clínicos rutinarios.

Típicamente, la dosificación será de 0,001 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal del sujeto. Los agentes pueden administrarse al sujeto en una serie de más de una administración. Para composiciones terapéuticas, a veces se requerirá la administración periódica regular (por ejemplo, cada 2-3 días), o puede ser deseable para reducir la toxicidad. Para las composiciones terapéuticas que se utilizarán en regímenes de dosis repetidas, se prefieren agentes que no provocan HAMA u otras respuestas inmunes.

Métodos de uso

En la presente se divulgan métodos para el tratamiento del cáncer. Se proporciona un activador de la señalización de TLR o un agonista de BTK en combinación con el bloqueo de CD47, donde se aumenta la eliminación de las células cancerosas con respecto a la eliminación de células en presencia de cualquiera de los agentes como una monoterapia. En algunas realizaciones, una población de células que comprende macrófagos se pone en contacto *in vitro* o *in vivo* con una dosis de un agonista de TLR o un agonista de BTK que es eficaz para aumentar la CRT en la superficie celular del macrófago en por lo menos aproximadamente un 25%, por lo menos aproximadamente un 50%, por lo menos aproximadamente un 75%, y puede aumentar la expresión 2 veces, 3 veces, 5 veces o más, con respecto a una célula no estimulada. El nivel de fagocitosis en una célula tratada de este modo puede ser por lo menos aproximadamente del 25%, por lo menos aproximadamente del 50%, por lo menos aproximadamente del 75%, y puede aumentar la fagocitosis 2 veces, 3 veces, 5 veces o más, con respecto a una célula no estimulada. En presencia de un agente que bloquea la interacción de CD47 con SIRPα, el aumento incremental de la fagocitosis para una célula tratada con una dosis eficaz de un agonista de TLR o un agonista de BTK puede ser por lo menos aproximadamente del 25%, por lo menos aproximadamente del 50%, por lo menos aproximadamente del 75%, y puede aumentar la fagocitosis 2 veces, 3 veces, 5 veces o más, con respecto a una

célula tratada con un agonista de TLR en ausencia de bloqueo de CD47.

Para el tratamiento *in vivo*, puede administrarse un agonista de TLR o un agonista de BTK en una dosis eficaz y durante un período de tiempo suficiente para aumentar la PrCr en el receptor, por ejemplo, como se determina por la fagocitosis de las células tumorales por las células fagocíticas. El agonista de TLR o un agonista de BTK puede coadministrarse o administrarse concurrentemente con una dosis eficaz de un agente que bloquea la interacción de CD47 con SIPα. El agonista de TLR o un agonista de BTK puede coadministrarse o administrarse concurrentemente con un agente que se dirige específicamente a una célula cancerosa, por ejemplo, un anticuerpo dirigido a un objetivo selectivo de tumor.

Las células fagocíticas que se han tratado *in vitro* con un agonista de TLR o un agonista de BTK pueden administrarse a un individuo para el tratamiento del cáncer, donde las células se administran sistémicamente o localmente, por ejemplo, en un sitio tumoral. Las células pueden coadministrarse o administrarse concurrentemente con una dosis eficaz de un agente que bloquea la interacción de CD47 con SIPα. Las células pueden ponerse en contacto con una célula tumoral o antígeno de células tumorales *in vitro* antes de la administración. Las células pueden coadministrarse o administrarse concurrentemente con un agente que se dirige específicamente a una célula cancerosa, por ejemplo, un anticuerpo dirigido a un objetivo selectivo de tumor.

La capacidad fagocítica de un fagocito, por ejemplo, un macrófago, puede determinarse midiendo la expresión de CRT en la superficie celular, donde un aumento en CRT corresponde a un aumento en la capacidad fagocítica. En algunas realizaciones, se mide la expresión de calreticulina en una superficie celular de macrófagos incluyendo, sin limitación, poner en contacto la célula con un anticuerpo específico para CRT y determinar la cantidad de anticuerpo que está unido, por ejemplo, mediante citometría de flujo, ELISA, inmunohistoquímica y similares como se conoce en la técnica. En algunas de tales realizaciones, el paso de medición se realiza después de tratar las células con un agonista de TLR in vitro. En algunas realizaciones, la medición se compara con un nivel predeterminado, o una célula de control que no está tratada con un agonista de TLR. En algunas realizaciones, las células que tienen un nivel predeterminado de CRT se administran a un individuo para el tratamiento del cáncer, donde las células se administran sistémicamente o localmente, por ejemplo, a un sitio tumoral.

En otras realizaciones de la divulgación, se proporciona un inhibidor de BTK, que incluye, sin limitación, ibrutinib, en una dosis terapéutica a un individuo que padece de PrCR excesivo o de otra forma indeseable incluyendo, sin limitación, un individuo que padece síndrome mielodisplásico (MDS), anemia hemolítica autoinmune (AIHA), púrpura trombocitopénica inmune (PTI), etc. La dosis de inhibidor de BTK es suficiente para regular por disminución la expresión de CRT en células fagocíticas, por ejemplo, disminuir por lo menos aproximadamente un 25%, por lo menos aproximadamente un 50%, por lo menos aproximadamente un 75%, y puede disminuir la expresión 2 veces, 3 veces, 5 veces o más, con respecto a una célula no estimulada. El nivel de fagocitosis en una célula así tratada puede reducirse por lo menos aproximadamente un 25%, por lo menos aproximadamente un 50%, por lo menos aproximadamente un 75%, y puede disminuir la fagocitosis 2 veces, 3 veces, 5 veces o más, con respecto a una célula no estimulada.

EJEMPLO 1

Los macrófagos comen células cancerosas usando su propia calreticulina como guía: roles de TLR y BTK

La eliminación celular programada mediada por macrófagos (PrCR) es un mecanismo importante para eliminar células enfermas y dañadas antes de la muerte celular programada. La inducción de PrCR mediante señales de "cómeme" en las células tumorales se contrarresta con señales de "no me comas", como CD47, que une la proteína α reguladora de la señal de macrófagos (SIRPα) para inhibir la fagocitosis. El bloqueo de CD47 en las células tumorales lleva a la fagocitosis por los macrófagos. Aquí demostramos que la activación de las vías de señalización del receptor tipo toll (TLR) en los macrófagos hace sinergia con el bloqueo de CD47 en las células tumorales para mejorar la PrCR. La tirosina quinasa de Bruton (BTK) media la señalización de TLR en los macrófagos. La calreticulina, mostrada anteriormente como una señal de "cómeme" en las células cancerosas, se activa en los macrófagos para la secreción y la exposición de la superficie celular por TLR y Btk, para dirigirse a células cancerosas objetivo para fagocitosis, incluso si las células cancerosas no expresan ellas mismas calrecutilia.

La eliminación celular programada (PrCR) es un proceso de inmunovigilancia mediada por macrófagos mediante el cual las células objetivo se reconocen y fagocitan. La PrCR se conocía anteriormente como un paso clave concurrente con la muerte celular programada para la depuración de las células apoptóticas, pero cuando se bloquea la apoptosis, se produce la PrCR de los neutrófilos que viven (debido a la expresión forzada de bcl2) precisamente al mismo tiempo que la PrCR elimina neutrófilos de tipo salvaje que están muriendo. Recientemente se ha revelado un papel para la PrCR en la eliminación de células tumorales vivas. Varios estudios han indicado una función crucial de CD47 como señal anti-fagocítica "no me comas" que domina sobre PrCR. Durante el desarrollo del cáncer, las células tumorales regulan por incremento CD47, lo que las protege de la PrCR. El bloqueo de la interacción entre CD47 en las células objetivo y su receptor, la proteína α reguladora de señales (SIRPα), en macrófagos provoca una PrCR eficiente de las células cancerosas, pero no en la mayoría de células normales *in*

*vitro* e *in vivo* (Fig. 1A). Cuando se bloquea CD47, las células cancerosas, pero no las células normales, se fagocitan porque las señales pro-fagocíticas de "cómeme", como la calreticulina (CRT) se expresan comúnmente en muchas leucemias, linfomas y tumores sólidos (Fig. 1A)

La calreticulina es normalmente una proteína del retículo endoplásmico (ER) que posee secuencias KDEL de retención de ER, pero puede liberarse a la superficie celular en muchos casos de daño celular por fármacos citotóxicos o inflamación y es reconocida por los macrófagos LRP1/CD91 durante la fagocitosis de células apoptóticas. La tirosina quinasa de Bruton (Btk) es un miembro de la familia de tirosinas quinasas de la proteína no receptora Tec, que desempeña un papel crucial en la regulación de la respuesta inmune innata. Un defecto de Btk lleva a inmunodeficiencias incluyendo hipo- o agammaglobulinemia ligada a X, presumiblemente debido al bloqueo del desarrollo de células B, y quizás también relacionado con la depuración ineficiente de células de linaje B defectuosas. Hasta ahora, sin embargo, se sabe poco respecto a los mecanismos moleculares por los cuales los macrófagos reconocen y fagocitan las células cancerosas vivas. Demostramos aquí que los macrófagos expresan calreticulina, y la señalización del receptor tipo Toll (TLR) a través de Btk da como resultado su tráfico a la superficie celular, donde puede usarse para mediar la PrCR de células tumorales apropiadas.

Realizamos ensayos de fagocitosis cocultivando macrófagos derivados de la médula ósea de ratón (BM-DM) y células cancerosas humanas objetivo para examinar la eficacia de PrCR bajo diferentes condiciones. Para inducir la fagocitosis, bloqueamos CD47 en una línea celular de cáncer de colon humano (SW620) o mediante el tratamiento de células tumorales con anticuerpos de bloqueo CD47 o directamente eliminándolo. La fagocitosis aumentó significativamente al eliminar la señal autoprotectora CD47 ($SW620^{CD47KO}$; Fig. 5, *AB*), como resultado de un desequilibrio de las vías "cómeme" sobre "no me comas" (Fig. 1*A*). El tratamiento de las células $SW620^{WT}$ con anticuerpo anti-CD47 provocó una fagocitosis más fuerte que se revirtió por los bloqueadores del receptor Fc al mismo nivel que las células $SW620^{CD47KO}$, lo que sugiere que la fagocitosis inducida por el anticuerpo anti-CD47 de las células cancerosas SW620 por ambos bloqueos de las interacciones de CD47-SIRPα (independientes de Fc) y con mecanismos dependientes de Fc (Figura 1*A*).

Para comprender los mecanismos moleculares de PrCR, realizamos experimentos de selección para identificar vías de señalización que regulan la capacidad fagocítica de los macrófagos. La señalización de TLR desempeña un papel crucial en la respuesta inmune innata contra los patógenos, y los agonistas de TLR se enumeran como agentes inmunoterapéuticos con potencial anti-canceroso. Sin embargo, el papel de la señalización de TLR en PrCR de células cancerosas vivas permanece sin explorar. Por tanto, pretratamos las BMDM con varios agonistas de TLR y luego analizamos su capacidad fagocitótica contra las células cancerosas. Descubrimos que la activación de múltiples TLR aumentó significativamente la fagocitosis de las células cancerosas (Fig. 1*B*). Luego nos centramos en los agonistas de TLR que fueron más eficaces para mejorar la fagocitosis, evaluando sus efectos en una gama más amplia de macrófagos y células tumorales. Demostramos que el tratamiento de los macrófagos con agonistas de TLR3, 4 y 7 (es decir, ácido polinosínico-policitidílico de alto peso molecular (Poli (I:C) HMW), lipopolisacárido (LPS) e imiquimod) mejoraron dramáticamente su fagocitosis de múltiples células tumorales hematopoyéticas y sólidas (Fig. 6*A-C* y 7 *A-D*). La evaluación posterior en ratones que carecen de células T-, B- y NK, mostró que estos agonistas de TLR mejoraron significativamente la eficacia del anticuerpo de bloqueo de CD47 para bloquear el crecimiento tumoral *in vivo* (Fig. 8, *A-B*).

Para comprender mejor el mecanismo por el cual la activación de la señalización de TLR en los macrófagos promovió la fagocitosis de las células tumorales, tratamos los macrófagos combinando agonistas de TLR con varios inhibidores dirigidos a moléculas clave que regulan positivamente (MAPK, Btk) o negativamente (PI3K, Caspasa-1) la señalización de TLR. Los bloqueadores de MAPK, PI3K y Caspasa-1 no mostraron ningún efecto sobre la fagocitosis de las células cancerosas. Por el contrario, el ibrutinib - un bloqueador específico de la tirosina quinasa de Bruton (Btk), una tirosina quinasa expresada en el sistema hematopoyético (Fig. 9), atenuó significativamente la fagocitosis inducida por agonistas de TLR (Fig. 2*A*) El tratamiento de macrófagos con Poli (I:C) HMW, LPS o imiquimod estimuló Btk para que fosforilara, y este efecto fue contrarrestado por ibrutinib, lo que dio como resultado la fosforilación basal de Btk (Fig. 2*B*). En particular, la fagocitosis de nivel basal de las células cancerosas estaba regulada por la vía de Btk, e ibrutinib mostró un efecto inhibidor sobre la fagocitosis dependiente e independiente de Fc (Fig. 10*A*). En resumen, Btk es un efector crucial a través del cual los TLR median la fagocitosis de las células tumorales. Curiosamente, la estimulación y la inhibición de Btk mostraron efectos temporales diferenciales sobre la fagocitosis. La capacidad fagocítica máxima de los macrófagos se logró con 16 h de activación de Btk (Fig. 2*C*); por el contrario, el bloqueo de Btk mostró un efecto rápido y alcanzó la inhibición máxima en el plazo de 1 hora (Fig. 2*D*).

Tras la activación, Btk fosforila factores de transcripción como TFII-I y STAT5A en el núcleo y PLCγ2 en la membrana plasmática. Estudios recientes identificaron la CRT como un sustrato fosforilado por Btk cuando TLR7 se activó en el reconocimiento de células apoptóticas. La fosforilación de CRT por Btk en macrófagos fue importante para el tráfico de CRT a la superficie celular para funcionar como una molécula puente en el complejo CRT/CD91/C1q, que inicia la fagocitosis de las células apoptóticas. Para investigar si la CRT es el efector crítico en sentido descendente de la vía TLR-Btk para mediar la PrCR de las células tumorales, examinamos luego la expresión y función de la CRT en los macrófagos. Descubrimos que la CRT se expresaba en la superficie de los macrófagos, y su exposición en la superficie celular estaba regulada por el estado de activación de Btk (Fig. 3, *A-B,*

Fig. S6*B*). El anticuerpo de CRT inhibió significativamente la fagocitosis de las células SW620 por los BMDM de ratón o los macrófagos derivados de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) (Fig. 3*C* y Fig. 10*C-D*), mientras que la sobreexpresión de CRT en una línea celular de monocitos/macrófagos de ratón J774 condujo a una fagocitosis mejorada (Fig. 3*D*). Además, confirmamos la fosforilación de CRT tras la activación de Btk, que alcanzó el nivel máximo después de 30 minutos de tratamiento con imiquimod de los macrófagos (Fig. 10*E*) Estos resultados sugieren que la CRT es un componente esencial regulado por la vía TLR-Btk para mediar la fagocitosis de las células cancerosas vivas.

Además diseccionamos el papel de la CRT en la mediación de PrCR de células cancerosas. Estudios anteriores demostraron la expresión en la superficie celular de CRT en células apoptóticas y múltiples células de cáncer humano viables (Fig. 11, *B-D*). Por tanto, examinamos si la CRT desempeñó un papel crítico en la mediación de la fagocitosis de las células cancerosas tanto en los macrófagos como en las células tumorales objetivo (Fig. 4*A*) Curiosamente, el bloqueo de la CRT en los macrófagos disminuyó la fagocitosis, pero el bloqueo de la CRT en las células cancerosas no mostró ningún efecto, lo que sugiere un papel específico de la CRT en los macrófagos para mediar la fagocitosis (Fig. 4*A*). De manera importante, la expresión de la CRT en la superficie celular fue mejorada por los agonistas de TLR en los macrófagos pero no en las células cancerosas, que carecen de Btk (Fig. 11, *A-D*), que indica mecanismos distintos que regulan la exposición a CRT. Luego, examinamos las subpoblaciones de macrófagos con diferentes niveles de CRT de superficie celular y descubrimos que los macrófagos con una CRT de superficie más alta mostraron una capacidad fagocítica más fuerte (Fig. 4*B* y Fig. 12 *A-B*) El análisis cuantitativo de un panel de macrófagos, que incluía las subpoblaciones con expresión diferencial de CRT de superficie y macrófagos en diferentes puntos temporales después del tratamiento con imiquimod, reveló una correlación significativa entre la expresión de CRT en macrófagos y la fagocitosis de células tumorales (Fig. 4*C* y Fig. 12 *C-D*). Adicionalmente, los macrófagos humanos M1 y M2 derivados de la sangre periférica expresaron CRT en la superficie, y el subconjunto M1 expresó un nivel algo más alto de CRT (Fig. 13) Tomados en conjunto, estos descubrimientos indican que la CRT es un efector clave para la vigilancia mediada por macrófagos de las células tumorales y puede lograrse un aumento de la PrCR de las células cancerosas regulando por incremento la CRT en los macrófagos.

El progreso reciente en la inmunología del cáncer ha puesto de relieve la capacidad de las células cancerosas para evadir la inmunovigilancia como una de las características esenciales del cáncer. Si bien se ha pensado que los linfocitos (células T, B y NK) median la mayor parte de la inmunovigilancia anticancerígena, hemos demostrado que el bloqueo de CD47 en las células tumorales lleva al reconocimiento inmune *in vivo*, la fagocitosis por macrófagos de las células tumorales y la eliminación del tumor en ratones deficientes en linfocitos, lo que indica que los fagocitos son cruciales para la vigilancia contra las células cancerosas. La fagocitosis de las células tumorales mediada por el bloqueo anti-CD47 puede dar lugar a la presentación cruzada de antígenos tumorales para las células T CD8, de tal manera que el bloqueo de CD47 puede dar como resultado tanto a la vigilancia de los macrófagos del sistema inmune innato como la estimulación de la citotoxicidad de las células T del sistema inmune adaptativo.

Aquí mostramos que la CRT de la superficie celular en los macrófagos, que está controlada por la vía TLR-Btk, provoca la fosforilación de la CRT del retículo endoplásmico, su escisión de las señales de retención de ER con la posterior secreción, donde es capaz de unirse a CD91 de macrófagos. Mostramos que este mecanismo de secreción es importante para mediar la PrCR de las células cancerosas vivas, además de la demostración de este mecanismo para eliminar las células apoptóticas. La CRT en los macrófagos puede funcionar en la detección de células objetivo a través de la interacción trans con receptores específicos aún no identificados en las células cancerosas objetivo; por tanto, el bloqueo de la CRT de superficie inhibe la PrCR. Además, los ratones mutantes de CD47 no fagocitan glóbulos rojos o células madre hematopoyéticas (HSC) propios, pero estas células se fagocitan rápidamente cuando se transfieren a ratones normales o irradiados congénicos de tipo salvaje, incluso aunque ningún tipo celular exprese CRT en micromatrices, indicando que podrían usarse otras señales de “cómeme”, o que la CRT puede decorar células objetivo que no expresan genes de calreticulina.

Mostramos que múltiples tipos de agonistas de TLR son capaces de estimular los macrófagos y mejorar la PrCR de las células tumorales sólidas, de acuerdo con los informes de que los agonistas de TLR4 LPS y los receptores IFN-γ eran necesarios para activar los macrófagos para fagocitar las células de leucemia mieloide aguda después de interrumpir la interacción CD47-SIRPα. A partir de estos estudios, es posible que la señalización de TLR pueda sinergizar con el bloqueo anti-CD47 para mejorar la fagocitosis de las células tumorales, pero el potencial de la señalización de TLR de las células normales, creándolas también como objetivos para la fagocitosis, debe probarse en varios sistemas antes de poder juzgar el potencial clínico de tal sinergia. La investigación adicional de la interacción entre los macrófagos y las células cancerosas objetivo debería hacer avanzar nuestra comprensión de los principios de la evasión inmune de las células cancerosas.

Materiales y métodos

Ratones. se criaron ratones BALB/c, RAG2$^{-/-}$ γc$^{-/-}$ BALB/c y NOD.Cg-Prkdc$^{scid}$ Il2rg$^{tm1Wjl}$/SzJ (NSG) en una instalación libre de patógenos en el Instituto de Biología de Células Madre y Medicina Regenerativa de la

Universidad de Stanford. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité Administrativo de Cuidado de Animales de Laboratorio en la Universidad de Stanford.

Cultivo de células. Las líneas celulares derivadas de cáncer humano SW620 (cáncer de colon), HL60 (leucemia), Raji (linfoma), MDA-MB-231 (cáncer de mama), PC3 (cáncer de próstata) y la línea celular de macrófagos/monocitos murina J774 se obtuvieron de la ATCC y se cultivaron rutinariamente en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% (SW620, MDA-MB-231, J774), medio IMDM suplementado con suero bovino fetal al 20% (HL60), medio F-12K suplementado con suero bovino fetal al 10% (PC 3), o medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% (Raji). Las células tumorales se transdujeron con virus lenti que se generaron con un vector viral lenti pCDH-CMV-MCS-EF1 que expresaba una proteína de fusión luciferasa-eGFP y se clasificaron por citometría de flujo con clasificadores celulares BD FACSAria II para células GFP+, como se ha descrito anteriormente.

Exclusión de CD47 con TALEN. Los TALEN fueron diseñados y ensamblados como se describe. El locus genómico de CD47 humano (NC_000003.12) se escaneó en busca de parejas de unión de TALEN putativas. El exón 2 se seleccionó finalmente para la orientación y las parejas de TALEN TGTCGTCATTCCATGCTTTG y TATACTTCAGTAGTGTTTTG se clonaron respectivamente en la estructura principal de pTALEN. Se transfectaron células SW620 con los constructos de CD47-TALEN usando lipofectamina 2000. Tres días después de la transfección, las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD47 o Isotipo. Las células de CD47 se clasificaron por citometría de flujo con clasificadores celulares BD FACSAria II.

Análisis de citometría de flujo. Los análisis de citometría de flujo se realizaron usando un BD LSRFortessa. Para la tinción, se incubaron $2{,}5x10^5$ - $10^6$ células con los anticuerpos indicados (1:50-1: 00) en tampón FACS (PBS con suero bovino fetal al 2%) en hielo durante 30 minutos. Las células se lavaron luego con tampón FACS y se sometieron a análisis FACS. Para la tinción de los macrófagos, las células se trataron primero con bloqueadores de los receptores Fc o con una concentración alta de control de isotipo IgG (5-10 veces los anticuerpos indicados) para bloquear la unión no específica de anticuerpos provocada por la interacción del dominio Fc y los receptores Fc sobre los macrófagos..

Preparación de macrófagos. Se generaron macrófagos derivados de sangre periférica humana como se ha descrito anteriormente. Los monocitos se enriquecieron de sangre periférica humana y se diferenciaron en macrófagos por cultivo en IMDM suplantado con suero humano al 10% durante 7-10 días. Para generar macrófagos humanos M1, los monocitos se trataron con GM-CSF humano recombinante (5 ng/ml) en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 5% y glutamax al 1% durante los 7 días. La polarización M1 se logró mediante un tratamiento adicional en el día 5 mediante estimulación con IFN-γ (20 ng/ml) durante 1 hora, seguido de tratamiento con LPS (100 ng/ml) en los días 6-7. Para generar macrófagos humanos M2, los monocitos se trataron con M-CSF humano recombinante (25 ng/ml) en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 5% y glutamax al 1% durante los 7 días. La polarización de M2 se logró mediante un tratamiento adicional en los días 5 y 6 con IL-4 (20 ng/ml) e IL-13 (20 ng/ml). La diferenciación de los macrófagos M1 y M2 se evaluó mediante la expresión de marcadores de superficie específicos CD80 (M1) y CD163 (M2).

Se usaron anticuerpos anti-CD47 (BD Biosciences), anti-calreticulina (Enzo Life Sciences, Abcam y MBL International), anti-F4/80 (Biolegend), anticuerpo anti-CD31 (BD Biosciences), anticuerpo anti-Gr-1 (Biolegend) para análisis FACS. Los anticuerpos eran anticuerpos secundarios conjugados con Ficoeritrina (PE), PE cy-7-, APC- o Violeta Brilliant 421 (BV421) o conjugados con fluoróforo. Se usó azul Sytox para excluir las células muertas.

Ensayo de fagocitosis. Se realizaron ensayos de fagocitosis basados en FACS para evaluar las capacidades fagocíticas de los macrófagos. Los macrófagos se recogieron después de 6-8 días de diferenciación y se dividieron en tubos FACS o placas de 96 pocillos de baja fijación, con $1\text{-}5x10^4$ células por pocillo/tubo. Las células objetivo se añadieron y se mezclaron con macrófagos, y se incubaron a 37º C durante 2 horas con las condiciones indicadas (tratamiento con anticuerpo/fármaco). Para el bloqueo de CD47, se usaron anticuerpos anti-CD47 (B6H12, BD Biosciences) o anti-CD47 humanizado (Hu5F9-G4; proporcionado por el equipo de la enfermedad de CD47 en la Universidad de Stanford). Las células se incubaron luego con anticuerpo anti-ratón F4/80 conjugado con PE cy7 para teñir los macrófagos. Después de la incubación, las células se lavaron con tampón FACS y se resuspendieron con tampón FACS que contenía azul sytox para distinguir las células muertas. El índice fagocítico se examinó mediante análisis FACS, y los macrófagos que fagocitaron células objetivo fueron F4/80+ y GFP+. El índice fagocítico se calculó con el número de células F4/80+GFP+/dividido por el número de células F4/80 . En cada experimento, los índices fagocíticos se normalizaron a los índices máximos.

Alternativamente, se mezclaron los macrófagos y las células objetivo y se cultivaron en placas de 24 pocillos durante 16-24 horas con las condiciones indicadas. Las células se recogieron de las placas mediante TrypLE y se incubaron con anticuerpo anti-ratón F4/80 conjugado con PE cy7 para teñir los macrófagos. Después de la incubación, las células se lavaron con tampón FACS y se resuspendieron con tampón FACS que contenía células con sytox blue y estándar no coloreadas (se usaron células 293T como células estándar). Las células se sometieron luego a análisis FACS. Las células objetivo restantes se normalizaron a células estándar (se conocía el número de

células estándar y se igualó en cada muestra) para evaluar el porcentaje de células fagocitadas por macrófagos durante la incubación.

Para los experimentos que investigan la capacidad fagocítica de los macrófagos con expresión de la superficie celular diferencial de CRT, las células se tiñeron con anticuerpo anti-F4/80, así como con anticuerpo anti-calreticulina o control de isotipo conjugado con el mismo color después del ensayo de fagocitosis. Se seleccionaron las células F4/80+ (macrófagos), entre las cuales se analizaron por separado las células $CRT^{Alta}$, $CRT^{Meda}$ o $CRT^{Baja}$ para los índices fagocíticos.

Sobreexpresión de CRT. Se usó lentivirus de replicación incompetente para sobreexpresar la calreticulina en células J774. El ADNc de CRT se clonó en el vector viral lenti pCDH-MCS-IRS-Puro, con un marcador myc después del péptido señal. El vector lentiviral que expresa la CRT marcada con myc se transfectó transitoriamente a células 293T con psPAX2 y pMD2.G a una proporción de (4:3:1). 48 horas después de la transfección, se recogió el sobrenadante y se añadió a las células J774. Las células se trataron con puromicina (2 µg/ml) durante 48 horas y las células seleccionadas se usaron para ensayos de fagocitosis. La sobreexpresión de CRT se confirmó mediante transferencia western con anticuerpo anti-myc.

Biotinilación de la superficie celular. Se sembraron macrófagos derivados de médula ósea de ratón el día 6 y se trataron con imiquimod o ibrutinib durante 16 horas antes del ensayo de biotinilación. Las células se incubaron con NHS-SS-Biotina (0,5 mg/ml) durante 1 hora en PBS (pH 8,0), y luego se enjuagaron con tampón de inactivación (Tris-HCl 20 mM, NaCl 120 mM, pH 7,4), glicina 100 mM en PBS, y PBS. Las células se lisaron en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, suplementado con Triton X-100 al 1%, cóctel inhibidor de proteasa y cóctel inhibidor de fosfatasa). El lisado celular se incubó con resina de agarosa de neutravidina durante 4 horas a 4º C, y la resina se lavó usando tampón de lisis. Las proteínas marcadas con biotina se eluyeron con tampón de lisis que contenía SDS al 2% y DTT 100 mM, y se sometieron a SDS-PAGE e inmunotransferencia. Se usó la proteína intracelular GAPDH como un control negativo para confirmar que sólo se marcaron las proteínas de la superficie celular por NHS-SS-Biotina.

Inmunoprecipitación La calreticulina se inmunoprecipitó de células J774 que expresaban myc-CRT. Las células J774 se colocaron en placas 12 horas antes de la inmunoprecipitación. Las células se trataron con imiquimod (1ug/ml) en los puntos temporales indicados, y se lavaron con PBS preenfriado que contenía inhibidores de fosfatasa en hielo. Luego, las células se lisaron en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, suplementado con Triton X-100 al 1%, cóctel inhibidor de proteasa y cóctel inhibidor de fosfatasa). El lisado celular se incubó durante 1 hora con GammaBind Plus Sefarosa para la predepuración y 4 horas con anticuerpos anti-myc a 4º C. Se añadió gammaBind sefarosa al lisado celular y se incubó durante 1 hora a 4º C. Las perlas se lavaron con tampón de lisis. Las proteínas se eluyeron con tampón de lisis que contenía SDS al 2% y DTT 100 mM, y se sometieron a SDS-PAGE e inmunotransferencia. Para detectar la CRT fosforilada, el transferencia se incubó con anticuerpo anti-p-Tirosina de pT66 marcado con biotina y estreptavidina conjugada con HRP.

Injerto y tratamiento tumoral. Se suspendieron células PC3 (cáncer de próstata humano) se suspendieron en medio F-12K con matrigel de matriz al 25%, y se inyectaron por vía subcutánea en la espalda de ratones NSG de 6-10 semanas. Los ratones se trataron con anticuerpo PBS o Hu5F9-G4 mediante inyección intraperitoneal 2 semanas después del injerto, y agonistas de PBS o TLR (20 µg de Poli (I C) HMW y 20 µg de LPS) mediante inyección intratumoral 7 semanas después del injerto cuando los tumores alcanzaron 100 $mm^3$.

Se obtuvieron imágenes bioluminiscentes para monitorizar el crecimiento tumoral, como se ha descrito anteriormente. Brevemente, se disolvió la sal de potasio de D-Luciferina (luciérnaga) en PBS hasta una concentración final de 16,6 mg/ml. A los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal una solución de luciferina (0,139 g de luciferina/kg de peso corporal), y se obtuvieron imágenes y se analizaron con el software Living Image 4.0.

Disociación tumoral y análisis FACS. Se recogieron especímenes de tumores de los ratones, se trocearon en trozos de menos de 1 mm de diámetro y se disociaron en medio 199 con enzimas TM y ADNasa a 37º C hasta que se logró la suspensión de células individuales. Las células se trataron con tampón de lisis ACK para la lisis de los glóbulos rojos, se lavaron dos veces con HBSS, se filtraron a través de un filtro de células de 70 µm y se sometieron a análisis de citometría de flujo. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD31, anticuerpo anti-Gr-1 y azul sytox para excluir células endoteliales, neutrófilos y células muertas, y con anticuerpo anti-F4/80 para macrófagos.

**REIVINDICACIONES**

**1.** Un método *in vitro* para aumentar la fagocitosis de las células cancerosas, el método comprendiendo:

poner en contacto una población de células fagocíticas con un agonista de TLR en una dosis eficaz para aumentar la expresión de calreticulina en la superficie de las células fagocíticas; y con una dosis eficaz de un agente de bloqueo de CD47;
en donde se aumenta la eliminación celular programada de células cancerosas por las células fagocíticas.

**2.** Un agonista de TLR para su uso en un método para aumentar la fagocitosis de células cancerosas, el método comprendiendo:

poner en contacto una población de células fagocíticas con un agonista de TLR en una dosis eficaz para aumentar la expresión de calreticulina en la superficie de las células fagocíticas; y con una dosis eficaz de un agente de bloqueo de CD47;
en donde se aumenta la eliminación celular programada de células cancerosas por las células fagocíticas, y en donde:

(a) el contacto se realiza *in vivo,* o
(b) el contacto se realiza *in vitro,* en donde las células fagocíticas se introducen en un sujeto después del contacto con un agonista de TLR y un agente de bloqueo de CD47.

**3.** Un agente de bloqueo de CD47 para su uso en un método para aumentar la fagocitosis de las células cancerosas, el método comprendiendo:

poner en contacto una población de células fagocíticas con un agonista de TLR en una dosis eficaz para aumentar la expresión de calreticulina en la superficie de las células fagocíticas; y con una dosis eficaz de un agente de bloqueo de CD47;
en donde se aumenta la eliminación celular programada de células cancerosas por las células fagocíticas, y en donde:

(a) el contacto se realiza *in vivo,* o
(b) el contacto se realiza *in vitro,* en donde las células fagocíticas se introducen en un sujeto después del contacto con un agonista de TLR y un agente de bloqueo de CD47.

**4.** El método *in vitro* de la reivindicación 1, el agonista de TLR para el uso de la reivindicación 2, o el agente de bloqueo de CD47 para el uso de la reivindicación 3, en donde las células fagocíticas son macrófagos.

**5.** El *in vitro* método de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, el agonista de TLR para el uso de la reivindicación 2 o la reivindicación 4, o el agente de bloqueo de CD47 para el uso de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde el agonista de TLR es imiquimod o poli I:C.

**6.** El método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 y 5, el agonista de TLR para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 y 5, o el agente de bloqueo de CD47 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde el agente de bloqueo de CD47 es un anticuerpo.

**7.** El método *in vitro*, el agonista de TLR para el uso o el agente de bloqueo de CD47 para el uso de la reivindicación 6, en donde el anticuerpo se une específicamente a CD47.

**8.** El método *in vitro*, el agonista de TLR para el uso o el agente de bloqueo de CD47 para el uso de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano, humanizado o quimérico.

**9.**El método *in vitro*, el agonista de TLR para el uso o el agente de bloqueo de CD47 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, opcionalmente en donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab', F(ab')2 o Fv.

**10.** El agonista de TLR para el uso de la reivindicación 2, o el agente de bloqueo de CD47 para el uso de la reivindicación 3, en donde el método comprende además medir la expresión de calreticulina en la superficie de la célula fagocítica antes del paso de introducción.

**11.** El método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-9, el agonista de TLR para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-10, o el agente de bloqueo de CD47 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3-10, en donde el cáncer se selecciona de: (a) tumores sólidos, como carcinomas, sarcomas, glioblastomas, melanomas, linfomas y mielomas, y (b) cánceres circulantes, como leucemias.

**12.**El método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-9, el agonista de TLR para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-10, o el agente de bloqueo de CD47 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3-10, en donde el cáncer se selecciona de: cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de cerebro.

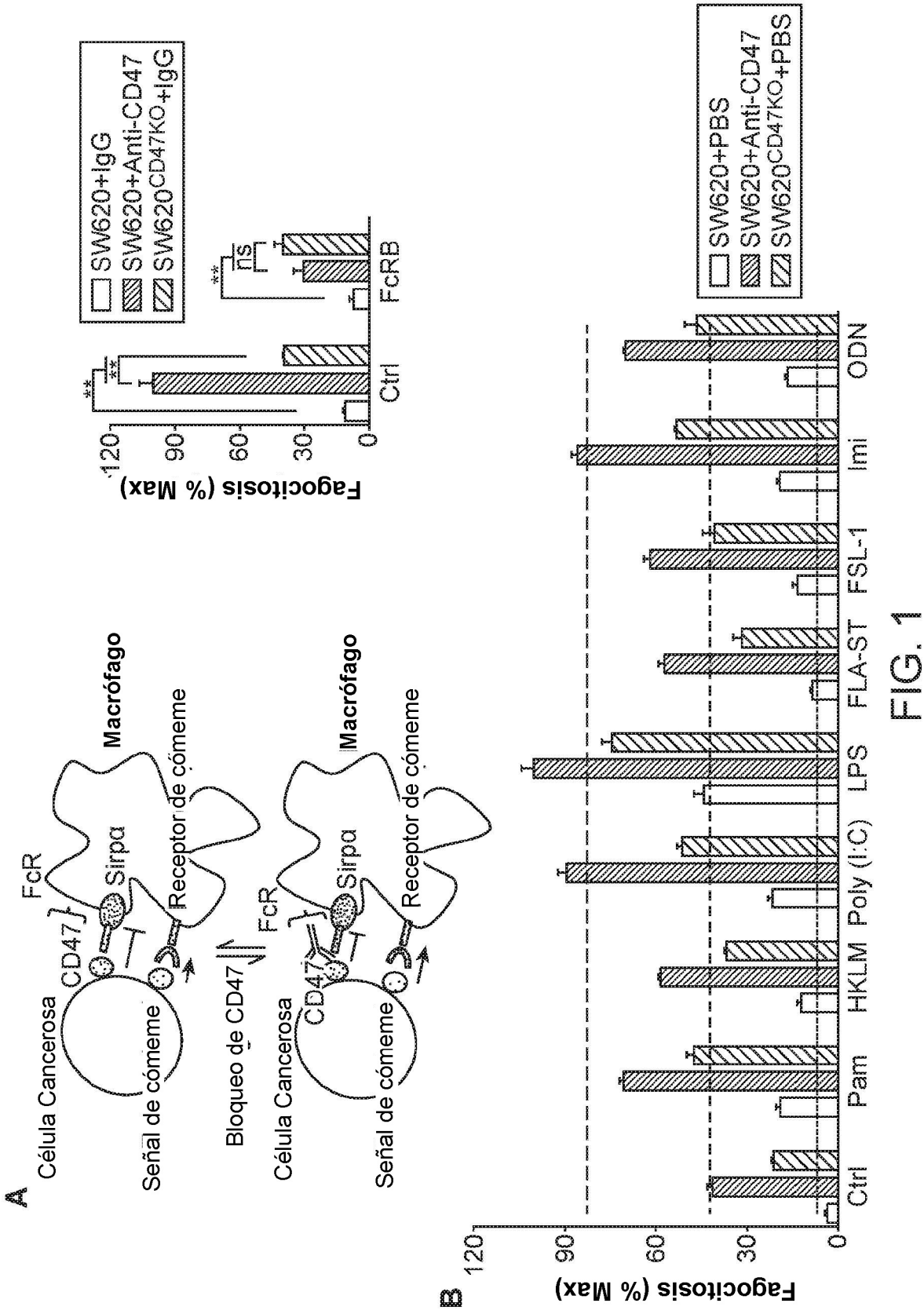
A
Célula Cancerosa
CD47
FcR
Sirpa
Macrófago
Receptor de cómeme
Señal de cómeme
Bloqueo de CD47
Célula Cancerosa
CD47
FcR
Sirpa
Macrófago
Receptor de cómeme
Señal de cómeme
SW620+IgG
SW620+Anti-CD47
SW620CD47KO+IgG
Fagocitosis (% Max)
120
90
60
30
0
**
**
ns
Ctrl
FcRB
B
SW620+PBS
SW620+Anti-CD47
SW620CD47KO+PBS
Fagocitosis (% Max)
120
90
60
30
0
Ctrl
Pam
HKLM
Poly (I:C)
LPS
FLA-ST
FSL-1
Imi
ODN

FIG. 1

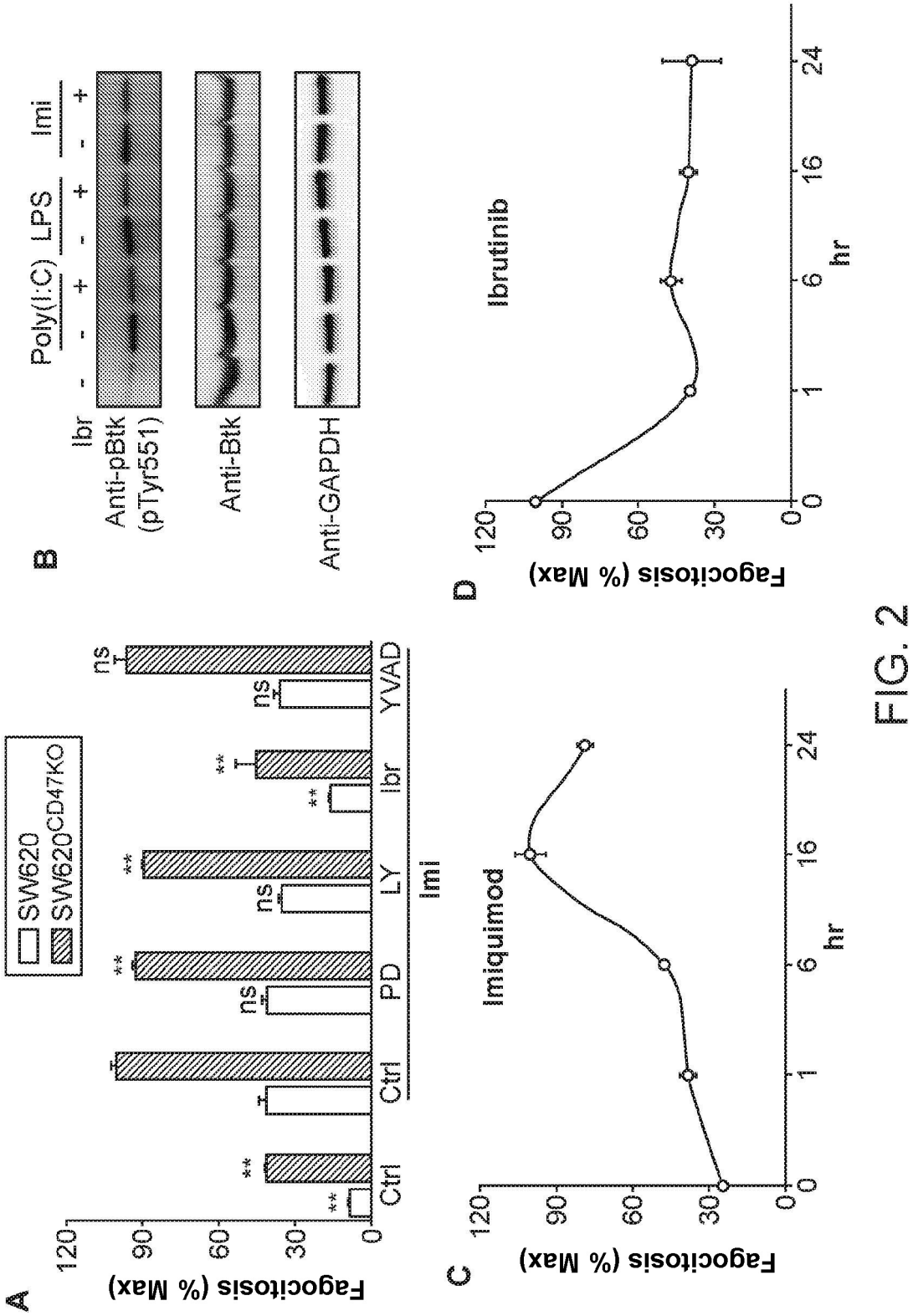
A
Fagocitosis (% Max)
120
90
60
30
0
SW620
SW620CD47KO
**
**
ns
**
ns
**
**
ns
Ctrl
Ctrl
PD
LY
Ibr
YVAD
Imi
B
Poly(I:C)
LPS
Imi
Ibr
Anti-pBtk (pTyr551)
Anti-Btk
Anti-GAPDH
C
Imiquimod
Fagocitosis (% Max)
120
90
60
30
0
0
1
6
16
24
hr
D
Ibrutinib
Fagocitosis (% Max)
120
90
60
30
0
0
1
6
16
24
hr

FIG. 2

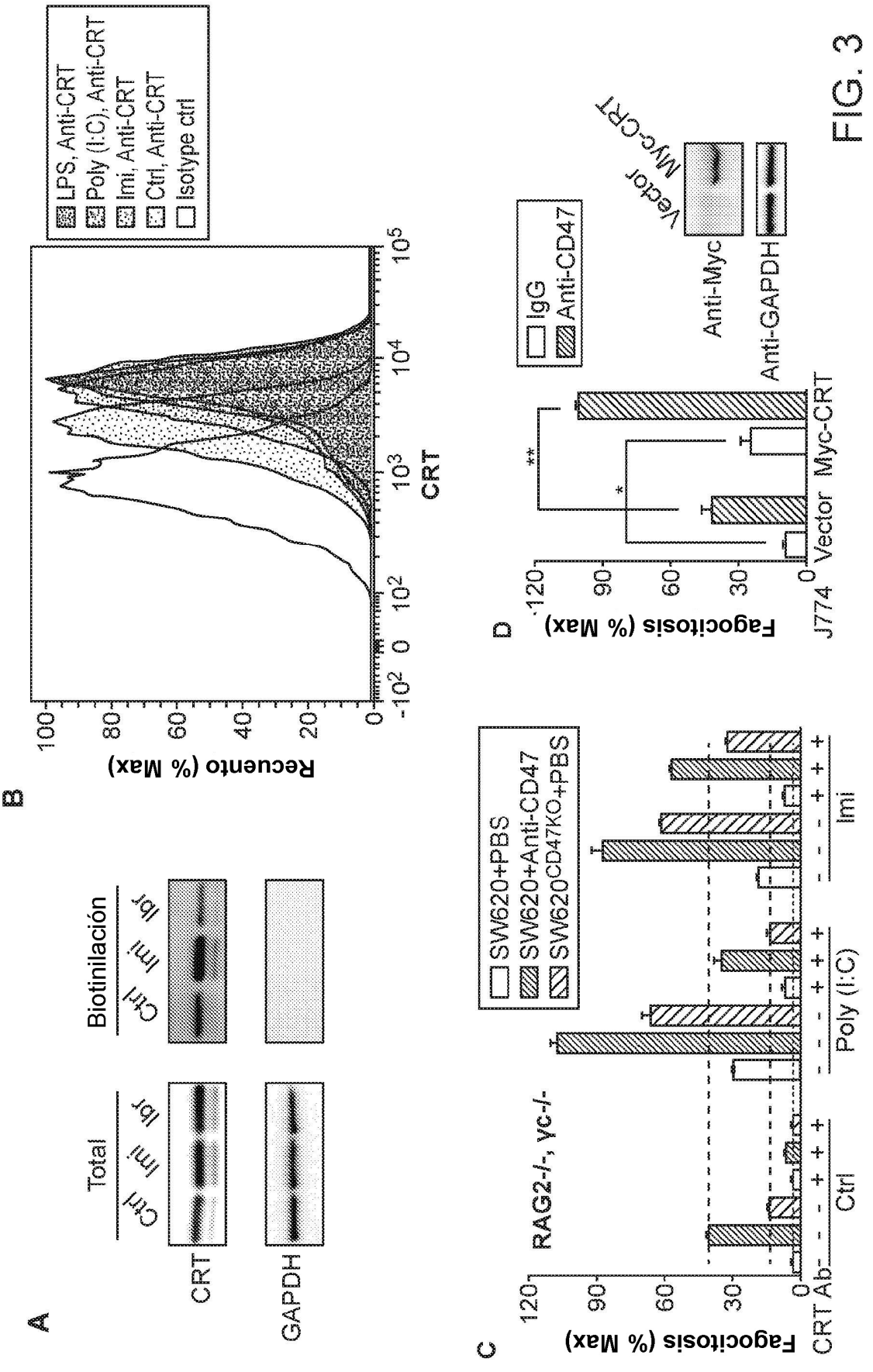
A
Total
Ctrl
Imi
Ibr
Biotinilación
Ctrl
Imi
Ibr
CRT
GAPDH
B
LPS, Anti-CRT
Poly (I:C), Anti-CRT
Imi, Anti-CRT
Ctrl, Anti-CRT
Isotype ctrl
Recuento (% Max)
CRT
C
SW620+PBS
SW620+Anti-CD47
SW620CD47KO+PBS
RAG2-/-, γc-/-
Fagocitosis (% Max)
CRT Ab
Ctrl
Poly (I:C)
Imi
D
IgG
Anti-CD47
Fagocitosis (% Max)
J774
Vector
Myc-CRT
Anti-Myc
Anti-GAPDH
Vector
Myc-CRT

FIG. 3

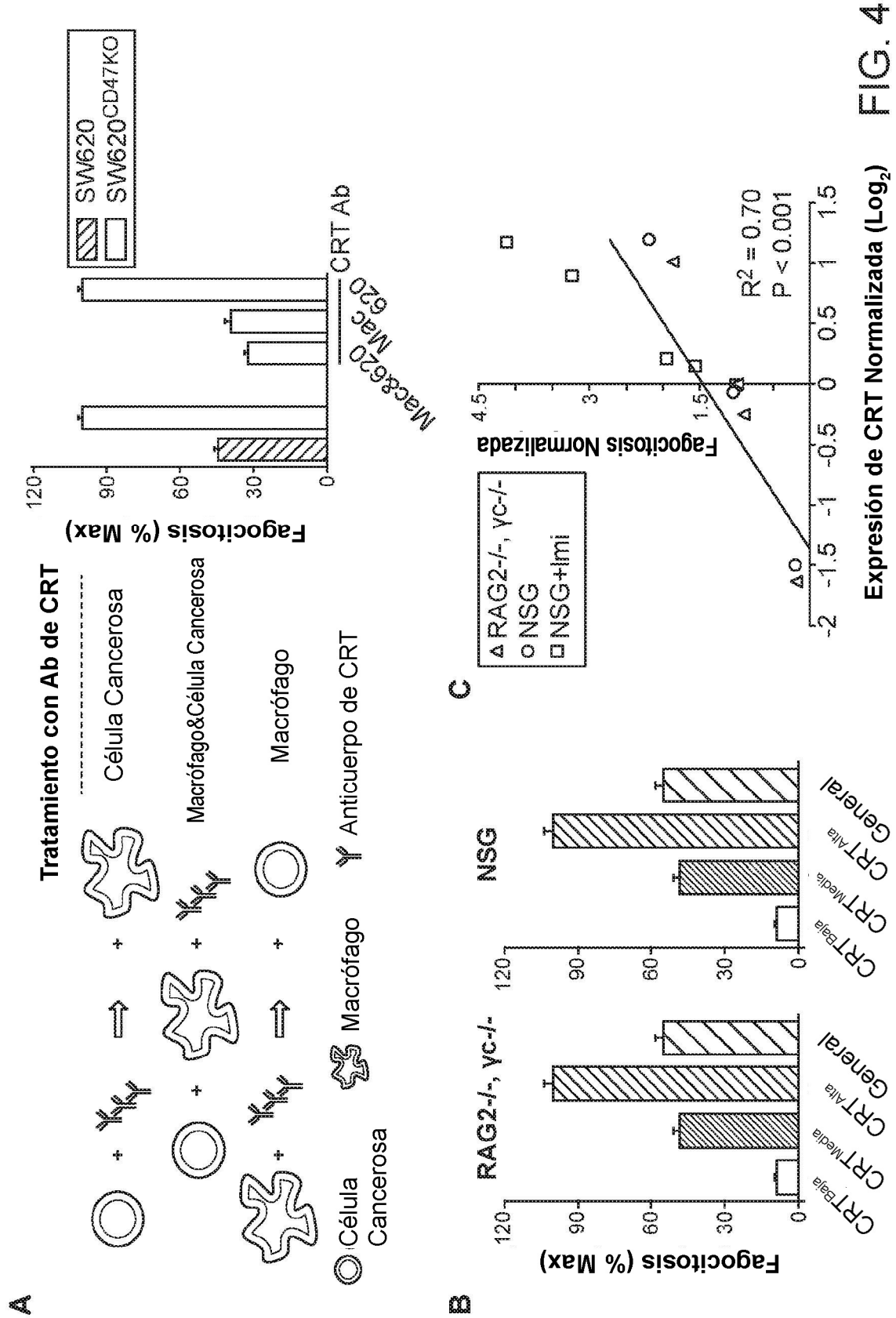
A
Tratamiento con Ab de CRT
Célula Cancerosa
Macrófago&Célula Cancerosa
Macrófago
Anticuerpo de CRT
Célula Cancerosa
Macrófago
Fagocitosis (% Max)
SW620
SW620CD47KO
Mac&620
Mac620
CRT Ab
B
RAG2-/-, γc-/-
NSG
Fagocitosis (% Max)
CRTBaja
CRTMedia
CRTAlta
General
C
RAG2-/-, γc-/-
NSG
NSG+Imi
Fagocitosis Normalizada
R2 = 0.70
P < 0.001
Expresión de CRT Normalizada (Log2)

FIG. 4

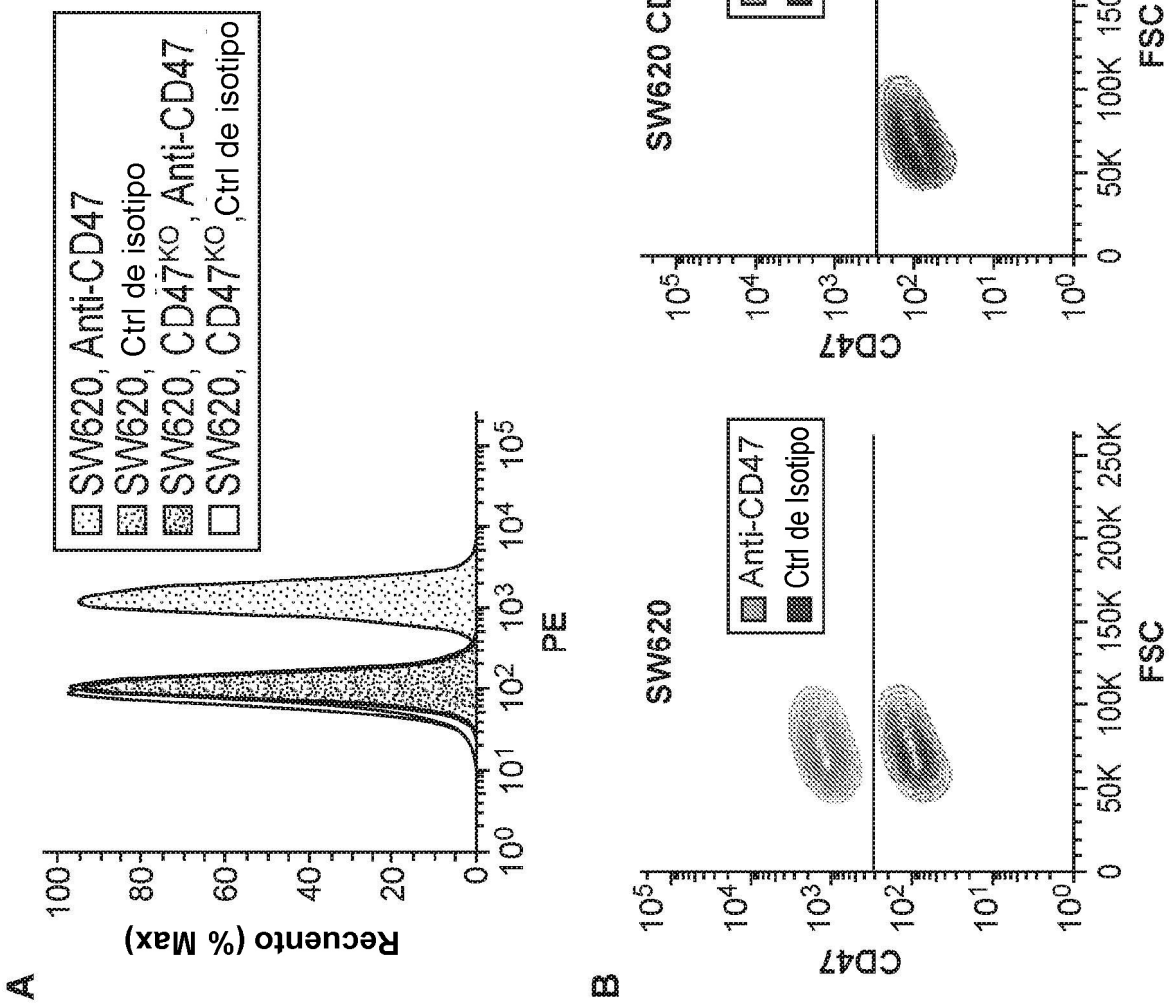
A
Recuento (% Max)
PE
SW620, Anti-CD47
SW620, Ctrl de isotipo
SW620, CD47KO, Anti-CD47
SW620, CD47KO, Ctrl de isotipo
B
SW620
SW620 CD47KO
Anti-CD47
Ctrl de Isotipo
CD47
FSC

FIG. 5

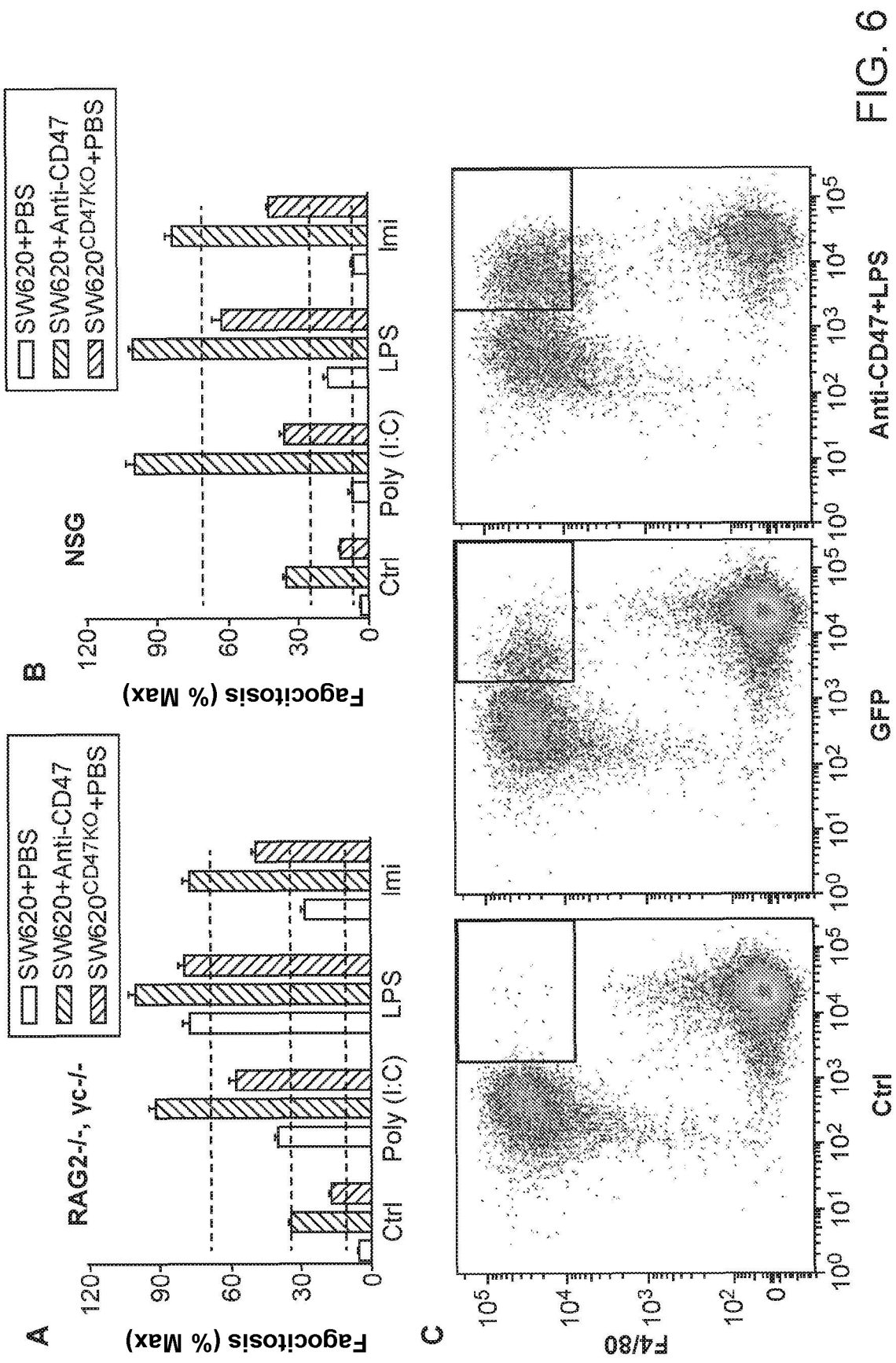
A
RAG2-/-, γc-/-
SW620+PBS
SW620+Anti-CD47
SW620CD47KO+PBS
Phagocitosis (% Max)
120
90
60
30
0
Ctrl
Poly (I:C)
LPS
Imi
B
NSG
SW620+PBS
SW620+Anti-CD47
SW620CD47KO+PBS
Phagocitosis (% Max)
120
90
60
30
0
Ctrl
Poly (I:C)
LPS
Imi
C
F4/80
GFP
Anti-CD47
Ctrl
Anti-CD47+LPS

FIG. 6

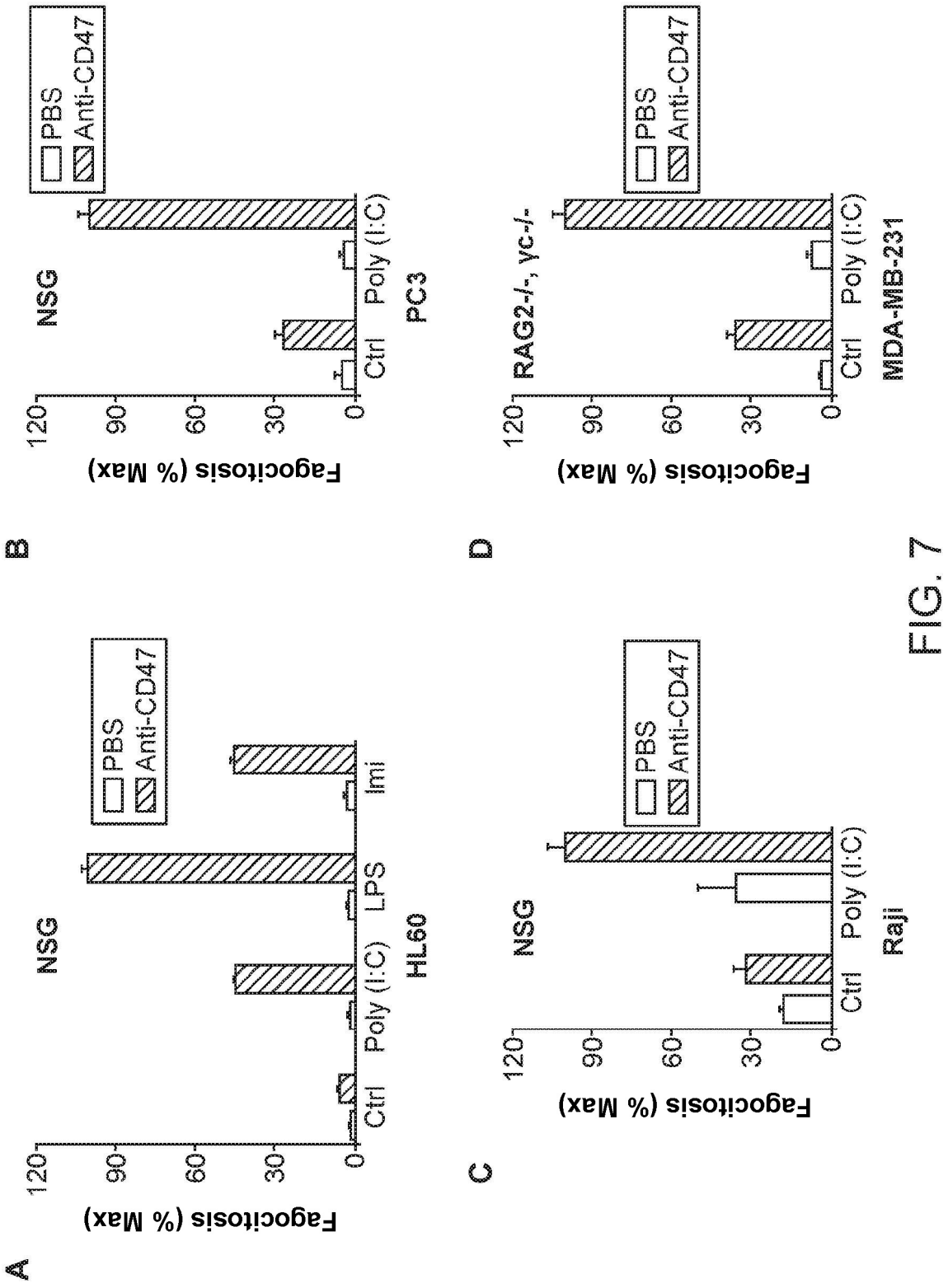
A
NSG
HL60
Phagocitosis (% Max)
120
90
60
30
0
PBS
Anti-CD47
Ctrl
Poly (I:C)
LPS
Imi
B
NSG
PC3
Phagocitosis (% Max)
PBS
Anti-CD47
Ctrl
Poly (I:C)
C
NSG
Raji
Phagocitosis (% Max)
PBS
Anti-CD47
Ctrl
Poly (I:C)
D
RAG2-/-, γc-/-
MDA-MB-231
Phagocitosis (% Max)
PBS
Anti-CD47
Ctrl
Poly (I:C)

FIG. 7

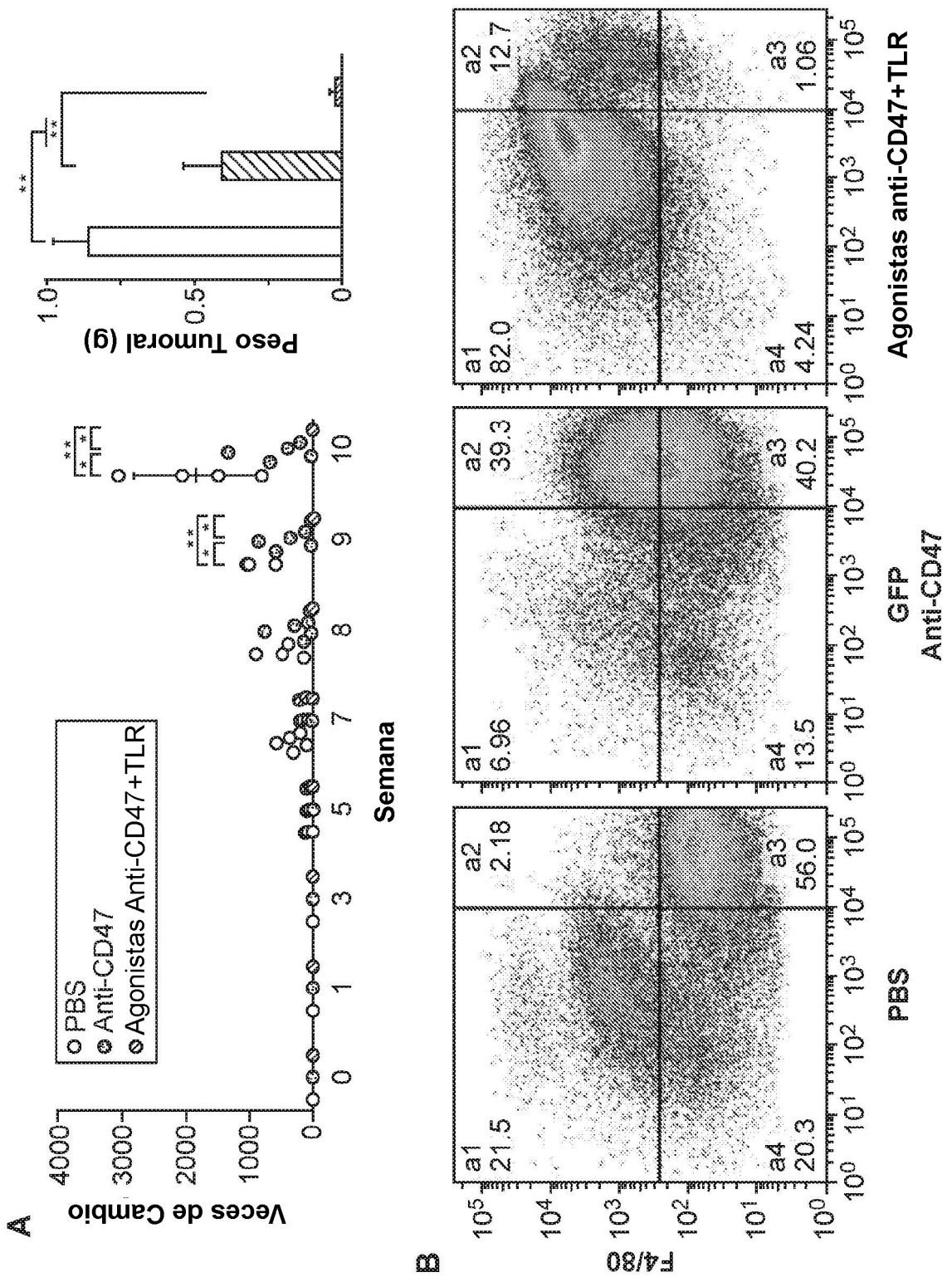
A
Veces de Cambio
4000
3000
2000
1000
0
PBS
Anti-CD47
Agonistas Anti-CD47+TLR
0 1 3 5 7 8 9 10
Semana
**
**
**
Peso Tumoral (g)
1.0
0.5
0
**
**
B
F4/80
GFP
Anti-CD47
PBS
Agonistas anti-CD47+TLR
a1 21.5
a2 2.18
a4 20.3
a3 56.0
a1 6.96
a2 39.3
a4 13.5
a3 40.2
a1 82.0
a2 12.7
a4 4.24
a3 1.06

FIG. 8

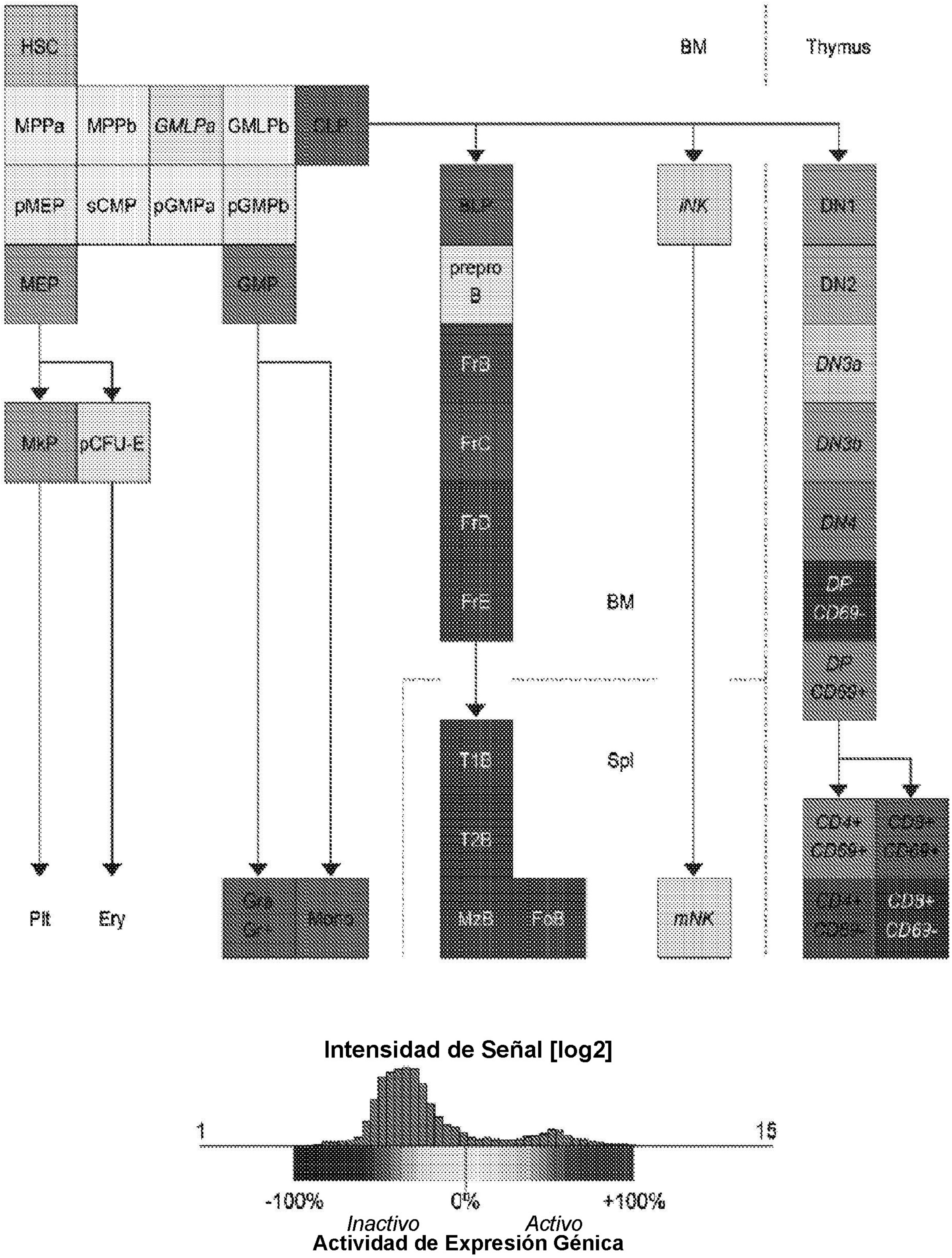
HSC
BM
Thymus
MPPa
MPPb
GMLPa
GMLPb
CLP
pMEP
sCMP
pGMPa
pGMPb
iNK
DN1
MEP
prepro B
GMP
DN2
DN3a
MkP
pCFU-E
DN3b
DN4
DP CD69-
BM
DP CD69+
Spl
Plt
Ery
mNK
Intensidad de Señal [log2]
1
15
-100%
0%
+100%
Inactivo
Activo
Actividad de Expresión Génica

FIG. 9

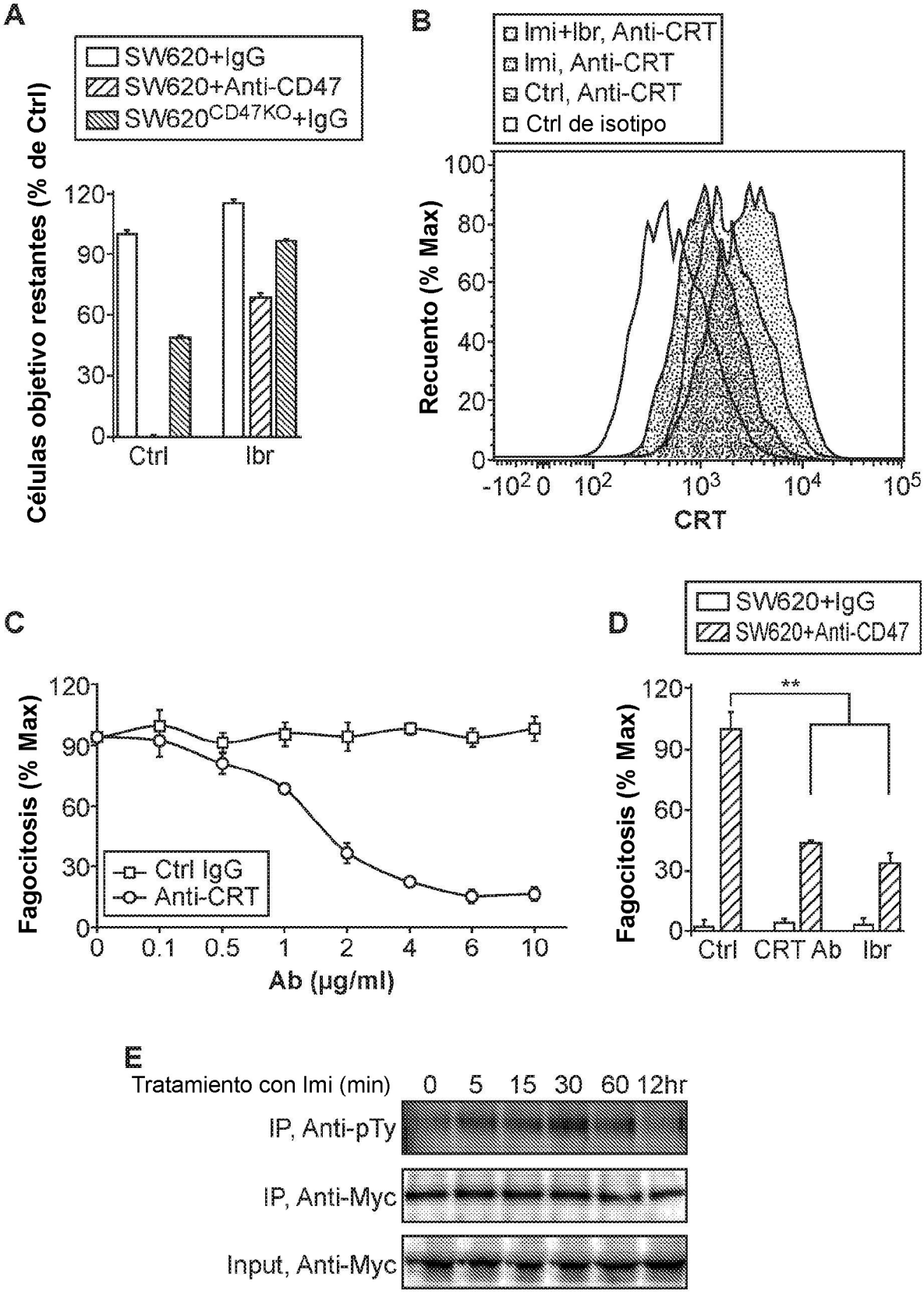
A
SW620+IgG
SW620+Anti-CD47
SW620CD47KO+IgG
Células objetivo restantes (% de Ctrl)
120
90
60
30
0
Ctrl
Ibr
B
Imi+Ibr, Anti-CRT
Imi, Anti-CRT
Ctrl, Anti-CRT
Ctrl de isotipo
Recuento (% Max)
100
80
60
40
20
0
-10^2 0
10^2
10^3
10^4
10^5
CRT
C
Fagocitosis (% Max)
120
90
60
30
0
Ctrl IgG
Anti-CRT
0
0.1
0.5
1
2
4
6
10
Ab (µg/ml)
D
SW620+IgG
SW620+Anti-CD47
Fagocitosis (% Max)
**
120
90
60
30
0
Ctrl
CRT Ab
Ibr
E
Tratamiento con Imi (min)
0
5
15
30
60
12hr
IP, Anti-pTy
IP, Anti-Myc
Input, Anti-Myc

FIG. 10

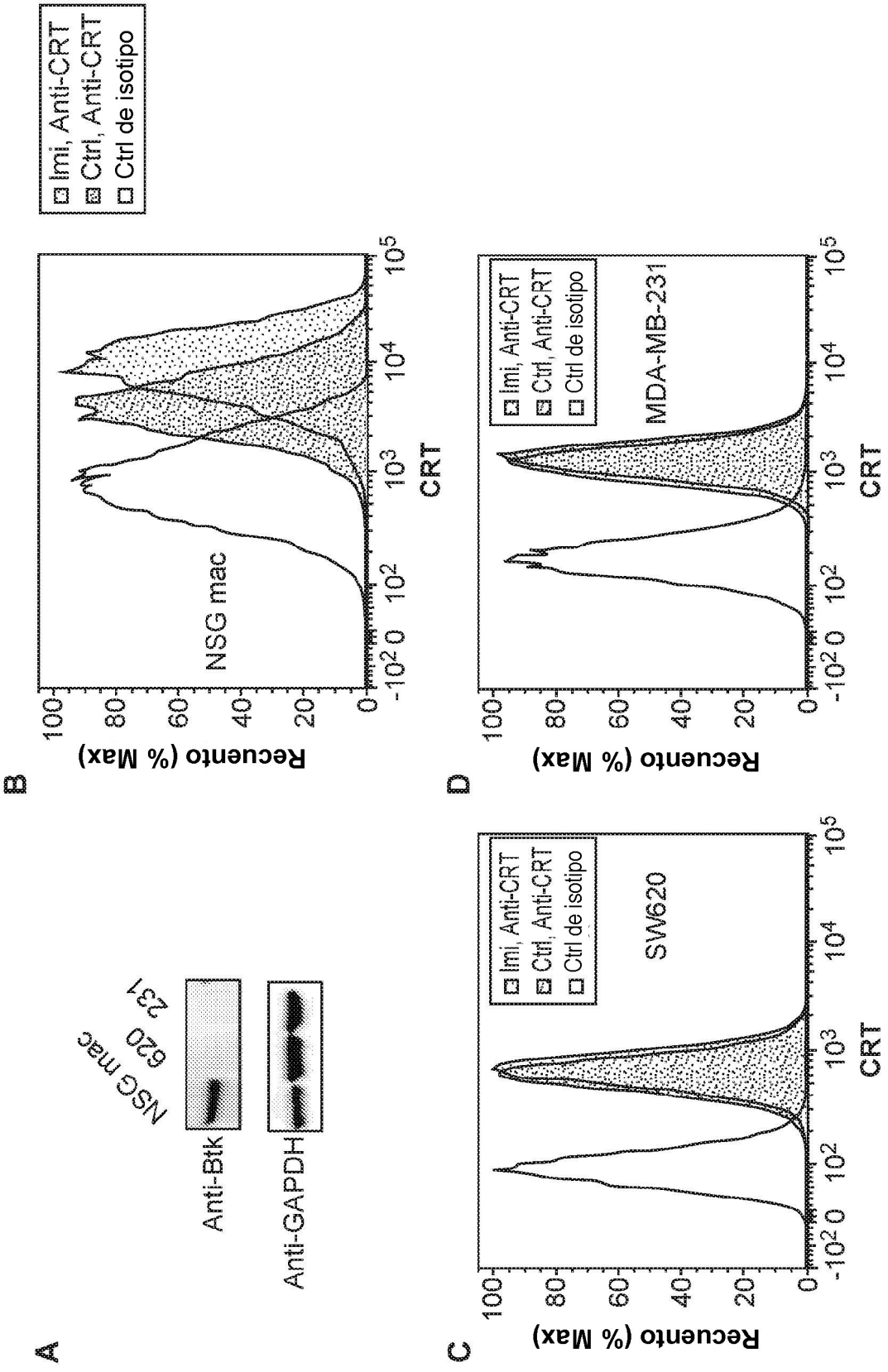
A
NSG mac
620
231
Anti-Btk
Anti-GAPDH
B
Imi, Anti-CRT
Ctrl, Anti-CRT
Ctrl de isotipo
NSG mac
Recuento (% Max)
CRT
C
SW620
D
MDA-MB-231

FIG. 11

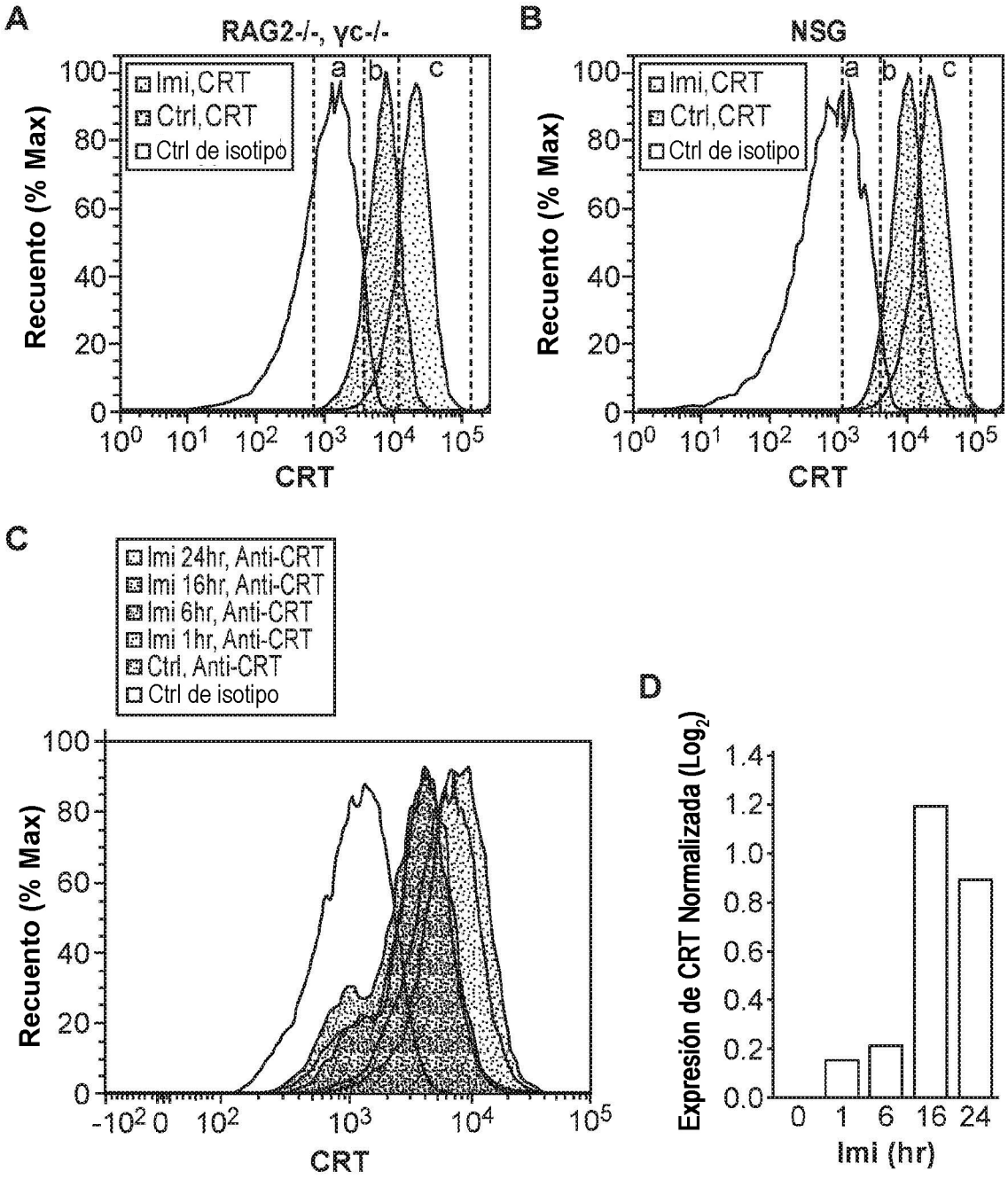
A
RAG2-/-, γc-/-
Imi,CRT
Ctrl,CRT
Ctrl de isotipo
a
b
c
Recuento (% Max)
CRT
B
NSG
Imi,CRT
Ctrl,CRT
Ctrl de isotipo
a
b
c
Recuento (% Max)
CRT
C
Imi 24hr, Anti-CRT
Imi 16hr, Anti-CRT
Imi 6hr, Anti-CRT
Imi 1hr, Anti-CRT
Ctrl, Anti-CRT
Ctrl de isotipo
Recuento (% Max)
CRT
D
Expresión de CRT Normalizada (Log2)
Imi (hr)

FIG. 12

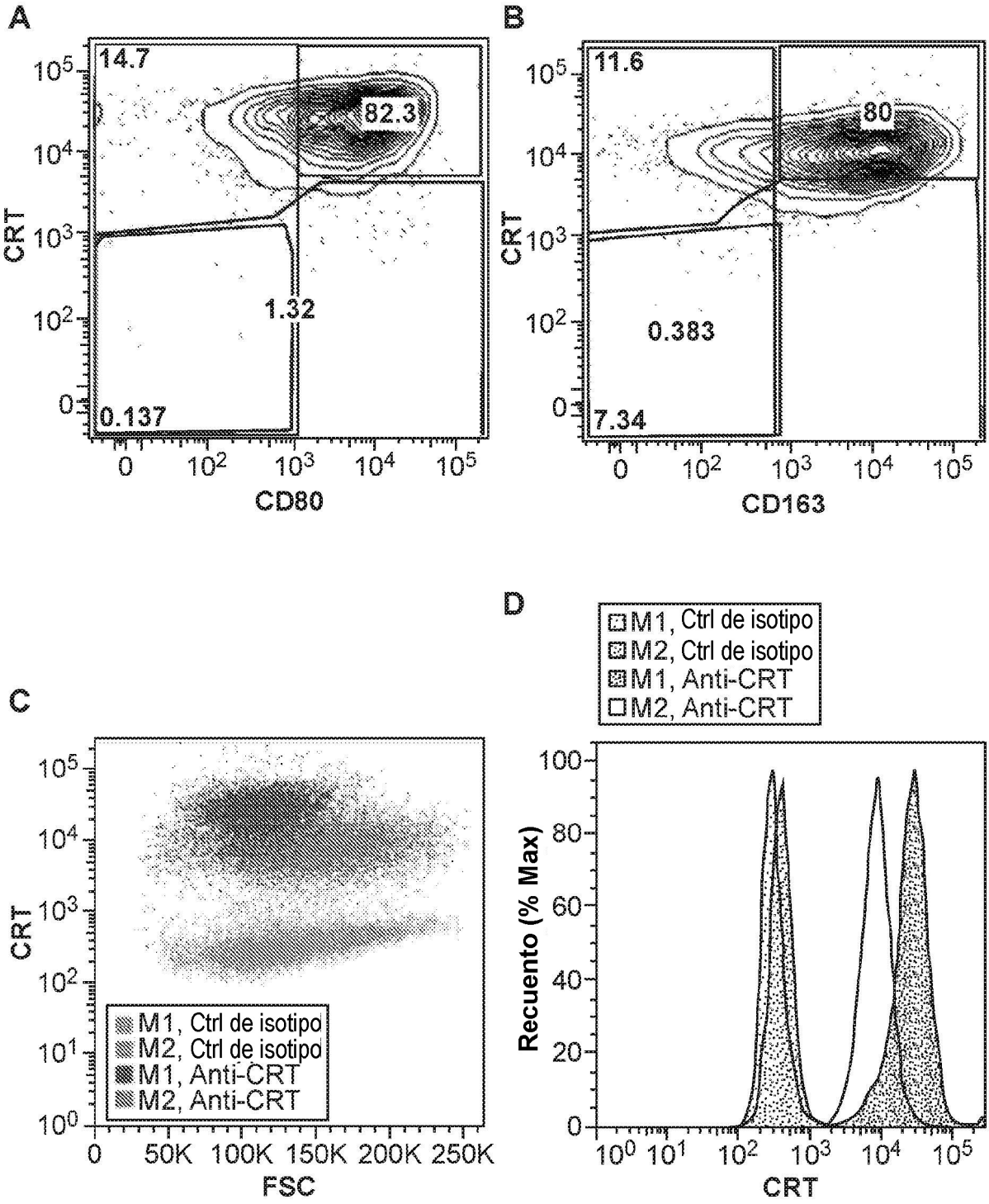
A
14.7
82.3
1.32
0.137
CRT
CD80
B
11.6
80
0.383
7.34
CRT
CD163
C
M1, Ctrl de isotipo
M2, Ctrl de isotipo
M1, Anti-CRT
M2, Anti-CRT
CRT
FSC
D
M1, Ctrl de isotipo
M2, Ctrl de isotipo
M1, Anti-CRT
M2, Anti-CRT
Recuento (% Max)
CRT

FIG. 13