

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 700**

51 Int. Cl.:

A61K 35/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2014** **E 17194591 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020** **EP 3311824**

54 Título: **Terapias dirigidas a CD47 para el tratamiento de enfermedades infecciosas**

30 Prioridad:

05.02.2013 US 201361761133 P

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

18.11.2020

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (33.3%)
Office of the General Counsel Building 170, 3rd
Floor, Main Quad P O Box 20386
Stanford, CA 94305-2038, US;
THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (33.3%) y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**WEISKOPF, KIPP;
HASENKRUG, KIM J.;
STODDART, CHERYL A.;
MCCUNE, JOSEPH M. y
WEISSMAN, IRVING L.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 794 700 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapias dirigidas a CD47 para el tratamiento de enfermedades infecciosas

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El recambio de células comienza con la inducción de un programa de apoptosis u otros cambios celulares que los marcan para su extracción, y el posterior reconocimiento de los marcadores por los fagocitos, incluyendo macrófagos, células dendríticas, y similares. Este proceso requiere una eliminación específica y selectiva de células no deseadas. A diferencia de las células sanas, las células no deseadas/envejecidas/que mueren muestran marcadores o ligandos llamados señales de "comerme", es decir, "yo alterado", que a su vez pueden ser reconocidos por los receptores de los fagocitos. Las células sanas pueden mostrar señales de "no comerme" que inhiben activamente la fagocitosis; estas señales están reguladas negativamente en las células en proceso de extinción, están presentes en una conformación alterada o son reemplazadas por la regulación positiva de las señales "comerme" o pro-fagocíticas. La proteína de la superficie celular CD47 en las células sanas y su compromiso de un receptor fagocítico, SIRPα, constituye una señal clave "no comerme" que puede desactivar inmersión mediada por múltiples modalidades, incluida la separación celular por apoptosis y la fagocitosis mediada por FcR. El bloqueo de la participación mediada por CD47 de SIRPα en un fagocito, o la pérdida de expresión de CD47 en ratones knockout, puede provocar la eliminación de las células vivas y eritrocitos no envejecidos. Alternativamente, el bloqueo de SIRPα también permite inmersión de objetivos que normalmente no son fagocitados, para aquellas células en las que las señales pre-fagocíticas también están presentes.

CD47 es una glicoproteína transmembrana expresada ampliamente con un solo dominio similar a Ig y cinco regiones que abarcan la membrana, que funciona como un ligando celular para SIRPα con la unión mediada por el dominio NH2-terminal de tipo V de SIRPα. SIRPα es expresada principalmente en células mieloides, incluyendo los macrófagos, granulocitos, células dendríticas mieloides (DCs), mastocitos, y sus precursores, incluyendo células madre hematopoyéticas. Determinantes estructurales en SIRPα que median CD47 de unión son discutidas por Lee et al. (2007) J. Immunol. 179: 7741 - 7750; Hatherley et al. (2007) J.B.C. 282: 14567 - 75; y el papel de dimerización cis SIRPα en unión CD47 es discutido por Lee et al. (2010) J.B.C. 285: 37953-63.

De acuerdo con el papel de CD47 para inhibir la fagocitosis de células normales, no existe evidencia de que está regulada positivamente de forma transitoria en células madre hematopoyéticas (HSC) y progenitores justo antes y durante su fase migratoria, y que el nivel de CD47 en estas células determina la probabilidad de que estén envueltas en vivo. El CD47 también está constitutivamente regulado positivamente en una serie de cánceres. La sobreexpresión de CD47 por las células tumorales puede aumentar la patogenicidad al permitir que la célula evite la fagocitosis.

La WO2011/143624 describe anticuerpos monoclonales humanizados y quiméricos contra CD47. La WO2009/131453 describe composiciones y métodos para mejorar el sistema inmune

La muerte celular programada (PCD) y la eliminación de las células fagocíticas son formas comunes que dañaron células precancerosas, inflamadas, o infectadas responden a las amenazas patógenas al organismo. Sin embargo, algunas infecciones persisten durante largos períodos de tiempo, lo que sugiere que las infecciones persistentes exitosas superan las vías de eliminación de células PCD y fagocíticas. La identificación y selección de un mecanismo por el cual los agentes infecciosos superan la eliminación de PCD y/o células fagocíticas resultará útil para el tratamiento de enfermedades infecciosas a través de la interrupción del mecanismo identificado. La presente invención proporciona métodos para el tratamiento de enfermedades infecciosas usando reactivos de bloqueo de CD47.

50 RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona una composición para su uso en un método de tratamiento de un sujeto mamífero por la infección por virus hepadna, el método comprendiendo: administrar al sujeto de un agente anti-CD47 que reduce la unión de CD47 en una célula infectada con SIRPα en una célula fagocítica, a una dosis eficaz para aumentar la fagocitosis de la célula infectada,

en donde el agente anti-CD47 es:

- (a) un anticuerpo anti-CD47,
- (b) un anticuerpo anti-SIRPα que no estimula la señalización a través de SIRPα,
- (c) un polipéptido derivado de SIRPα que se une específicamente a CD47, o
- (d) un polipéptido de CD47 soluble que se une específicamente a SIRPα y no estimula la señalización a través de SIRPα.

En la presente se divulgan métodos para tratar a un individuo infectado con un patógeno intracelular administrando una dosis eficaz de un agente que reduce la unión entre la CD47 presente en una célula infectada

con el patógeno intracelular, con SIRP α en una célula fagocítica presente en un individuo, donde la dosis es eficaz en aumentar la fagocitosis de las células infectadas. Los agentes adecuados incluyen polipéptidos de SIRP α de alta afinidad solubles; CD47 soluble; anticuerpos anti-CD47, anticuerpos anti-SIRP α , y similares. Los anticuerpos de interés incluyen anticuerpos humanizados, o anticuerpos caninizados, felinizados, equinizados, bovinizados, porcinizados, etc., y variantes de los mismos.

Las realizaciones de la invención incluyen tratar a un sujeto mamífero, incluyendo, sin limitación perro, gato, cerdo, oveja, vaca, caballo, humano, etc. En realizaciones particulares los métodos se usan en el tratamiento de infecciones por virus hepadna.

En algunas realizaciones, los métodos se destinan a la orientación o agotamiento de las células infectadas, que comprende poner en contacto una población de células, por ejemplo sangre de un sujeto infectado, con un agente que se une específicamente a CD47, a fin de orientar o agotar las células infectadas. En ciertos aspectos, el agente es un anticuerpo anti-CD47 o SIRP α soluble de alta afinidad conjugada con un agente citotóxico, *por ejemplo*, isótopo radioactivo, agente quimioterapéutico, toxina, etc. En algunas realizaciones, el agotamiento se realiza en una población *ex vivo* de células (por ejemplo, la purga de células infectadas de la sangre del sujeto). En otra realización, los métodos son para la dirección *in vivo* de las células infectadas en un sujeto mediante la administración de un tal agente al sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 A-D demuestra una regulación positiva de CD47 en células infectadas por Virus Friend (FV) en comparación con células no infectadas del mismo animal (7 días después de la infección de ratones adultos). (A y B) CD19 + células B (C y D) Ter119 + células eritroides. "34+" es un marcador de células infectadas por virus, mientras que "34-" indica células no infectadas.

La Fig. 2 AB demuestra una regulación al alza de CD47 en células infectadas con Fr98 frente a células no infectadas del mismo animal (recién nacidos de ratón). "34+" es un marcador de células infectadas por virus, mientras que "34-" indica células no infectadas. Fr98 es un virus de leucemia de ratón neurotrópico.

La Fig. 3 AB demuestra una regulación al alza de CD47 en tipos de células individuales que están infectadas con el virus de leucemia de ratón neurotrópico Fr98. (A) indica el porcentaje de cada tipo de célula que se tiñó positivo para mAb34 + cuando está infectado con virus en comparación con una infección simulada. (B) indica el nivel de expresión de CD47 por célula (MFI - Intensidad media de fluorescencia) para las células infectadas frente a las no infectadas del mismo animal. Múltiples tipos de células diferentes fueron analizados.

La Fig. 4 AD demuestra un aumento de la expresión de CD47 tras la infección por VIH de células humanas. (A-B) Se aislaron células T de personas y (A) se infectaron por VIH o (B) simulacros de infección. El porcentaje de células que expresan el antígeno p24 se determinó mediante FACS. (C-D) demuestran un aumento de la expresión de CD47 en las células T infectadas con VIH en relación con las células T no infectadas dentro de una única muestra. Los dos gráficos en C representan experimentos duplicados. Los dos gráficos en D representan experimentos duplicados.

La Fig. 5 demuestra niveles aumentados de CD47 en células infectadas con el virus de La Crosse en comparación con células no infectadas para una variedad de diferentes tipos de células (28 días después de la infección de los ratones).

Fig. 6 A-B demuestra una regulación positiva de CD47 en células HeLa infectadas con *Chlamydia* serovar A, una cepa con tropismo reducido de macrófagos. Expresión CD47 fue detectada por tinción con proteína de fusión SIRP α -Fc recombinante.

Fig. 7 A-D presenta una evaluación de la actividad antiviral de anticuerpo monoclonal 5F9-hlgG4 humanizado anti-CD47 contra la infección establecida de VIH-1 (JR-CSF) en ratones Thy/Liv SCID-hu tratados por inyección intraperitoneal. (A) resumen del protocolo experimental. (B) indica los niveles de antígeno p24 de VIH y el número de copias de ARN de VIH-1 después del tratamiento de control o anti-CD47 como se indica. (C) representa el análisis de citometría de flujo de timocitos humanos después del tratamiento de control o anti-CD47 como se indica. (D) muestra los recuentos de células absolutas y el cambio de peso corporal de los animales tratados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición para su uso en un método de tratamiento de un sujeto mamífero por infección por virus hepadna administrando un agente que reduce la unión de CD47 a SIRP α , que puede ser referido en la presente como agente anti-CD47.

Los términos "tratamiento", "tratar", y similares se usan en este documento para referirse en general a la obtención de un efecto farmacológico deseado y/o fisiológico. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una estabilización o curación parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento" como se utiliza en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad o síntoma en un

sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o síntoma pero que aún no ha sido diagnosticado por tenerlo; (b) inhibir el síntoma de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar el síntoma de la enfermedad, es decir, causando la regresión de la enfermedad o el síntoma. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen una infección y aquellos en los que se debe prevenir una infección. Como tal, un tratamiento terapéutico es aquel en el que el sujeto se infecta antes de la administración y un tratamiento profiláctico es aquel en el que el sujeto no está infectado antes de la administración. En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto está infectado antes de la administración. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un mayor riesgo de infección antes de la administración. En algunas realizaciones, se sospecha que el sujeto tiene un mayor riesgo de infección antes de la administración.

Los términos "receptor", "individual", "sujeto", "huesped", y "paciente", se utilizan indistintamente en este documento y se refieren a cualquier sujeto mamífero para quien se desea el diagnóstico, tratamiento o terapia, particularmente seres humanos. "Mamífero" para propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y zoológicos, de deporte o animales de compañía, como perros, caballos, gatos, vacas, ovejas, cabras, cerdos, etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para efectuar resultados clínicos beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para los fines de esta invención, una cantidad 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 enfermedad (por ejemplo, infección) al aumentar la fagocitosis de una célula diana.

Como se utiliza en este documento, una "célula diana" es una célula que expresa CD47 en la superficie, donde el enmascaramiento o de otra manera la alteración del fenotipo CD47 positiva (por ejemplo, mediante la administración de un agente anti-CD47) da como resultado el aumento de la fagocitosis. Habitualmente, una célula diana es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana.

Tal como se utiliza aquí, el término "infección" se refiere a cualquier estado en al menos una célula de un organismo (es decir, un sujeto) infectado por un agente infeccioso. Como se utiliza en el presente documento, el término "agente infeccioso" se refiere a una entidad biológica extraña, es decir, un patógeno, que induce una expresión aumentada de CD47 en al menos una célula del organismo infectado. Por ejemplo, los agentes infecciosos incluyen, pero no están limitados a, bacterias, virus, protozoos y hongos. Los patógenos intracelulares son de particular interés. Las enfermedades infecciosas son trastornos causados por agentes infecciosos. Algunos agentes infecciosos no causan síntomas o enfermedades reconocibles bajo ciertas condiciones, pero tienen el potencial de causar síntomas o enfermedades bajo condiciones cambiadas.

Tal como se utiliza aquí, el término "agente anti-CD47" se refiere a cualquier agente que reduce la unión de CD47 (por ejemplo, en una célula infectada) para SIRP α (por ejemplo, en una célula fagocítica). Los ejemplos no limitantes de reactivos anti-CD47 adecuados incluyen SIRP α reactivos de alta afinidad, anticuerpos anti-SIRP α , polipéptidos CD47 solubles, y anticuerpos anti-CD47 o fragmentos de anticuerpos. En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 adecuado (por ejemplo un anticuerpo anti-CD47, un reactivo SIRP α de alta afinidad, etc.) se une específicamente CD47 para reducir la unión de CD47 a SIRP α . En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 adecuado (p.ej., un anticuerpo anti-SIRP α , un polipéptido CD47 soluble, etc.) se une específicamente SIRP α para reducir la unión de CD47 a SIRP α . Un agente adecuado anti-CD47 que se une SIRP α no activa SIRP α (por ejemplo, en células fagocíticas que expresan SIRP α). La eficacia de un agente anti-CD47 adecuado puede evaluarse ensayando el agente (descrito más adelante). En un ensayo ejemplar, las células infectadas se incuban en presencia o ausencia del agente candidato. Un agente para usar en los métodos de la invención regulará positivamente la fagocitosis en al menos 10% (por ejemplo, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 100%, al menos 120%, al menos 140%, al menos 160%, al menos 160%, o al menos 200%) en comparación con la fagocitosis en ausencia del agente. Del mismo modo, un ensayo *in vitro* para los niveles de fosforilación de tirosina de SIRP α mostrará una disminución en la fosforilación por al menos 5% (por ejemplo, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 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, se produce un proceso similar a la apoptosis (es decir, muerte celular programada) (Manna y Frazier, Cancer Research, 64, 1026-1036, 1 de febrero de 2004). Por lo tanto, en algunas realizaciones, el agente anti-CD47 no induce directamente la muerte celular de una célula que expresa CD47.

Los términos "unión específica", "se une específicamente", y similares, se refieren a unión preferencial no covalente o covalente a una molécula pariente a otras moléculas o restos en una mezcla de solución o de reacción (por ejemplo, un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido o epítipo particular en relación con otros polipéptidos disponibles, o unión de un polipéptido SIRP α de alta afinidad). En algunas realizaciones, la afinidad de

una molécula a otra molécula a la que se une específicamente se caracteriza por una K_D (constante de disociación) de 10^{-5} M o menos (por ejemplo, 10^{-6} M o menos, 10^{-7} M o menos, 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-11} M o menos, 10^{-12} M o menos, 10^{-13} M o menos, 10^{-14} M o menos, 10^{-15} M o menos, o 10^{-16} M o menos). "Afinidad" se refiere a la fuerza de la unión, el aumento de la afinidad de unión se correlaciona con una K_D inferior.

El término "miembro de unión específica", Como se utiliza aquí se refiere a un miembro de un par de unión específica (es decir, dos moléculas, por lo general dos moléculas diferentes, donde una de las moléculas, por ejemplo, un miembro de unión específica primero, a través de medio no covalente específicamente se une a la otra molécula, por ejemplo, un segundo miembro de unión específico). Los miembros de unión específicos adecuados incluyen agentes que se unen específicamente CD47 (es decir, agentes anti-CD47), o que bloquean de otro modo la interacción entre CD47 y SIRP α .

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos también se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

En una realización de la invención, el agente anti-CD47, o una composición farmacéutica que comprende el agente, se proporciona en una cantidad eficaz para inhibir de forma detectable la unión de CD47 a SIRP α presente en la superficie de las células fagocíticas. La cantidad efectiva se determina mediante la rutina de pruebas empíricas en la técnica, por ejemplo en una muestra biológica tomada de un individuo infectado. La cantidad eficaz puede variar en función del número de células en la mira, la ubicación de las células, y factores específicos para el sujeto.

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

El término "muestra" con respecto a un paciente engloba sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido tal como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de los mismos y la progenie de la misma. La definición también incluye muestras que han sido manipuladas de alguna manera después de su adquisición, como por tratamiento con reactivos; lavado; o enriquecimiento para ciertas poblaciones de células, como las células cancerosas. La definición también incluye muestras que han sido enriquecidas para tipos particulares de moléculas, *por ejemplo*, ácidos nucleicos, polipéptidos, *etc.*

El término "muestra biológica" abarca una muestra clínica, y también incluye tejido obtenido por la resección quirúrgica, el tejido obtenido por biopsia, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, muestras de tejido, órganos, médula ósea, sangre, plasma, suero y similares. Una "muestra biológica" incluye una muestra obtenida de células infectadas de un paciente, *por ejemplo*, una muestra que comprende los polinucleótidos y/o polipéptidos que se obtienen de células infectadas de un paciente (*por ejemplo*, un lisado celular u otro extracto celular que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos); y una muestra que comprende células infectadas de un paciente. Una muestra biológica que comprende una célula infectada de un paciente también puede incluir células no infectadas.

Reactivo SIRP α de alta afinidad. En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 sujeto es un "reactivo SIRP α de alta afinidad", que incluye polipéptidos derivados de SIRP α y análogos de los mismos. Reactivos SIRP α de alta afinidad se describen en la solicitud internacional PCT/US13/21937, que se incorpora aquí específicamente por referencia. Reactivos de SIRP α de alta afinidad son variantes de la proteína SIRP α nativa. En algunas realizaciones, un reactivo SIRP α de alta afinidad es soluble, en el que el polipéptido carece del dominio de transmembrana SIRP α y comprende al menos un cambio de aminoácido respecto a la secuencia SIRP α de tipo salvaje, y en el que el cambio de aminoácido aumenta la afinidad de polipéptido SIRP α de unión a CD47, por ejemplo disminuyendo la velocidad de disociación en al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, o más.

Un reactivo SIRP α de alta afinidad comprende la porción de SIRP α que es suficiente para unir CD47 con una afinidad reconocible, *por ejemplo*, de alta afinidad, que normalmente se encuentra entre la secuencia señal y el dominio de transmembrana, o un fragmento del mismo que retiene la actividad vinculante. El reactivo SIRP α de alta afinidad comprenderá normalmente al menos el dominio D1 de SIRP α con residuos de aminoácidos modificados para aumentar la afinidad. En algunas realizaciones, una variante de SIRP α de la presente invención es una proteína de fusión, *por ejemplo*, fusionada en el marco con un segundo polipéptido. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es capaz de aumentar el tamaño de la proteína de fusión, *por ejemplo*, de modo que la proteína de fusión no se elimina de la circulación rápidamente. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina. En otras realizaciones, el segundo polipéptido es cualquier polipéptido adecuado que es sustancialmente similar a Fc, *por ejemplo*, proporcionando un mayor tamaño, dominios de multimerización, y/o interacción de unión o adicional con moléculas de Ig.

Un reactivo SIRP α de alta afinidad adecuada reduce (por ejemplo, bloquea, impide, etc.) la interacción entre las proteínas nativas SIRP α y CD47. Los cambios de aminoácidos que proporcionan una mayor afinidad se localizan en el dominio D1, y por lo tanto reactivos SIRP α de alta afinidad comprenden un dominio d1 de SIRP α humana, con al menos un cambio de aminoácidos respecto a la secuencia de tipo salvaje dentro del dominio d1. Dicho reactivo SIRP α de alta afinidad comprende opcionalmente secuencias de aminoácidos adicionales, por ejemplo secuencias de Fc de anticuerpos; porciones de proteína SIRP α humana de tipo salvaje distinta del dominio d1, incluyendo sin limitación los residuos 150-374 de la proteína nativa o fragmentos de los mismos, por lo general fragmentos contiguos con el dominio d1; y similares. Reactivos de alta afinidad SIRP α 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 CD47 (es decir, un anticuerpo anti-CD47 de anticuerpos) y reduce la interacción entre CD47 en una célula (por ejemplo, una célula infectada) y SIRP α sobre otra célula (por ejemplo, una célula fagocítica). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD47 adecuado no activa CD47 tras la unión. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos adecuados incluyen clones B6H12, 5F9, 8B6, y C3 (por ejemplo como se describe en la Publicación de Patente Internacional WO 2011/143624, incorporada aquí específicamente por referencia).

Anticuerpos Anti-SIRP α . En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 sujeto es un anticuerpo que enlaza específicamente SIRP α (es decir, un anticuerpo anti-SIRP α) y reduce la interacción entre CD47 en una célula (por ejemplo, una célula infectada) y SIRP α sobre otra célula (por ejemplo, una célula fagocítica). Anticuerpos anti-SIRP α adecuados pueden unirse SIRP α sin activar o estimular la señalización a través de SIRP α porque la activación de SIRP α inhibiría fagocitosis. En lugar de ello, los anticuerpos anti-SIRP α adecuados facilitan la fagocitosis preferencial de las células infectadas sobre las células no infectadas. Aquellas células que expresan niveles más altos de CD47 (por ejemplo, las células infectadas) con relación a otras células (células no infectadas) serán preferentemente fagocitadas. Por lo tanto, un anticuerpo anti-SIRP α adecuado enlaza específicamente SIRP α sin activar/estimular suficiente respuesta de señalización para inhibir la fagocitosis.

Polipéptidos solubles de CD47. En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 sujeto es un polipéptido CD47 soluble que se une específicamente SIRP α y reduce la interacción entre CD47 en una célula (por ejemplo, una célula infectada) y SIRP α sobre otra célula (por ejemplo, una célula fagocítica). Un polipéptido de CD47 soluble adecuado puede unirse SIRP α sin activar o estimular la señalización a través de SIRP α porque la activación de SIRP α inhibiría la fagocitosis. En cambio, los polipéptidos CD47 solubles adecuados facilitan la fagocitosis preferencial de las células infectadas sobre las células no infectadas. Aquellas células que expresan niveles más altos de CD47 (por ejemplo, las células infectadas) en relación a otras células (células no infectadas) serán preferentemente fagocitadas. Por lo tanto, un polipéptido CD47 soluble adecuado se une específicamente SIRP α sin activar/estimular un grado suficiente de una respuesta de señalización para inhibir la fagocitosis.

En algunos casos, un polipéptido CD47 soluble adecuado puede ser una proteína de fusión (por ejemplo como se describe estructuralmente en la publicación de patente de EE.UU. US20100239579, incorporada aquí específicamente por referencia). Sin embargo, sólo las proteínas de fusión que no activan/estimulan SIRP α son apropiadas para los métodos proporcionados en este documento. Polipéptidos CD47 solubles adecuados incluyen también cualquier fragmento de péptido o péptido que comprende la variante o las secuencias de CD47 natural existente (por ejemplo, secuencias de dominio extracelular o variantes de dominio extracelular) que pueden unirse específicamente a SIRP α e inhibir la interacción entre CD47 y SIRP α sin estimular suficiente actividad SIRP α para inhibir la fagocitosis.

En ciertas realizaciones, el polipéptido 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 es típicamente 142 aminoácidos de longitud, y tiene la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO: 3. Los polipéptidos de CD47 solubles descritos en este documento también incluyen variantes de dominio extracelular CD47 que comprenden una secuencia de aminoácidos de al menos 65%-75%, 75%-80%, 80-85%, 85%-90%, o 95%-99% (o cualquier porcentaje de identidad no enumerado específicamente entre 65% a 100%), cuyas variantes retienen la capacidad de unirse a SIRP α sin estimular la señalización de SIRP α .

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 del CD47 de longitud completa, que es un polipéptido de superficie celular que atraviesa la membrana celular externa, los polipéptidos de CD47 solubles son secretados; por consiguiente, un polinucleótido que codifica un polipéptido CD47 soluble puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que está asociado con un polipéptido que normalmente se secreta desde una célula.

En otras realizaciones, el polipéptido 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 indicada en la SEQ ID N°: 1 (124 aminoácidos). Como se describe en este documento,

los péptidos de señal no están expuestos en la superficie celular de una proteína secretada o transmembrana porque el péptido señal se escinde durante la translocación de la proteína o el péptido de señal permanece anclado en la membrana celular externa (dicho péptido también se denomina señal de anclaje). Se cree que la secuencia del péptido de señal de CD47 se escinde del polipéptido precursor CD47 *in vivo*.

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

En algunos casos, un agente anti-CD47 no es un polipéptido CD47 soluble (es decir, es un agente anti-CD47 que no sea un polipéptido CD47 soluble). En algunos casos, un agente anti-CD47 se une a SIRP α pero no es un polipéptido CD47 soluble (es decir, es un agente SIRP α de unión anti-CD47 que no sea un polipéptido CD47 soluble).

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la deseada actividad biológica. "Anticuerpos" (Abs) e "inmunoglobulinas" (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos exhiben especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos del último tipo son, por ejemplo, producidos a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles aumentados por mielomas.

"Fragmento de anticuerpo", y todas las variantes gramaticales de los mismos, tal como se utiliza en el presente documento se define como una porción de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión a antígeno o región variable del anticuerpo intacto, donde la porción está libre de los dominios constantes de cadena pesada (es decir, CH2, CH3 y CH4, dependiendo del isotipo de anticuerpo) de la región Fc del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab 'Fab'-SH, F(ab')₂, y fragmentos Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que es un polipéptido que tiene una estructura primaria que consiste en una secuencia ininterrumpida de residuos de aminoácidos contiguos (denominados aquí "fragmento de anticuerpo monocatenario" o "polipéptido monocatenario"), que incluye sin limitación (1) moléculas Fv de cadena única (scFv) (2) polipéptidos de cadena única que contienen solo un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento del mismo que contiene las tres CDR del dominio variable de cadena ligera, sin un resto de cadena pesada asociado (3) polipéptidos de cadena única que contienen solamente una región variable de cadena pesada, o un fragmento de la misma que contiene las tres CDR de la región variable de cadena pesada, sin un resto de cadena ligera asociado y (4) nanocuerpos que comprenden dominios de Ig individuales de especies no humanas u otros módulos de unión de dominio único específicos; y estructuras multiespecíficas o multivalentes formadas a partir de fragmentos de anticuerpos. En un fragmento de anticuerpo que comprende una o más cadenas pesadas, la (s) cadena (s) pesada (s) puede (n) contener cualquier secuencia de dominio constante (por ejemplo CH1 en el isotipo IgG) encontrada en una región no Fc de un anticuerpo intacto, y/o puede contener cualquier secuencia de región de bisagra encontrada en un anticuerpo intacto, y/o puede contener una secuencia de cremallera de leucina fusionada a o situada en la secuencia de región de bisagra o la secuencia de dominio constante de la (s) cadena (s) pesada (s).

Como se utiliza en esta invención, el término "epítipo" significa cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se une el paratopo de un anticuerpo. Los determinantes epitópicos suelen consistir en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y, por lo general, tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Los anticuerpos anti-CD47 adecuados incluyen versiones totalmente humanas, humanizadas o quiméricas de tales anticuerpos. Los anticuerpos humanizados son especialmente útiles para aplicaciones *in vivo* en humanos debido a su baja antigenicidad. Del mismo modo, anticuerpos caninizados, felinizados, etc., son especialmente útiles para aplicaciones en perros, gatos y otras especies respectivamente.

Métodos

Se describen métodos para el tratamiento o reducción de la infección, incluyendo, sin limitación bacteriana, viral, protozoaria, y las infecciones fúngicas, por inhibición de la interacción entre SIRP α y CD47, lo que aumenta fagocitosis *in vivo* de las células infectadas. Tales métodos incluyen administrar a un sujeto que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis efectiva de un agente anti-CD47, que incluye, sin limitación, combinaciones del reactivo con otro fármaco.

En algunas realizaciones la infección es una infección crónica, es decir una infección que no se depura por

el sistema inmune del huésped en el periodo de hasta 1 semana, 2 semanas, etc. En algunos casos, las infecciones crónicas implican la integración de elementos genéticos patógenos en el genoma huésped, por ejemplo, retrovirus, lentivirus, virus de la Hepatitis B, etc. En otros casos, las infecciones crónicas, por ejemplo ciertos patógenos bacterianos o protozoarios intracelulares, son el resultado de una célula patógena que reside dentro de una célula huésped. Adicionalmente, en algunas realizaciones, la infección está en una etapa latente, como con los virus del herpes o los virus del papiloma humano.

Los patógenos virales de interés incluyen el virus de la Hepatitis B.

Una infección tratada con los métodos generalmente implica un patógeno con al menos una parte de su ciclo de vida dentro de una célula huésped, es decir, una fase intracelular. Los métodos proporcionan una eliminación más eficaz de las células infectadas por las células fagocíticas del organismo huésped, en relación con la fagocitosis en ausencia de tratamiento, y por lo tanto se dirigen a la fase intracelular del ciclo de vida del patógeno.

En algunas realizaciones, los métodos implican el diagnóstico de un paciente que sufría de una infección intracelular patógena; o la selección de un paciente previamente diagnosticado con una infección intracelular patógena; tratar el paciente con un régimen de terapia anti-CD47, opcionalmente en combinación con una terapia adicional; y monitorear al paciente para la eficacia del tratamiento. El monitoreo puede medir indicios clínicos de infección, por ejemplo, fiebre, recuento de glóbulos blancos, etc., y/o monitoreo directo de la presencia del patógeno.

El tratamiento puede ser combinado con otros agentes activos. Clases de antibióticos incluyen penicilinas, *por ejemplo*, penicilina G, penicilina V, meticilina, oxacilina, carbenicilina, nafcilina, ampicilina, *etc.*; penicilinas en combinación con inhibidores de β -lactamasa, cefalosporinas, *por ejemplo* cefaclor, cefazolina, cefuroxima, moxalactam, *etc.*; carbapenems; monobactámicos; aminoglucósidos; tetraciclinas; macrólidos; lincomicinas; polimixinas; sulfonamidas; quinolonas; cloramfenicol; metronidazol; espectinomicina; trimetoprim; vancomicina; *etc.* Las citoquinas también se pueden incluir, *por ejemplo*, interferón γ , factor de necrosis tumoral α , interleuquina 12, *etc.* Los agentes antivirales, *por ejemplo* aciclovir, ganciclovir, *etc.*, también se puede utilizar en tratamiento.

Las dosis eficaces de la entidad terapéutica para su uso según la presente invención variará dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo la naturaleza del agente anti-CD47, los medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Por lo general, el paciente es un ser humano, pero mamíferos no humanos también se puede tratar, *por ejemplo*, animales de compañía tales como perros, gatos, caballos, *etc.*, mamíferos de laboratorio tales como conejos, ratones, ratas, *etc.*, y similares. Las dosificaciones de tratamiento se pueden valorar para optimizar la seguridad y eficacia.

En algunas realizaciones, la dosis terapéutica puede variar de aproximadamente 0,0001 a 500 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 100 mg/kg, de peso corporal del huésped. *Por ejemplo*, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-50 mg/kg. La dosificación se puede ajustar para el peso molecular del reactivo. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración diaria, semi-semanal, semanal, una vez cada dos semanas, una vez al mes, *etc.* En otro ejemplo, el tratamiento se puede administrar como una infusión continua. Entidades terapéuticas de la presente invención se administran generalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos de la entidad terapéutica en el paciente. Alternativamente, las entidades terapéuticas de la presente invención se pueden administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere menos administración frecuente. La dosificación y frecuencia varían dependiendo de la vida media del polipéptido en el paciente. Se entenderá por un experto en la técnica que tales directrices se ajustarán para el peso molecular del agente activo, *por ejemplo*, en el uso de fragmentos de anticuerpos, en el uso de conjugados de anticuerpos, en el uso de reactivos SIRP α de alta afinidad, *etc.* la dosis puede variarse también para la administración localizada, *por ejemplo*, intranasal, inhalación, *etc.*, o para la administración sistémica, *por ejemplo*, i.m., i.p., i.v., y similares.

Para el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada del agente de anti-CD 47 dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se define anteriormente, la gravedad y curso de la enfermedad, si el agente se administra con fines preventivos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. El agente anti-CD47 se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Los agentes anti-CD47 adecuados se pueden proporcionar en composiciones farmacéuticas adecuadas para uso terapéutico, *por ejemplo* para el tratamiento humano. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen una o más entidades terapéuticas de la presente invención o sales farmacéuticamente aceptables, ésteres o solvatos del mismo. En algunas otras realizaciones, el uso de un agente anti-CD47 incluye el uso en combinación con otro agente terapéutico, *por ejemplo*, otro agente anti-infección. Las formulaciones terapéuticas que comprenden uno o más agentes anti-CD47 de la invención se preparan para su almacenamiento mezclando el agente anti-CD47 que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes

o estabilizantes fisiológicamente aceptables (Pharmaceutical Sciences 16ª edición de Remington, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. La composición de agente de anti-CD47 se formulará, dosificará y administrará de una manera consistente con la buena práctica médica. Factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero particular a tratar, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del agente anti-CD47 a administrar se regirá por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir la enfermedad asociada a CD47.

El agente anti-CD47 se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo administración tópica, oral, parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal o subcutánea. Además, el agente anti-CD47 se administra de forma adecuada por infusión de pulsos, particularmente con dosis decrecientes del agente.

El agente anti-CD47 no es necesario, pero se formula opcionalmente con uno o más agentes que potencian la actividad, o que aumentan de otra manera el efecto terapéutico. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosis y con vías de administración como se utiliza aquí anteriormente o aproximadamente del 1 al 99% de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

Un agente anti-CD47 se administra a menudo como una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico activo y otro excipiente farmacéuticamente aceptable. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, portadores farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, o diluyentes, que se definen como vehículos comúnmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para la administración animal o humana. El diluyente se selecciona de manera que no afecta a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición farmacéutica o formulación también puede incluir otros vehículos, adyuvantes, o estabilizadores no terapéuticos, no inmunogénicos no tóxicos y similares.

En todavía algunas otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos tales como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tales como látex funcionalizado Sepharose™, agarosa, celulosa, y similares), ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros aminoácidos, y agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas).

Un vehículo puede llevar los agentes de una diversidad de maneras, incluyendo la unión covalente ya sea directamente o mediante un grupo enlazador, y asociaciones no covalentes. Portadores de enlace covalente adecuados incluyen proteínas tales como albúminas, péptidos, y polisacáridos tales como aminodextrano, cada uno de los cuales tienen múltiples sitios para la unión de restos. Un vehículo también puede portar un anticuerpo agente anti-CD47 por asociaciones no covalentes, tales como unión no covalente o por encapsulación. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Los expertos en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para los agentes anti-CD47 de unión, o serán capaces de determinarlos usando experimentación de rutina.

Los vehículos, excipientes o estabilizantes no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de amonio de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo o alcohol de bencilo; parabenos de alquilo tales como metilo o propilo parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos) polipéptidos; proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteínas Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietileno glicol (PEG). Formulaciones que se utilizarán para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo) microcápsula, respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Pharmaceutical Sciences 16ª edición de Remington, Osol, A. Ed. (1980).

Los portadores y enlazadores específicos para agentes radionúclidos incluyen moléculas pequeñas radiohalogenadas y compuestos quelantes. Un quelato radionúclido puede formarse a partir de compuestos quelantes que incluyen los que contienen átomos de nitrógeno y de azufre como átomos donadores para la unión del metal, o de óxido de metal, radionúclido.

Los restos radiográficos para el uso como restos de formación de imágenes en la presente invención incluyen compuestos y quelatos con relativamente grandes átomos, como el oro, el iridio, el tecnecio, bario, talio, yodo, y sus isótopos. Se prefiere que los restos de formación de imágenes radiográficas menos tóxicas, tales como yodo o isótopos de yodo, sean utilizados en los métodos de la invención. Tales restos pueden conjugarse con el agente anti-CD47 a través de un soporte de engarce químico o quelación aceptable. Restos de positron para su uso en la presente invención incluyen emisores de ^{18}F , que pueden ser fácilmente conjugados por una reacción de fluoración con el agente anti-CD47.

Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección también se pueden preparar. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida, o copolímero para efecto adyuvante mejorado, como se discutió anteriormente. Langer, Science 249: 1527, 1990 y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. Los agentes de esta invención se pueden administrar en forma de una preparación de inyección de depósito o implante que se puede formular de una manera tal como que permita una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente como estériles, sustancialmente isotónicas y en total cumplimiento con todos los reglamentos de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos.

La toxicidad de los agentes anti-CD47 se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la LD_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) o la LD_{100} (la dosis letal a 100% de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación que no es tóxico para su uso en humanos. La dosificación de las proteínas descritas en el presente documento se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la dosis eficaz con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosificación pueden elegirse por el médico individual en vista de la condición del paciente.

La invención ahora se describe completamente, será evidente para un experto ordinario en la técnica que varios cambios y modificaciones se pueden hacer sin apartarse del alcance de la invención.

EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos ordinarios en la técnica una exposición y descripción completa de cómo realizar y usar la presente invención, y no se pretende limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni pretenden representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo cantidades, temperatura, etc.), Pero algunos errores y desviaciones experimentales deberían tenerse en cuenta. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la atmosférica o próxima.

La presente invención ha sido descrita en términos de realizaciones particulares encontradas o propuestas por el presente inventor para comprender los modos preferidos para la práctica de la invención. Se apreciará por los expertos en la técnica que, a la luz de la presente descripción, numerosas modificaciones y cambios se pueden hacer en las realizaciones particulares ejemplificadas sin apartarse del alcance pretendido de la invención. Por ejemplo, debido a la redundancia de codones, se pueden realizar cambios en la secuencia de ADN subyacente sin afectar a la secuencia de la proteína. Por otra parte, debido a consideraciones de equivalencia funcional biológica, se pueden realizar cambios en la estructura de proteínas sin afectar a la acción biológica en especie o cantidad. Todas estas modificaciones están destinadas a ser incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Los datos presentados aquí demuestran que el aumento de expresión de CD47 es un mecanismo común mediante el cual los agentes infecciosos (por ejemplo, virus, hongos, bacterias, protozoos, etc.) eluden la respuesta inmune del organismo huésped. Cuando una célula infectada se induce por un agente infeccioso para expresar mayores niveles de CD47, la célula infectada presenta una señal de "no me comas" (CD47) a los macrófagos y

fagocitos del organismo huésped. De este modo, el agente infeccioso impide la fagocitosis y la eliminación de la célula infectada. Para contrarrestar este proceso y permitir la fagocitosis y la eliminación de las células infectadas en un sujeto, un agente anti-CD47 se puede administrar para reducir la unión de CD47 en la célula infectada, a SIRPα en una célula huésped fagocítica y permitiendo así que prevalezcan las señales cómeme.

Se realizaron los siguientes experimentos, revelando que las células infectadas con diversos agentes infecciosos expresan niveles más altos de CD47 que las células no infectadas.

Los ratones adultos fueron infectados experimentalmente con el virus Friend (virus FV, una cepa de virus de la leucemia murina que es miembro de Retroviridae que tiene un genoma ARN de cadena simple). Se aislaron células no infectadas e infectadas (es decir, las células infectadas FV) del mismo animal 7 días después de la infección y se analizaron a través de células activadas fluorescentes (FACS) para determinar los niveles relativos de expresión de CD47 (utilizando un anticuerpo anti-CD47). Células infectadas FV (células B, así como células eritroides) expresaron niveles más altos de CD47 en comparación con las células no infectadas del mismo animal (**Fig. 1**).

Se aislaron células infectadas y no infectadas de los recién nacidos de ratón infectados con el virus de la leucemia del ratón FR98-neurotrópico. Células FR98 infectadas expresaron niveles aumentados de CD47 en comparación con las células no infectadas del mismo animal (**Fig. 2**). Esta tendencia puede decirse de múltiples tipos de células individuales que fueron aislados, lo que demuestra una tendencia general que células infectadas expresan niveles incrementados de CD47 en comparación con las células no infectadas, independientemente del tipo de células (**Fig. 3**).

Los niveles elevados de CD47 se expresaron por las células infectadas por el VIH en comparación con las células no infectadas (**Fig. 4**). PBMCs se aislaron de 3 personas diferentes, y las células se sometieron a selección negativa de perla CD8-CD56 y la estimulación con anti-CD3, anti-CD28 e IL-2 durante 4 días.

Los niveles elevados de CD47 se expresaron por una variedad de diferentes tipos de células infectadas aisladas de ratones 28 días después de la infección con el virus de La Crosse en comparación con las células no infectadas (**Fig. 5**).

Los niveles elevados de CD47 fueron expresados por las células HeLa infectadas con Chlamydia trachomatis serovar A (un patógeno bacteriano) en comparación con las células no infectadas (**Fig. 6**).

En base a los hallazgos anteriores, la unión de CD47 en una primera célula a SIRPα se espera en una segunda célula para aumentar la fagocitosis de las células infectadas. Para probar esta expectativa, un agente anti-CD47 (el anticuerpo anti-CD47 5F9- hlgG4) se administró a ratones (SCID-hu Thy/Liv) que albergan una infección por VIH.

Como se describe en Stoddart et al. (Stoddart CA et al, PLoS One 2007 Aug 1; 2 (7): E655), el modelo de ratón SCID-hu, en el que los órganos linfoides humanos se implantan en ratones inmunodeficientes combinados severos (SCID), fue diseñado para proporcionar un pequeño modelo animal para el estudio de hematopoyesis humana (McCune, 1988, Science 241: 1632-1639). Estos ratones facilitaron estudio de la patogénesis de VIH-1 en órganos hematolinfoides humanos y evaluación de compuestos anti-VIH-1 *in vivo*. En este modelo, los ratones SCID se implantan con una variedad de órganos fetales humanos, incluyendo hueso, hígado, timo, ganglios linfáticos y el bazo. Los implantes fetales se vuelven tolerantes del entorno del ratón, y recíprocamente, el crecimiento del tejido humano está permitido por el estado inmunocomprometido del ratón de receptor SCID.

El ratón SCID-hu Thy/Liv, reportado por primera vez por Namikawa et al. en 1990 (J Exp Med 172: 1055-1063, 1990), se genera por co-implante de timo fetal humano y el hígado debajo de la cápsula renal de ratón. De una manera altamente reproducible, estos órganos de fusibles, se convierten en vascularizado, y crecen en un órgano estable denominado "Thy/Liv," llegando a una masa total de 100-300x10⁶ células humanas en 18 semanas. El implante Thy/Liv reproduce la diferenciación, proliferación y función de las células progenitoras hematopoyéticas humanas derivadas de hígado fetal dentro del timo humano. Los implantes poseen compartimentos corticales y medulares histológicamente normales que sostienen la hematopoyesis humana de multilínea durante 6-12 meses, generando una fuente continua de timocitos que expresan CD4 que pueden servir como células diana para la infección de VIH-1 y replicación. Es importante destacar que para un modelo de la quimioterapia antiviral, 50-60 ratones Thy/Liv de SCID-hu se pueden hacer con los tejidos de un único donante fetal, y el implante Thy/Liv es susceptible a la manipulación experimental y la infección con VIH-1. Los implantes Thy/Liv soportan la replicación viral después de la inoculación del VIH-1 por inyección directa, y el agotamiento de los timocitos se produce con ambos clones moleculares y los aislados clínicos de VIH-1 en 3-5 semanas. Este agotamiento incluye la pérdida de timocitos corticales inmaduros CD4⁺CD8⁺ (doble positivo, DP) y una disminución en la proporción CD4/CD8 en la médula tímica.

El modelo de ratón Thy/Liv SCID-hu de infección por VIH-1 se considera en la técnica por ser una

plataforma útil para la evaluación preclínica de eficacia antiviral in vivo. Este modelo de VIH se considera que es un modelo de ratón altamente reproducible, que es probable que prediga la eficacia antiviral clínica en seres humanos (Stoddart CA et al, PLoS One 2007. Aug 1; 2 (7): E655).

Un agente anti-CD47 (un anticuerpo monoclonal humanizado 5F9-hIgG4) se administró a través de inyección intraperitoneal a ratones Thy/Liv SCID-hu que albergan una infección persistente por el VIH. Una evaluación de la actividad antiviral del agente anti-CD47 se presenta en la **Figura 7**, lo que demuestra la eficacia de los métodos de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> WEISSMAN, IRVING L.

Weiskopf, Kipp

Hasenkrug, Kim J.

Stoddart, Cheryl A.

McCune, Joseph M.

<120> Terapias dirigidas a CD47 para el tratamiento de enfermedades infecciosas

<130> STAN-1000WO

<150> US 61/761.133

<151>05-02-2013

<160>3

<170> PatentIn versión 3.5

<210>1

<211>124

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>1

Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn
1 5 10 15

Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn
20 25 30

Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr
35 40 45

Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu
65 70 75 80

Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys
85 90 95

Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
100 105 110

Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn
115 120

ES 2 794 700 T3

<210> 2
 <211> 18
 <212>PRT
 5 <213>Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de polipéptido sintético

 10 <400>2

 Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
 1 5 10 15

 Ser Ala

 20 <210> 3
 <211> 142
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens

 25 <400>3

 Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
 1 5 10 15

 Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
 20 25 30

 35 Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
 35 40 45

 40 Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
 50 55 60

 45 Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
 65 70 75 80

 Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
 85 90 95

 50 Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
 100 105 110

 55 Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
 115 120 125

 60 Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn
 130 135 140

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en un método para tratar a un sujeto mamífero por infección por virus hepática, el método comprendiendo:

administrar al sujeto de un agente anti-CD47 que reduce la unión de CD47 en una célula infectada con SIRPα en una célula fagocítica, a una dosis eficaz para aumentar la fagocitosis de la célula infectada, en donde el agente anti-CD47 es:

- (a) un anticuerpo anti-CD47,
- (b) un anticuerpo anti-SIRPα que no estimula la señalización a través de SIRPα,
- (c) un polipéptido derivado de SIRPα que se une específicamente a CD47, o
- (d) un polipéptido de CD47 soluble que se une específicamente a SIRPα y no estimula la señalización a través de SIRPα.

2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto es un humano.

3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el virus es el virus de la Hepatitis B.

4. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el agente anti-CD47 es un anticuerpo anti-CD47.

5. La composición para el uso de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo anti-CD47 es un anticuerpo completamente humano, humanizado o quimérico.

6. La composición para el uso de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo es 5F9-hIgG4 humanizado.

7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el agente anti-CD47 es un anticuerpo anti-SIRPα que no estimula la señalización a través de SIRPα.

8. La composición para el uso de la reivindicación 7, en donde el anticuerpo anti-SIRPα es un anticuerpo humanizado.

9. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en donde el anticuerpo anti-CD47 o el anticuerpo anti-SIRPα es un anticuerpo monoclonal.

10. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en donde el anticuerpo anti-CD47 o el anticuerpo anti-SIRPα es un fragmento de anticuerpo.

11. La composición para el uso de la reivindicación 10, en donde el fragmento de anticuerpo es:

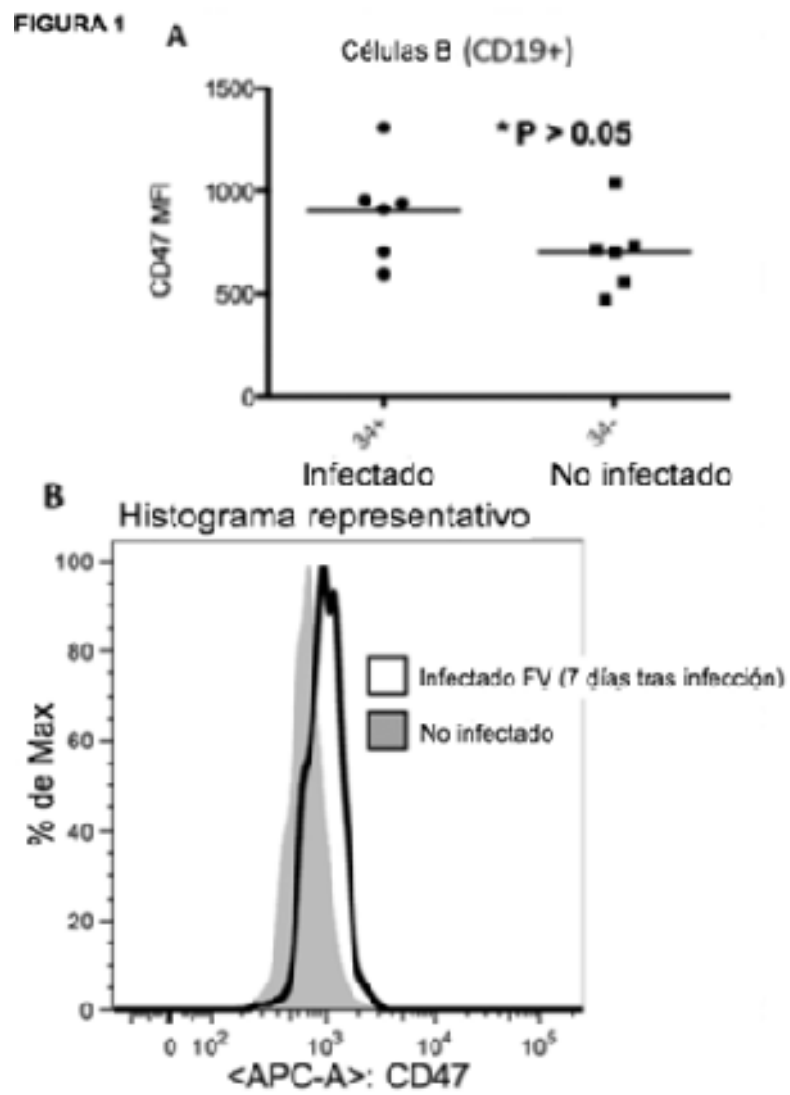
- (a) fragmento Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ o Fv; o
- (b) un diacuerpo.

12. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el agente anti-CD47 es un polipéptido derivado de SIRPα que se une específicamente con CD47.

13. La composición para el uso de la reivindicación 12, en donde el polipéptido derivado de SIRPα comprende por lo menos el dominio d1 de SIRPα con residuos de aminoácidos modificados para aumentar la afinidad.

14. La composición para el uso de la reivindicación 13, en donde el polipéptido derivado de SIRPα es una proteína de fusión, opcionalmente en donde el polipéptido derivado de SIRPα está fusionado en un marco con una región Fc de inmunoglobulina.

15. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el agente anti-CD47 es un polipéptido de CD47 soluble que se une específicamente con SIRPα y no estimula la señalización a través de SIRPα.



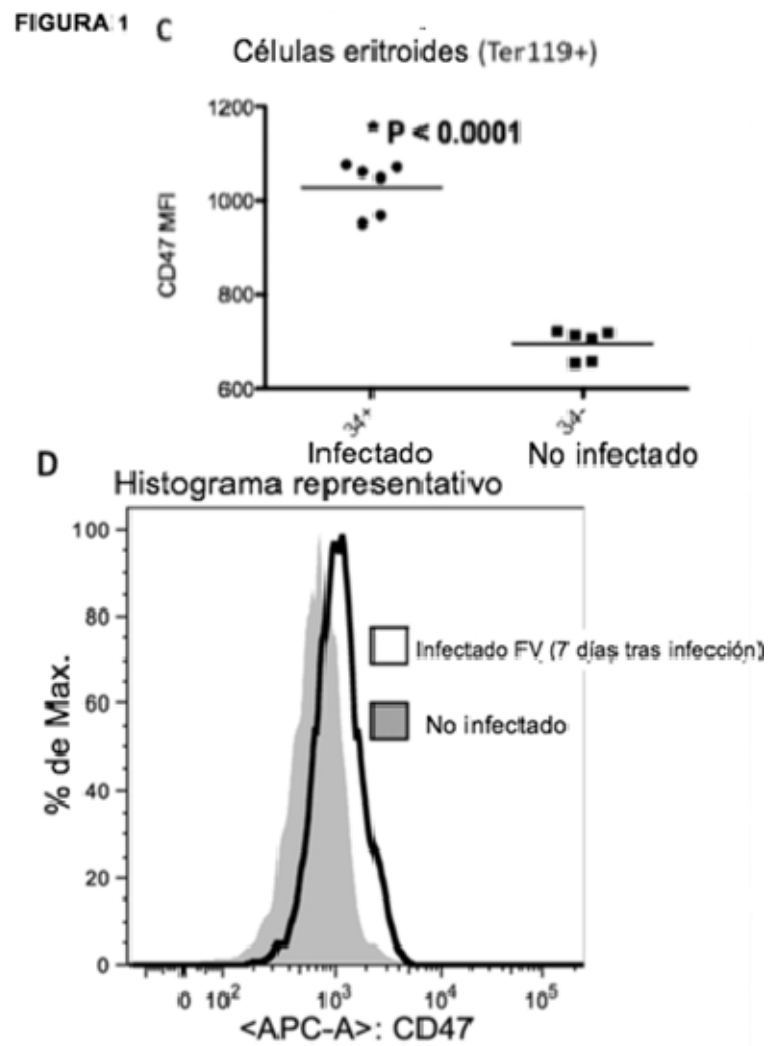
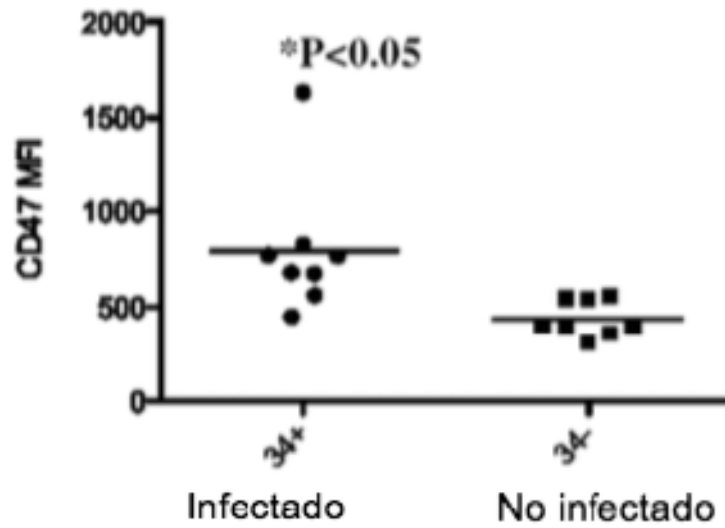


FIGURA 2

A. FR98 Virus



B. Histograma representativo

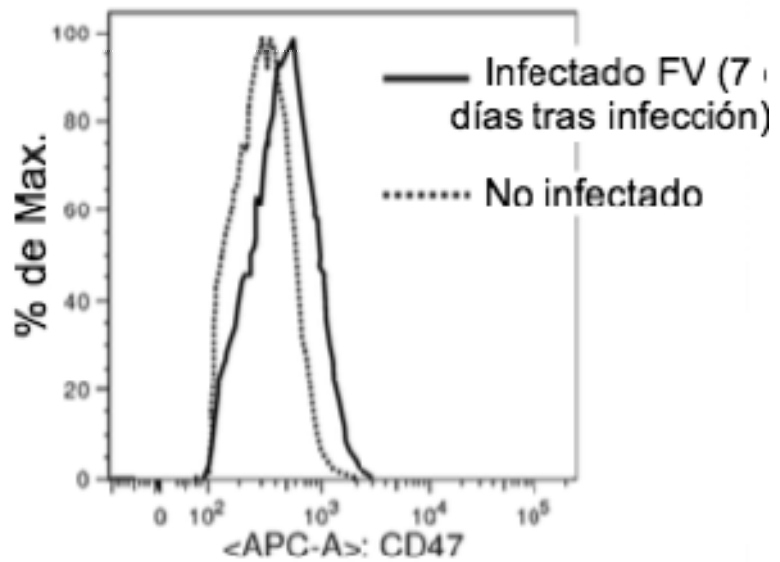


FIGURA 3

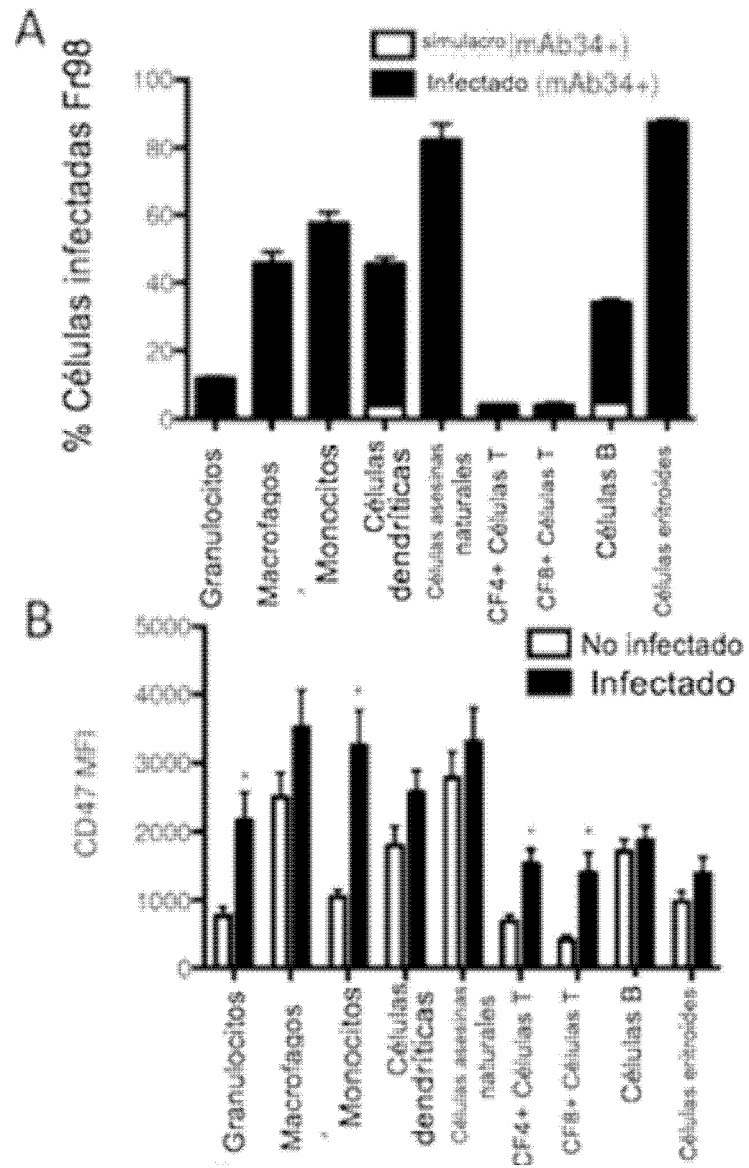


FIGURA 4 A Células T infectadas con VIH

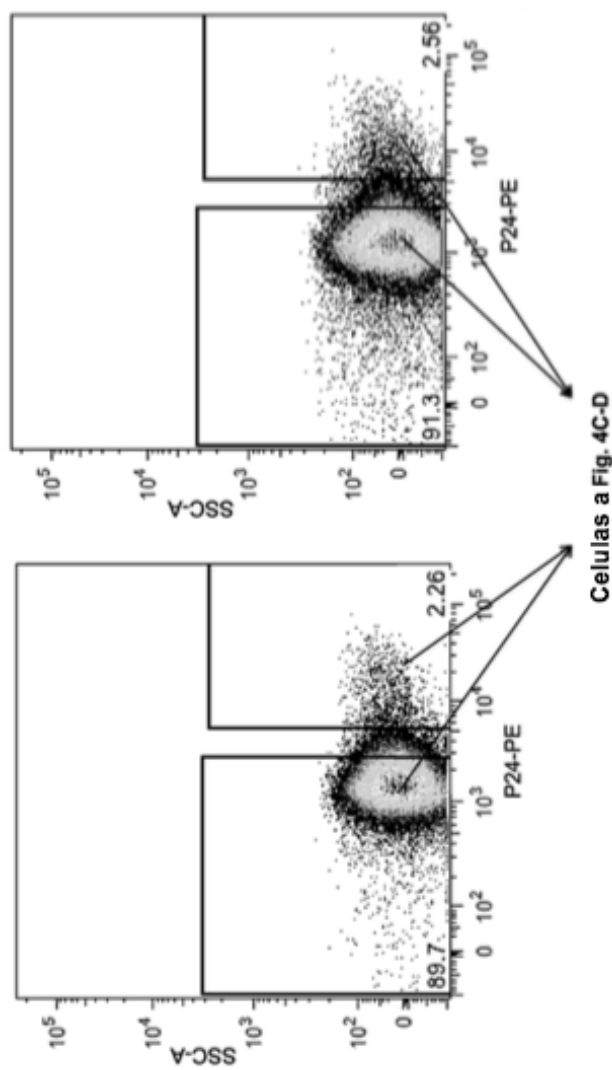


FIGURA 4 **B** Células T infectadas por simulacro

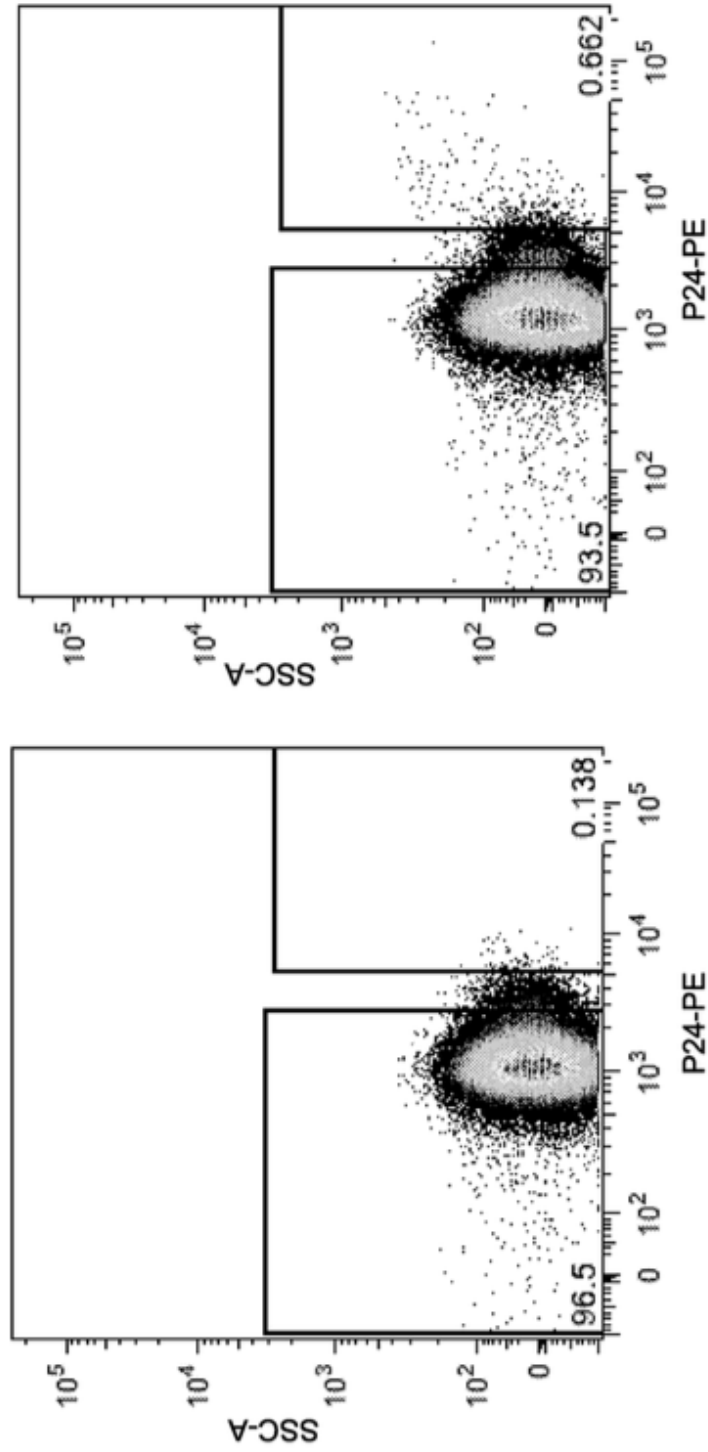


FIGURA 4

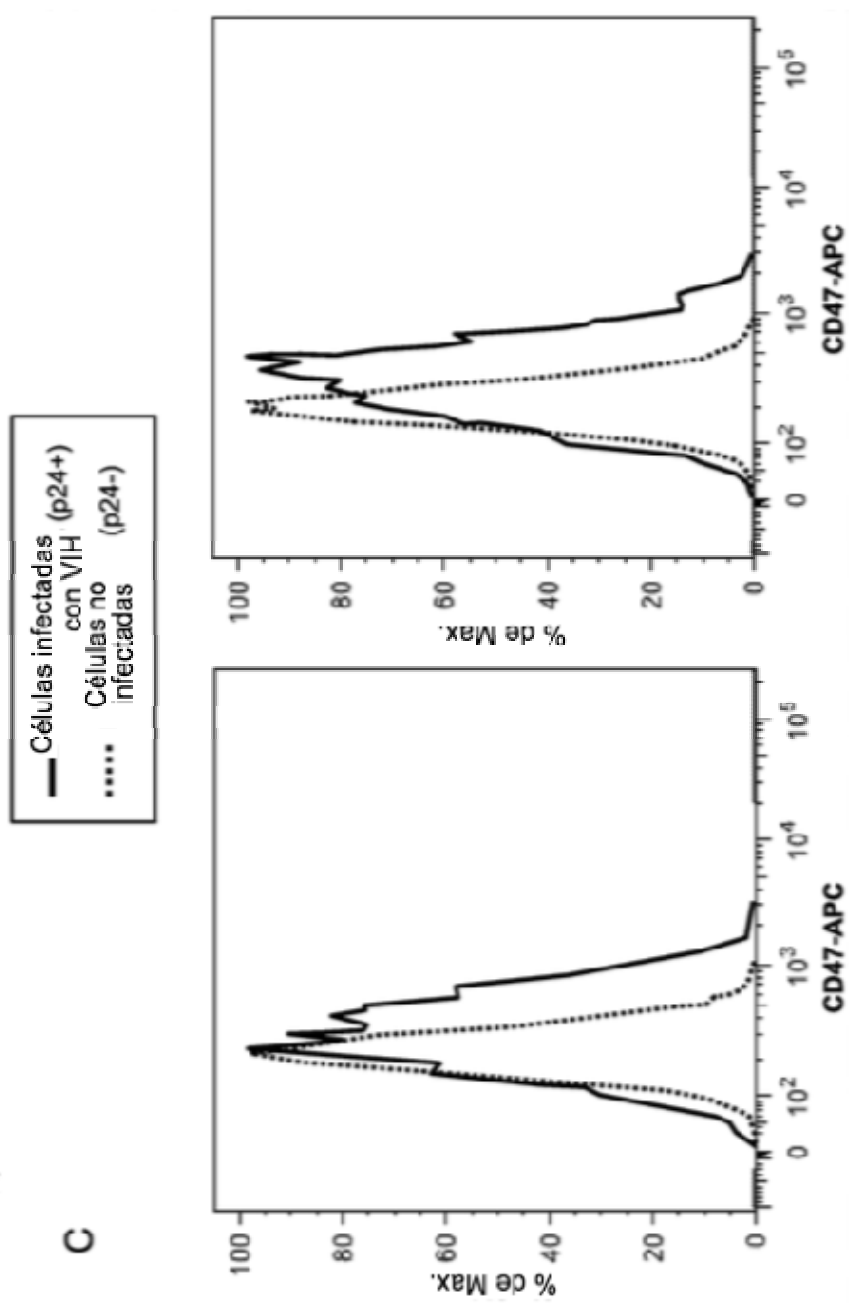


FIGURA 4

D

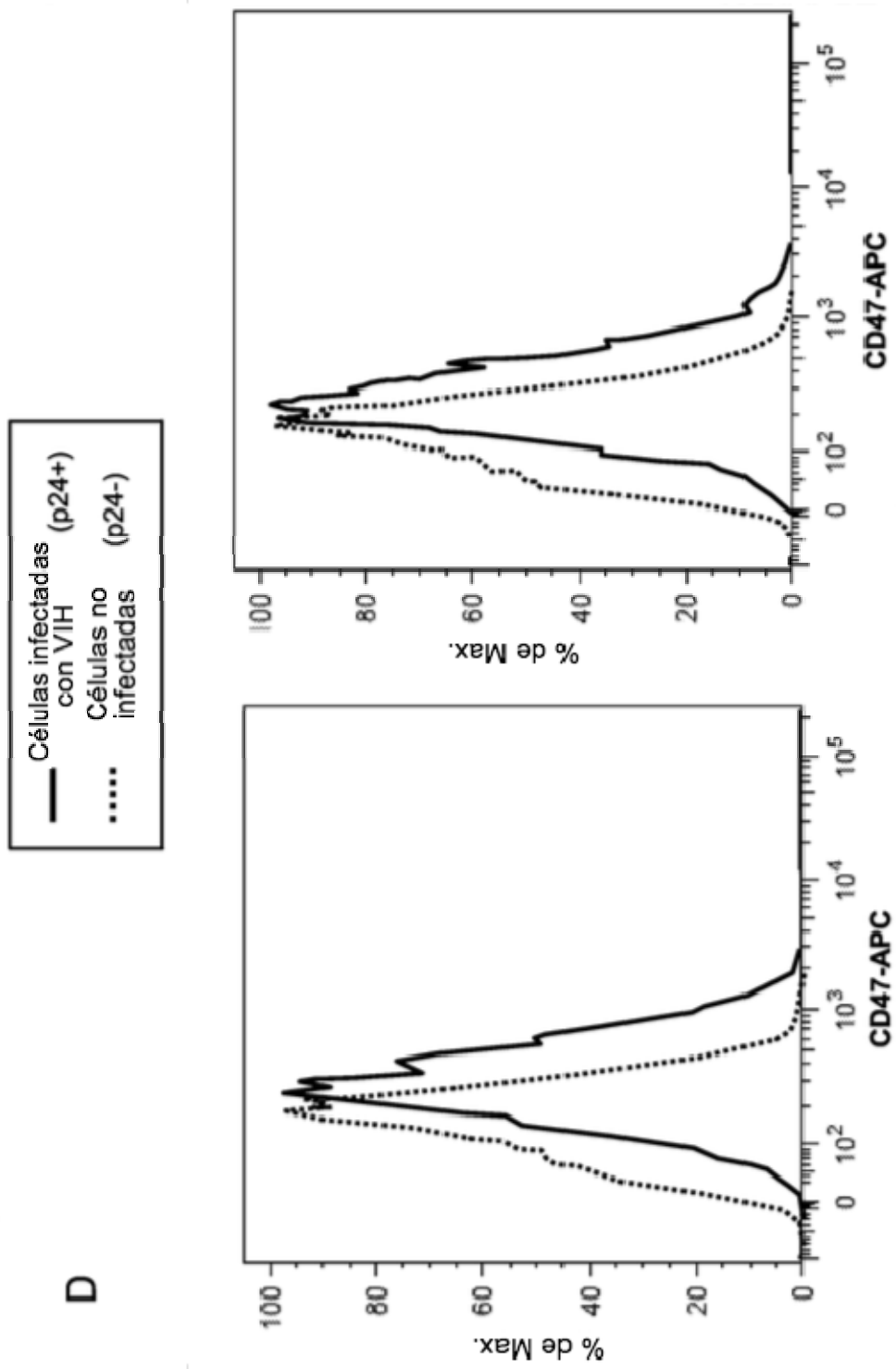


FIGURA 5

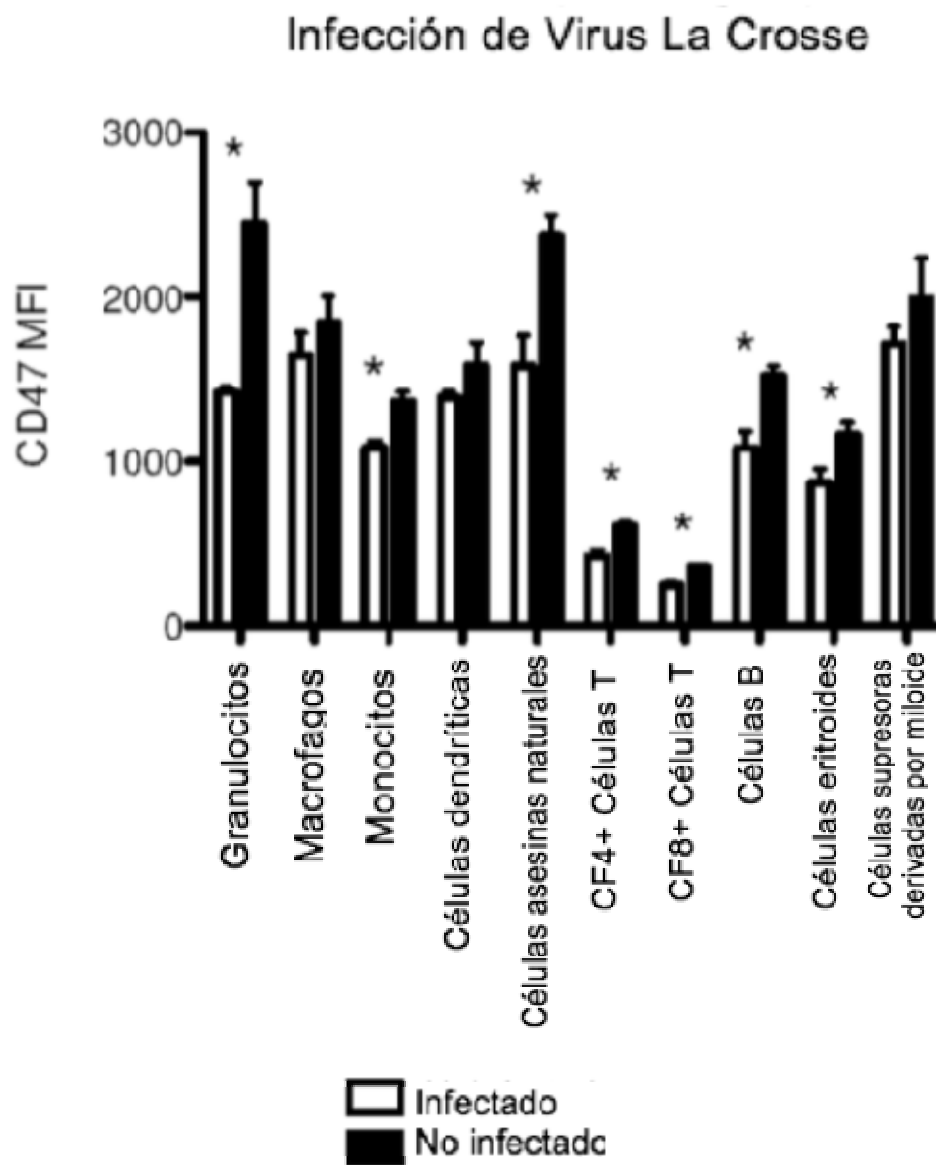
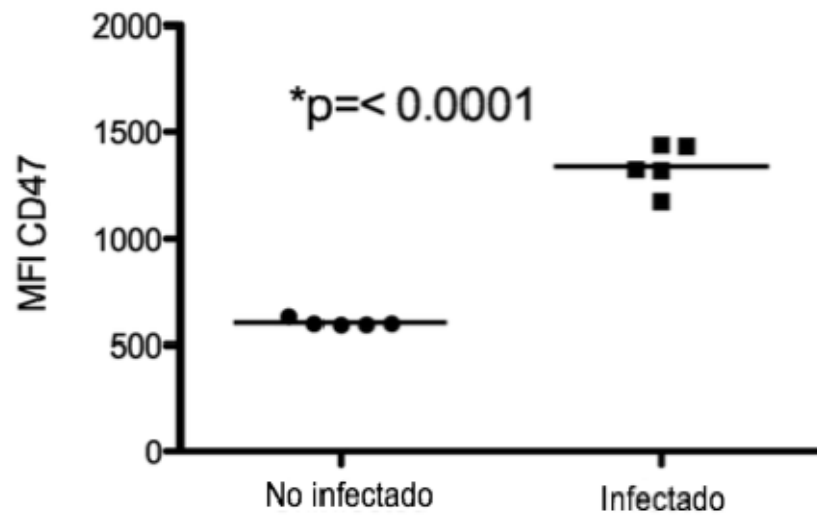


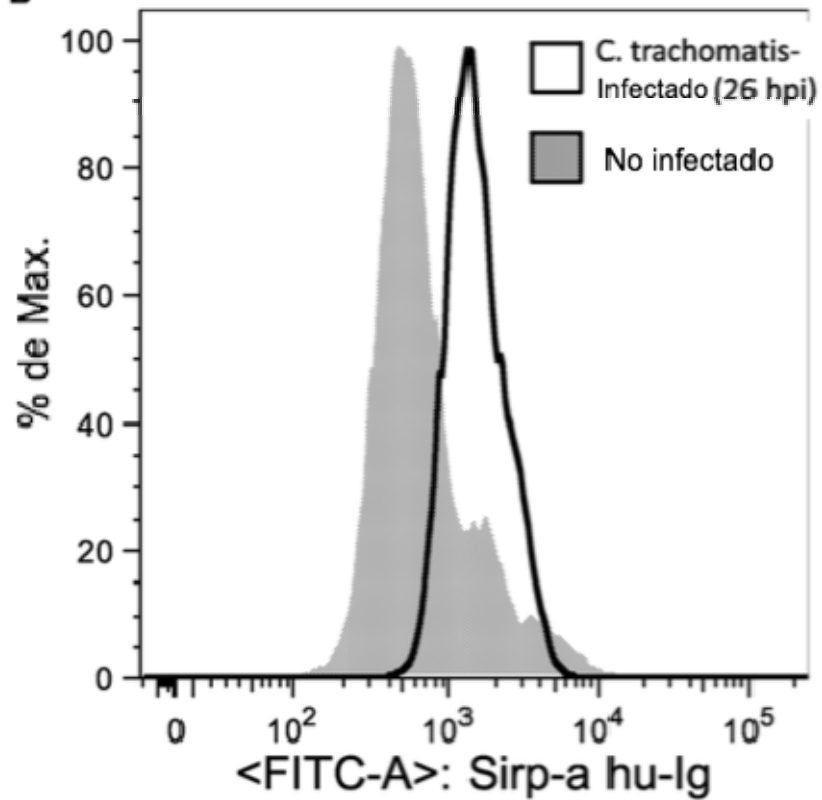
FIGURA 6

A

C. trachomatis serovar A



B



Fecha de implante	12/29/11
Edad de implante	26 semanas
Donante ID	#122811
Fecha de inoculación	6/28/12
Virus	VIH-1 YK-JRCSF; lote 11/16/07 (no diluido)
Inoculum	1.800 TCID ₅₀ por implante
Fecha de terminación	8/9/12 (42 días tras inoculación) 8/30/12 (63 días tras inoculación, 3 semanas tras iniciación de tratamiento)
Fármaco	anti-CD47 (Stanford, #SF9-hlgG4, 1,5 mg/ml, lote #6-18-12) control Ab (Stanford, #control h-IgG, 1,5 mg/ml, lote #6-18-12)
Ruta	intraperitoneal
Dosificación	300 µg tres veces a la semana (lunes, miércoles, viernes)
Volumen	200 µl
Iniciación de tratamiento	43 días tras inoculación por virus

Figura 7**A**

Grupo	Ratones/grupo	Virus	Fármaco	Dosis (µg)	Colección de implantes (semanas tras inoculación)	p24		VIH-1 ARN (copia log ₁₀ /células 10 ⁶)
						(pg/10 ⁶ células)	(% de control)	
A	3	JR-CSF	-	-	6	81 ± 1,9	51 ± 1,2	4,2 ± 0,07
B/C†	7	JR-CSF	anti-CD47	300	9	47 ± 6,3*	29 ± 3,9	4,4 ± 0,17
D/E†	6	JR-CSF	control Ab	300	9	96 ± 14**	60 ± 8,9	4,5 ± 0,16
F/G	6	JR-CSF	-	-	9	160 ± 43	100 ± 27	4,8 ± 0,16
H	3	Medio	-	-	6	negativo	0,0 ± 0,0	negativo
I/J	6	Medio	-	-	9	negativo	0,0 ± 0,0	negativo

Figura 7

B

* $P \leq 0,050$ ratones infectados por JR-CSF tratados de anti-CD47 (grupo B/C) comparados con ratones infectados con JR-CSF no tratados (grupo F/G) por la prueba Mann-Whitney U.

* $P \leq 0,050$ ratones infectados por JR-CSF tratados de control Ab (grupo D/E) comparados con ratones infectados con JR-CSF tratados con anti-CD47 (grupo B/C) por la prueba Mann-Whitney U.

†grupo B: raton #8 excluido de análisis (linfoma de cuerpo entero).

†grupo D: implante de ratón #15 excluido de análisis (perfil de células anormal).

Figura 7

C

Grupo	Ratones/grupo	Virus	Fármaco	Análisis FACS						
				Gag-p24 ⁺ timocitos (%)	CD4 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	Relación CD4/CD8	Intensidad de fluorescencia media W6/32	Timocitos vivos (%)
A	3	JR-CSF	-	0,77 ± 0,12	80 ± 2,6	6,9 ± 1,2	3,4 ± 0,56	2,0 ± 0,07	770 ± 580	70 ± 2,0
B/C [†]	7	JR-CSF	anti-CD47	0,54 ± 0,06	70 ± 7,5	18 ± 5,3	6,8 ± 0,13*	2,6 ± 0,13*	2800 ± 190	44 ± 5,2
D/E [†]	6	JR-CSF	control Ab	0,81 ± 0,19	84 ± 1,7**	7,7 ± 0,39**	4,1 ± 0,41	1,9 ± 0,11**	3100 ± 130	47 ± 3,6
F/G	6	JR-CSF	-	0,62 ± 0,05	76 ± 4,6	9,3 ± 1,4	4,9 ± 0,53	1,8 ± 0,13	3000 ± 190	49 ± 2,8
H	3	Medio	-	0,45 ± 0,06	77 ± 2,5	8,1 ± 1,6	3,9 ± 1,3	2,3 ± 0,41	2700 ± 430	77 ± 1,8
I/J	6	Medio	-	0,34 ± 0,11	78 ± 6,3	13 ± 4,4	4,3 ± 1,0	2,7 ± 0,20	2000 ± 64	45 ± 6,8

* $P \leq 0,050$ ratones infectados por JR-CSF tratados de anti-CD47 (grupo B/C) comparados con ratones infectados con JR-CSF no tratados (grupo F/G) por la prueba Mann-Whitney U.

** $P \leq 0,050$ ratones infectados por JR-CSF tratados de control Ab (grupo D/E) comparados con ratones infectados con JR-CSF tratados con anti-CD47 (grupo B/C) por la prueba Mann-Whitney U.

[†]grupo B: raton #8 excluido de análisis (linfoma de cuerpo entero).

[†]grupo D: implante de ratón #15 excluido de análisis (perfil de células anormal).

Figura 7 D

Grupo	Ratones/grupo	Virus	Fármaco	Rendimiento celular total (10 ⁶)	Rendimiento de timocito vivo (10 ⁶)	Cambio de peso corporal (%)
A	3	JR-CSF	-	310 ± 60	210 ± 38	N/A
B/C†	7	JR-CSF	anti-CD47	110 ± 64	57 ± 36	-3,0
D/E†	6	JR-CSF	control <u>Ab</u>	140 ± 32	63 ± 13	-2,2
F/G	6	JR-CSF	-	240 ± 72	120 ± 40	-3,2
H	3	Medio	-	490 ± 72	370 ± 47	N/A
I/J	6	Medio	-	190 ± 49	99 ± 29	-4,5

†grupo B: raton #8 excluido de análisis (linfoma de cuerpo entero).

†grupo D: implante de ratón #15 excluido de análisis (perfil de células anormal).