



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 938 652**

⑮ Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2018 PCT/US2018/056442**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2019 WO19079549**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2018 E 18807145 (0)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2022 EP 3697819**

④ Título: **Tratamiento del cáncer de ovario con anti-CD47 y anti-PD-L1**

⑩ Prioridad:

18.10.2017 US 201762574073 P

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.04.2023

⑩ Titular/es:

FORTY SEVEN, INC. (100.0%)
333 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404, US

⑩ Inventor/es:

TAKIMOTO, CHRIS HIDEKI, MIZUFUNE;
VOLKMER, JENS-PETER y
CHAO, MARK, PING

⑩ Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 938 652 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento del cáncer de ovario con anti-CD47 y anti-PD-L1

5 ANTECEDENTES

[0001] El cáncer de ovario es la causa más frecuente de muerte por cáncer ginecológico en los EE. UU. La terapia sistémica estándar para pacientes recién diagnosticados con enfermedad avanzada generalmente implica el uso de quimioterapia basada en platino con o sin agentes antiangiogénicos. Más recientemente, los agentes dirigidos, como los inhibidores de PARP, se han utilizado en mujeres con enfermedad avanzada y mutaciones BRCA. Sin embargo, las inmunoterapias más nuevas, como los inhibidores de puntos de control, no han impactado los resultados clínicos lo suficiente como para convertirse en el estándar de atención. En mujeres con cáncer de ovario recurrente, el intervalo libre de platino (PFI), definido como el intervalo entre la última dosis de platino y la fecha de la recaída, está fuertemente relacionado con la probabilidad de respuesta a la quimioterapia posterior. Los pacientes con una PFI de más de 1 mes, pero menos de 6 meses históricamente se denominaron resistentes al platino, y estos pacientes han tenido opciones de tratamiento limitadas. Por lo tanto, el desarrollo de tratamientos efectivos contra el cáncer para estos pacientes abordaría una importante necesidad médica no satisfecha.

[0002] La capacidad natural del sistema inmunológico para detectar y destruir células anormales puede prevenir el desarrollo de muchos cánceres. Sin embargo, las células cancerosas a veces pueden evitar que el sistema inmunitario las detecte y las destruya. Las células cancerosas pueden reducir la expresión de antígenos tumorales en su superficie, lo que dificulta que el sistema inmunitario los detecte; expresan proteínas en su superficie que inducen la inactivación de células inmunitarias; y/o inducen a las células en el microambiente a liberar sustancias que suprimen las respuestas inmunitarias y promueven la proliferación y supervivencia de las células tumorales.

[0003] Se han desarrollado inmunoterapias contra el cáncer para potenciar las respuestas inmunitarias contra los tumores, estimulando componentes específicos del sistema inmunitario; o contrarrestando las señales producidas por las células cancerosas que suprimen las respuestas inmunitarias.

[0004] Un enfoque bloquea las proteínas del punto de control inmunitario, que limitan la fuerza y la duración de las respuestas inmunitarias. Estas proteínas normalmente controlan las respuestas inmunitarias al evitar respuestas demasiado intensas que podrían dañar tanto las células normales como las células anormales. El bloqueo de la actividad de las proteínas del punto de control inmunitario libera los "frenos" del sistema inmunitario, lo que aumenta su capacidad para destruir las células cancerosas.

[0005] Los inhibidores de puntos de control inmunitarios en uso clínico actual incluyen ipilimumab, que bloquea la actividad de CTLA4, que se expresa en la superficie de los linfocitos T citotóxicos activados. CTLA4 actúa como un "interruptor" para inactivar estas células T, reduciendo así la fuerza de las respuestas inmunitarias; su inhibición aumenta la respuesta de las células T citotóxicas. Otros dos inhibidores de puntos de control aprobados por la FDA, nivolumab y pembrolizumab, funcionan de manera similar, pero se dirigen a la PD-1. Un tercer inhibidor de puntos de control aprobado por la FDA, Avelumab, se dirige a PD-L1.

[0006] Otras formas de inmunoterapia usan proteínas que normalmente ayudan a regular o modular la actividad del sistema inmunitario para potenciar la respuesta inmunitaria del cuerpo contra el cáncer, por ejemplo, interleucinas e interferones. Los anticuerpos dirigidos a antígenos de células tumorales también se utilizan clínicamente.

[0007] Algunas formas de inmunoterapia aprovechan el sistema inmunitario innato. La proteína CD47 de la superficie celular en células sanas y su participación en un receptor de fagocitos, SIRP α , constituye una señal clave de "no me comas" que puede desactivar el engullimiento mediado por múltiples modalidades, incluida la eliminación de células apoptóticas y la fagocitosis mediada por FcR. El bloqueo de la participación mediada por CD47 de SIRP α en un fagocito, o la pérdida de la expresión de CD47 en ratones knockout, puede provocar la eliminación de células vivas y eritrocitos no envejecidos. Alternativamente, el bloqueo del reconocimiento de SIRP α también permite la absorción de objetivos que normalmente no se fagocitan. También se ha demostrado que el tratamiento con anticuerpos anti-CD47 no solo permite la fagocitosis de macrófagos del cáncer, sino que también puede iniciar una respuesta inmunitaria de células T citotóxicas antitumorales.

[0008] Las combinaciones de agentes reguladores inmunitarios con bloqueo de CD47 también pueden potenciar la eficacia de los agentes reguladores inmunitarios al promover la presentación de antígenos tumorales y el agotamiento de las células inmunitarias inhibidoras. Esto permite acortar el período de tratamiento y, por lo tanto, reduce la duración y la importancia de las posibles toxicidades y efectos secundarios.

[0009] Las publicaciones relacionadas incluyen "Engineered Sirp alpha Variants As Immunotherapeutic Adjuvants To Anticancer Antibodies." Science 341 (6141): 88-91; Willingham, SB, JP Volkmer, et al. (2012). "The Cd47-Signal Regulatory Protein Alpha (Sirpa) Interaction Is A Therapeutic Target For Human Solid Tumors." Proc Natl Acad Sci EE. UU. 109(17): 6662-6667. Chao, MP, AA Alizadeh, et al. (2010). "Anti-Cd47 Antibody Synergizes With Rituximab To Promote Phagocytosis And Eradicate Non-Hodgkin Lymphoma." Cell 142(5): 699-713. Boyerinas B, Jochems C, Fantini

M, Heery CR, Gulley JL, Tsang, KY y Schlom J. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-LI Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells Cancer Immunol Res 2015;3(10): 1148-57. Davis A, Tinker AV, Friedlander M. Cáncer de ovario "Platinum resistant" ovarian cancer: What is it, who to treat and how to measure benefit? Gynecol Oncol 2014;133:624-631. Disis ML, Patel MR, Pant S, Hamilton EP, Lockart AC, Kelly K, Beck JT, Gordon MS, Weiss, GJ, Taylor MH, Chaves J, Mita AC, Chin KM, von Heydebreck A, Cuillerot JM, Gulley JL. Avelumab (MSB0010718C; anti-PD-LI) en pacientes con cáncer de ovario recurrente/refractario del ensayo fase 1b JAVELIN Solid Tumor phase 1b trial: Safety and clinical activity. J Clin Oncol 34, 2016 (suplemento; resumen 5533). Rustin GJS, Vergote I, Eisenhauer E, et al. Definitions for Response and Progression in Ovarian Cancer Clinical Trials Incorporating RECIST 1.1 and CA 125 Agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIG). Int J Gynecol Cancer 2011;21: 419-423. Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, 3 et al. Grupo de trabajo RECIST. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. Lancet Oncol. 2017 marzo;18(3):e143-e152. Tseng D, Volkmer JP, Willingham SB, et al., Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor. PNAS 2013;110(27):11103-11108. Wilson MK 1, Pujade-Lauraine E, Aoki D, et al. Fifth Ovarian Cancer Consensus Conference of the Gynecologic Cancer InterGroup: recurrent disease. Annals of Oncol 2017; 28: 727-732. Yanagita T, Murata Y, Tanaka D, et al, Anti-SIRPa antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. JCI Insight, 2017;2(1):e89140. Related applications include: Methods for Achieving Therapeutically Effective Doses of anti-CD47 Agents for Treating Cancer, patente de EE. UU. Nº 9.623,079. Treatment of cancer with combinations of immunoregulatory agents, publicación de patente EE. UU. Nº US 2017/0210803.

20 [0010] El documento WO 2017/127707 describe el tratamiento del cáncer con combinaciones de agentes inmunorreguladores. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico)

25 RESUMEN

[0011] La invención proporciona un anticuerpo anti-CD47 para usar en un método de tratamiento de un sujeto humano resistente al platino que tiene cáncer de ovario epitelial, que comprende

30 a. administrar una dosis de sensibilización del anticuerpo anti-CD47 al sujeto, siendo la dosis de sensibilización 1 mg/kg del anticuerpo anti-CD47; y
 b. administrar una dosis terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-CD47 al sujeto, donde la dosis terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-CD47 es de 20 a 60 mg/kg, y donde el paso (b) se realiza después de al menos aproximadamente 7 días después de comenzar el paso (a) y cada 7 días a partir de entonces; y
 35 c. administrar Avelumab al sujeto, donde la dosis de Avelumab es de 10 mg/kg, y donde el paso (c) se realiza al menos aproximadamente 7 días después del paso (a) y cada 14 días a partir de entonces, donde el anticuerpo anti-CD47 tiene la fuerte secuencias de cadena y cadena ligera de SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente.

40 [0012] Se proporcionan métodos para tratar a un individuo, por ejemplo, un sujeto humano, con una combinación terapéutica de un anticuerpo anti-CD47 y un anticuerpo anti-PD-LI. Un beneficio de la presente invención puede ser el uso de dosis más bajas de los agentes, por ejemplo, el anticuerpo anti-CD47 y el anticuerpo anti-PD-LI, en relación con la dosis requerida como agente inmunorregulador único o una combinación de agentes inmunorreguladores, en ausencia de bloqueo de CD47. Un beneficio de la presente invención también puede ser, o alternativamente, una disminución en el tiempo requerido para el tratamiento, en relación con el tiempo requerido para el tratamiento como un solo agente inmunorregulador, o una combinación de agentes inmunorreguladores en ausencia de bloqueo de CD47. Un beneficio de la presente invención también puede ser, o alternativamente, una respuesta mejorada con respecto a la respuesta observada después del tratamiento con un solo agente inmunorregulador o una combinación de agentes inmunorreguladores en ausencia de bloqueo de CD47.

45 [0013] Los métodos descritos en el presente documento comprenden la administración de un anticuerpo anti-CD47. En algunos casos, el anticuerpo comprende una región Fc de IgG4 humana. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD47 compite por unirse a CD47 con Hu5F9-G4. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD47 se une al mismo epítopo de CD47 que Hu5F9-G4. En otros casos, el anticuerpo anti-CD47 es Hu5F9-G4.

50 [0014] Los métodos de la divulgación comprenden la administración de un anticuerpo anti-PD-LI. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-LI es Avelumab (Bavencio®).

[0015] En la invención, el anticuerpo anti-CD47 es Hu5F9-G4 y el anticuerpo anti-PD-LI es Avelumab (Bavencio®)

55 [0016] En algunas formas de realización, el cáncer de ovario es un tumor seroso, un tumor mucinoso, un tumor de células claras tumor, tumor de endometrio, tumor de células de transición, tumor de Brenner, tumor de carcinosarcoma, tumor epitelial mixto, tumor epitelial borderline, tumor de carcinoma indiferenciado, tumor de las trompas de Falopio o tumor peritoneal primario. En algunas formas de realización, el cáncer de ovario epitelial es un tumor seroso, por ejemplo, el cáncer de ovario de tumor seroso es de bajo o alto grado según lo determinado por subtipificación del análisis histológico. En algunas formas de realización, el tipo de tumor se determina mediante análisis histológico.

- [0017] En algunas formas de realización, el sujeto no tiene experiencia con anticuerpos anti-PD-L1. El sujeto es resistente al platino.
- [0018] Los métodos de la presente divulgación comprenden la administración del anticuerpo anti-CD47 y/o el anticuerpo anti-PDL1 mediante cualquier suministro apropiado. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD47 y/o el anticuerpo anti-PD-L1 se administran por vía intraabdominal. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD47 y/o el anticuerpo anti-PD-L1 se administran por vía intratumoral. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD47 y/o el anticuerpo anti-PD-L1 se administran por vía intravenosa. El anticuerpo anti-CD47 y el anticuerpo anti-PD-L1 se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente.
- [0019] En algunas formas de realización de la invención, la administración del anticuerpo anti-CD47 y/o el anticuerpo anti-PD-L1 reducen el nivel de marcadores de cáncer tales como CA125, HE4 (proteína 4 del epidídimo humano), CA-72-4, CA-19-9 y CEA; en comparación con la línea de base. En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-CD47 y/o el anticuerpo anti-PD-L1 reduce CA125 en el sujeto en comparación con la línea de base. En algunas formas de realización, el nivel de CA125 se mide aproximadamente una vez al mes. En otras formas de realización, la administración reduce el nivel de CA125 en el sujeto en al menos 30-90, 40-80, 50-70, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % en comparación con el valor inicial. En otras formas de realización, la administración reduce el tamaño del cáncer o metástasis del mismo en comparación con el valor inicial, opcionalmente según lo medido por imágenes, opcionalmente en el que las imágenes son CT/PET/CT o MRI, que comprende opcionalmente una enfermedad que aumenta inicialmente desde el valor inicial pero que posteriormente disminuye de tamaño.
- [0020] En algunos casos, un régimen terapéutico para el tratamiento del cáncer comprende la administración de una dosis de carga de un anticuerpo anti-CD47, que incluye, entre otros, 5F9-G4, donde la dosis de carga se administra dos veces por semana a una dosis de 20 mg/kg a 67,5 mg/kg; y puede administrarse dos veces por semana a una dosis de 20 mg/kg a 30 mg/kg. A continuación, se administra al paciente una dosis de mantenimiento, semanal o quincenalmente, a una dosis de 10 mg/kg a 40 mg/kg; y puede estar en una dosis de 20 mg/kg a 30 mg/kg. En algunos de estos casos, el cáncer es un cáncer de ovario. En la invención, el cáncer es un cáncer de ovario epitelial, por ejemplo, un tumor seroso, un tumor mucinoso, un tumor de células claras, un tumor de endometrio, un tumor de células de transición, un tumor de Brenner, un tumor de carcinosarcoma, un tumor epitelial mixto, un tumor epitelial límitrofe, un tumor de carcinoma indiferenciado, un tumor de las trompas de Falopio o tumor peritoneal primario.
- [0021] La cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PD-L1 es de 10 mg/kg. El anticuerpo anti-PD-L1 se administra cada 14 días. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 se administra 7 días después de la dosis de sensibilización y cada 14 días a partir de entonces. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 se administra el mismo día que la dosis inicial y cada 14 días a partir de entonces.
- [0022] En el presente documento también se describe una composición que comprende un anticuerpo anti-CD47 y un anticuerpo anti-PD-L1. En el presente documento también se describe un kit que comprende un anticuerpo anti-CD47, un anticuerpo anti-PD-L1 e instrucciones de uso.
- 40 DESCRIPCIÓN DETALLADA**
- [0023] Se proporcionan métodos para el tratamiento del cáncer de ovario en un sujeto o para reducir el tamaño del cáncer de ovario, comprendiendo el tratamiento administrar al sujeto un anticuerpo anti-CD47 y un anticuerpo anti-PD-L1.
- [0024] Antes de describir los presentes agentes activos y métodos, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, productos, aparatos y factores particulares descritos, ya que tales métodos, aparatos y formulaciones pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir formas de realización particulares únicamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.
- [0025] Debe señalarse que tal como se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "y" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un fármaco candidato" se refiere a uno o mezclas de tales candidatos, y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, etc.
- [0026] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.
- [0027] Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro establecido o el valor intermedio en ese rango establecido está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños que también están incluidos dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen cualquiera de los dos límites incluidos también se incluyen en la invención.

5 [0028] En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión más completa de la presente invención. Sin embargo, será evidente para un experto en la técnica que la presente invención se puede poner en práctica sin uno o más de estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito características y procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para evitar oscurecer la invención.

10 [0029] En general, en la presente invención se emplean métodos convencionales de síntesis de proteínas, cultivo de células recombinantes y aislamiento de proteínas, y técnicas de ADN recombinante dentro del conocimiento de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, véase, por ejemplo, Maniatis, Fritsch & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Sambrook, Russell y Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2001); Harlow, Lane y Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); y Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988).

15 **Definiciones**

20 [0030] Como se usa aquí, un "anticuerpo anti-CD47" se refiere a cualquier anticuerpo que reduce la unión de CD47 (*p. ej.*, en una célula diana) a SIRPa (*p. ej.*, en una célula fagocítica). Los ejemplos no limitantes se describen con más detalle a continuación e incluyen, entre otros, Hu5F9-G4.

25 [0031] Como se describe con más detalle a continuación, un anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo que inhibe la unión de PD-L1 (ligando de PD1) a PD1 (muerte programada 1). Los ejemplos incluyen avelumab.

30 [0032] Como se usa en el presente documento, "anticuerpo" incluye la referencia a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno particular, e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. El término también incluye formas modificadas genéticamente tales como anticuerpos químicos (*p. ej.*, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados. El término "anticuerpo" también incluye formas de unión a antígeno de anticuerpos, incluidos fragmentos con capacidad de unión a antígeno (*p. ej.*, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y rlgG). El término también se refiere a fragmentos Fv de cadena sencilla recombinantes (scFv). El término anticuerpo también incluye moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. A continuación, se encuentra una descripción adicional del término anticuerpo.

35 [0033] Un "paciente" para los fines de la presente descripción incluye tanto humanos como otros animales, particularmente mamíferos, incluidos animales domésticos y de laboratorio, por ejemplo, ratones, ratas, conejos, *etc.* Por lo tanto, los métodos son aplicables tanto a la terapia humana como a aplicaciones veterinarias. En un caso, el paciente es un mamífero, preferiblemente un primate. En la invención, el paciente es un ser humano.

40 [0034] Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un mamífero que se evalúa para tratamiento y/o está siendo tratado. En la invención, el mamífero es un ser humano. Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" abarcan, sin limitación, individuos que tienen cáncer. Los sujetos pueden ser humanos, pero también incluyen otros mamíferos, particularmente aquellos mamíferos útiles como modelos de laboratorio para enfermedades humanas, por ejemplo, ratones, ratas, *etc.*

45 [0035] Como se usa en este documento, la frase "sensible al platino" se refiere a un sujeto humano que desarrolla una enfermedad recurrente más de 6 meses después de recibir la última quimioterapia basada en platino.

50 [0036] Como se usa en el presente documento, la frase "resistente al platino" se refiere a un sujeto humano que desarrolla una enfermedad recurrente menos de 6 meses después de recibir la última quimioterapia basada en platino.

[0037] Como se usa en el presente documento, el término "línea de base" se define como un período de 30 días antes de la administración del primer tratamiento a un sujeto humano con cáncer de ovario.

55 [0038] El término "muestra" con respecto a un paciente abarca muestras de sangre y otros líquidos de origen biológico, muestras de tejido sólido, como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de los mismos y su descendencia. La definición también incluye muestras que hayan sido manipuladas de cualquier manera después de su obtención, como por tratamiento con reactivos, lavadas o enriquecimiento para ciertas poblaciones celulares, como 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 resección quirúrgica, 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 una célula cancerosa de un paciente, por ejemplo, una muestra que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos que se obtiene de una célula cancerosa de un paciente (por ejemplo, un lisado celular u otro extracto celular que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos); y una muestra que comprende células cancerosas de un paciente. Una muestra biológica que comprende una célula cancerosa de un paciente también puede incluir células no cancerosas.

65 [0039] El término "diagnóstico" se utiliza aquí para referirse a la identificación de un estado, enfermedad o condición

molecular o patológica, tal como la identificación de un subtipo molecular de cáncer de mama, cáncer de próstata u otro tipo de cáncer.

5 **[0040]** El término "pronóstico" se usa aquí para referirse a la predicción de la probabilidad de muerte o progresión atribuible al cáncer, incluyendo recurrencia, diseminación metastásica y resistencia a fármacos, de una enfermedad neoplásica, tal como cáncer de ovario. El término "predicción" se usa aquí para referirse al acto de predecir o estimar, basado en la observación, la experiencia o el razonamiento científico. En un ejemplo, un médico puede predecir la probabilidad de que un paciente sobreviva, después de la extirpación quirúrgica de un tumor primario y/o quimioterapia durante un cierto período de tiempo sin recurrencia del cáncer.

10 **[0041]** Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" y similares, se refieren a administrar un agente, o llevar a cabo un procedimiento, con el fin de obtener un efecto. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención total o parcial de una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de efectuar una cura parcial o completa de una enfermedad y/o síntomas de la enfermedad. "Tratamiento", tal como se usa en el presente documento, puede incluir el tratamiento de un tumor en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad o un síntoma de una enfermedad ocurra en un sujeto que puede estar predisposto a la enfermedad, pero aún no se le ha diagnosticado que la tiene (p. ej., incluidas las enfermedades que pueden estar asociadas o ser causadas por una enfermedad primaria; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, causar regresión de la enfermedad

15 **[0042]** El tratamiento puede referirse a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o la mejora o la prevención de un cáncer, incluido cualquier parámetro objetivo o subjetivo como la reducción, la remisión, la disminución de los síntomas o hacer que la condición de la enfermedad sea más tolerable para el paciente, disminuir la tasa de degeneración o declive, o hacer que el punto final de la degeneración sea menos debilitante. El tratamiento o la mejora de los síntomas puede basarse en 20 parámetros objetivos o subjetivos, incluidos los resultados de un examen por un médico. Por consiguiente, el término "tratar" incluye la administración de los compuestos o agentes de la presente invención para prevenir o retrasar, aliviar o detener o inhibir el desarrollo de los síntomas o condiciones asociadas con el cáncer u otras enfermedades. El término "efecto terapéutico" se refiere a la reducción, eliminación o prevención de la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o los efectos secundarios de la enfermedad en el sujeto.

25 **[0043]** "En combinación con", "terapia de combinación" y "productos de combinación" se refieren, en ciertas formas de realización, a la administración simultánea a un paciente de los agentes descritos en el presente documento. Cuando se administra en combinación, cada componente puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden 30 en diferentes puntos en el tiempo. Por lo tanto, cada componente se puede administrar por separado, pero lo suficientemente cerca en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

35 **[0044]** "Administración concomitante" de agentes activos significa la administración con los reactivos en el momento en que los agentes tendrán un efecto terapéutico al mismo tiempo. Dicha administración concomitante puede implicar la administración concurrente (es decir, al mismo tiempo), anterior o posterior de los agentes. Un experto en la materia no tendría dificultad para determinar el momento, la secuencia y las dosis de administración apropiados para fármacos y 40 composiciones particulares de la presente invención.

45 **[0045]** Como se usa en el presente documento, el término "se correlaciona" o "se correlaciona con" y términos similares se refiere a una asociación estadística entre instancias de dos eventos, donde los eventos incluyen números, conjuntos de datos y similares. Por ejemplo, cuando los eventos involucran números, una correlación positiva (también denominada en el presente documento "correlación directa") significa que a medida que uno aumenta, el otro también aumenta. Una correlación negativa (también denominada en el presente documento "correlación inversa") significa que a medida que una aumenta, la otra disminuye.

50 **[0046]** "Unidad de dosificación" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el individuo particular a tratar. Cada unidad puede contener una cantidad predeterminada de compuesto(s) activo(s) calculado(s) para producir el(los) efecto(s) terapéutico(s) deseado(s) en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación puede estar dictada por (a) las características únicas de los compuestos activos y los efectos terapéuticos particulares que se lograrán, y (b) las limitaciones inherentes a la 55 técnica de preparar dichos compuestos activos.

[0047] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar el tratamiento de esa enfermedad.

60 **Métodos de tratamiento**

[0048] Se proporcionan métodos para tratar a un sujeto humano que tiene cáncer de ovario o reducir el tamaño del cáncer de ovario, comprendiendo el método administrar al sujeto un anticuerpo anti-CD47 y un anticuerpo anti-PD-L1. Dichos métodos incluyen administrar a un sujeto que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis 65 eficaz de los agentes combinados de la descripción, incluidas, entre otras, las combinaciones con un ESA.

- [0049]** Los anticuerpos anti-PD-L1 pueden potenciar la eficacia de los anticuerpos anti-CD47. El anticuerpo anti-CD47 se puede administrar en combinación o antes del anticuerpo anti-PD-L1 para simular la sensibilización de las células T específicas del tumor que pueden expandirse si se bloquea la vía inhibidora anti-PD1/PD-L1.
- 5 **[0050]** Se administra una combinación de un anticuerpo anti-CD47 con un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en el presente documento a pacientes con subtipos de tumores que responden a estas terapias. Estos tumores pueden definirse por una mayor frecuencia de mutaciones, lo que da como resultado más antígenos tumorales y, por lo tanto, son más inmunogénicos, como se describe en este documento. En algunas formas de realización, los pacientes tratados con terapia combinada responden al tratamiento con un activador inmunitario o un inhibidor de puntos de control; sin embargo, 10 esto representa un subconjunto de aproximadamente el 25 % de los pacientes dentro de un subtipo de tumor específico potencialmente sensible. En algunos casos, los individuos pueden ser sensibles o resistentes a la terapia con platino.
- [0051]** En algunos casos, los métodos en cuestión incluyen un paso de administración de un agente iniciador al sujeto, seguido de un paso de administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD47 y un anticuerpo anti-PD-L1 al sujeto. En algunos casos, el paso de administrar una dosis terapéuticamente eficaz se realiza después de 15 al menos 3 días (*p. ej.*, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 7 días, al menos 8 días, al menos 9 días, o al menos 10 días) después de comenzar la administración de un agente cebador. Este período de tiempo es, por ejemplo, suficiente para proporcionar una mayor producción de reticulocitos por parte del individuo.
- 20 **[0052]** La administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD47 y/o un anticuerpo anti-PD-L1 se puede lograr de varias formas diferentes. En algunos casos, se administran dos o más dosis terapéuticamente eficaces después de administrar un agente iniciador. La administración adecuada de una dosis terapéuticamente eficaz puede implicar la administración de una sola dosis, o puede implicar la administración de dosis diarias, quincenales, semanales, 25 una vez cada dos semanas, una vez al mes, anualmente, etc. En algunos casos, una dosis terapéuticamente eficaz se administra como dos o más dosis de concentración creciente (es decir, dosis crecientes), donde (i) todas las dosis son dosis terapéuticas, o donde (ii) se administra una dosis subterapéutica (o dos o más dosis subterapéuticas) dadas inicialmente y las dosis terapéuticas se alcanzan mediante dicho aumento. Como un ejemplo no limitativo para ilustrar la concentración creciente (es decir, dosis crecientes), se puede administrar semanalmente una dosis terapéuticamente eficaz, comenzando con una dosis subterapéutica (por ejemplo, una dosis de 5 mg/kg), y cada dosis subsiguiente puede incrementarse en un incremento particular (*p. ej.*, en 5 mg/kg), o en incrementos variables, hasta alcanzar una dosis terapéutica (*p. ej.*, 30 mg/kg), momento en el cual la administración puede cesar o continuar (*p. ej.*, continuación de la dosis terapéutica). dosis, por ejemplo, dosis de 30 mg/kg). Como otro ejemplo no limitativo para ilustrar la concentración creciente (es decir, dosis crecientes), se puede administrar semanalmente una dosis terapéuticamente eficaz, 30 comenzando con una dosis terapéutica (*p. ej.*, una dosis de 10 mg/kg), y cada dosis subsiguiente se puede aumentar por un incremento particular (*p. ej.*, 10 mg/kg), o por incrementos variables, hasta alcanzar una dosis terapéutica (*p. ej.*, 30 mg/kg, 100 mg/ml, etc.), momento en el cual la administración puede cesar o puede continuar (*p. ej.*, dosis terapéuticas continuadas, *p. ej.*, dosis de 30 mg/kg, 100 mg/ml, etc.). En algunas formas de realización, la administración de una dosis terapéuticamente eficaz puede ser una infusión continua y la dosis puede modificarse (*p. ej.*, aumentarse) a lo largo del tiempo.
- 40 **[0053]** La dosificación y la frecuencia pueden variar dependiendo de la vida media del anticuerpo anti-CD47 y/o el anticuerpo anti-PD-L1 en el paciente. Un experto en la técnica entenderá que dichas directrices se ajustarán al 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 péptidos CD47 solubles, etc. La dosificación también se puede variar para la administración localizada, por ejemplo, intranasal, inhalación, etc., o para la administración sistémica, por ejemplo, i.p., i.v., s.c. y similares.
- [0054]** En ciertas formas de realización de la invención, el anticuerpo anti-CD47 se infunde a un paciente en una dosis inicial, y opcionalmente en dosis posteriores, durante un período de tiempo y/o concentración que reduce la posibilidad 45 de microambientes hematológicos donde hay una alta concentración local de RBC y el agente.
- 50 **[0055]** En algunas formas de realización de la invención, se infunde una dosis inicial del anticuerpo anti-CD47 durante un período de al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 2,5 horas, al menos aproximadamente 3 horas, al menos aproximadamente 3,5 horas, en al menos unas 4 horas, al menos unas 4,5 horas, al menos unas 5 horas, al menos unas 6 horas o más. En algunas formas de realización, se infunde una dosis inicial durante un período de tiempo de aproximadamente 2,5 horas a aproximadamente 6 horas; por ejemplo, de unas 3 horas a unas 4 horas. En algunas de tales formas de realización, la dosis de agente en la infusión es de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml; por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,25 mg/ml.
- 55 **[0056]** Los métodos en cuestión también incluyen la coadministración de un anticuerpo anti-PD-L1 con el anticuerpo anti-CD47. En la invención, el anticuerpo anti-PD-L1 es Avelumab. En algunas formas de realización, el individuo que recibe el tratamiento no tiene anticuerpos anti-PD-L1. El anticuerpo anti-PD-L1 puede administrarse junto con el anticuerpo anti-CD47 o por separado, en cualquier método de administración apropiado, e.g. i.v., i.p., subcutánea, intratumoral o intraabdominal. La cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PD-L1 puede ser de aproximadamente 10 mg/kg. En la invención, el anticuerpo anti-PD-L1 puede administrarse cada 14 días. En otros casos, el anticuerpo anti-PD-L1 puede administrarse 7 días después de la preparación del anticuerpo anti-CD47 y cada 14 días a partir de entonces. En

otros casos, el anticuerpo anti-PD-L1 puede administrarse con las dosis de sensibilización del anticuerpo anti-CD47 y cada 14 días a partir de entonces.

Cáncer de ovario

5

[0057] En el presente documento se proporcionan métodos para tratar individuos que tienen cáncer de ovario o reducir el tamaño del cáncer de ovario en el sujeto, que comprenden administrar: una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD47 al sujeto; y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-PD-L1 para el sujeto.

10

[0058] Los ejemplos de cáncer de ovario incluyen cáncer de ovario epitelial, tumor seroso opcionalmente, tumor mucinoso, tumor de células claras, tumor de endometrio, tumor de células de transición, tumor de Brenner, tumor de carcinosarcoma, tumor epitelial mixto, tumor epitelial limítrofe, tumor de carcinoma indiferenciado, trompa de Falopio tumor o tumor peritoneal primario.

15

[0059] En algunas formas de realización, el cáncer de ovario epitelial es un tumor seroso. Se puede determinar que el cáncer de ovario de tumor seroso es de bajo o alto grado mediante subtipificación de análisis histológico. En un caso, los individuos son sensibles a la quimioterapia con platino. En la invención, los individuos son resistentes a la quimioterapia con platino. En algunas formas de realización, los individuos son naïve a PD-L1.

20

[0060] En algunas formas de realización, el paciente tiene una carga de mutación baja. En algunas formas de realización, la paciente tiene una alta carga de mutaciones. Como se sabe en la técnica, los tipos de cáncer pueden variar en el grado de mutación promedio o específico, donde los niveles más altos de mutación están asociados con una mayor expresión de neoantígenos. Véase, por ejemplo, Vogelstein et al., (2013), supra. Una carga de mutación baja puede ser un tipo de cáncer con un promedio por tumor, o número específico para un tumor individual, de hasta aproximadamente 10, hasta aproximadamente 20, hasta aproximadamente 30, hasta aproximadamente 40, hasta aproximadamente 50 mutaciones no sinónimas por tumor. Una alta carga de mutaciones puede ser un tipo de cáncer con más de aproximadamente 50, más de aproximadamente 75, más de aproximadamente 100, más de aproximadamente 125, más de aproximadamente 150 mutaciones no sinónimas por tumor.

25

[0061] En tales formas de realización, el cáncer es cáncer de ovario epitelial. En algunas de tales formas de realización, el cáncer es un tipo que tiene una alta carga de neoantígeno o mutagénesis (ver Vogelstein et al. (2013) Science 339 (6127): 1546-1558). En otras formas de realización, el cáncer con un tipo con una carga de neoantígeno baja. En algunas de tales formas de realización, la terapia de combinación de la presente invención potencia la actividad del inhibidor de puntos de control. En otras formas de realización, cuando el cáncer individual no responde a un inhibidor de punto de control solo, la terapia de combinación proporciona una respuesta terapéutica. En la invención, el individuo es resistente al platino.

Cáncer

30

[0062] Los términos "cáncer", "neoplasia" y "tumor" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a células que exhiben un crecimiento autónomo y no regulado, de modo que exhiben un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control sobre la proliferación de células. Las células de interés para la detección, el análisis o el tratamiento en la presente solicitud incluyen células precancerosas (*p. ej.*, benignas), malignas, premetastásicas, metastásicas y no metastásicas. Se conocen cánceres de prácticamente todos los tejidos. La frase "carga de cáncer" se refiere a la cantidad de células cancerosas o volumen de cáncer en un sujeto. En consecuencia, 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 el presente documento, se refiere a cualquier célula que sea una célula cancerosa o que se derive de una célula cancerosa, por ejemplo, un clon de una célula cancerosa. Los expertos en la técnica conocen muchos tipos de cánceres, incluidos tumores sólidos tales como carcinomas, sarcomas, glioblastomas, melanomas, linfomas, mielomas, etc., y cánceres circulantes tales como leucemias. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, 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 de orina del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de cerebro.

45

[0063] 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 vecinas, 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 ganglios linfáticos, etc.

50

[0064] Como se usa en el presente documento, los términos "recurrencia del cáncer" y "recurrencia del tumor", y sus variantes gramaticales, se refieren al crecimiento adicional de células neoplásicas o cancerosas después del diagnóstico de cáncer. Particularmente, la recurrencia puede ocurrir cuando se produce un mayor crecimiento de células cancerosas en el tejido canceroso. De manera similar, la "propagación tumoral" ocurre cuando las células de un tumor se diseminan

a tejidos y órganos locales o distantes; por lo tanto, la diseminación tumoral abarca la metástasis tumoral. La "invasión tumoral" ocurre cuando el crecimiento del tumor se extiende localmente para comprometer la función de los tejidos involucrados por compresión, destrucción o prevención de la función normal del órgano.

- 5 **[0065]** Como se usa en el presente documento, el término "metástasis" se refiere al crecimiento de un tumor canceroso en un órgano o parte del cuerpo, que no está conectado directamente al órgano del tumor canceroso original. Se entenderá que metástasis incluye micrometástasis, que es la presencia de una cantidad indetectable de células cancerosas en un órgano o parte del cuerpo que no está conectado directamente con el órgano del tumor canceroso original. La metástasis también se puede definir como varios pasos de un proceso, como la salida de las células cancerosas de un sitio tumoral original y la migración y/o invasión de células cancerosas a otras partes del cuerpo.

Criterios de valoración clínicos

- 15 **[0066]** Los métodos descritos en el presente documento dan como resultado al menos un criterio de valoración mejorado en comparación con la línea de base.

- 20 **[0067]** En algunas formas de realización de la invención, la administración del anticuerpo anti-CD47 y/o el anticuerpo anti-PD-L1 reduce el nivel de marcadores de cáncer tales como CA125, HE4 (proteína 4 del epidídimo humano), CA-72-4, CA-19-9 y CEA; en comparación con la línea de base. En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-CD47 y/o el anticuerpo anti-PD-L1 reduce CA125 en el sujeto en comparación con la línea de base. En algunas formas de realización, el nivel de CA125 se mide aproximadamente una vez al mes. En otras formas de realización, la administración reduce el nivel de CA125 en el sujeto en al menos un 30-90, 40-80, 50-70, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % en comparación con la línea base. CA125 se puede medir con un inmunoensayo. CA125 se puede medir usando uno o más de los ensayos descritos en Mongia et al., Performance characteristics of seven automated CA 125 assays. Am J Clin Pathol. junio de 2006; 125(6):921-7. En otras formas de realización, la administración reduce el tamaño del cáncer o metástasis del mismo en comparación con el valor inicial, opcionalmente según lo medido por imágenes, opcionalmente en el que las imágenes son CT/PET/CT o MRI, que comprende opcionalmente una enfermedad que aumenta inicialmente desde el valor inicial pero que posteriormente disminuye de tamaño.

- 30 **[0068]** Como se usa en este documento, los criterios de valoración para el tratamiento tendrán un significado conocido en la técnica y como lo usa la Administración de Alimentos y Medicamentos.

- 35 **[0069]** La supervivencia global se define como el tiempo desde la aleatorización hasta la muerte por cualquier causa, y se mide en la población por intención de tratar. La supervivencia se considera el criterio de valoración del cáncer más fiable y, cuando se pueden realizar estudios para evaluar adecuadamente la supervivencia, suele ser el criterio de valoración preferido. Este punto final es preciso y fácil de medir, documentado por la fecha de la muerte. El sesgo no es un factor en la medición del punto final. La mejora de la supervivencia debe analizarse como un análisis de riesgo-beneficio para evaluar el beneficio clínico. La supervivencia global puede evaluarse en estudios controlados aleatorios. La demostración de una mejora estadísticamente significativa en la supervivencia general se puede considerar clínicamente significativa si el perfil de toxicidad es aceptable y, a menudo, ha respaldado la aprobación de nuevos medicamentos. Un beneficio de los métodos de la invención puede incluir una mayor supervivencia global de los pacientes.

- 40 **[0070]** Los criterios de valoración que se basan en evaluaciones tumorales incluyen DFS, ORR, TTP, PFS y tiempo hasta el fracaso del tratamiento (TTF). La recopilación y el análisis de datos sobre estos criterios de valoración dependientes del tiempo se basan en evaluaciones indirectas, cálculos y estimaciones (p. ej., mediciones de tumores). La supervivencia libre de enfermedad (DFS) se define como el tiempo desde la aleatorización hasta la recurrencia del tumor o la muerte por cualquier causa. El uso más frecuente de este criterio de valoración es en el entorno adyuvante después de la cirugía definitiva o la radioterapia. La DFS también puede ser un punto final importante cuando un gran porcentaje de pacientes logra respuestas completas con quimioterapia.

- 50 **[0071]** Tasa de respuesta objetiva. La ORR se define como la proporción de pacientes con una reducción del tamaño del tumor de una cantidad predefinida y durante un período de tiempo mínimo. La duración de la respuesta generalmente se mide desde el momento de la respuesta inicial hasta la progresión documentada del tumor. En general, la FDA ha definido la ORR como la suma de las respuestas parciales más las respuestas completas. Cuando se define de esta manera, la ORR es una medida directa de la actividad antitumoral del fármaco, que se puede evaluar en un estudio de un solo brazo.

- 55 **[0072]** Tiempo hasta la progresión y supervivencia libre de progresión. TTP y PFS han servido como criterios de valoración primarios para la aprobación de fármacos. TTP se define como el tiempo desde la aleatorización hasta la progresión objetiva del tumor; TTP no incluye muertes. La SLP se define como el tiempo desde la aleatorización hasta la progresión objetiva del tumor o la muerte. La definición precisa de la progresión del tumor es importante y debe detallarse cuidadosamente en el protocolo.

Anticuerpos

- 65 **[0073]** Los métodos descritos en este documento incluyen la administración de un anticuerpo o anticuerpos, es decir, la administración de un anticuerpo anti CD47 y la administración de un anticuerpo anti PD-L1. Como se describió

anteriormente, el término "anticuerpo" incluye la referencia a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno particular, e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. El término también incluye formas modificadas genéticamente tales como anticuerpos quiméricos (*p. ej.*, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados. El término "anticuerpo" también incluye formas de unión a antígeno de anticuerpos, incluidos fragmentos con capacidad de unión a antígeno (*p. ej.*, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y rlgG). El término también se refiere a fragmentos Fv de cadena sencilla recombinantes (scFv). El término anticuerpo también incluye moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos.

5 [0074] La selección de anticuerpos puede basarse en una variedad de criterios, que incluyen selectividad, afinidad, citotoxicidad, *etc.* se une selectivamente" a un anticuerpo o "específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con", cuando se refiere a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que determina la presencia de la proteína, en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por lo tanto, en las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una secuencia de proteína particular al menos dos veces el fondo y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo. La presente invención se une a antígenos en la superficie de las células diana en presencia de células efectoras (tales como células asesinas naturales o macrófagos). Los receptores Fc en las células efectoras reconocen los anticuerpos unidos.

10 [0075] Se puede generar un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular mediante métodos recombinantes tales como la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, o mediante la inmunización de un animal con el antígeno o con el ADN que codifica el antígeno. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos por el experto en la materia. Los anticuerpos pueden, alternativamente, ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando métodos de hibridoma. En un método de hibridoma, típicamente se inmuniza un animal huésped apropiado con un agente inmunizante para provocar linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. 15 Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma.

20 [0076] Los anticuerpos humanos se pueden producir utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluidas las bibliotecas de presentación de fagos. De forma similar, los anticuerpos humanos pueden prepararse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras el desafío, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en humanos en todos los aspectos, incluidos el reordenamiento de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos.

25 [0077] Los anticuerpos también existen como varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con varias peptidasas. Así, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir F(ab')₂, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-C_{H1} por un enlace disulfuro. El F(ab')₂ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo así el dímero F(ab')₂ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra. Aunque varios fragmentos 30 de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos pueden sintetizarse *de novo* químicamente o usando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa aquí, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos completos o aquellos sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (*p. ej.*, Fv monocatenario) o aquellos identificados usando bibliotecas de presentación de fagos.

35 [0078] Un "anticuerpo humanizado" es una molécula de inmunoglobulina que contiene una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que tiene la deseada especificidad, afinidad y capacidad. En algunos casos, los residuos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias marco o CDR importadas. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco (FR) son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. De manera óptima, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

40 [0079] Los anticuerpos de interés pueden probarse para determinar su capacidad para inducir ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) o ADCP (fagocitosis celular dependiente de anticuerpos). La actividad de ADCC asociada a anticuerpos se puede controlar y cuantificar mediante la detección de la liberación del marcador o lactato deshidrogenasa de las células lisadas, o la detección de la viabilidad reducida de las células diana (*p. ej.*, ensayo de anexina). Los ensayos de apoptosis se pueden realizar mediante el ensayo de marcado de extremo de muesca de digoxigenina-11-dUTP (TUNEL) mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (Lazebnik et al., *Nature*: 371, 346 (1994). La citotoxicidad 45 también se puede detectar directamente mediante kits de detección conocidos en la técnica., como el kit de detección de citotoxicidad de Roche Applied Science (Indianapolis, Ind.).

Anticuerpos CD47

5 [0080] Los métodos descritos en este documento incluyen la administración de un anticuerpo anti-CD47.

10 [0081] CD47 es una glicoproteína transmembrana ampliamente expresada con un solo dominio de tipo Ig y cinco regiones que abarcan la membrana, que funciona como un ligando celular para SIRP α con unión mediada a través del dominio NH2-terminal similar a V de SIRP α . SIRP α se expresa principalmente en células mieloides, incluidos macrófagos, granulocitos, células dendríticas (CD) mieloides, mastocitos y sus precursores, incluidas las células madre hematopoyéticas. Lee et al. (2007) J. Immunol. 179:7741-7750; Hatherley et al. (2008) Mol. Cell 31(2):266-77; Hatherley et al. (2007) J.B.C. 282:14567-75; y el papel de la dimerización en cis de SIRP α en la unión de 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 las células normales, existe evidencia de que se regula transitoriamente 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 sean engullidos in vivo.

15 [0082] En algunos casos, el anticuerpo anti-CD47 en cuestión se une específicamente a CD47 y reduce la interacción entre CD47 en una célula (p. ej., una célula infectada) y SIRP α en otra célula (p. ej., una célula fagocítica). En algunos casos, un anticuerpo anti-CD47 adecuado no activa CD47 tras la unión. Algunos anticuerpos anti-CD47 no reducen la unión de CD47 a SIRP α y dicho anticuerpo puede denominarse "anticuerpo anti-CD47 no bloqueante". Un anticuerpo anti-CD47 adecuado que es un "agente anti-CD47" puede denominarse "anticuerpo bloqueador de CD47". Los ejemplos no limitantes 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 químicas de dichos anticuerpos. Los anticuerpos humanizados (p. ej., hu5F9-G4) son especialmente útiles para aplicaciones in vivo en seres 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.

20 [0083] En algunos casos, un anticuerpo anti-CD47 comprende una región Fc de IgG humana, por ejemplo, una región constante de IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4. En un caso, la región Fc de IgG es una región constante de IgG4. La bisagra de IgG4 puede estabilizarse mediante la sustitución del aminoácido S241P (ver Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30(1):105-108).

25 [0084] En algunos casos, el anticuerpo anti-CD47 compite por unirse a CD47 con Hu5F9-G4. En algunos casos, el anti-CD47 se une al mismo epitopo de CD47 que Hu5F9-G4.

30 [0085] En algunas formas de realización, los métodos descritos en este documento incluyen la administración del anticuerpo anti-CD47 Hu5f9-G4. Este anticuerpo se ha descrito en la patente US 9,623,079. En algunos casos, los métodos descritos en este documento incluyen la administración de un anticuerpo anti-CD47 con secuencias (cadena ligera, cadena pesada y/o CDR) al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idénticas a las secuencias de Hu5f9-G4. La Tabla 1 contiene la secuencia de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo Hu5f9-G4. Las regiones CDR se muestran en negrita.

Tabla 1.

SEQ ID NO	Descripción y secuencia
50	Cadena pesada del anticuerpo Hu5f9-G4 QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQA PGQRLEWMGTIYPGNDDTSYNQKFKDRVTITADTSASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQGTLTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALT SGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS 55 1 NTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA 60 VEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK 65

(Continuación)

SEQ ID NO	Descripción y secuencia
5	Cadena ligera de anticuerpo Hu5f9-G4 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVYSNGNTYLGWYLQ KPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCFQGSHPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
10	2
15	

Anticuerpos PD-L1

20 [0086] Los métodos descritos en este documento incluyen la administración de un anticuerpo anti-PD-L1.

25 [0087] PD-L1 (ligando 1 de muerte programada) es un ligando para PD1. Tanto PD-L1 como PD1 son ejemplos de una proteína de punto de control inmunitario. Las proteínas de punto de control inmunitario son moléculas inhibidoras inmunitarias que actúan para disminuir la capacidad de respuesta inmunitaria hacia una célula diana, particularmente contra una célula tumoral en los métodos de la descripción. Las respuestas endógenas a los tumores por parte de las células T pueden ser desreguladas por las células tumorales que activan los puntos de control inmunitarios (proteínas inhibidoras inmunitarias) e inhiben los receptores coestimuladores (proteínas activadoras inmunitarias). La clase de agentes terapéuticos a los que se hace referencia en la técnica como "inhibidores de puntos de control inmunitarios" invierte la inhibición de las respuestas inmunitarias mediante la administración de antagonistas de señales inhibidoras. Otras inmunoterapias administran agonistas de moléculas coestimuladoras inmunitarias para aumentar la capacidad de respuesta.

30 [0088] Dos proteínas de punto de control inmunitario son PD1 y PD-L1. El papel principal de PD1 es limitar la actividad de las células T en los tejidos periféricos en el momento de una respuesta inflamatoria a la infección y limitar la autoinmunidad. La expresión de PD1 se induce cuando las células T se activan. Cuando se activa con uno de sus ligandos, PD1 inhibe las quinasas que están involucradas en la activación de las células T. PD1 se expresa en gran medida en las células T Reg, donde puede aumentar su proliferación en presencia de ligando. Debido a que muchos tumores están altamente infiltrados con células T Reg, el bloqueo de la vía PD1 también puede mejorar las respuestas inmunitarias antitumorales al disminuir el número y/o la actividad supresora de las células T Reg intratumorales.

40 [0089] Los dos ligandos para PD1 son el ligando 1 de PD1 (PD-L1; también conocido como B7-H1 y CD274) y PD-L2 (también conocido como B7-CD y CD273). Los ligandos de PD1 comúnmente se regulan al alza en la superficie de la célula tumoral de muchos tumores humanos diferentes. En células de tumores sólidos, el principal ligando de PD1 que se expresa es PD-L1. PD-L1 se expresa en las células cancerosas y, al unirse a su receptor PD1 en las células T, inhibe la activación/funciónde las células T. Por lo tanto, los agentes bloqueadores de PD1 y PD-L1 pueden superar esta señalización inhibitoria y mantener o restaurar la función de las células T antitumorales. Los agentes anti-CD47 pueden estimular una respuesta específica de células T antitumorales (fagocitosis del cáncer mediada por anticuerpos anti-CD47 por macrófagos preparan una respuesta eficaz de células T antitumorales; Tseng y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU.. 2 de julio de 2013; 110(27):11103-8.)

50 [0090] PD-L1 se expresa en células cancerosas y mediante la unión a su receptor PD1 en células T inhibe la activación/funciónde células T. Por lo tanto, los agentes bloqueadores de PD1 y PD-L1 pueden superar esta señalización inhibitoria y mantener o restaurar la función de las células T antitumorales. Sin embargo, dado que PD-L1 se expresa en células tumorales, los anticuerpos que se unen y bloquean PD-L1 también pueden activar ADCP, ADCC y CDC de células tumorales. Los agentes anti-CD47 pueden hacer sinergia con anticuerpos monoclonales dirigidos y mejorar su potencia para estimular ADCP y ADCC (anticuerpo anti-CD47 sinergiza con rituximab para promover la fagocitosis y erradicar el linfoma no Hodgkin, Chao et al., Cell. 2010 Sep 3;142(5):699-713.) Así, una combinación de agentes anti-PD-L1 con agentes anti-CD47 puede potenciar la potencia antitumoral. Estos agentes pueden administrarse juntos (en el mismo curso de tratamiento, no necesariamente el mismo día y frecuencia).

60 [0091] Los anticuerpos en uso clínico actual contra PD-L1 incluyen atezolizumab, durvalumab y avelumab. Avelumab es un anticuerpo bloqueador del ligando 1 de muerte programada humana (PD-L1) con un componente Fc activo (Boyerinas, 2015) aprobado en los EE. UU. para el tratamiento de pacientes con carcinoma urotelial metastásico o localmente avanzado que tienen la enfermedad progresión durante o después de la quimioterapia que contiene platino, o dentro de los 12 meses que reciben quimioterapia neoadyuvante o adyuvante que contiene platino. También está aprobado para su uso en pacientes adultos y pediátricos mayores de 12 años con carcinoma metastásico de células de Merkel. Avelumab bloquea la inhibición mediada por PD-L1/PD-1 de la respuesta inmune adaptativa que conduce a una respuesta

antitumoral dirigida por las células T.

[0092] En algunos casos, los métodos descritos en este documento incluyen la administración de un anticuerpo anti-PD-L1, por ejemplo, Avelumab. En algunos casos, los métodos descritos en este documento incluyen la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 con secuencias (cadena ligera, cadena pesada y/o CDR) al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idénticas a las secuencias de Avelumab. La Tabla 2 contiene la secuencia de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo Avelumab.

Tabla 2.

SEQ ID NO	Descripción y secuencia
3	Cadena pesada de anticuerpo Avelumab EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGK GLEWVSSIYPGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
4	Cadena ligera de anticuerpo Avelumab QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGNYVSWYQQHPGK APKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKY AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

45 **Dosificación**

[0093] Los métodos descritos en el presente documento incluyen la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de composiciones, es decir, una dosis terapéuticamente eficaz de cada uno de un anticuerpo anti-CD47 y un anticuerpo anti-PD-L1.

[0094] Las composiciones se administran a un paciente en una cantidad suficiente para eliminar sustancialmente las células diana, como se describe anteriormente. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz", que puede proporcionar una mejora en las tasas de supervivencia global. Se pueden administrar administraciones únicas o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosis y la frecuencia según lo requiera y tolere el paciente. La dosis particular requerida para un tratamiento dependerá de la condición médica y el historial del mamífero, así como de otros factores como la edad, el peso, el género, la vía de administración, la eficiencia, etc.

[0095] Las dosis efectivas de los agentes combinados de la presente divulgación para el tratamiento del cáncer varía dependiendo de muchos factores diferentes, incluidos los medios de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos, por ejemplo, animales de compañía como perros, gatos, caballos, etc., mamíferos de laboratorio como conejos, ratones, ratas, etc., y similares. Las dosis de tratamiento se pueden ajustar para optimizar la seguridad y la eficacia.

[0096] Una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD47 puede depender del agente específico utilizado, pero normalmente es de aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal o más (p. ej., aproximadamente 20 mg/kg o más,

aproximadamente 25 mg/kg o más, aproximadamente 30 mg/kg o más, aproximadamente 35 mg/kg o más, aproximadamente 40 mg/kg o más, aproximadamente 45 mg/kg o más, aproximadamente 50 mg/kg o más, o aproximadamente 55 mg/kg o más, o aproximadamente 60 mg/kg o más, o aproximadamente 65 mg/kg o más, o aproximadamente 70 mg/kg o más), o de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 70 mg/kg (por ejemplo, de 5 aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 67,5 mg/kg, o desde aproximadamente 20 mg/kg hasta aproximadamente 60 mg/kg).

10 [0097] En algunos casos, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD47 es de 20, 30, 45, 60 o 67,5 mg/kg. En la invención, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD47 es de 20 a 60 mg/kg. En algunos casos, la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD47 es de 20 a 67,5 mg/kg.

15 [0098] Una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PD-L1 puede depender del anticuerpo específico utilizado, pero normalmente es de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal o más (p. ej., aproximadamente 10 mg/kg o más, aproximadamente 15 mg/kg). kg o más, aproximadamente 20 mg/kg o más, aproximadamente 25 mg/kg o más, aproximadamente 30 mg/kg o más, aproximadamente 35 mg/kg o más, aproximadamente 40 mg/kg o más, aproximadamente 45 mg/kg o más, aproximadamente 50 mg/kg o más, o aproximadamente 55 mg/kg o más, o 20 aproximadamente 60 mg/kg o más, o aproximadamente 65 mg/kg o más, o aproximadamente 70 mg/kg o más), o de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 70 mg/kg (p. ej., de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 67,5 mg/kg, o de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 60 mg/kg).

25 [0099] La cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PD-L1 es de 10 mg/kg. El anticuerpo anti-PD-L1 se administra cada 14 días. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 se administra 7 días después de la dosis de sensibilización y cada 14 días a partir de entonces. En algunos casos, el anticuerpo anti-PD-L1 se administra el mismo día que la dosis inicial y cada 14 días a partir de entonces.

30 [0100] La dosis requerida para alcanzar y/o mantener un nivel particular en suero de la composición administrada es proporcional a la cantidad de tiempo entre las dosis e inversamente proporcional al número de dosis administradas. Así, a medida que aumenta la frecuencia de dosificación, disminuye la dosis requerida. La optimización de las estrategias de dosificación será fácilmente comprendida y puesta en práctica por un experto en la materia. Un régimen de tratamiento exemplar implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Las entidades terapéuticas suelen administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser semanales, 35 mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles en sangre de la entidad terapéutica en el paciente. Alternativamente, las entidades terapéuticas pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del polipéptido en el paciente.

40 [0101] Una "dosis de mantenimiento" es una dosis destinada a ser una dosis terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, en experimentos para determinar la dosis terapéuticamente eficaz, pueden administrarse múltiples dosis de mantenimiento diferentes a diferentes sujetos. Como tal, algunas de las dosis de mantenimiento pueden ser dosis terapéuticamente eficaces y otras pueden ser dosis subterapéuticas.

45 [0102] En aplicaciones profilácticas, se puede administrar una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En otras aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

50 [0103] Todavía en otros casos, los métodos de la presente descripción incluyen el tratamiento, la reducción o la prevención del crecimiento tumoral, la metástasis tumoral o la invasión tumoral de cánceres que incluyen carcinomas, cánceres hematológicos, melanomas, sarcomas, gliomas, etc. Para aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o los medicamentos se administran a un paciente susceptible o en riesgo de padecer una enfermedad en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, incluidos los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad.

55 [0104] La toxicidad de los agentes combinados descritos en el presente documento se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, determinando la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) o la DL₁₀₀ (la dosis letal para el 100 % de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico y el terapéutico es el índice terapéutico. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden utilizar para formular un rango 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 rango de concentraciones circulantes que incluyen la dosis efectiva con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. 60 La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual en vista de la condición del paciente.

Agentes cebadores y dosis cebadora

5 [0105] En algunos casos de los métodos descritos en el presente documento, se administra un agente cebador antes de administrar una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD47 y un anticuerpo anti-PD-L1 al individuo. Los agentes cebadores adecuados incluyen un agente estimulante de la eritropoyesis (ESA) y/o una dosis cebadora de un anticuerpo anti-CD47. Después de la administración del agente de preparación, y dejando pasar un período de tiempo efectivo para un aumento en la producción de reticulocitos, se administra una dosis terapéutica de un anticuerpo anti-CD47. La administración se puede realizar de acuerdo con los métodos descritos en la patente de EE. UU. 9.623,079.

10 15 [0106] En algunas formas de realización, la administración de una combinación de agentes se combina con una dosis eficaz de un agente que aumenta el hematocrito del paciente, por ejemplo, agentes estimulantes de la eritropoyetina (ESA). Dichos agentes son conocidos y utilizados en la técnica, incluidos, por ejemplo, Aranesp® (darbepoetina alfa), EpoGen®/Procrit®/NF (epoetina alfa), Omontys® (pigesatida), Procrit®, etc.

15 20 25 [0107] El término "dosis de preparación" o como se usa en el presente documento se refiere a una dosis de un anticuerpo anti-CD47 que prepara a un sujeto para la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de anticuerpo anti-CD47 tal que la dosis terapéuticamente eficaz no da como resultado una pérdida grave de glóbulos rojos (hematocrito reducido o hemoglobina reducida). La dosis de preparación específica apropiada de un anticuerpo anti-CD47 puede variar dependiendo de la naturaleza del anticuerpo usado y de numerosos factores específicos del sujeto (p. ej., edad, peso, etc.). Los ejemplos de dosis de cebado adecuadas de un anticuerpo anti-CD47 incluyen desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 4 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg. En la invención, la dosis de cebado es de 1 mg/kg.

30 35 [0108] En algunos casos de los métodos descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-CD47 se administra al sujeto como una dosis de sensibilización que oscila entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 5 mg/kg de anticuerpo, opcionalmente 1 mg/kg de anticuerpo. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD47 se administra al sujeto como una dosis que oscila entre aproximadamente 20 y aproximadamente 67,5 mg/kg de anticuerpo, opcionalmente 20 mg/kg de anticuerpo, 30 mg/kg de anticuerpo, 45 mg/kg de anticuerpo, 60 mg/kg de anticuerpo, o 67,5 mg/kg de anticuerpo.

40 45 50 [0109] En algunos casos, se administra un agente cebador antes de administrar una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD47 al individuo. Los agentes cebadores adecuados incluyen un agente estimulante de la eritropoyesis (ESA) y/o una dosis cebadora de un anticuerpo anti-CD47. Después de la administración del agente de preparación, y dejando pasar un período de tiempo efectivo para un aumento en la producción de reticulocitos, se administra una dosis terapéutica de un anticuerpo anti-CD47. La dosis terapéutica se puede administrar de varias maneras diferentes. En algunas formas de realización, se administran dos o más dosis terapéuticamente eficaces después de administrar un anticuerpo cebador. En algunas formas de realización, una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD47 se administra como dos o más dosis de concentración creciente, en otras, las dosis son equivalentes.

55 [0110] En algunos casos, se proporciona una dosis de sensibilización eficaz de Hu-5F9G4, donde la dosis de sensibilización eficaz para un ser humano es de aproximadamente 1 mg/kg, por ejemplo, desde al menos aproximadamente 0,5 mg/kg hasta no más de aproximadamente 5 mg/kg; desde al menos aproximadamente 0,75 mg/kg hasta no más de aproximadamente 1,25 mg/kg; desde al menos aproximadamente 0,95 mg/kg hasta no más de aproximadamente 1,05 mg/kg; y puede ser de aproximadamente 1 mg/kg.

60 65 [0111] En algunas formas de realización de la invención, se infunde una dosis inicial de un anticuerpo anti-CD47 durante un período de al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 2,5 horas, al menos aproximadamente 3 horas, al menos aproximadamente 3,5 horas, al menos aproximadamente 4 horas, al menos aproximadamente 4,5 horas, al menos aproximadamente 5 horas, al menos aproximadamente 6 horas o más. En algunas formas de realización, se infunde una dosis inicial durante un período de tiempo de aproximadamente 2,5 horas a aproximadamente 6 horas; por ejemplo, de unas 3 horas a unas 4 horas. En algunas de tales formas de realización, la dosis de anticuerpo en la infusión es de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml; por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,25 mg/ml.

60 [0112] En algunas formas de realización, una dosis de cebado puede administrarse a través de una vía subcutánea, mediante inyección, parche, bomba osmótica y similares, como se conoce en la técnica.

65 [0113] Después de la administración del anticuerpo de cebado, y dejando un período de tiempo efectivo para un aumento en la producción de reticulocitos, se administra una dosis terapéutica de un anticuerpo anti-CD47. La dosis terapéutica se puede administrar de varias maneras diferentes. En algunas formas de realización, se administran dos o más dosis terapéuticamente eficaces después de administrar un agente iniciador, por ejemplo, en un programa de dosificación semanal. En algunas formas de realización, una dosis efectiva de un anticuerpo anti-CD47 se administra como dos o más dosis de concentración creciente, en otros las dosis son equivalentes.

5 [0114] En otras formas de realización, se administra una dosis inicial de un anticuerpo de unión a CD47, por ejemplo, una dosis de cebado, mediante fusión continua, por ejemplo, como bomba osmótica, parche de administración, etc., donde la dosis se administra durante un período de al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 12 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días. Muchos de tales sistemas son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la tecnología DUROS, proporciona un sistema de dos compartimentos separados por un pistón. Uno de los compartimentos consta de motor osmótico específicamente formulado con un exceso de NaCl sólido, de forma que permanece presente durante todo el período de entrega y da como resultado un gradiente osmótico constante. También consta de una membrana semipermeable en un extremo a través de la cual se introduce agua en el motor osmótico y se establece un gradiente osmótico grande y constante entre el agua tisular y el motor osmótico. El otro compartimento consta de una solución de fármaco con un orificio por el que se libera el fármaco debido al gradiente osmótico. Esto ayuda a proporcionar un suministro sistémico y específico del fármaco cuando se implanta en seres humanos. El sitio preferido de implantación es la colocación subcutánea en el interior de la parte superior del brazo.

10 15 [0115] Después de la administración del agente de cebado, y dejando un período de tiempo efectivo para un aumento en la producción de reticulocitos, se administra una dosis terapéutica del anticuerpo anti-CD47. La dosis terapéutica se puede administrar de varias maneras diferentes. En algunas formas de realización, se administran dos o más dosis terapéuticamente eficaces después de administrar un agente iniciador, por ejemplo, en un programa de dosificación semanal. En algunas formas de realización, una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD47 se administra como dos o más dosis de concentración creciente, en otras, las dosis son equivalentes. Hay una reducción de la hemaglutinación después de la dosis inicial y, por lo tanto, no se requiere un tiempo de infusión prolongado.

25 Administración

30 [0116] En los métodos descritos en el presente documento, las composiciones, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47 y un anticuerpo anti-PD-L1, se administran a un sujeto. Las composiciones se pueden administrar por vía parenteral, tópica, intravenosa, intraabdominal, intratumoral, oral, subcutánea, intraarterial, intracranial, intraperitoneal, intranasal o intramuscular. Una vía típica de administración es la intravenosa o intratumoral, aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces.

35 [0117] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD47 y/o el anticuerpo anti-PD-L1 se administran por vía intraabdominal. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD47 y/o el anticuerpo anti-PD-L1 se administran por vía intravenosa. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD47 y/o el anticuerpo anti-PD-L1 se administran por vía intratumoral. En una forma de realización, se administra una dosis de sensibilización del anticuerpo anti-CD47 y la dosis de sensibilización se administra por vía subcutánea. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD47 y el anticuerpo anti-PD-L1 se administran simultáneamente. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD47 y el anticuerpo anti-PD-L1 se administran secuencialmente.

40 [0118] Los agentes activos se administran dentro de un período de tiempo para producir un efecto aditivo o sinérgico sobre el agotamiento de las células cancerosas en el huésped. Los métodos de administración incluyen, sin limitación, administración sistémica, administración intratumoral, etc. Normalmente, el anticuerpo anti-CD47 se administra en un período de aproximadamente 45 días, aproximadamente 30 días, aproximadamente 21 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 2 días, aproximadamente 1 día o sustancialmente el mismo día que el anticuerpo anti-PD-L1. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD47 se administra antes que el anticuerpo anti-PD-L1. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD47 se administra después del anticuerpo anti-PD-L1. Se puede considerar que los agentes se combinan si el programa de administración es tal que el nivel sérico de ambos agentes se encuentra en un nivel terapéutico al mismo tiempo. La administración puede repetirse según sea necesario para el agotamiento de la población de células cancerosas.

50 Composiciones farmacéuticas

55 [0119] Los métodos descritos en este documento incluyen la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo anti-CD47 y/o el anticuerpo anti-PD-L1.

60 [0120] Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas como poliláctido, poliglicolído o copolímero para mejorar el efecto adyuvante, como se discutió anteriormente. Langer, Science 249: 1527, 1990 y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. Los agentes se pueden administrar en forma de inyección de depósito o preparación de implante que se puede formular de tal manera que permita una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente como estériles, sustancialmente isotónicas y en pleno cumplimiento de todas las normas de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) de la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU.

- 5 [0121] Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una variedad de formas de dosificación unitaria dependiendo del método de administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitaria adecuadas para administración oral incluyen, pero no se limitan a polvo, tabletas, píldoras, cápsulas y pastillas para chupar. Se reconoce que las composiciones, cuando se administran por vía oral, deben ser protegidas de la digestión. Esto se logra típicamente formando complejos con las moléculas con una composición para hacerlas resistentes a la hidrólisis ácida y enzimática, o empaquetando las moléculas en un vehículo resistente apropiado, como un liposoma o una barrera de protección. Los medios para proteger a los agentes de la digestión son bien conocidos en la técnica.
- 10 [0122] Las composiciones para administración comprenderán comúnmente un anticuerpo u otro agente ablativo disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Se puede utilizar una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de materia indeseable. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes tamponadores y reguladores del pH, agentes reguladores de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico y similares. La concentración de agente activo en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará principalmente en función de los volúmenes de fluidos, viscosidades, peso corporal y similares de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente (p. ej., Remington's Pharmaceutical Science (15^a ed., 1980) y Goodman & Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman et al., eds., 1996)).
- 15 [0123] "Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil para preparar una composición farmacéutica que generalmente es segura, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano. Dichos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición de aerosol, gaseosos.
- 20 [0124] "Sales y ésteres farmacéuticamente aceptables" significa sales y ésteres que son farmacéuticamente aceptables y tienen las propiedades farmacológicas deseadas. Dichas sales incluyen sales que pueden formarse cuando los protones ácidos presentes en los compuestos son capaces de reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen las formadas con los metales alcalinos, por ejemplo, sodio y potasio, magnesio, calcio y aluminio. Las sales orgánicas adecuadas incluyen las formadas con bases orgánicas tales como las bases de amina, por ejemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N metilglucamina y similares. Dichas sales también incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos (p. ej., ácido clorhídrico y bromhídrico) y ácidos orgánicos (p. ej., ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico y los ácidos alcano y arenosulfónico tales como ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico). Los ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen ésteres formados a partir de grupos carboxi, sulfoniloxy y fosfonoxi presentes en los compuestos, por ejemplo, ésteres de alquilo C₁₋₆. Cuando hay dos grupos ácidos presentes, una sal o éster farmacéuticamente aceptable puede ser una monosal o éster monoácido o una disal o éster; y de manera similar, cuando hay más de dos grupos ácidos presentes, algunos o todos estos grupos pueden estar salificados o esterificados. Los compuestos mencionados en esta invención pueden estar presentes en forma no salificada o no esterificada, o en forma salificada y/o esterificada, y la denominación de tales compuestos pretende incluir tanto el compuesto original (no salificado y no esterificado) como sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables. Además, ciertos compuestos mencionados en esta invención pueden estar presentes en más de una forma estereoisómera, y la denominación de tales compuestos pretende incluir todos los estereoisómeros individuales y todas las mezclas (ya sean racémicas o no) de tales estereoisómeros.
- 25 [0125] Los términos "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y variaciones gramaticales de los mismos, ya que se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales pueden administrarse a un ser humano o sobre él sin la producción de efectos fisiológicos indeseables hasta un grado que prohibiría la administración de la composición.
- 30 [0126] También se describen aquí kits que comprenden los agentes activos, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47 y un anticuerpo anti-PD-L1, y formulaciones de los mismos, e instrucciones de uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico, ESA, etc. Los kits normalmente incluyen una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier escrito o material grabado que se suministre en o con el equipo, o que acompañe al equipo.
- 35 [0127] En algunos casos, los métodos descritos en este documento incluyen la administración de anticuerpos con secuencias descritas en este documento; por ejemplo, las secuencias de cadena pesada, cadena ligera y/o CDR descritas en el presente documento. Las secuencias de los anticuerpos administrados pueden ser, por ejemplo, al menos 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idénticas a las secuencias descritas en el presente documento.
- 40 [0128] El término porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje específico de nucleótidos o residuos de
- 45 Kits
- 50 [0126] También se describen aquí kits que comprenden los agentes activos, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47 y un anticuerpo anti-PD-L1, y formulaciones de los mismos, e instrucciones de uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico, ESA, etc. Los kits normalmente incluyen una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier escrito o material grabado que se suministre en o con el equipo, o que acompañe al equipo.
- 55 Secuencias
- 60 [0127] En algunos casos, los métodos descritos en este documento incluyen la administración de anticuerpos con secuencias descritas en este documento; por ejemplo, las secuencias de cadena pesada, cadena ligera y/o CDR descritas en el presente documento. Las secuencias de los anticuerpos administrados pueden ser, por ejemplo, al menos 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idénticas a las secuencias descritas en el presente documento.
- 65 [0128] El término porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje específico de nucleótidos o residuos de

5 aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una máxima correspondencia, medida usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias descritos a continuación (por ejemplo, BLASTP y BLASTN u otros algoritmos disponibles para personas expertas) o mediante inspección visual. Dependiendo de la aplicación, el porcentaje de "identidad" puede existir sobre una región de la secuencia que se compara, por ejemplo, sobre un dominio funcional o, alternativamente, puede existir sobre la longitud total de las dos secuencias que se comparan.

10 [0129] Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba en relación con la secuencia de referencia, en función de los parámetros de programa designados.

15 [0130] El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. UU.* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software genético de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual (véase en general Ausubel et al., *infra*).

20 [0131] Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

25 EJEMPLOS

Ejemplo 1

30 Experimento de sinergia in vitro

35 [0132] Se realiza un ensayo ADCC utilizando células NK de ratón o humanas (efectores) y células cancerosas de ratón o humanas (células diana). Las células NK de ratón se aíslan de sangre periférica, médula ósea o bazo; las células NK humanas se aíslan de la sangre periférica. Las líneas celulares de cáncer humano o las muestras primarias se etiquetan para su uso como células diana (*p. ej.*, con cromo o colorante fluorescente).

[0133] Las células NK y las células cancerosas se combinan in vitro y se cocultivan con los siguientes tratamientos:

- 40
- Control de vehículos (por ejemplo, PBS)
 - Anticuerpo anti-PD-L1 solo, incluido avelumab
 - Anticuerpo anti-CD47 solo
 - Anticuerpo anti-CD47 más el anticuerpo anti-PD-L1 ADCC se mide mediante un ensayo de liberación de cromo o ensayos de muerte celular por citometría de flujo (*p. ej.*, tinción con anexina V/DAPI). La liberación de citoquinas de células NK (*p. ej.*, IFN-gamma) se mide mediante ELISA. El cambio en la muerte celular y la liberación de citoquinas en presencia del inhibidor del punto de control combinado con anti-CD47 se determina en relación con las monoterapias enumeradas anteriormente.

Ejemplo 2

50 Protocolo de experimento in vivo

[0134] Se inyectan células cancerosas en ratones a través de la inyección de sangre periférica, retroperitoneal o subcutánea y se permite que se injerten. Los animales se aleatorizan en cuatro grupos de tratamiento:

- 55
- Control de vehículos (por ejemplo, PBS)
 - Anticuerpo anti-PD-L1 solo, incluido avelumab
 - Anticuerpo anti-CD47 solo
 - Anticuerpo anti-CD47 más anticuerpo anti-PD-L1
- 60 [0135] Los ratones se tratan diariamente, tres veces por semana, dos veces por semana o una vez por semana con los respectivos tratamientos. La carga tumoral se mide mediante mediciones del volumen del tumor, bioluminiscencia utilizando células cancerosas marcadas (*p. ej.*, células positivas para luciferasa) y/o análisis de sangre periférica. También se mide la supervivencia global de los ratones.

Ejemplo 3

Un estudio de avelumab en combinación con anticuerpo anti-CD47 en cánceres de ovario

[0136] Este es un estudio de optimización de dosis para evaluar la seguridad, farmacocinética, farmacodinámica y actividad antitumoral de avelumab (MSB0010718C) en combinación con bloqueo de CD47 en pacientes con tumores sólidos y pacientes con cáncer de ovario, de trompas de Falopio y carcinoma peritoneal primario sin tratamiento previo que han progresado previamente dentro de los 6 meses de quimioterapia previa con platino. El propósito principal es evaluar la seguridad y eficacia de varias combinaciones con bloqueo de CD47, optimizando los regímenes de dosificación según corresponda, en una serie limitada de indicaciones. Inicialmente, el estudio evaluará la seguridad y la actividad antitumoral de avelumab, un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-PD-L1 en combinación con 5F9-G4, un anticuerpo humanizado que bloquea las interacciones entre CD47 y SIRPalfa. Los objetivos secundarios incluyen determinar una dosis recomendada de Hu5F9-G4 + avelumab en pacientes con tumores sólidos, examinar los perfiles farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) de Hu5F9-G4 en combinación con avelumab, evaluar la inmunogenicidad de Hu5F9-G4 en combinación con avelumab, y evaluar el impacto de esta combinación en las poblaciones de células mieloides en el 15 microambiente tumoral según lo evaluado en biopsias tumorales secuenciales en pacientes con cáncer de ovario resistente al platino.

[0137] Medidas del objetivo primario: se controlará el número de participantes con toxicidades limitantes de la dosis (DLT) durante las primeras 5 semanas de tratamiento, comenzando con la dosis de cebado inicial de Hu5F9-G4. El primer ciclo tendrá una duración de 5 semanas y los ciclos posteriores serán cada 4 semanas. Las evaluaciones iniciales de la respuesta tumoral se realizarán justo antes de la semana 10 de tratamiento (antes del ciclo 3) y luego cada 8 semanas de tratamiento (cada 2 ciclos). Todas las toxicidades se clasificarán de acuerdo con la versión 4,03 de NCI CTCAE. Una DLT se define como cualquier EA de Grado 3 o mayor que se evalúa como relacionado con el tratamiento del estudio que ocurre durante el período de observación de DLT de 4 semanas.

[0138] Medidas objetivas secundarias: en la cohorte de cáncer de ovario, se obtendrán biopsias tumorales donde sea médicaamente factible en todos los pacientes al inicio durante la selección y después al final del ciclo 2 (\pm 2 semanas). Las biopsias de tumores son opcionales para los pacientes de prueba de seguridad. La evaluación durará hasta 30 días antes de la primera dosis del fármaco del estudio, tiempo durante el cual se determinarán la elegibilidad del paciente y las 30 características iniciales. La eficacia se evaluará utilizando los criterios iRECIST. El tratamiento con el fármaco del estudio puede continuar hasta que se produzca una toxicidad inaceptable relacionada con el fármaco o hasta la progresión de la enfermedad según iRECIST. Los pacientes que experimenten una progresión inicial de la enfermedad pueden permanecer en el estudio hasta que iRECIST considere que tienen una enfermedad progresiva siempre que se cumplan 35 todas las condiciones siguientes: ausencia de síntomas de empeoramiento de su tumor, toxicidad inaceptable o irreversible relacionada con el tratamiento del estudio, ausencia de evidencia de deterioro clínico o estado funcional en declive, y sin complicaciones inminentes que pongan en peligro la vida derivadas del crecimiento del tumor. Después del tratamiento, se observará la supervivencia de los pacientes hasta la muerte, el retiro del consentimiento o el final del estudio, lo que ocurra primero.

Cohorte de dosis	Fármaco/Dosis (IV)	Programa de dosis	
		Ciclo 1 (35 días)	Ciclo 2+ (28 días)
-1	Hu5F9-G4 1 mg/kg (principal)	Día 1	-
	Hu5F9-G4 20 mg/kg (mantenimiento)	Día 8, 15, 22, 29	Día 1, 8, 15, 22
1 (dosis inicial)	Avelumab 10 mg/kg cada 2 semanas	Día 8, 22	Día 1, 15
	Hu5F9-G4 1 mg/kg (principal)	Día 1	-
	Hu5F9-G4 30 mg/kg (mantenimiento)	Día 8, 15, 22, 29	Día 1, 8, 15, 22
	Avelumab 10 mg/kg cada 2 semanas	Día 8, 22	Día 1, 15

Ejemplo 4

Ensayos de células T

[0139] Ensayo de presentación de antígeno. Para los ensayos de presentación de antígenos in vitro, se cocultivan 10^4 macrófagos con cantidades iguales de células cancerosas DLD1-cOVA-GFP durante la noche en medios RPMI sin suero. Al día siguiente, se añade a los cultivos un volumen igual de RPMI + FCS al 20 %. Los ganglios linfáticos periféricos se recogen de ratones transgénicos TCR OT-I u OT-II y se marcan con CFSE 0,5 mM (Molecular Probes). Las células T se aíslan usando anticuerpos anti-CD8 o anti-CD4 biotinilados, seguido de enriquecimiento con perlas magnéticas anti-biotina (Miltenyi Biotec). Se añaden 5×10^4 células T a los cultivos y se analizan el día 3 (para células T OT-I) o el día 4 (para células T OT-II). Para los ensayos de presentación de antígenos in vivo, se transfieren adoptivamente iv 2×10^6 células T OT-I marcadas con CFSE (CD45,2) a ratones receptores (CD45,1). Los macrófagos se aíslan del cocultivo con células cancerosas y se inyectan en la planta de los ratones. Los ganglios linfáticos poplíticos se analizan el día 4 para la dilución de CFSE dentro de las células CD45,2+.

[0140] Ensayo de eliminación de células in vivo. En resumen, los esplenocitos de ratones C57BL/Ka (CD45,1) se marcan con CFSE 10 uM (CFSE alto) y CFSE 1 uM (CFSE bajo). Se pulsan esplenocitos altos en CFSE en una placa de 6 pocillos

- con péptido SIINFEKL 1 uM (SEQ ID NO: 5) durante 1 hora. Las células se mezclan en una proporción de 1:1 con células CFSE bajas sin pulsos de péptidos antes de la transferencia iv. Para tener en cuenta la variación en la proporción alta/baja de CFSE en ausencia de lisis específica de péptido, los ratones de control reciben esplenocitos con alto contenido de CFSE no pulsados con péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 5) antes de mezclarlos en una proporción de 1:1 con esplenocitos con bajo contenido de CFSE y transferirlos a ratones. Los ganglios linfáticos que drenan se analizan 16 horas más tarde. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como $(1 - \% \text{ CFSE}^{\text{alto}} / \% \text{ CFSE}^{\text{bajo}})$ normalizado a la relación en ratones de control que recibieron esplenocitos no pulsados con péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 5).
- 5 [0141] Desafío tumoral. 1×10^6 células T OT-I enriquecidas con CD8 se transfieren adoptivamente iv a ratones receptores C57BL/Ka. Los macrófagos de ratones C57BL/Ka singénicos se cocultivan con cáncer DLD1-cOVA-GFP y luego se aíslan mediante enriquecimiento magnético y se inyectan en la almohadilla de los ratones. La línea de células tumorales E.G7 (células EL.4 que expresan el ADNc de OVA de pollo) se usa para la exposición a tumores de ratones (ATCC). Se inyectan 1×10^5 células E.G7 s.c. en la pata trasera derecha de los ratones en una proporción de 1:1 con matriz normal. El tamaño del tumor se mide todos los días utilizando calibradores finos y el volumen se calcula en función de la longitud * anchura * altura * $\pi/6$.
- 10 [0142] Proliferación de células T. Las células T maduras reconocen y responden al complejo antígeno/MHC a través de sus receptores específicos de antígeno (TCR). La consecuencia más inmediata de la activación de TCR es el inicio de vías de señalización que incluyen la inducción de proteínas tirosina quinasa (PTK) específicas, la descomposición del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), la activación de la proteína quinasa C (PKC) y la elevación del ion de calcio intracelular. concentración. Estos eventos tempranos se transmiten al núcleo y dan como resultado la expansión clonal de las células T; regulación positiva de marcadores de activación en la superficie celular; diferenciación en células efectoras; inducción de citotoxicidad o secreción de citoquinas; inducción de la apoptosis.
- 15 [0143] La activación de células T se evalúa midiendo la proliferación de células T tras la estimulación in vitro de células T a través de antígenos o anticuerpos agonistas contra TCR. Este protocolo está escrito como punto de partida para examinar la proliferación in vitro de células T esplénicas de ratón y células T periféricas humanas estimuladas a través de CD3. Los parámetros críticos incluyen la densidad celular, el título de anticuerpos y la cinética de activación.
- 20 [0144] Preparar una solución de 5-10 $\mu\text{g/mL}$ de anti-CD3e (145-2C11) en PBS estéril. Calcule el número de pocillos necesarios para cada condición experimental y considere muestras por triplicado para cada condición. Por ejemplo, para cubrir media placa (48 pocillos) se requieren 2,6 mL de solución de anticuerpo. Dispense 50 μL de la solución de anticuerpos en cada pocillo de la placa de ensayo de 96 pocillos. Para los pocillos no estimulados de control, agregue 50 μE de PBS estéril. Cubra bien la placa con ParafilmTM para evitar la evaporación de la muestra e incube a 37 °C durante 2 horas o prepare la placa con un día de anticipación y manténgala a 4 °C durante la noche. Justo antes de agregar las células, retire la solución de anticuerpos de 50 μL con una pipeta multicanal. Enjuague cada pocillo con 200 μL de PBS estéril y deseche el PBS.
- 25 [0145] Cosechar el bazo y preparar una suspensión de células individuales en condiciones estériles y resuspender en RPMI-1640 completo a 10⁶/mL en presencia de los agentes deseados, por ejemplo, anti-CD47, inhibidores de puntos de control, etc. Agregar 200 μE de la suspensión celular a cada pocillo y colóquelo en una incubadora humidificada a 37 °C, CO₂ al 5 %. Agregue anti-CD28 soluble a las células a 2 ug/mL. Incubar durante 2-4 días. Las células se pueden recolectar y procesar para la cuantificación.
- 30 [0145] Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, los protocolos, las líneas celulares, las especies o géneros animales y los reactivos particulares descritos, ya que pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir formas de realización particulares únicamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.
- 35 [0146] Como se utilizan aquí, las formas singulares "un", "y" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia a "el cultivo" incluye la referencia a uno o más cultivos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. Todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entienden los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención, a menos que se indique claramente lo contrario.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CD47 para uso en un método de tratamiento de un cáncer de ovario epitelial humano resistente al platino, que comprende
- 5 a. administrar una dosis de sensibilización del anticuerpo anti-CD47 al sujeto, siendo la dosis de sensibilización 1 mg/kg del anticuerpo anti-CD47; y
- 10 b. administrar una dosis terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-CD47 al sujeto, donde la dosis terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-CD47 es de 20 a 60 mg/kg, y donde el paso (b) se realiza después de al menos aproximadamente 7 días después de comenzar paso (a) y cada 7 días a partir de entonces; y
- 15 c. administrar Avelumab al sujeto, donde la dosis de Avelumab es de 10 mg/kg, y donde el paso (c) se realiza al menos aproximadamente 7 días después del paso (a) y cada 14 días a partir de entonces, donde el anticuerpo anti-CD47 tiene la fuerte secuencias de cadena y cadena ligera de SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente.
2. El anticuerpo anti-CD47 para el uso de la reivindicación 1, en el que la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD47 es de 30 mg/kg.
3. El anticuerpo anti-CD47 para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el cáncer de ovario epitelial es tumor seroso, tumor mucinoso, tumor de células claras, tumor de endometrio, tumor de células de transición, tumor de Brenner, tumor de carcinosarcoma, tumor epitelial mixto, tumor epitelial limítrofe, tumor carcinoma indiferenciado, tumor de las trompas de Falopio o tumor peritoneal primario.
4. El anticuerpo anti-CD47 para el uso de la reivindicación 3, en el que el cáncer de ovario epitelial es un tumor seroso, opcionalmente en el que el cáncer de ovario del tumor seroso es de bajo o alto grado según se determina mediante subtipificación del análisis histológico.
5. El anticuerpo anti-CD47 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
- 30 (i) el tipo de tumor se determina mediante análisis histológico, o
(ii) el sujeto no tiene anticuerpos anti-PD-L1.
6. El anticuerpo anti-CD47 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde:
- 35 (i) el anticuerpo anti-CD47 y Avelumab se administran simultáneamente o secuencialmente, y/o
(ii) el anticuerpo anti-CD47 y Avelumab se formulan cada uno en una composición farmacéutica con un excipiente farmacéuticamente aceptable, y/o
(iii) el anticuerpo anti-CD47 y/o Avelumab se administra por vía intravenosa, intraabdominal o intratumoral.
- 40 7. El anticuerpo anti-CD47 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la administración:
- 45 (i) reduce el nivel de CA125 en el sujeto en comparación con la línea de base, opcionalmente donde el nivel de CA125 se mide aproximadamente una vez al mes, y/o
(ii) reduce el nivel de CA125 en el sujeto en al menos un 30-90, 40-80, 50-70, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % en comparación con el valor inicial, y/o
(iii) reduce el tamaño del cáncer o metástasis del mismo en comparación con el valor inicial, opcionalmente según lo medido por imágenes, opcionalmente en el que las imágenes son CT/PET/CT o MRI, que comprende opcionalmente una enfermedad que aumenta inicialmente desde el valor inicial pero que posteriormente disminuye de tamaño, y/o
- 50 (iv) reduce el nivel de al menos uno de CA125, HE4 (proteína 4 del epidídimos humano), CA-72-4, CA-19-9 y CEA; en comparación con la línea de base.
8. El anticuerpo anti-CD47 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además administrar una dosis de cebado de un agente estimulante de la eritropoyetina.
- 55 9. El anticuerpo anti-CD47 para uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende (a) administrar la dosis de cebado del anticuerpo anti-CD47 al sujeto a una dosis de 1 mg/kg de anticuerpo el día 1; y (b) administrar la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD47 al sujeto a una dosis de 20 mg/kg de anticuerpo, 30 mg/kg de anticuerpo, 45 mg/kg de anticuerpo o 60 mg/kg de anticuerpo el día 8.
- 60 10. El anticuerpo anti-CD47 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que:
- 65 (i) la eficacia de la dosis inicial se determina en función del estado de anemia del sujeto después de la administración de la dosis inicial, o
(ii) la dosis inicial se considera efectiva si: la caída en el nivel de hemoglobina del sujeto no es inferior a 8,0 g/dL; y/o la caída absoluta en el nivel de hemoglobina del sujeto es inferior a 3,0 a 3,75 g/dL.

11. El anticuerpo anti-CD47 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende además después del paso (a) y antes del paso (b): un paso para determinar si la administración de la dosis de preparación fue efectiva, opcionalmente en donde la determinación El paso comprende realizar un recuento de reticulocitos, en el que se determina que la administración de la dosis de cebado ha sido eficaz si el recuento de reticulocitos es de aproximadamente 100 x 10⁹ reticulocitos por L a aproximadamente - 1000 x 10⁹ reticulocitos por L,
5 opcionalmente además en el que el paso de determinación comprende realizar un recuento de reticulocitos, en el que: (i) se determina que la administración de la dosis de cebado ha sido eficaz si el porcentaje de reticulocitos en la sangre es superior a aproximadamente el 1,5 %, o (ii) se determina que la administración del agente cebador ha sido eficaz sido eficaz si el índice de reticulocitos es superior a aproximadamente el 2 %.
- 10 12. El anticuerpo anti-CD47 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde la dosis de cebado se administra al sujeto humano en una infusión con una concentración de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml de anticuerpo anti-CD47, donde opcionalmente la infusión se administra durante un período de:
15 (i) al menos aproximadamente 1-3, 8- 10, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 hora(s),
(ii) al menos aproximadamente 3 horas, o
(iii) de aproximadamente 2,5 horas a aproximadamente 6 horas.
- 20 13. El anticuerpo anti-CD47 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde la dosis de cebado:
25 (i) se administra mediante bomba continua durante un período de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 3 días, y/o
(ii) es administrado por vía subcutánea, y/o
(iii) satura al menos aproximadamente del 50 % al 100 % de los sitios CD47 en los glóbulos rojos, opcionalmente el 100 % de los sitios CD47 en los glóbulos rojos, opcionalmente donde la dosis se determina mediante un ensayo de ocupación del receptor, en el que, después de la administración de una dosis de anticuerpo anti-CD47 no marcado al sujeto, se obtiene una muestra de sangre y se combina con una dosis de saturación de anticuerpo anti-CD47 marcado de forma detectable; y determinar el nivel de unión.
30 14. El anticuerpo anti-CD47 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde la dosis terapéuticamente efectiva de (b) es suficiente para lograr un nivel circulante de más de 100, 250, 500 o 1000 µg/ml del anticuerpo anti-CD47 durante un período sostenido de tiempo, opcionalmente en el que el período sostenido es de al menos 1-28, 7-28, 7-21, 14-28 o 21-28 días, opcionalmente en el que el período sostenido es de aproximadamente 1, 2, 3 o 4 semanas.
35 15. El anticuerpo anti-CD47 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde la dosis terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-CD47 es 20 mg/kg, 30 mg/kg, 45 mg/kg o 60 mg/kg.