

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 558**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2018 PCT/US2018/038798**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2018 WO18237168**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2018 E 18820011 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2024 EP 3642242**

54 Título: **Parámetros de dosificación para terapias de direccionamiento de CD47 en neoplasias hematológicas**

30 Prioridad:

21.06.2017 US 201762523182 P

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

05.08.2024

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (50.0%)
Office of the General Counsel Building 170, Third Floor, Main Quad P.O. Box 20386
Stanford, CA 94305-2038, US y
FORTY SEVEN, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MAJETI, RAVINDRA;
CHAO, MARK P.;
LIU, JIE;
VOLKMER, JENS-PETER y
WEISSMAN, IRVING L.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 976 558 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

Parámetros de dosificación para terapias de direccionamiento de CD47 en neoplasias hematológicas

5 FONDO

10 **[0001]** CD47 es una glicoproteína transmembrana expresada ampliamente con un solo dominio similar a Ig y cinco regiones que abarcan la membrana, que funciona como un ligando celular para SIRP α con la unión mediada por el dominio de terminal NH₂ de tipo V de SIRP α . La SIRP α se expresa principalmente en células mieloides, como macrófagos, granulocitos, células dendríticas mieloides (DC), mastocitos y sus precursores, incluidas las células madre hematopoyéticas. CD47 interviene en diversos procesos biológicos, como la adhesión y migración de leucocitos, la activación de células T, la apoptosis y la fagocitosis.

15 **[0002]** SIRP α inhibe la fagocitosis de células huésped por macrófagos, donde la ligadura de SIRP α en macrófagos por CD47 expresado en la célula huésped diana genera una señal inhibitoria mediada por SHP-1 que regula negativamente la fagocitosis. SIRP α actúa para detectar las señales proporcionadas por el "yo", para controlar negativamente la función efectora inmune innata contra estas células.

20 **[0003]** CD47 también se regula al alza de forma constitutiva en varios tipos de cáncer, incluidas las leucemias. La sobreexpresión de CD47 aumenta la patogenicidad al permitir que las células cancerosas eludan la fagocitosis. Aunque la acción sobre CD47 representa un mecanismo de acción único para el tratamiento del cáncer, la amplia expresión de CD47 supone un reto terapéutico. Además, el tratamiento de las leucemias y los trastornos hematológicos relacionados presenta problemas especiales, como los efectos adversos del cáncer sobre la médula ósea y la función hematológica, y las complicaciones del síndrome de lisis tumoral. Los métodos que aquí se presentan abordan estos retos.

25 **[0004]** Métayer et al. (2017) Oncotarget 8(37), p. 60892-60903 describe anticuerpos anti-CD47 que inducen la fagocitosis de células B malignas vivas por macrófagos a través del dominio Fc. Sutherland et al. (2010) mAbs Landes Bioscience vol. 24, p. 440-448 describe la potenciación de la actividad antileucocítica del lintuzumab por la 5-azacitidina en modelos preclínicos de leucemia mieloide aguda. Boasman et al. (2017) 22º Congreso de la Asociación Europea de Hematología Madrid, España, 22-25 de junio de 2017 El libro de resúmenes describe el papel de la calreticulina profagocítica y CD47 antifagocítica en modelos de MDS y MPN tratados con azacitidina o ruxolitinib. El documento US 2016/0008429 describe métodos para conseguir dosis terapéuticamente eficaces de agentes anti-CD47. El documento WO 2016/094698 describe la detección de tumores circulantes y células madre tumorales mediante sondas genómicas específicas.

35 **[0005]** Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

40 RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] La invención proporciona un anticuerpo anti-CD47 que reduce la unión de CD47 a SIRP α y azacitidina para su uso en un método de tratamiento de un paciente para un cáncer hematológico.

45 **[0007]** Las neoplasias malignas hematológicas, incluyendo sin limitación las leucemias como la leucemia mieloide aguda, la leucemia linfocítica aguda, el mieloma múltiple, etc., plantean un conjunto único de problemas para una terapia eficaz. Si se eliminan con demasiada rapidez, la elevada carga de células tumorales circulantes que suele asociarse a las leucemias puede resultar tóxica para el paciente. Esto puede suponer un riesgo al aumentar la dosis de un agente anti-CD47 con demasiada rapidez. Al mismo tiempo, es deseable llevar a un paciente hasta niveles terapéuticos del agente lo más rápidamente posible para proporcionar un beneficio terapéutico.

50 **[0008]** En el presente documento se proporcionan métodos para determinar y administrar una dosificación optimizada de anticuerpos terapéuticos anti-CD47, en un programa que proporciona una escalada segura de la dosis mientras se alcanza un nivel terapéutico en un periodo de tiempo clínicamente eficaz. Los métodos pueden comprender las etapas de autorización, escalada y mantenimiento. En una realización, el régimen de dosificación administra una (i) dosis subterapéutica inicial de un anticuerpo anti-CD47 o (ii) una terapia citorreductora para alcanzar un nivel seguro de células tumorales circulantes para el tratamiento posterior (aclaramiento); escalada de la dosis de un anticuerpo anti-CD47 hasta alcanzar una dosis terapéutica, en la que se logra una ocupación del receptor superior al 80% aproximadamente en células blásticas de la médula ósea del paciente (escalada); y mantenimiento de la dosis terapéutica durante un periodo de tiempo suficiente para reducir las células tumorales en la médula ósea del paciente (mantenimiento). En un régimen de dosificación alternativo, un paciente con un nivel seguro de células tumorales circulantes en el momento de la presentación es tratado mediante los pasos de escalada y mantenimiento, que comprenden: escalada de la dosis de un anticuerpo anti-CD47 hasta alcanzar una dosis terapéutica, en la que se consigue una ocupación del receptor superior al 80% aproximadamente en células blásticas de la médula ósea del paciente (escalada); y mantenimiento de la dosis terapéutica durante un periodo de tiempo suficiente para reducir las células tumorales en la médula ósea del paciente (mantenimiento).

65 **[0009]** Los parámetros para la dosis y el tiempo pueden incluirse en un programa de "rampa", que proporciona tanto

directrices generales para la administración como puntos específicos en los que pueden utilizarse datos de pacientes individuales para ajustar la rampa, por ejemplo, evaluando el nivel de células blásticas circulantes; monitorizando la ocupación del receptor de células blásticas de la médula ósea; etc.

5 **[0010]** La elevada carga tumoral circulante y de médula ósea asociada a las neoplasias hematológicas puede crear problemas de toxicidad cuando se administra a un individuo una dosis terapéutica de un anticuerpo anti-CD47 sin un
escalado de dosis adecuado, además del efecto del tratamiento anti-CD47 sobre los eritrocitos. La toxicidad puede
deberse a la lisis de las células tumorales circulantes. En los presentes métodos, la escalada a un nivel terapéutico no se
10 inicia hasta que el paciente tiene un nivel seguro de células tumorales circulantes, estado que puede denominarse punto
de escalada. Alcanzar un nivel seguro, si los niveles iniciales de células tumorales circulantes son demasiado altos, puede
lograrse administrando un agente citorreductor, por ejemplo hidroxurea, hidroxycarbamida, fludarabina, etopósido oral,
leucaféresis, etc. para reducir la carga de células tumorales circulantes. Alternativamente, esto puede conseguirse
administrando un nivel bajo, subterapéutico, del anticuerpo anti-CD47. Una vez alcanzado un nivel seguro de células
15 circulantes, la dosis puede aumentarse hasta niveles terapéuticos. Este aumento de la dosis evita la mortalidad precoz y
permite la eliminación segura de las células leucémicas.

[0011] En algunas realizaciones, una dosis terapéutica para el tratamiento de neoplasias hematológicas equivale a una
dosis que proporciona una ocupación sustancialmente completa de los sitios de unión de CD47 en la superficie de las
células blásticas en la médula ósea por un anticuerpo anti-CD47 (denominada en el presente documento ocupación del
20 receptor), durante un periodo de tiempo definido. La ocupación sustancialmente completa del receptor puede ser de al
menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, o más. El
periodo de tiempo definido puede ser, por ejemplo, el tiempo entre la administración de dosis, p. ej., alrededor de 1 día,
alrededor de 2 días, alrededor de 4 días, alrededor de 4 días, alrededor de 5 días, alrededor de 6 días, alrededor de 1
semana, alrededor de 10 días, alrededor de 2 semanas, y similares. Alternativamente, el periodo de tiempo definido puede
25 ser el tiempo entre la administración de una dosis terapéutica y el trasplante, entre la administración de una dosis
terapéutica y la administración de un agente adicional alternativo, complementario y/o sinérgico, y similares.

[0012] El programa de dosificación para un anticuerpo anti-CD47 de interés puede incluir (i) el número de escaladas, por
ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.; (ii) el periodo de tiempo entre escaladas, por ejemplo alrededor de 1 día, alrededor
30 de 2 días, alrededor de 4 días, alrededor de 4 días, alrededor de 5 días, alrededor de 6 días, alrededor de 1 semana,
alrededor de 10 días, alrededor de 2 semanas, y similares; (iii) el nivel de aumento de la dosis para cada escalada, y si
es fijo o variable; y (iv) la dosis inicial. Un programa también puede incluir (v) la dosificación y/o escalada de un agente
citorreductor para reducir la carga de células tumorales circulantes. Estos parámetros definen una pauta de dosificación
35 segura y clínicamente eficaz.

[0013] Los puntos de datos para la evaluación de una respuesta individual y el ajuste del programa pueden incluir la
determinación del número de células tumorales circulantes; y la determinación de si un individuo ha alcanzado un nivel
terapéutico de un anticuerpo anti-CD47, p. ej., determinando la ocupación del receptor de los sitios de unión de CD47 en
la superficie de las células tumorales, p. ej., en la médula ósea o en la sangre; determinando el nivel sérico del anticuerpo
40 anti-CD47, etc.

[0014] Para determinar el número de células tumorales circulantes, la medición puede hacerse de células blásticas
circulantes, o de glóbulos blancos, donde el término "célula blástica" se usa para referirse a células tumorales
hematológicas circulantes. En algunas realizaciones, cuando las células blásticas circulantes del paciente son superiores
45 a aproximadamente 20×10^9 /litro, superiores a aproximadamente 15×10^9 /litro, superiores a aproximadamente $10 \times$
 10^9 /litro, superiores a aproximadamente 5×10^9 /litro, superiores a aproximadamente 2×10^9 /litro, el paciente es tratado
con una dosis subterapéutica de un anticuerpo anti-CD47, tratado con un agente citorreductor, o ambos, hasta el momento
en que el nivel de células blásticas circulantes se reduce a un nivel seguro para la terapia. Por el contrario, un paciente
con niveles iniciales de menos de aproximadamente 2×10^9 /litro de blastos circulantes, menos de aproximadamente $5 \times$
50 10^9 /litro, menos de aproximadamente 10×10^9 /litro puede iniciarse en la fase de intensificación sin citorreducción. Los
glóbulos blancos (WBC) circulantes pueden contarse en lugar de las células blásticas circulantes, donde cuando los WBC
circulantes del paciente son mayores de aproximadamente 50×10^9 /litro, mayores de aproximadamente 20×10^9 /litro,
mayores de aproximadamente 5×10^9 /litro el paciente es tratado con una dosis subterapéutica de un anticuerpo anti-
CD47, tratado con un agente citorreductor, o ambos, hasta el momento en que el nivel de células tumorales circulantes
55 se reduce a un nivel seguro para la terapia. Por el contrario, un paciente con niveles iniciales de menos de
aproximadamente 5×10^9 /litro de WBC circulantes, menos de aproximadamente 10×10^9 /litro, menos de
aproximadamente 20×10^9 /litro puede iniciarse en la fase de intensificación sin citorreducción.

[0015] Los métodos incluyen la administración de un anticuerpo anti-CD47 para el tratamiento de neoplasias
hematológicas en terapias combinadas, que pueden proporcionar un efecto aditivo y/o sinérgico en la reducción de células
60 tumorales. Las terapias combinadas específicas incluyen, sin limitación, combinaciones con agentes y terapias
citorreductoras, combinaciones con agentes hipometilantes (epigenéticos), combinaciones con agentes inmuno-
oncológicos, incluyendo aquellos agentes que actúan sobre células T, combinaciones con agentes dirigidos a tumores,
por ejemplo anticuerpos que se unen selectivamente a marcadores de células cancerosas, combinaciones con factores
biológicos que aumentan la activación de células fagocíticas, el crecimiento, la localización y similares; combinaciones
65 con trasplantes, transfusiones, leucaféresis, agentes estimulantes de la eritropoyetina, incluida la eritropoyetina, y

similares.

[0016] Los métodos incluyen la selección de pacientes para la eficacia de un anticuerpo anti-CD47 para el tratamiento de neoplasias hematológicas y el tratamiento de pacientes seleccionados. Los criterios de selección pueden basarse en parámetros clínicos, expresión de biomarcadores y similares. Se incluyen como biomarcadores las mutaciones moleculares para el enriquecimiento de la eficacia, p. ej., las mutaciones específicas del MDS. Los parámetros clínicos pueden incluir, sin limitación, pacientes con MDS de riesgo intermedio/alto (R/R); terapia combinada con azacitidina para pacientes no aptos ingenuos al tratamiento; monoterapia para pacientes no aptos para quimioterapia de inducción que han recaído/son refractarios a terapias convencionales; y tratamiento de pacientes con enfermedad residual mínima.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0017] La invención se comprende mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con los dibujos adjuntos. Se subraya que, según la práctica habitual, las distintas características de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de las distintas características se amplían o reducen arbitrariamente para mayor claridad. Los dibujos incluyen las siguientes figuras.

- La **FIG. 1.** Aumento de la fagocitosis de células de leucemia mielógena aguda por macrófagos mediante el tratamiento combinado de Hu5F9-G4 con azacitidina. Abreviatura: AZA = Azacitidine.
- La **FIG. 2.** Escalada de dosis en la AML
- La **FIG. 3A-3B.** El tratamiento escalonado de dosis en la AML previene la muerte aguda
- La **FIG. 4.** Concentraciones séricas de Hu5F9-G4 en pacientes.
- La **FIG. 5.** Microfotografías de biopsias de médula ósea de ratones y pacientes tratados con Ab Anti-CD47 (ratones: Clon B6H12; Humano: Clon Hu5F9-G4).
- La **FIG. 6.** Microfotografías del análisis inmunohistoquímico de macrófagos y células T en biopsias de médula ósea de pacientes tratados con Hu5F9-G4
- La **FIG. 7.** Esquema del ensayo de ocupación del receptor.
- La **FIG. 8.** Perfil clínico de dosificación.
- La **FIG. 9.** Ocupación del receptor CD47 en la AML. Los datos muestran que una dosis de 15mg/kg (después de las dosis de cebado de 1 mg/kg) fue suficiente para alcanzar casi el 100% de RO en los compartimentos críticos de sangre periférica y médula ósea.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0018] Se proporcionan métodos para determinar y administrar una dosificación optimizada de anticuerpos terapéuticos anti-CD47 para el tratamiento de neoplasias hematológicas, p. ej., leucemias, en un programa que proporciona una escalada segura de la dosis mientras se alcanza un nivel terapéutico en un periodo de tiempo clínicamente eficaz.

[0019] Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de dicho intervalo también se divulga específicamente. La invención abarca todos los intervalos menores entre cualquier valor declarado o valor intermedio de un intervalo declarado y cualquier otro valor declarado o valor intermedio de ese intervalo declarado. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el rango, y cada rango en el que uno, ninguno o ambos límites estén incluidos en los rangos más pequeños también se engloba dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos límites incluidos también se incluyen en la invención.

[0020] Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos, a continuación se describen algunos métodos y materiales potenciales y preferidos.

[0021] Cabe señalar que, tal como se utilizan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/una", y "el/la" incluyen una referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia a "el péptido" incluye la referencia a uno o más péptidos y equivalentes de los mismos, p. ej., polipéptidos, conocidos por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

[0022] Las publicaciones comentadas en el presente documento se facilitan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo aquí expuesto debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a ser anterior a dicha publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación facilitadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, lo que puede requerir una confirmación independiente.

[0023] Los términos "receptor", "individuo", "sujeto", "huésped" y "paciente" se utilizan indistintamente en el presente

documento y se refieren a cualquier sujeto mamífero para el que se desee un diagnóstico, tratamiento o terapia, en particular los seres humanos. "Mamífero" a efectos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos los seres humanos, los animales domésticos y de granja, y los animales de zoológico, deportivos o de compañía, como perros, caballos, gatos, vacas, ovejas, cabras, cerdos, etc. Normalmente, el mamífero es humano.

[0024] Los términos "cáncer", "neoplasia", "tumor" y "carcinoma" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a células que presentan un crecimiento relativamente autónomo, de modo que muestran un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa del control de la proliferación celular. En general, las células de interés para la detección o el tratamiento en la presente aplicación incluyen células precancerosas (p. ej., benignas), malignas, premetastásicas, metastásicas y no metastásicas. La detección de células cancerosas reviste especial interés. El término "normal", utilizado en el contexto de "célula normal", se refiere a una célula de fenotipo no transformado o que presenta la morfología de una célula no transformada del tipo de tejido examinado. "Fenotipo canceroso" se refiere generalmente a cualquiera de una variedad de fenómenos biológicos que son característicos de una célula cancerosa, fenómenos que pueden variar con el tipo de cáncer. El fenotipo canceroso se identifica generalmente por anomalías en, por ejemplo, el crecimiento o la proliferación celular (p. ej., crecimiento o proliferación incontrolados), la regulación del ciclo celular, la movilidad celular, la interacción célula-célula, o la metástasis, etc.

[0025] Los términos "neoplasia hematológica", "tumor hematológico" y "cáncer hematológico" se utilizan indistintamente y en el sentido más amplio en el presente documento y se refieren a todas las etapas y todas las formas de cáncer que surgen de las células del sistema hematopoyético.

[0026] Ejemplos de neoplasias hematológicas que pueden tratarse usando los métodos del sujeto incluyen leucemias, linfomas y mielomas, incluyendo pero sin limitarse a leucemia bifenotípica aguda, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia promielocítica aguda (APL), leucemia aguda bifenotípica (BAL), neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica (CMML), leucemia linfocítica crónica (CLL) (denominada linfoma linfocítico pequeño (SLL) cuando no hay células leucémicas), leucemia monocítica aguda (AMOL), linfomas de Hodgkin (e.g. linfoma linfocítico crónico (CLL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular (FL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de zona marginal (MZL), linfoma de Burkitt (BL), leucemia de células pilosas, trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), macroglobulinemia de Waldenström/linfoma linfoplasmocitario, linfoma hepatoesplénico de células T y linfoma cutáneo de células T (incluido el síndrome de Sezary)), mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico y neoplasias mieloproliferativas. En realizaciones particulares, los métodos del sujeto encuentran utilidad en el tratamiento de leucemias, p. ej., leucemia bifenotípica aguda, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia promielocítica aguda, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia monocítica aguda (AMOL).

[0027] Para AML, varios marcadores moleculares pueden encontrar uso en la selección y dosificación de pacientes, incluyendo sin limitación factores pronósticos clínicos conocidos asociados con un resultado favorable incluyen mutaciones citogenéticas como t(15;17)PML/RAR α , t(8;21)AML1/ETO, 11q23, e inv(16)CBF β /MYH11, o mutaciones moleculares en FLT3 asociadas con un riesgo intermedio (p. ej., FLT3-ITD, FLT3-D835), NPM1, EVI1 o cEBP α ; los factores de pronóstico clínico que se han asociado a un resultado intermedio incluyen, entre otros, el cariotipo normal y las mutaciones citogenéticas +8, +21, +22, del(7q) y del(9q); y los factores pronósticos clínicos que se han asociado a un resultado adverso incluyen, entre otros, las mutaciones citogenéticas del(5q), 11q23, t(6;9), t(9;22), 3q anormal, citogenética compleja y niveles elevados de expresión de IL2Ra y/o MSI2.

[0028] Tal como se utiliza en el presente documento, una "célula diana" es una célula hematológica maligna que expresa CD47 en la superficie, en la que el enmascaramiento o la alteración de otro modo del fenotipo CD47 positivo (p. ej., mediante la administración de un agente anti-CD47) produce un aumento de la fagocitosis. Por lo general, una célula diana es una célula de mamífero, por ejemplo una célula humana.

[0029] Células blásticas circulantes y de médula ósea. Es típico de las leucemias y los síndromes mielodisplásicos que las células tumorales se encuentren en la circulación y la médula ósea. En estos tejidos puede contarse el número de blastos o glóbulos blancos. El recuento de blastos puede ser más preciso, ya que el porcentaje de WBC que son blastos puede variar con la enfermedad.

[0030] La clasificación franco-americano-británica (FAB) requiere un porcentaje de blastos de al menos el 30% en médula ósea (BM) o sangre periférica (SP) para el diagnóstico de leucemia mieloide aguda (AML), y también requiere porcentajes de blastos específicos para subclasificar los MDS. Por el contrario, la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) disminuye el límite de corte para el diagnóstico de AML del 30 al 20% de blastos BM o PB. El porcentaje de blastos en PB y BM no es tan importante para el diagnóstico de la leucemia linfoblástica aguda (ALL), ya que la presencia de cualquier población clonal de blastos es diagnóstica. Sin embargo, el porcentaje de blastos de PB tras la terapia es un importante índice pronóstico que refleja el resultado en la ALL.

[0031] El diagnóstico de la leucemia y de los MDS se basa en los blastos de la BM porque, en la mayoría de los casos, el porcentaje de blastos es mayor en la BM que en la PB. Sin embargo, en una pequeña proporción de pacientes con leucemia aguda, conocida como "leucemia periférica", no se produce un aumento diagnóstico del porcentaje de blastos

en la médula ósea; el diagnóstico se basa en la presencia de al menos un 20% de blastos en la médula ósea. Además del porcentaje de blastos, el número de blastos circulantes puede proporcionar una medida útil.

5 **[0032]** El punto de intensificación, o el punto en el que es seguro iniciar una intensificación del agente anti-CD47 a niveles terapéuticos, puede definirse por el nivel de blastos o WBC circulantes. En algunos métodos, el número se monitoriza en uno o más puntos temporales para determinar si es apropiado iniciar la escalada de dosis a niveles terapéuticos. El punto de intensificación puede ser, por ejemplo, menos de aproximadamente 2×10^9 /litro de blastos circulantes, menos de aproximadamente 5×10^9 /litro, menos de aproximadamente 10×10^9 /litro o, para los glóbulos blancos (WBC), menos de aproximadamente 5×10^9 /litro de WBC circulantes, menos de aproximadamente 10×10^9 /litro, menos de aproximadamente 20×10^9 /litro.

15 **[0033]** La terapia citorreductora es el proceso mediante el cual se reduce el número de células blásticas circulantes, p. ej., para alcanzar el punto de intensificación. Por ejemplo, un paciente con células blásticas circulantes mayores de 20×10^9 /litro, mayores de 15×10^9 /litro, mayores de 10×10^9 /litro, etc., es tratado con una terapia citorreductora para reducir el número de células blásticas circulantes.

20 **[0034]** Una terapia citorreductora de interés es la administración de una dosis subterapéutica de un agente anti-CD47. Una dosis subterapéutica es una dosis (es decir, una cantidad) que evita la muerte súbita por lisis de células tumorales, aglutinación, etc. Una dosis subterapéutica de un agente anti-CD47 puede depender del agente específico utilizado, pero puede ser la dosis equivalente a menos de aproximadamente 20 mg/kg de anticuerpo 5F9G4, menos de aproximadamente 15 mg/kg de anticuerpo 5F9G4, menos de aproximadamente 10 mg/kg de anticuerpo 5F9G4, menos de aproximadamente 7,55 mg/kg de anticuerpo 5F9G4, menos de aproximadamente 5 mg/kg de anticuerpo 5F9G4, menos de aproximadamente 2,5 mg/kg de anticuerpo 5F9G4, menos de aproximadamente 1 mg/kg de anticuerpo 5F9G4. Una dosis subterapéutica puede ser, por ejemplo, equivalente a aproximadamente 1-20 mg/kg de anticuerpo 5F9G4, de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 15 mg/kg de anticuerpo 5F9G4, de aproximadamente 5-10 10 mg/kg de anticuerpo 5F9G4.

30 **[0035]** Métodos alternativos para la citorreducción utilizan la administración de un agente citorreductor distinto de un agente anti-CD47, por ejemplo hidroxurea, hidroxycarbamida, fludarabina, etopósido oral, leucaféresis, etc. Dichos agentes se administran de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, la hidroxurea puede administrarse a una dosis de entre aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30 mg/kg PO al día, o en dosis planas de un mínimo de 500 mg PO al día hasta un máximo de 6 gramos PO al día.

35 **[0036]** Una "dosis terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéutica" es una cantidad suficiente para obtener los resultados clínicos deseados (es decir, lograr la eficacia terapéutica). Una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47 es una cantidad suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, prevenir, ralentizar o retrasar la progresión del estado de enfermedad mediante el aumento de la fagocitosis de una célula diana (p. ej., una célula diana); por ejemplo, para reducir el número de células tumorales en la sangre, la médula ósea, etc. Así, una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47 reduce la unión de CD47 en una célula diana, a SIRP α en una célula fagocítica, a una dosis eficaz para aumentar la fagocitosis de la célula diana.

45 **[0037]** La vía de eliminación mediada por diana implica la interacción entre un agente anti-CD47 y su diana farmacológica, y representa una vía de eliminación de proteínas. Por ejemplo, la unión del mA b a dianas en la superficie celular puede desencadenar la internalización del complejo en las células seguida de la posterior degradación lisosomal del complejo. La eliminación mediada por la diana es saturable debido a las cantidades finitas de antígeno diana, lo que puede dar lugar a una eliminación no lineal. Normalmente, la eliminación de los mA b que se unen al antígeno de membrana es más rápida a dosis bajas, ya que las dianas no unidas "absorberán" el anticuerpo, sirviendo de sumidero (este fenómeno se conoce como "sumidero de antígeno"). Asimismo, los cambios en el número de dianas como resultado del efecto del agente anti-CD47 sobre los eritrocitos y las células cancerosas altera la farmacocinética de los anticuerpos terapéuticos a través de vías de eliminación mediadas por la diana.

50 **[0038]** Como indicador de una dosis terapéuticamente eficaz, que tiene en cuenta la compleja interacción entre el hundimiento del antígeno, las actividades biológicas del agente y el requisito de potenciar la fagocitosis de las células cancerosas, la dosis terapéutica puede determinarse como equivalente a una dosis que proporcione una ocupación sustancialmente completa de los sitios de unión de CD47 en la superficie de las células blásticas, por ejemplo en la médula ósea, la sangre, etc. por un agente anti-CD47 (denominada en el presente documento ocupación del receptor), durante un periodo de tiempo definido. El agente anti-CD47 puede unirse específicamente a CD47. La ocupación sustancialmente completa del receptor puede ser de al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, o más.

60 **[0039]** La ocupación del receptor puede medirse mediante un ensayo de competición, por ejemplo como se muestra en la Figura 7. Por ejemplo, tras la administración de un agente a un individuo, se obtiene una muestra biológica adecuada, normalmente un aspirado de médula ósea, que opcionalmente se trata para separar los WBC de las células estromales y otras células. La muestra se divide y una alícuota se satura artificialmente con el agente anti-CD47. A continuación, las dos alícuotas se tiñen con una etiqueta detectable homóloga del agente anti-CD47 y se cuantifica la etiqueta detectable. La ocupación del receptor es la relación porcentual de la muestra de ensayo dividida por la muestra saturada

artificialmente.

[0040] La ocupación del receptor puede alcanzar un pico transitorio después de la administración del agente y, por lo tanto, es útil definir el período de tiempo durante el cual se logra una ocupación sustancialmente completa del receptor. El período de tiempo definido puede ser, por ejemplo, el tiempo entre la administración de dosis, p. ej., alrededor de 1 día, alrededor de 2 días, alrededor de 4 días, alrededor de 4 días, alrededor de 5 días, alrededor de 6 días, alrededor de 1 semana, alrededor de 10 días, alrededor de 2 semanas, y similares. Alternativamente, el periodo de tiempo definido puede ser el tiempo entre la administración de una dosis terapéutica y el trasplante, entre la administración de una dosis terapéutica y la administración de un agente adicional alternativo, complementario y/o sinérgico, y similares. Por ejemplo, una medición de la ocupación del receptor de CD47 en blastos de médula ósea puede determinarse alrededor de 1 día, alrededor de 2 días, alrededor de 4 días, alrededor de 4 días, alrededor de 5 días, alrededor de 6 días, alrededor de 1 semana, alrededor de 10 días, alrededor de 2 semanas después de la administración de una dosis del agente.

[0041] Como sustituto de la ocupación del receptor, se pueden determinar los niveles séricos del agente anti-CD47. Una dosis terapéuticamente eficaz puede conducir a niveles séricos sostenidos del agente anti-CD47 (p. ej., un anticuerpo anti-CD47) de aproximadamente 40 µg/ml o más (p. ej., aproximadamente 50 µg/ml o más, aproximadamente 60 µg/ml o más, aproximadamente 75 µg/ml o más, aproximadamente 100 µg/ml o más, aproximadamente 125 µg/ml o más, o aproximadamente 150 µg/ml o más). Una dosis terapéuticamente eficaz puede conducir a niveles séricos sostenidos del agente anti-CD47 (p. ej., un anticuerpo anti-CD47) que oscilan entre aproximadamente 40 µg/ml y aproximadamente 300 µg/ml, hasta aproximadamente 500 µg/ml, hasta aproximadamente 750 µg/ml, hasta aproximadamente 1000 µg/ml, p. ej., desde aproximadamente 40 µg/ml hasta aproximadamente 1000 µg/ml, de aproximadamente 40 µg/ml a aproximadamente 1000 µg/ml, de aproximadamente 40 µg/ml a aproximadamente 800 µg/ml, de aproximadamente 40 µg/ml a aproximadamente 700 µg/ml, de aproximadamente 40 µg/ml a aproximadamente 600 µg/ml, de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 750 µg/ml, de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 300 µg/ml, de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 250 µg/ml, de aproximadamente 75 µg/ml a aproximadamente 1000 µg/ml de aproximadamente 75 µg/ml a aproximadamente 750 µg/ml, de aproximadamente 75 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, de aproximadamente 75 µg/ml a aproximadamente 250 µg/ml, de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 1000 µg/ml, de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 600 µg/ml, o de aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 300 µg/ml). Una dosis terapéuticamente eficaz para tratar neoplasias hematológicas puede conducir a niveles séricos sostenidos del agente anti-CD47 (p. ej., un anticuerpo anti-CD47) de aproximadamente 50 µg/ml o más (p. ej., niveles séricos sostenidos de 75 µg/ml o más; o niveles séricos sostenidos que oscilan entre aproximadamente 50 µg/ml y aproximadamente 150 µg/ml).

[0042] Escalada. Una "escalada", tal como se utiliza aquí, es un aumento de la dosis del agente, y puede variar según el nivel de aumento, p. ej., un aumento de aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 100%, 2 veces, 2,5 veces, 5 veces o más. El nivel de aumento puede ser constante o variable. El efecto sobre un individuo puede controlarse, por ejemplo, determinando el nivel de blastos circulantes, y la intensificación puede ajustarse en función del número de blastos circulantes.

[0043] Por ejemplo, una vez que se determina que un paciente ha alcanzado un punto en el que la intensificación es segura, la dosis del agente anti-CD47 puede aumentarse en aproximadamente 1 mg/kg/dosis, en aproximadamente 2,5 mg/kg/dosis, en aproximadamente 5 mg/kg/dosis, en aproximadamente 7,5 mg/kg/dosis, en aproximadamente 10 mg/kg/dosis; en aproximadamente 12,5 mg/kg/dosis, en aproximadamente 15 mg/kg/dosis, en aproximadamente 20 mg/kg/dosis, en aproximadamente 25 mg/kg/dosis, en aproximadamente 30 mg/kg/dosis, generalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mg/kg/dosis, de 1 a 20 mg/kg/dosis, de 1 a 15 mg/kg/dosis, etc., donde el aumento puede ser semanal, quincenal, bisemanal, quincenal, bisemanal, cada 3 días, etc.

[0044] Una "dosis de mantenimiento" es una dosis que se administra cuando se alcanza un nivel terapéuticamente eficaz. Una dosis terapéuticamente eficaz o una serie de dosis terapéuticamente eficaces pueden alcanzar y mantener un nivel sérico de agente anti-CD47, y/o una ocupación sustancialmente completa del receptor. Una dosis terapéuticamente eficaz de un agente anti-CD47 puede depender del agente específico utilizado, pero suele ser de aproximadamente 8 mg/kg de peso corporal o más (p. ej., aproximadamente 8 mg/kg o más, aproximadamente 10 mg/kg o más, aproximadamente 15 mg/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, o aproximadamente 40 mg/kg o más), o aproximadamente 45 mg/kg o más, o aproximadamente 50 mg/kg, o aproximadamente 60 mg/kg o más. Los rangos pueden incluir desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 60 mg/kg (p. ej., desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, o desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg). La dosis necesaria para alcanzar y/o mantener una dosis terapéutica determinada es proporcional al tiempo transcurrido entre las dosis e inversamente proporcional al número de dosis administradas. Así, a medida que aumenta la frecuencia de dosificación, disminuye la dosis necesaria. La optimización de las estrategias de dosificación será fácilmente comprendida y practicada por un experto en la materia.

[0045] *Agente anti-CD47.* Como se utiliza en el presente documento, el término "agente anti-CD47" se refiere a cualquier agente que reduzca la unión de CD47 (p. ej., en una célula diana) a SIRPα (p. ej., en una célula fagocítica). Ejemplos no limitantes de reactivos anti-CD47 adecuados incluyen reactivos SIRPα, incluyendo sin limitación polipéptidos SIRPα de

alta afinidad, anticuerpos anti-SIRP α , polipéptidos CD47 solubles y anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-CD47. Un agente anti-CD47 adecuado (p. ej., un anticuerpo anti-CD47, un reactivo SIRP α , etc.) puede unirse específicamente a CD47 para reducir la unión de CD47 a SIRP α . La eficacia de un agente anti-CD47 adecuado puede evaluarse ensayando el agente (descrito más adelante). En un ensayo ejemplar, las células diana se incuban en presencia o ausencia del agente candidato. Un agente aumentará la fagocitosis en al menos un 10% (p. ej., al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 100%, al menos un 120%, al menos un 140%, al menos un 160%, al menos un 180% o al menos un 200%) en comparación con la fagocitosis en ausencia del agente. Del mismo modo, un ensayo *in vitro* de los niveles de fosforilación de tirosina de SIRP α mostrará una disminución de la fosforilación de al menos el 5% (p. ej., al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o el 100%) en comparación con la fosforilación observada en ausencia del agente candidato.

[0046] El agente anti-CD47 puede no activar CD47 tras la unión. Cuando CD47 se activa, puede producirse un proceso similar a la apoptosis (es decir, la muerte celular programada) (Manna y Frazier, *Cancer Research*, 64, 1026-1036, 1 de febrero de 2004). Así pues, es posible que el agente anti-CD47 no induzca directamente la muerte celular de una célula que exprese CD47.

[0047] *Reactivo SIRP α* . Un reactivo SIRP α comprende la porción de SIRP α que es suficiente para unirse a CD47 con una afinidad reconocible, que normalmente se encuentra entre la secuencia señal y el dominio transmembrana, o un fragmento del mismo que conserva la actividad de unión. Un reactivo SIRP α adecuado reduce (p. ej., bloquea, impide, etc.) la interacción entre las proteínas nativas SIRP α y CD47. El reactivo SIRP α comprenderá normalmente al menos el dominio d1 de SIRP α . Un reactivo SIRP α puede ser una proteína de fusión, p. ej., fusionada en marco con un segundo polipéptido. El segundo polipéptido puede ser capaz de aumentar el tamaño de la proteína de fusión, p. ej., para que la proteína de fusión no se elimine rápidamente de la circulación. El segundo polipéptido puede ser parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina. La región Fc ayuda en la fagocitosis proporcionando una señal de "cómeme", que mejora el bloqueo de la señal de "no me comas" proporcionada por el reactivo SIRP α de alta afinidad. Alternativamente, el segundo polipéptido puede ser cualquier polipéptido adecuado que sea sustancialmente similar a Fc, p. ej., proporcionando un mayor tamaño, dominios de multimerización, y/o unión o interacción adicional con moléculas de Ig.

[0048] Un agente anti-CD47 puede ser un "reactivo SIRP α de alta afinidad", que incluye polipéptidos derivados de SIRP α y análogos de los mismos. Los reactivos SIRP α de alta afinidad se describen en la solicitud internacional WO 2013/109752. Los reactivos SIRP α de alta afinidad son variantes de la proteína SIRP α nativa. Un reactivo SIRP α de alta afinidad puede ser soluble, en el que el polipéptido carece del dominio transmembrana SIRP α y comprende al menos un cambio aminoacídico en relación con la secuencia SIRP α de tipo salvaje, y en el que el cambio aminoacídico aumenta la afinidad de la unión del polipéptido SIRP α a CD47, por ejemplo disminuyendo la tasa de desactivación en al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, o más.

[0049] Un reactivo SIRP α de alta afinidad comprende la porción de SIRP α que es suficiente para unirse a CD47 con una afinidad reconocible, p. ej., alta afinidad, que normalmente se encuentra entre la secuencia señal y el dominio transmembrana, o un fragmento del mismo que retiene la actividad de unión. El reactivo SIRP α de alta afinidad comprenderá normalmente al menos el dominio d1 de SIRP α con residuos de aminoácidos modificados para aumentar la afinidad. Una variante de SIRP α puede ser una proteína de fusión, p. ej., fusionada en marco con un segundo polipéptido. El segundo polipéptido puede ser capaz de aumentar el tamaño de la proteína de fusión, p. ej., para que la proteína de fusión no se elimine rápidamente de la circulación. El segundo polipéptido puede ser parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina. La región Fc ayuda en la fagocitosis proporcionando una señal de "cómeme", que mejora el bloqueo de la señal de "no me comas" proporcionada por el reactivo SIRP α de alta afinidad. Alternativamente, el segundo polipéptido puede ser cualquier polipéptido adecuado que sea sustancialmente similar a Fc, p. ej., proporcionando un mayor tamaño, dominios de multimerización, y/o unión o interacción adicional con moléculas Ig. Los cambios de aminoácidos que aumentan la afinidad se localizan en el dominio d1, por lo que los reactivos SIRP α de alta afinidad comprenden un dominio d1 de SIRP α humana, con al menos un cambio de aminoácido en relación con la secuencia de tipo salvaje dentro del dominio d1. Dicho reactivo SIRP α de alta afinidad comprende opcionalmente secuencias de aminoácidos adicionales, por ejemplo secuencias Fc de anticuerpos; porciones de la proteína SIRP α humana de tipo salvaje distintas del dominio d1, incluyendo sin limitación los residuos 150 a 374 de la proteína nativa o fragmentos de la misma, generalmente fragmentos contiguos al dominio d1; y similares. Los reactivos SIRP α de alta afinidad pueden ser monoméricos o multiméricos, es decir, dímeros, trímeros, tetrámeros, etc.

[0050] *Anticuerpos anti-CD47*. En la invención, el agente anti-CD47 es un anticuerpo que se une específicamente a CD47 (es decir, un anticuerpo anti-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 algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD47 adecuado no activa CD47 al unirse. 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). **[0048]** Los anticuerpos anti-CD47 adecuados incluyen versiones totalmente humanas, humanizadas o quiméricas de dichos anticuerpos. Los anticuerpos humanizados (p. ej., hu5F9-G4) son especialmente útiles para aplicaciones in vivo en humanos debido a su baja antigenicidad. Del mismo modo, 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 caninizados, felinizados, equinizados, bovinizados, porcinizados, etc., y sus variantes.

[0051] Anticuerpos anti-SIRP α . Un agente anti-CD47 puede ser un anticuerpo que se une específicamente a SIRP α (es decir, un anticuerpo anti-SIRP α) 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). Los anticuerpos anti-SIRP α adecuados pueden unirse a SIRP α sin activar o estimular la señalización a través de SIRP α porque la activación de SIRP α inhibiría la fagocitosis. En cambio, los anticuerpos anti-SIRP α adecuados facilitan la fagocitosis preferente de las células infectadas sobre las células normales. AqueALLs células que expresen niveles más altos de CD47 (p. ej., células infectadas) en relación con otras células (células no infectadas) serán fagocitadas preferentemente. Así, un anticuerpo anti-SIRP α adecuado se une específicamente a SIRP α (sin activar/estimular lo suficiente una respuesta de señalización como para inhibir la fagocitosis) y bloquea una interacción entre SIRP α y CD47. Los anticuerpos anti-SIRP α adecuados incluyen versiones totalmente humanas, humanizadas o quiméricas de dichos anticuerpos. Los anticuerpos humanizados son especialmente útiles para aplicaciones in vivo en humanos debido a su baja antigenicidad. Del mismo modo, 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 caninizados, felinizados, equinizados, bovinizados, porcinizados, etc., y sus variantes.

[0052] Polipéptidos CD47 solubles. Un agente anti-CD47 puede ser un polipéptido CD47 soluble que se une específicamente a SIRP α 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). Un polipéptido CD47 soluble adecuado puede unirse a SIRP α sin activar o estimular la señalización a través de SIRP α porque la activación de SIRP α inhibiría la fagocitosis. En cambio, los polipéptidos CD47 solubles adecuados facilitan la fagocitosis preferencial de las células infectadas sobre las no infectadas. AqueALLs células que expresen niveles más altos de CD47 (p. ej., células infectadas) en relación con las células normales no diana (células normales) serán fagocitadas preferentemente. Así, un polipéptido CD47 soluble adecuado se une específicamente a SIRP α sin activar/estimular lo suficiente una respuesta de señalización para inhibir la fagocitosis.

[0053] En algunos casos, un polipéptido CD47 soluble adecuado puede ser una proteína de fusión (por ejemplo, como se describe estructuralmente en la Publicación de Patente US20100239579). Sin embargo, sólo las proteínas de fusión que no activan/estimulan la SIRP α son adecuadas para los métodos aquí descritos. Los polipéptidos CD47 solubles adecuados también incluyen cualquier péptido o fragmento peptídico que comprenda secuencias CD47 variantes o naturalmente existentes (p. ej., secuencias de dominio extracelular o variantes de dominio extracelular) que puedan unirse específicamente a SIRP α e inhibir la interacción entre CD47 y SIRP α sin estimular suficiente actividad de SIRP α para inhibir la fagocitosis.

[0054] Un polipéptido CD47 soluble puede comprender el dominio extracelular de CD47, incluido el péptido señal, de manera que la porción extracelular de CD47 tiene típicamente 142 aminoácidos de longitud. Los polipéptidos solubles CD47 descritos en el presente documento también incluyen variantes del dominio extracelular CD47 que comprenden una secuencia de aminoácidos de al menos 65%-75%, 75%-80%, 80-85%, 85%- 90%, o 95%-99% (o cualquier porcentaje de identidad no enumerado específicamente entre 65% y 100%), cuyas variantes conservan la capacidad de unirse a SIRP α sin estimular la señalización de SIRP α .

[0055] La secuencia de aminoácidos del péptido señal puede sustituirse por una secuencia de aminoácidos del péptido señal derivada de otro polipéptido (p. ej., una inmunoglobulina o CTLA4). Por ejemplo, a diferencia del CD47 de longitud completa, que es un polipéptido de la superficie celular que atraviesa la membrana celular externa, los polipéptidos CD47 solubles son secretados; en consecuencia, un polinucleótido que codifica un polipéptido CD47 soluble puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que está asociado con un polipéptido que normalmente es secretado por una célula.

[0056] El polipéptido CD47 soluble puede comprender un dominio extracelular de CD47 que carece del péptido señal. Por ejemplo, el dominio extracelular CD47 carece del péptido señal 124 aminoácidos. Como se describe en el presente documento, los péptidos señal no están expuestos en la superficie celular de una proteína secretada o transmembrana porque, o bien el péptido señal se escinde durante la translocación de la proteína, o bien el péptido señal permanece anclado en la membrana celular externa (dicho péptido también se denomina anclaje señal). Se cree que la secuencia del péptido señal de CD47 se escinde del polipéptido precursor CD47 in vivo.

[0057] Alternativamente, un polipéptido CD47 soluble puede comprender una variante del dominio extracelular CD47. Dicho polipéptido CD47 soluble conserva la capacidad de unirse a SIRP α sin estimular la señalización de SIRP α . La variante del dominio extracelular CD47 puede tener una secuencia de aminoácidos que sea al menos 65%-75%, 75%-80%, 80-85%, 85%-90%, o 95%-99% idéntica (que incluye cualquier porcentaje de identidad entre cualquiera de los rangos descritos) a una secuencia CD47 de referencia, p. ej., el número de acceso Genbank NP_001768.1 o NP_942088.1.

[0058] Los términos "tratamiento", "en tratamiento", "tratar" y similares se utilizan aquí para referirse en general a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención completa o parcial de una enfermedad o síntoma(s) de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de estabilización parcial o completa o curación de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. El término "tratamiento" abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en particular un ser humano, e incluye: inhibir la

enfermedad y/o síntoma(s), es decir, detener su desarrollo; y/o aliviar el síntoma(s) de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad y/o síntoma(s). Entre las personas que necesitan tratamiento se encuentran las que ya han sido diagnosticadas de una neoplasia hematológica.

5 **[0059]** Los términos "unión específica", "se une específicamente" y similares se refieren a la unión preferente no covalente o covalente a una molécula en relación con otras moléculas o moléculas en una solución o mezcla de reacción (p. ej., un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido o epítipo particular en relación con otros polipéptidos disponibles, o la unión de un polipéptido SIRP α). En algunas realizaciones, la afinidad de una molécula por otra molécula a la que se une específicamente se caracteriza por una K_D (constante de disociación) de 10^{-5} M o menos (p. ej., 10^{-6} M o menos, 10^{-7} M o menos, 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-11} M o menos, 10^{-12} M o menos, 10^{-13} M o menos, 10^{-14} M o menos, 10^{-15} M o menos, o 10^{-16} M o menos). "Afinidad" se refiere a la fuerza de unión, una mayor afinidad de unión se correlaciona con una K_D menor.

15 **[0060]** El término "miembro de unión específica", tal como se utiliza aquí, se refiere a un miembro de un par de unión específica (es decir, dos moléculas, normalmente dos moléculas diferentes, en las que una de las moléculas, p. ej., un primer miembro de unión específica, a través de medios no covalentes se une específicamente a la otra molécula, p. ej., un segundo miembro de unión específica). Los miembros de unión específicos adecuados incluyen agentes que se unen específicamente a CD47 y/o SIRP α (es decir, agentes anti-CD47), o que bloquean de otro modo la interacción entre CD47 y SIRP α .

20 **[0061]** Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos también se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos naturales y a los polímeros de aminoácidos no naturales.

25 **[0062]** Los términos "células fagocíticas" y "fagocitos" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a una célula capaz de fagocitosis. Existen tres categorías principales de fagocitos: macrófagos, células mononucleares (histiocitos y monocitos); leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) y células dendríticas.

30 **[0063]** El término "muestra" con respecto a un paciente abarca la médula ósea, p. ej., el aspirado de médula ósea; la sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas o aisladas de los mismos y su progenie. La definición también incluye las muestras que han sido manipuladas de algún modo tras su obtención, como por ejemplo mediante tratamiento con reactivos; lavado; o enriquecimiento para determinadas poblaciones celulares, como las células cancerosas. La definición también incluye muestras que han sido enriquecidas para tipos particulares de moléculas, p. ej., ácidos nucleicos, polipéptidos, etc.

35 **[0064]** 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 que comprende células diana o células normales de control o que se sospecha que comprende dichas células o fluidos biológicos derivados de las mismas (p. ej., células cancerosas, etc.), p. ej., una muestra que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos que se obtiene a partir de dichas células (p. ej., un lisado celular u otro extracto celular que comprenda polinucleótidos y/o polipéptidos). Una muestra biológica que comprende células tumorales de un paciente también puede incluir células no tumorales.

45 **[0065]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a cualquier determinante antigénico de un antígeno al que se une el paratopo de un anticuerpo. Los determinantes epitópicos suelen consistir en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas, como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y suelen tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

50 **[0066]** Un hemograma completo (CBC) y un frotis periférico se utilizan para evaluar la salud general y detectar una amplia gama de trastornos, incluyendo anemia, infección y leucemia. Un hemograma completo mide varios componentes y características de la sangre: glóbulos rojos, glóbulos blancos, hemoglobina, hematocrito, recuento de plaquetas, etc. Los aumentos o disminuciones anormales en los recuentos celulares revelados en un hemograma completo pueden indicar una afección médica subyacente que requiera una evaluación adicional. La pancitopenia y los blastos periféricos sugieren una leucemia aguda. Las células blásticas en el frotis periférico pueden aproximarse al 100% del recuento de WBC en las neoplasias hematológicas.

55 **[0067]** El número de blastos en sangre periférica con infección puede ser de aproximadamente $10-40 \times 10^9/l$, aunque puede llegar a $100 \times 10^9/l$. En la leucemia linfocítica crónica (CLL) el recuento suele estar considerablemente elevado ($30-300 \times 10^9/l$), aunque puede sospecharse el diagnóstico con recuentos tan bajos como $5-10 \times 10^9/l$ si su aspecto morfológico es característico.

60 **[0068]** Un análisis diferencial de sangre mide el porcentaje de cada tipo de glóbulo blanco (WBC) en la sangre, y revela si hay células anormales o inmaduras. En general, la prueba cuenta neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos.

- 5 **[0069]** Para diagnosticar CLL, debe haber una linfocitosis superior a 5000/mm³. El recuento absoluto de neutrófilos suele ser normal y los recuentos de hematíes y plaquetas están ligeramente disminuidos. Además, el frotis periférico o la médula ósea deben mostrar linfocitos pequeños maduros normales con menos del 55% de formas atípicas o blásticas.
- 10 **[0070]** CML se define por su recuento periférico de WBC. Típicamente, la leucocitosis es superior a 100,000/mm³. El recuento diferencial muestra la presencia de precursores de neutrófilos. Se acompaña de basofilia y eosinofilia. A diferencia de las de la AML, estas células son maduras y funcionales.
- 15 **[0071]** AML puede diagnosticarse por su recuento periférico de WBC, en el que al menos un 20% de blastos mieloides en la sangre significa un diagnóstico de AML.
- 20 **[0072]** El examen de la médula ósea mediante aspiración o biopsia con aguja puede realizarse de forma rutinaria, aunque el diagnóstico puede hacerse normalmente a partir del frotis periférico. Las células blásticas en la médula ósea se sitúan clásicamente entre el 25 y el 95% en las neoplasias hematológicas.
- 25 **[0073]** La aspiración de médula ósea establece el diagnóstico de leucemia. La morfología de los blastos suele permitir diferenciar entre ALL y AML. En la ALL, un infiltrado homogéneo de linfoblastos sustituye a los elementos normales de la médula ósea. Los linfoblastos suelen ser pequeños y medir aproximadamente 14 µm de diámetro. Tienen escaso citoplasma sin gránulos. El núcleo no tiene nucleolos o tiene uno pequeño e indistinto.
- 30 **[0074]** Para el diagnóstico de AML, al menos el 20-30% (dependiendo de la clasificación) de las células nucleadas en el aspirado deben ser células blásticas de origen mielóide. Múltiples nucleolos grandes, cromatina delicada, citoplasma gris azulado y bastones de Auer caracterizan a los mieloblastos. La presencia de bastones de Auer es prácticamente diagnóstica de AML, ya que estas estructuras citoplasmáticas condensadas azurófilas en forma de bastón no aparecen en la ALL.
- 35 **[0075]** En la CLL, la infiltración de la médula ósea supera el 30% de linfocitos. Los linfocitos son maduros con menos del 55% de formas atípicas o blásticas. Los núcleos son redondos, el citoplasma escaso, la cromatina compacta, los nucleolos poco visibles y las figuras mitóticas escasas.
- 40 **[0076]** Inmunofenotipado mediante citometría de flujo multiparamétrica tras el marcaje con anticuerpos monoclonales frente a antígenos de la superficie celular, que identifica el origen de células B o T de los linfoblastos. Basándose en la expresión de antígenos restringidos al linaje B y en los reordenamientos clonales de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, se ha estimado que hasta el 80% de los casos de ALL surgen de precursores de células B. La mayoría posee un antígeno común de la ALL (CAALL) que sólo está presente en las células leucémicas. La ALL de células T posee receptores para los eritrocitos de oveja y, cuando éstos se combinan, forman E-rosetas. Otro subgrupo de ALL carece de características de células B o T y se denomina ALL de células nulas.
- 45 **[0077]** Ciertos antígenos mieloides específicos, como CD13, CD33, CD41 y otros se han utilizado para diagnosticar la AML.
- 50 **[0078]** Las células malignas en la CLL corresponden a una subpoblación menor de células B que expresan inmunoglobulina M (IgM) e inmunoglobulina D (IgD) en la superficie celular y el antígeno CD5 asociado a células T.
- 55 **[0079]** Las tinciones histoquímicas para mieloperoxidasa (tinción de Leder) y esterasa inespecífica tienen una fuerte afinidad por los precursores mielógenos, pero no tiñen los precursores linfocíticos. La demostración de la enzima polimerizadora del ADN nuclear desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) es indicativa de un origen linfóide. Sin embargo, hasta un 2-5% de los pacientes con AML presentan esta enzima. Pueden producirse excepciones cuando un clon maligno surge de células multipotentes que pueden expresar tanto características mielógenas como linfocíticas.
- 60 **[0080]** El análisis cromosómico también desempeña un papel importante. El diagnóstico de la CML se establece mediante la identificación citogenética o molecular de una expansión clonal de una célula madre hematopoyética que posea una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22. El análisis cromosómico de la célula leucémica proporciona actualmente la información pronóstica más importante previa al tratamiento en la AML.
- 65 **[0081]** El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente los anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos monoclonales de longitud completa), los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., los anticuerpos biespecíficos) y los fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Los "anticuerpos" (Abs) y las "inmunoglobulinas" (Igs) son glicoproteínas con las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a los anticuerpos que carecen de especificidad antigénica. Los polipéptidos de este último tipo son producidos, por ejemplo, a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles elevados por los mielomas.
- [0082]** "Fragmento de anticuerpo", y todas sus variantes gramaticales, tal como se utiliza en el presente documento, se

define como una porción de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión al antígeno o la región variable del anticuerpo intacto, en la que la porción está libre de los dominios constantes de cadena pesada (es decir, CH2, CH3 y CH4, dependiendo del isotipo del anticuerpo) de la región Fc del anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que sea un polipéptido con una estructura primaria consistente en una secuencia ininterrumpida de residuos de aminoácidos contiguos (denominado en el presente documento "fragmento de anticuerpo de cadena única" o "polipéptido de cadena única"), incluyendo sin limitación (1) moléculas Fv de cadena única (scFv) (2) polipéptidos de cadena única que contengan sólo un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento del mismo que contenga las tres CDR del dominio variable de cadena ligera, sin una fracción de cadena pesada asociada (3) polipéptidos de cadena única que contengan sólo una región variable de cadena pesada, o un fragmento del mismo que contenga las tres CDR de la región variable de cadena pesada, sin una fracción de cadena ligera asociada y (4) nanocuerpos que comprendan dominios Ig únicos de especies no humanas u otros módulos de unión de dominio único específicos; y estructuras multiespecíficas o multivalentes formadas a partir de fragmentos de anticuerpos. En un fragmento de anticuerpo que comprende una o más cadenas pesadas, la(s) cadena(s) pesada(s) puede(n) contener cualquier secuencia de dominio constante (p. ej., CH1 en el isotipo IgG) que se encuentre en una región no-Fc de un anticuerpo intacto, y/o puede(n) contener cualquier secuencia de región bisagra que se encuentre en un anticuerpo intacto, y/o puede(n) contener una secuencia de cremallera de leucina fusionada o situada en la secuencia de región bisagra o en la secuencia de dominio constante de la(s) cadena(s) pesada(s).

[0083] Como se usa aquí, el término "correlaciona" o "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 sucesos implican números, una correlación positiva (también denominada aquí "correlación directa") significa que cuando uno aumenta, el otro también aumenta. Una correlación negativa (también denominada aquí "correlación inversa") significa que a medida que una aumenta, la otra disminuye.

[0084] "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) calculada para producir el(los) efecto(s) terapéutico(s) deseado(s) en asociación con el soporte farmacéutico requerido. La especificación de las formas farmacéuticas unitarias puede venir dictada por (a) las características únicas del compuesto o compuestos activos y el efecto o efectos terapéuticos concretos que deban conseguirse, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de composición de dicho compuesto o compuestos activos.

[0085] "Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente 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 en aerosol, gaseosos.

[0086] Por "sales y ésteres farmacéuticamente aceptables" se entienden las sales y ésteres que son farmacéuticamente aceptables y tienen las propiedades farmacológicas deseadas. Tales 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, p. ej., sodio y potasio, magnesio, calcio y aluminio. Las sales orgánicas adecuadas incluyen las formadas con bases orgánicas como las bases aminas, p. ej., etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N metilglucamina y similares. Dichas sales también incluyen sales de adición ácida formadas con ácidos inorgánicos (p. ej., ácidos clorhídrico e bromhídrico) y ácidos orgánicos (p. ej., ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico y los ácidos alcano- y areno-sulfónico como el ácido metanosulfónico y el ácido bencenosulfónico). Los ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen ésteres formados a partir de grupos carboxi, sulfoniloxy y fosfonoxi presentes en los compuestos, p. ej., ésteres de alquilo C₁₋₆. Cuando hay dos grupos ácidos presentes, una sal o éster farmacéuticamente aceptable puede ser una mono-ácido-mono-sal o éster o una di-sal o éster; y de forma similar cuando hay más de dos grupos ácidos presentes, algunos o todos esos grupos pueden ser 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 estereoisomérica, y la denominación de dichos compuestos pretende incluir todos los estereoisómeros simples y todas las mezclas (ya sean racémicas o de otro tipo) de dichos estereoisómeros.

[0087] Los términos "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y sus variaciones gramaticales, cuando se refieren a composiciones, portadores, diluyentes y reactivos, se utilizan indistintamente y representan que los materiales son capaces de administrarse a o sobre un ser humano sin la producción de efectos fisiológicos indeseables en un grado que prohibiría la administración de la composición.

Terapia Combinada

[0088] "En combinación con", "terapia de combinación" y "productos de combinación" se refieren, en ciertas realizaciones, a la administración concurrente a un paciente de los agentes aquí descritos. Cuando se administran en combinación, cada componente puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos. Así,

cada componente puede administrarse por separado pero con la suficiente proximidad en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

[0089] La "administración concomitante" de agentes activos en los métodos de la invención significa la administración con los reactivos en un momento tal que los agentes tendrán un efecto terapéutico al mismo tiempo. Dicha administración concomitante puede implicar la administración concurrente (es decir, al mismo tiempo), previa o posterior de los agentes. Una persona con conocimientos ordinarios en la materia no tendría dificultad para determinar el momento, la secuencia y las dosis de administración adecuados para determinados fármacos y composiciones de la presente invención.

[0090] Los agentes quimioterapéuticos que pueden administrarse en combinación con un agente anti-CD47 incluyen, sin limitación, abitrexato, adriamicina, adrucil, amsacrina, asparaginasa, antraciclinas, azacitidina, azatioprina, bicnu, blenoxano, busulfano, bleomicina, camptosar, camptotecinas, carboplatino, carmustina, cerubidina, clorambucil, cisplatino, cladribina, cosmegen, citarabina, citosar, ciclofosfamida, citoxán, dactinomomicina, docetaxel, doxorubicina, daunorrubicina, ellence, elspar, epirubicina, etopósido, fludarabina, fluorouracilo, fludara, gemcitabina, gemzar, hcamantina, hidroxiurea, hidrea, idamicina, idarubicina, ifosfamida, ifex, irinotecán, lanvis, leukan, leustatina, matulano, mecloretamina, mercaptopurina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, mitramicina, mutamicina, myleran, mylosar, navelbina, nipent, novantrona, oncovin, oxaliplatino, paclitaxel, paraplatino, pentostatina, platinol, plicamicina, procarbazona, purinetol, raltrexed, taxotere, taxol, teniposida, tioguanina, tomudex, topotecán, valrubicina, velban, vepesid, vinblastina, vindesina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y vumon.

[0091] Las terapias dirigidas que pueden administrarse en combinación con un agente anti-CD47 pueden incluir, sin limitación, inhibidores de la tirosina cinasa, como Imatinib mesilato (Gleevec, también conocido como STI-571), Gefitinib (Iressa, también conocido como ZD1839), Erlotinib (comercializado como Tarceva), Sorafenib (Nexavar), Sunitinib (Sutent), Dasatinib (Sprycel), Lapatinib (Tykerb), Nilotinib (Tasigna) y Bortezomib (Velcade); Inhibidores de la cinasa Janus, como tofacitinib; inhibidores de ALK, como crizotinib; inhibidores de Bcl-2, como obatocax, venclaxta y gopipol; Inhibidores de FLT3, como midostaurina (Rydapt); inhibidores de IDH, como AG-221; inhibidores de PARP, como iniparib y olaparib; inhibidores de PI3K, como perifosina; inhibidores del receptor 2 de VEGF, como apatinib; doxorubicina AN-152 (AEZS-108) unida a [D-Lys(6)]-LHRH; inhibidores de Braf, como vemurafenib, dabrafenib y LGX818; inhibidores de MEK, como trametinib; inhibidores de CDK, como PD-0332991 y LEE011; inhibidores de Hsp90, como salinomycin; y/o conjugados de fármacos de molécula pequeña, como vintafolida; Inhibidores de serina/treonina quinasa, como temsirolimus (Torisel), everolimus (Afinitor), vemurafenib (Zelboraf), trametinib (Mekinist) y dabrafenib (Tafinlar).

[0092] Un agente anti-CD47 puede administrarse en combinación con un inmunomodulador, como una citocina, una lincocina, una monocina, un factor de crecimiento de células madre, una lincotoxina (LT), un factor hematopoyético, un factor estimulante de colonias (CSF), un interferón (IFN), hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina, prorelaxina, hormona foliculoestimulante (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático, prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno placental, proteína OB, un factor de crecimiento transformante (TGF), como TGF- α o TGF- β , factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), eritropoyetina, trombopoyetina, un factor de necrosis tumoral (TNF) como TNF- α o TNF- β , una sustancia inhibidora de la mulleriana, péptido asociado a gonadotropina de ratón, inhibina, activina, factor de crecimiento endotelial vascular, integrina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), un interferón como interferón- α , interferón- β o interferón- γ , factor S1, una interleucina (IL) como IL-1, IL-1cc, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 IL-21 o IL-25, LIF, kit-ligando, FLT-3, angiostatina, trombospodina, endostatina y LT.

[0093] Los anticuerpos monoclonales específicos del tumor que pueden administrarse en combinación con un agente anti-CD47 pueden incluir, sin limitación, gemtuzumab ozogamicina (Myelotarg), Rituximab (comercializado como MabThera o Rituxan), Trastuzumab (Herceptin), Alemtuzumab, Cetuximab (comercializado como Erbitux), Panitumumab, Bevacizumab (comercializado como Avastin) e Ipilimumab (Yervoy).

[0094] De particular interés son los agentes hipometilantes (también conocidos como epigenéticos) para combinación con un agente anti-CD47. Un agente hipometilante es un fármaco que inhibe la metilación del ADN. Los agentes hipometilantes disponibles actualmente bloquean la actividad de la ADN metiltransferasa (inhibidores de la ADN metiltransferasa / inhibidores de la DNMT). En la actualidad, la FDA ha aprobado el uso de dos miembros de esta clase: la azacitidina y la decitabina. La guadecitabina también es interesante. Debido a sus efectos secundarios relativamente leves, la azacitidina y la decitabina son especialmente viables para el tratamiento de pacientes de edad avanzada y pacientes con comorbilidades. Ambos fármacos tienen una actividad notable contra los blastos de AML con características citogenéticas desfavorables.

[0095] El tratamiento de neoplasias hematológicas, por ejemplo leucemias, puede combinarse con una o más entidades terapéuticas. En algunos aspectos, la entidad terapéutica adicional es un modulador de la respuesta inmunitaria. Las proteínas de punto de control inmunitario son moléculas inhibidoras inmunitarias que actúan para disminuir la capacidad de respuesta inmunitaria hacia una célula diana, en particular contra una célula tumoral en los métodos de la invención. Las respuestas endógenas de las células T a los tumores pueden estar desreguladas por 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 denominados en la técnica "inhibidores de puntos de control

inmunitarios" revierte la inhibición de las respuestas inmunitarias mediante la administración de antagonistas de señales inhibitorias. Otras inmunoterapias administran agonistas de moléculas costimuladoras inmunitarias para aumentar la capacidad de respuesta.

5 **[0096]** Los receptores de punto de control inmunitario que se han estudiado más activamente en el contexto de la inmunoterapia clínica del cáncer, el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4; también conocido como CD152) y la proteína 1 de muerte celular programada (PD1; también conocida como CD279), son ambos receptores inhibidores. La actividad clínica de los anticuerpos que bloquean cualquiera de estos receptores implica que la inmunidad antitumoral puede potenciarse a múltiples niveles y que las estrategias combinatorias pueden diseñarse de forma inteligente, guiándose por consideraciones mecanicistas y modelos preclínicos.

10 **[0097]** CTLA4 se expresa exclusivamente en las células T, donde regula principalmente la amplitud de las primeras etapas de la activación de las células T. CTLA4 contrarresta la actividad del receptor coestimulador de células T, CD28. CD28 y CTLA4 comparten ligandos idénticos: CD80 (también conocido como B7.1) y CD86 (también conocido como B7.2). Las principales funciones fisiológicas de CTLA4 son la modulación a la baja de la actividad de las células T auxiliares y la potenciación de la actividad inmunosupresora de las células T reguladoras (T_{Reg}). El bloqueo de CTLA4 produce una amplia potenciación de las respuestas inmunitarias. Dos anticuerpos CTLA4 totalmente humanizados, ipilimumab y tremelimumab, se encuentran en fase de ensayo y uso clínico. Clínicamente, la respuesta a los bloqueantes de puntos de control inmunitarios es lenta y, en muchos pacientes, se retrasa hasta 6 meses después del inicio del tratamiento.

15 **[0098]** Otras proteínas de punto de control inmunitario son PD1 y PDL1. Entre los anticuerpos actualmente en uso clínico contra estas dianas se encuentran el nivolumab y el pembrolizumab. La función principal de PD1 es limitar la actividad de las células T en los tejidos periféricos en el momento de una respuesta inflamatoria a una infección y limitar la autoinmunidad. La expresión de PD1 se induce cuando las células T se activan. Cuando es activada por uno de sus ligandos, la PD1 inhibe las quinasas que intervienen en la activación de las células T. PD1 está altamente expresada en las células T_{Reg} , donde puede potenciar su proliferación en presencia de ligando. Dado que muchos tumores están muy infiltrados de 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.

20 **[0099]** El gen de activación de linfocitos 3 (LAG3; también conocido como CD223), 2B4 (también conocido como CD244), el atenuador de linfocitos T de banda (BTLA; también conocido como CD272), la proteína de membrana de células T 3 (TIM3; también conocida como HAVcr2), el receptor de adenosina A2a (A2aR) y la familia de receptores inhibidores de la muerte se han asociado con la inhibición de la actividad linfocitaria y, en algunos casos, con la inducción de anergia linfocitaria. En los métodos de la invención pueden utilizarse anticuerpos dirigidos a estos receptores.

25 **[0100]** TIM3 inhibe las respuestas de las células T helper 1 (T_H1), y los anticuerpos TIM3 potencian la inmunidad antitumoral. También se ha observado que TIM3 se coexpresa con PD1 en células T $CD8^+$ específicas de tumores. Los agentes bloqueantes de Tim3 pueden superar esta señalización inhibitoria y mantener o restaurar la función antitumoral de las células T.

30 **[0101]** BTLA es un receptor inhibidor de las células T que interactúa con TNFRSF14. Las células T BTLA^{hi} se inhiben en presencia de su ligando. El sistema de moléculas que interactúan es complejo: CD160 (un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas) y LIGHT (también conocido como TNFSF14), median la actividad inhibitoria y coestimuladora, respectivamente. La señalización puede ser bidireccional, dependiendo de la combinación específica de interacciones. El bloqueo dual de BTLA y PD1 mejora la inmunidad antitumoral.

35 **[0102]** A2aR, cuyo ligando es la adenosina, inhibe las respuestas de las células T, en parte impulsando a las células T $CD4^+$ a expresar FOXP3 y, por tanto, a convertirse en células T_{Reg} . La supresión de este receptor da lugar a respuestas inflamatorias a la infección aumentadas y, en ocasiones, patológicas. El A2aR puede inhibirse mediante anticuerpos que bloquean la unión de la adenosina o mediante análogos de la adenosina.

40 **[0103]** Los agentes que agonizan una molécula costimuladora inmunitaria también son útiles en los métodos de la invención. Tales agentes incluyen agonistas o CD40 y OX40. CD40 es una proteína coestimuladora que se encuentra en las células presentadoras de antígenos (APC) y es necesaria para su activación. Estas APC incluyen fagocitos (macrófagos y células dendríticas) y células B. El CD40 forma parte de la familia de receptores del TNF. Las principales moléculas de señalización activadoras del CD40 son el IFN γ y el ligando CD40 (CD40L). La estimulación a través de CD40 activa los macrófagos. Uno de los principales efectos de los agentes bloqueantes de CD47 es potenciar la fagocitosis de las células diana por los macrófagos y otros fagocitos. Por lo tanto, la combinación de ligandos CD40 agonistas con anti CD47 puede mejorar la eficacia terapéutica en comparación con cada monoterapia (ejemplo 1). Los agentes agonistas CD40 pueden administrarse sustancialmente de forma simultánea con los agentes anti-CD47; o pueden administrarse antes y simultáneamente con el tratamiento con anti-CD47 para preactivar los macrófagos.

45 **[0104]** Los agentes que alteran el microambiente inmunitario tumoral son útiles en los métodos de la invención. Dichos agentes incluyen los inhibidores de laIDO, que inhiben la producción de indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO), una enzima que presenta un efecto inmunosupresor.

5 **[0105]** Otros agentes inmuno-oncológicos que pueden administrarse en combinación con el bloqueo de CD47 según los métodos aquí descritos incluyen anticuerpos específicos para receptores de quimiocinas, incluyendo sin limitación anti-CCR4 y anti-CCR2. Los anticuerpos anti CCR4 (CD194) de interés incluyen anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos contra el receptor 4 de la quimiocina C-C (CCR4) con potenciales actividades antiinflamatorias y antineoplásicas. Un ejemplo es el mogamulizumab, que se une selectivamente al CCR4 y bloquea su actividad, lo que puede inhibir las vías de transducción de señales mediadas por el CCR4 y, por tanto, la migración celular y la proliferación de células T mediadas por quimiocinas, así como la angiogénesis mediada por quimiocinas. Además, este agente puede inducir citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) contra células T CCR4 positivas. CCR4, un receptor de proteína G acoplada para quimiocinas C-C como MIP-1, RANTES, TARC y MCP-1, se expresa en las superficies de algunos tipos de células T, células endoteliales y algunos tipos de neuronas. CCR4, también conocido como CD194, puede estar sobreexpresado en las células del linfoma de células T del adulto (ATL) y del linfoma de células T periféricas (PTCL).

15 **[0106]** La terapia combinada descrita anteriormente puede combinarse con otros agentes que actúan sobre las células T reguladoras, p. ej., Ab anti-CTLA4, u otros inhibidores del punto de control de células T, p. ej., anticuerpos anti-PD1, anti-PDL1 y similares.

20 **[0107]** En algunas realizaciones, la administración de una combinación de agentes de la invención se combina con una dosis eficaz de un agente que aumenta el hematocrito del paciente, por ejemplo agentes estimulantes de la eritropoyetina (ESA). Tales agentes son conocidos y utilizados en la técnica, incluyendo, por ejemplo, Aranesp® (darbepoetina alfa), Epogen®/Procrit® (epoetina alfa), Omontys® (peginesatida), Procrit®, etc. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 9.623.079.

25 Métodos

30 **[0108]** La administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD47 se proporciona en un programa que proporciona una escalada segura de la dosis mientras se alcanza un nivel terapéutico en un periodo de tiempo clínicamente eficaz. Los métodos pueden comprender las etapas de autorización, escalada y mantenimiento. En una realización, el régimen de dosificación administra una (i) dosis subterapéutica inicial de un anticuerpo anti-CD47 o (ii) una terapia citorreductora para alcanzar un nivel seguro de células tumorales circulantes para el tratamiento posterior (eliminación); escalando la dosis de un anticuerpo anti-CD47 hasta alcanzar una dosis terapéutica (escalada); y manteniendo la dosis terapéutica durante un periodo de tiempo suficiente para reducir las células tumorales en la médula ósea del paciente (mantenimiento).

35 **[0109]** En un régimen de dosificación alternativo, un paciente que se determina que tiene un nivel seguro de células tumorales circulantes en el momento de la presentación se trata mediante los pasos de intensificación y mantenimiento, que comprenden: intensificación de la dosis de un anticuerpo anti-CD47 hasta que se alcanza una dosis terapéutica, en la que se logra una ocupación del receptor superior al 80% aproximadamente en células blásticas de médula ósea del paciente (intensificación); y mantenimiento de la dosis terapéutica durante un periodo de tiempo suficiente para reducir las células tumorales en la médula ósea del paciente (mantenimiento).

40 **[0110]** La dosis y la frecuencia pueden variar en función de la semivida del agente anti-CD47 en el paciente. Se entenderá por un experto en la materia que dichas directrices se ajustarán al peso molecular del agente activo, p. ej., en el uso de fragmentos de anticuerpos, en el uso de conjugados de anticuerpos, en el uso de reactivos SIRP α , en el uso de péptidos CD47 solubles, etc. La dosificación también puede variar para la administración localizada, p. ej., intranasal, por inhalación, etc., o para la administración sistémica, p. ej., i.m., i.p., i.v., y similares.

45 Kits

50 **[0111]** También se divulgan kits para su uso en los métodos. Los kits del sujeto incluyen un agente anti-CD47. Un agente anti-CD47 puede proporcionarse en una forma de dosificación (p. ej., una forma de dosificación terapéuticamente eficaz). Un agente anti-CD47 puede proporcionarse en dos o más formas de dosificación diferentes (p. ej., dos o más formas de dosificación terapéuticamente eficaces diferentes). En el contexto de un kit, un agente cebador y/o un agente anti-CD47 pueden suministrarse en forma líquida o vendida en cualquier envase conveniente (p. ej., envase en barra, envase dosificador, etc.).

55 **[0112]** Además de los componentes anteriores, los kits pueden incluir instrucciones para practicar los métodos. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits en cuestión en una variedad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una de las formas en que pueden presentarse estas instrucciones es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, p. ej., una o varias hojas de papel en las que esté impresa la información, en el envase del kit, en un prospecto, y similares. Otra forma de estas instrucciones es un medio legible por ordenador, p. ej., un disquete, un disco compacto (CD), una unidad flash, etc., en el que se ha grabado la información. Otra forma de estas instrucciones que puede estar presente es una dirección de sitio web que se puede utilizar a través de Internet para acceder a la información en un sitio eliminado.

EXPERIMENTAL

5 **[0113]** Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la materia una descripción y divulgación completas, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención, ni que los experimentos que se exponen a continuación sean todos o los únicos experimentos realizados. Se ha procurado garantizar la exactitud de las cifras utilizadas (*p. ej.*, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio, la temperatura es en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

10 Ejemplo 1

15 **[0114]** CD47 se expresa altamente en las células madre de la leucemia mieloide aguda (AML) humana y en otras células cancerosas. Inhibe la fagocitosis de células cancerosas por macrófagos humanos. El bloqueo de CD47 permite a los macrófagos eliminar el AML y mediante la fagocitosis. Por lo tanto, CD47 es una diana terapéutica de anticuerpos. Los agentes de unión a CD47 provocan la eliminación de la leucemia y otras células cancerosas, o de otras células enfermas. Si un sujeto tiene una carga elevada de células enfermas circulantes, *p. ej.*, células circulantes de leucemia o linfoma, los agentes de unión a CD47 pueden causar aglutinación y/o lisis, pero también otros tipos de muerte celular y eliminación de las células enfermas que podrían conducir a una toxicidad potencialmente mortal de las terapias dirigidas a CD47. Por lo tanto, se requiere una estrategia de dosificación que evite los efectos secundarios agudos potencialmente mortales. Hemos establecido una estrategia de escalada de dosis intra-sujeto que previene estas toxicidades mediante la reducción de la carga de enfermedad circulante a través del aumento gradual de la dosis de terapias dirigidas a CD47.

25 **[0115]** Hemos establecido un modelo de ratón de xenoinjerto de AML humana para probar terapias de bloqueo de la vía CD47-SIRPalpha. Descubrimos que en ratones xeroinjertados con células de AML que posteriormente presentaban una carga muy elevada de células de AML circulantes (>50% del recuento total de leucocitos) e infiltración de la médula con AML (>90%), la terapia dirigida contra CD47 con anticuerpo anti-CD47 (Hu5F9-G4) a menudo causaba la muerte en la hora siguiente a la administración de la primera dosis. Sorprendentemente, en estos ratones se podía evitar la muerte prematura si se utilizaban al principio dosis bajas de Hu5F9-G4 para reducir la cantidad de células AML circulantes en la sangre antes de administrar dosis posteriores más altas del fármaco. Esta escalada de dosis intra-sujeto no sólo evitó la mortalidad temprana, sino que también dio lugar a una eliminación segura de las células leucémicas.

35 **[0116]** El escalado de dosis intra-sujeto (1) previene el síndrome de muerte precoz mediante el tratamiento inicial con dosis bajas de Ab anti-CD47, (2) puede reducir o limpiar la sangre periférica de células leucémicas mediante el tratamiento inicial con dosis bajas de Ab anti-CD47 o un agente citorreductor, (3) satura las células normales y leucémicas con dosis bajas de Ab anti-CD47 para prevenir y/o reducir la agregación celular y las toxicidades asociadas, y (4) permite la administración segura de dosis posteriores más altas que, en última instancia, pueden eliminar la enfermedad de la sangre y la médula ósea. Así pues, las dosis iniciales bajas de Ab anti-CD47 pueden limpiar la sangre periférica y facilitar la administración de dosis terapéuticas más altas.

40 Ejemplo 2

El tratamiento combinado con azacitidina y Hu5F9-G4 mejora la eliminación fagocítica de células cancerosas de leucemia mielógena aguda por macrófagos humanos

45 **[0117]** Se evaluó la combinación de Azacitidina con Hu5F9-G4 para el tratamiento de la AML. La azacitidina (Vidaza®) es un agente quimioterápico que se utiliza para el tratamiento de la leucemia mielógena aguda (AML). Se cree que los efectos anticancerígenos de la azacitidina se atribuyen a la desmetilación o interferencia en la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN), así como a la interferencia en el metabolismo celular, para producir un efecto citotóxico directo que causa la muerte de las células cancerosas que se dividen rápidamente.

50 **[0118]** Las células de leucemia promielocítica aguda (HL60) que habían sido previamente transducidas con un lentivirus que codificaba la proteína verde fluorescente (GFP) se incubaron durante 24 horas con dosis crecientes de Azacitidina a concentraciones de 0 μ M, 1 μ M, 3 μ M y 15 μ M. Posteriormente, las células leucémicas HL60 se co-cultivaron durante 2 horas con macrófagos humanos, derivados de monocitos humanos, en presencia o ausencia de Hu5F9-G4 Ab a una concentración de 10 μ g/ml. Los macrófagos se marcaron con un Ab anti-CD206 y todas las células se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la fagocitosis de las células leucémicas HL60. La fagocitosis de las células leucémicas HL60 se determinó como el porcentaje de macrófagos GFP positivos, que engullen HL60, en comparación con el número total de macrófagos. Los resultados se normalizaron con respecto a la condición de fagocitosis máxima (100%).

60 **[0119]** La combinación de azacitidina a una concentración de 3 μ M con Hu5F9-G4 potenció la eliminación fagocítica de células leucémicas HL60 por macrófagos humanos en comparación con la fagocitosis de células leucémicas HL60 que sólo habían sido tratadas con un único agente: azacitidina o Hu5F9-G4. Se seleccionó la dosis de azacitidina de 3 μ M por ser ésta la concentración plasmática máxima aproximada de azacitidina en los pacientes. La azacitidina a una concentración de 1 μ M no potenció la eliminación fagocítica de las células leucémicas HL60. La azacitidina a una concentración de 15 μ M en combinación con Hu5F9-G4 no potenció la eliminación fagocítica de las células leucémicas HL60 más que la azacitidina a una concentración de 3 μ M. Estos resultados fueron consistentes en dos ensayos diferentes

con macrófagos derivados de dos donantes diferentes de monocitos.

[0120] En resumen, la combinación de azacitidina a una concentración de 3 μM con Hu5F9-G4 aumentó significativamente la eliminación fagocítica de células leucémicas HL60 por macrófagos humanos *in vitro* en comparación con el tratamiento de agente único con azacitidina o Hu5F9-G4. Estos experimentos proporcionan una demostración preclínica de la eficacia de una combinación de Hu5F9-G4 y azacitidina en pacientes con AML.

[0121] Clínicamente, Hu5F9-G4 puede combinarse con azacitidina, decitabina u otro agente hipometilante para el tratamiento de 1) pacientes con AML sin tratamiento que no son elegibles para quimioterapia de inducción estándar o trasplante alogénico de células hematopoyéticas debido a la edad y/o comorbilidades; 2) pacientes con AML en recaída y/o refractarios a agentes hipometilantes de primera línea o a terapias estándar; 3) pacientes con síndrome mielodisplásico (MDS) de riesgo intermedio y alto no tratados previamente; y 4) pacientes con MDS en recaída y/o refractarios a agentes hipometilantes de primera línea.

[0122] Este estudio demuestra que la combinación de azacitidina con Hu5F9-G4 puede potenciar la eliminación fagocítica de células leucémicas HL60 por macrófagos humanos *in vitro* en comparación con el tratamiento de agente único con azacitidina o Hu5F9-G4.

Ejemplo 3

El tratamiento escalonado de la dosis de Hu5F9-G4 previene la muerte aguda en ratones con alta carga de enfermedad

[0123] En este estudio, se investigó un régimen de aumento de dosis como estrategia preventiva de la muerte temprana inducida por Hu5F9-G4, un anticuerpo humanizado anti-CD47, contra la enfermedad de AML humana en un modelo de xenoinjerto de ratón. En un estudio anterior, observamos que las dosis terapéuticas iniciales de Hu5F9-G4 causaban la muerte precoz en ratones injertados con AML. También observamos que la muerte prematura parecía estar relacionada con la carga de enfermedad circulante, en el sentido de que los ratones con altos niveles de células leucémicas circulantes sucumbían a la muerte prematura. Nuestra hipótesis era que las dosis iniciales bajas de Hu5F9-G4 podrían eliminar la enfermedad circulante y facilitar la administración de dosis terapéuticas más altas para eliminar la enfermedad de la médula ósea.

[0124] En ratones xenoinjertados con leucocitos circulantes muy elevados ($> 50\%$ del recuento total de leucocitos) e infiltración de la médula con AML ($> 80\%$), el tratamiento con Hu5F9-G4 causó la muerte en la hora siguiente a la administración de la primera dosis. El objetivo de este estudio era determinar si la muerte precoz observada en ratones xenoinjertados con AML puede evitarse reduciendo la velocidad a la que se eliminan las células leucémicas. Los exhaustivos análisis clínico-patológicos e histológicos no lograron identificar definitivamente la causa de la muerte. Se planteó la hipótesis de que la muerte precoz podría deberse a la aglutinación de las células leucémicas o a la lisis del tumor, y que la muerte precoz podría evitarse reduciendo la velocidad de destrucción de las células leucémicas.

[0125] Para probar esta última hipótesis, se trató a ratones con dosis iniciales de Hu5F9-G4 que oscilaban entre 1 μg y 100 μg . Cuatro de cinco ratones tratados con 100 μg de Hu5F9-G4 murieron, al igual que 1 de 5 ratones tratados con 10 μg de Hu5F9-G4; sin embargo, no se observaron muertes prematuras en 5 de 5 ratones tratados con 1 μg de Hu5F9-G4.

[0126] Para determinar si el uso de dosis iniciales bajas de Hu5F9-G4 podría reducir la enfermedad de forma segura, tras lo cual se podrían utilizar dosis más altas para curar la enfermedad, los ratones supervivientes del mismo estudio continuaron con la dosificación. Los ratones fueron tratados con los siguientes esquemas de dosificación de Hu5F9-G4: Cohorte I - 100 $\mu\text{g}/\text{día}$ durante 14 días, Cohorte II - 10 $\mu\text{g}/\text{día}$ durante 7 días seguidos de 100 $\mu\text{g}/\text{día}$ durante 14 días, y Cohorte III - 1 $\mu\text{g}/\text{día}$ durante 7 días seguido de 10 $\mu\text{g}/\text{día}$ durante 7 días seguidos de 100 $\mu\text{g}/\text{día}$ durante 14 días. Cuatro de cada cinco ratones de la cohorte I, inyectados con una dosis inicial de 100 μg de Hu5F9-G4 experimentaron el síndrome de muerte precoz. El único ratón superviviente toleró las 14 dosis restantes de 100 μg de anticuerpo y la enfermedad desapareció. Uno de los cinco ratones de la cohorte II que recibieron una dosis inicial de 10 μg de Hu5F9-G4 experimentó una muerte prematura; los cuatro ratones restantes sobrevivieron a las siete primeras dosis de 10 μg de Hu5F9-G4 y a las 14 dosis posteriores de 100 μg . Ninguno de los ratones de la cohorte III que recibieron una dosis inicial de 1 μg de Hu5F9-G4 experimentó una muerte prematura; sin embargo, el aclaramiento de la enfermedad disminuyó notablemente tras 7 dosis de 1 μg , 7 dosis de 10 μg y 14 dosis de 100 μg y los ratones recayeron varias semanas después de finalizar el tratamiento. Todos los ratones del grupo de control progresaron continuamente y murieron. Los grupos que recibieron un régimen escalonado de dosis de Hu5F9-G4 presentaron un aumento de la carga de la enfermedad y de las células de AML y recayeron tras la interrupción del tratamiento inicial. El retratamiento eliminó la enfermedad y, en algunos casos, condujo a una supervivencia libre de enfermedad a largo plazo. Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3.

Ejemplo 4

Perfil farmacocinético y de eficacia en la AML

[0127] Dada la expresión generalizada de CD47 en los tejidos normales, una dosis terapéutica de Hu5F9-G4 debe ser capaz de saturar el sumidero interno de CD47 para saturar y eliminar las células leucémicas. En el ensayo de fase 1 de

AML, se demuestra que el régimen de dosificación de Hu5F9-G4 es capaz de saturar el sumidero interno de CD47 y conducir a niveles significativos de fármaco circulante en dosis clínicamente viables.

[0128] En modelos preclínicos, se determinó que un nivel valle de Hu5F9-G4 de 100 µg/ml o superior se asociaba con la eficacia (línea azul punteada). Este nivel valle sirvió como objetivo de nivel valle mínimo para guiar la dosificación en el ensayo de fase 1. Las dosis iguales o inferiores a 3 mg/kg no alcanzaron los niveles valle deseados. Los rápidos picos y valles observados eran coherentes con la disposición mediada por diana debido a la saturación no lineal del sumidero de CD47. Por lo tanto, no se esperaba ni se observó una respuesta al tratamiento a una concentración de 3 mg/kg o inferior (cohortes 1 y 2). Los niveles de dosis de 10 mg/kg o superiores (cohortes 3 y 4) alcanzan los niveles mínimos deseados aproximadamente a las 4 semanas, que es el momento de la evaluación de la primera respuesta.

Ejemplo 5

Efecto terapéutico del tratamiento con Hu5F9-G4 en la AML

[0129] En pacientes que recibieron un máximo de 10 mg/kg de Hu5F9-G4 dos veces por semana (Cohorte 3), dos de tres pacientes (106 y 702) exhibieron actividad biológica antileucémica. Estos dos pacientes mostraron una médula ósea marcadamente hipocelular y una reducción absoluta del recuento de blastos similar a la actividad antileucémica de Hu5F9-G4 observada en modelos preclínicos murinos de xenoinjerto. Varios factores adicionales son notables para estos pacientes con actividad biológica. En primer lugar, uno de estos dos pacientes presentó una respuesta parcial (PR) con una reducción de los blastos >50%, con una respuesta duradera durante 6 meses y en curso. Clínicamente este paciente ha tolerado bien la terapia y ha tenido una mejora significativa en los requerimientos de transfusión de glóbulos rojos, de aproximadamente cada semana antes del tratamiento a una vez al mes durante el mes 3 y después del tratamiento.

[0130] La ocupación del receptor CD47 en los blastos leucémicos en la médula ósea se ha medido en todos los pacientes como una medida farmacodinámica de la actividad de Hu5F9-G4. En estos dos pacientes con respuesta biológica, se ha observado una ocupación del 50-60% del receptor CD47 en las células leucémicas de la médula ósea, lo que demuestra el compromiso de las células tumorales por Hu5F9-G4.

[0131] Basándose en el MOA de Hu5F9-G4 para inducir la actividad antileucémica específica de macrófagos y células T, se evaluó la presencia de células efectoras inmunitarias en el microambiente tumoral (médula ósea) en este paciente con respuesta duradera. A pesar de la significativa hipocelularidad inducida por Hu5F9-G4, un número significativo de macrófagos (evaluados mediante tinción CD68 o CD163) estaban presentes en la médula en la semana 4 de tratamiento. Además, la infiltración de células T en la médula ósea aumentó notablemente durante el tratamiento: El 10-15% de los infiltrados de células T estaban presentes al inicio del tratamiento, con un aumento hasta el 40-50% de todas las células de la médula ósea en la semana 8 de tratamiento (círculos azules). Aunque el tamaño de la muestra es limitado, estos datos sugieren que Hu5F9-G4 elimina las células leucémicas mediante mecanismos inmunitarios tanto innatos como adaptativos, como se ha demostrado en estudios preclínicos.

[0132] Como se muestra en la Figura 9, se trató a un paciente con una dosis de cebado de 5F9-G4 de 1 mg/kg en el día 1 y en el día 4. La dosis se aumentó a 15 mg/kg en el día 8. Se midió la ocupación del receptor tras cada administración. Para la sangre periférica CD45⁺ y la médula ósea, esta dosificación proporcionó una ocupación casi completa del receptor.

EJEMPLO 6

Terapia combinada con agentes citorreductores y Hu5F9-G4:

[0133] El co-tratamiento con terapias citorreductoras y Hu5F9-G4 para reducir la carga celular leucémica circulante puede mitigar el riesgo de muerte temprana asociado con Hu5F9-G4. Las terapias citorreductoras son agentes que reducen la carga tumoral circulante y de la médula ósea e incluyen terapias como la hidroxiurea, el etopósido oral, la leucaféresis y otras quimioterapias citotóxicas. En modelos preclínicos, se evaluó el impacto de la hidroxiurea y la posible toxicidad aditiva con el tratamiento en curso con Hu5F9-G4 en ratones sanos inmunocompetentes de tipo salvaje.

[0134] En un ensayo de Fase 1 de Hu5F9-G4 en AML recidivante/refractaria, se utilizó citorreducción con hidroxiurea y/o etopósido oral para reducir la carga de WBC circulantes a $<10 \times 10^9/L$ durante la dosificación concomitante de Hu5F9-G4. La adición de hidrea con el tratamiento Hu5F9-G4 fue suficiente para mantener los WBC $< 10 \times 10^9/L$ de los pacientes durante el ensayo sin aumentar las toxicidades. No se ha observado ninguna muerte aguda relacionada con Hu5F9-G4 en ningún paciente tratado en el ensayo hasta la presentación de esta patente.

EJEMPLO 7

Combinaciones de terapia inmuno-oncológica con Hu5F9-G4:

[0135] El bloqueo del eje de señalización CD47-SIRP α en las células tumorales mediante un anticuerpo monoclonal bloqueante anti-CD47 conduce a la eliminación del tumor mediante la activación del sistema inmunitario innato y adaptativo. La eliminación tumoral mediada por anticuerpos anti-CD47 por parte del sistema inmunitario innato se produce

a través de la eliminación fagocítica de las células tumorales por parte de macrófagos y otros fagocitos. Es bien sabido que los macrófagos son un infiltrado de células inmunitarias común en muchos tipos de tumores, y que el grado de infiltrado de macrófagos intratumoral se correlaciona con el pronóstico clínico. La correlación de la infiltración de macrófagos con el curso clínico de la enfermedad suele depender de la presencia de macrófagos de tipo M1 activados clásicamente que suprimen la progresión tumoral o, alternativamente, de macrófagos de tipo M2 activados que promueven la progresión tumoral.

[0136] Dada la frecuente infiltración de macrófagos M2 en muchos tipos de tumores y su papel en la promoción de la tumorigénesis, existe un interés generalizado en el desarrollo de terapias que cambien la polarización de los macrófagos tumorales de los M2 pro-tumorigénicos a los macrófagos M1 anti-tumorigénicos. En estudios no clínicos, se ha demostrado que la fagocitosis de células tumorales mediada por anticuerpos anti-CD47 se produce a través de macrófagos M1 y M2 (véase Zhang et al. (2016) PLoS ONE 11(4): e0153550). Además, el tratamiento in vivo de tumores humanos xenoinjertados con un anticuerpo anti-CD47 demostró un aumento de los macrófagos intratumorales M1 tras el tratamiento, lo que sugiere que un anticuerpo anti-CD47 también puede cambiar el fenotipo de los macrófagos de M2 a M1 in vivo. Dado que el reclutamiento de macrófagos efectores es un mecanismo clave para la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-CD47, la caracterización de la infiltración tumoral de macrófagos antes y después del tratamiento en pacientes tratados con anticuerpos anti-CD47 proporcionará información sobre los subtipos de pacientes y cáncer y los biomarcadores de macrófagos que enriquecerán la eficacia antitumoral.

[0137] Además de modular el sistema inmunitario innato, la terapia con anticuerpos anti-CD47 también activa el sistema inmunitario adaptativo hacia una respuesta antitumoral. La fagocitosis de las células tumorales por los fagocitos (macrófagos y/o células dendríticas) conduce a la presentación cruzada de los antígenos tumorales a las células T, lo que permite una respuesta antitumoral de las células T. En un estudio no clínico, el anticuerpo anti-CD47 mediaba una respuesta antitumoral específica de células T CD8 sin proliferación de células T reguladoras (que generalmente se considera que favorecen la aparición de tumores). En la actualidad, existe un gran interés por investigar la relación entre los subconjuntos de células T que se infiltran en el tumor y la respuesta clínica con el uso de terapias inmuno-oncológicas. De hecho, el aumento de la infiltración de células T en el tumor se ha asociado a la respuesta clínica en pacientes oncológicos tratados con inhibidores del punto de control de las células T. Dado el papel del anticuerpo anti-CD47 en la mediación de una respuesta antitumoral de las células T, la investigación clínica de la contribución de los efectores de las células T a la eficacia mediada por el anticuerpo anti-CD47 es importante para seleccionar a los pacientes y subtipos tumorales que responden a la terapia.

[0138] Basándose en el MOA de Hu5F9-G4 para inducir la actividad antileucémica específica de macrófagos y células T, se evaluó la presencia de células efectoras inmunitarias en el microambiente tumoral (médula ósea) en pacientes con AML en el ensayo clínico de fase 1 con Hu5F9-G4. En un paciente que obtuvo una respuesta parcial, se evaluaron los infiltrados de macrófagos y células T en la médula ósea.

[0139] Un número significativo de macrófagos (evaluados por tinción CD68 o CD163) estaban presentes en la médula en la semana 4 de tratamiento. Además, la infiltración de células T en la médula ósea aumentó notablemente durante el tratamiento: El 15% de las células T infiltradas estaban presentes al inicio del tratamiento, con un aumento hasta el 40-50% de todas las células de la médula ósea en la semana 8 de tratamiento (círculos azules). Estos datos indican que Hu5F9-G4 elimina las células leucémicas a través de mecanismos inmunitarios tanto innatos como adaptativos, como se ha demostrado en estudios preclínicos.

[0140] Basándose en la evidencia del aumento de infiltrados tumorales de células T con el tratamiento con Hu5F9-G4, la combinación de agentes terapéuticos que activan y potencian una respuesta antitumoral de células T con Hu5F9-G4 puede conducir a una eficacia clínica mejorada. El tratamiento combinado con Hu5F9-G4 incluye inhibidores del punto de control de células T (p. ej., anticuerpos anti-PD1, anti-PDL1, anti-CTLA-4, anti-Tim3).

50 EJEMPLO 8

Biomarcadores

[0141] El uso de perfiles moleculares, citogenéticos, inmunofenotípicos y del microambiente tumoral para seleccionar pacientes con leucemia o condiciones preleucémicas (p. ej., MDS) que predican una respuesta clínica mejorada a Hu5F9-G4.

[0142] En modelos preclínicos, Hu5F9-G4 ha demostrado actividad en monoterapia en una amplia gama de subtipos citogenéticos, moleculares y fenotípicos de AML. Sin embargo, el tratamiento con Hu5F9-G4 puede haber potenciado preferentemente la actividad clínica en determinados subtipos de AML. Las pruebas prospectivas de las características moleculares, cromosómicas y fenotípicas de los pacientes con AML mediante secuenciación del ADN, análisis citogenético/hibridación fluorescente in situ (FISH) y citometría de flujo, pueden conducir a la identificación de los pacientes con mayor respuesta a Hu5F9-G4. En el ensayo de fase 1 sobre la AML, se realizó la secuenciación dirigida del ADN de las mutaciones mieloides en pacientes que recibían tratamiento con Hu5F9-G4. Se observó una reducción de la carga mutacional (frecuencia alélica variante) para algunas mutaciones con respecto a otras (Figura X).

5 **[0143]** Además de la selección fenotípica de la AML, la caracterización prospectiva del microambiente tumoral en la médula ósea puede ser predictiva de la respuesta de Hu5F9-G4. Dado que los macrófagos, otros fagocitos y las células T son células efectoras primarias necesarias para la actividad antitumoral de Hu5F9-G4, la frecuencia de estos tipos de células inmunitarias en la médula ósea antes del tratamiento puede predecir la actividad de Hu5F9-G4. En concreto, el aumento de la frecuencia de macrófagos en la médula ósea mediante CD68, CD163, caracterización de M1 y M2 y otros marcadores similares puede correlacionarse con una mayor eficacia. El aumento de la infiltración de neutrófilos, células dendríticas y células T también puede estar relacionado con una mayor eficacia. Los subtipos específicos de células T, incluyendo pero sin limitarse a la caracterización de la expresión de CD3, CD4, CD8, PDL1, PD1, FoxP3, CD25 pueden correlacionarse con la eficacia de Hu5F9-G4. Por último, el grado de infiltración de SIRPα en el tumor puede predecir la respuesta, ya que SIRPα es el ligando de CD47 en las células efectoras. Las modalidades de caracterización de efectores inmunitarios en la médula ósea incluirían inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, cyTOF y citometría de flujo.

EJEMPLO 9

15 Indicaciones Hu5F9-G4 AML:

20 **[0144]** Hu5F9-G4 tiene una amplia actividad preclínica en todos los subtipos morfológicos, moleculares y citogenéticos de AML. Así pues, Hu5F9-G4 podría tener una amplia actividad clínica potencial en la AML. En cuanto a las indicaciones clínicas específicas, Hu5F9-G4 puede tratarse en: 1) Leucemia mieloide aguda recidivante y/o refractaria; 2) Pacientes con AML no elegibles para quimioterapia de inducción estándar que fracasaron con terapia estándar de baja intensidad (p. ej., con agentes hipometilantes); 3) Pacientes con AML en remisión morfológica completa con evidencia de enfermedad residual mínima.

25 **[0145]** La monitorización de la enfermedad mínima residual (MRD) se ha convertido en un potente factor pronóstico que está empezando a desempeñar un papel central en el tratamiento de los pacientes con AML, tanto en el entorno pre como postrasplante. En múltiples estudios a gran escala de pacientes con AML recién diagnosticados, la positividad de la MRD tras la terapia fue un factor independiente de mal pronóstico y predictor de recaída. Además, la positividad de la MRD también parece ser un factor de mal pronóstico en el entorno postrasplante. En un estudio retrospectivo, en pacientes con remisión morfológica sometidos a HSCT alogénico, la presencia de MRD antes del trasplante fue un factor predictivo independiente de recaída, ya que el 67% de los pacientes con remisión positiva para MRD recayeron en los 3 años posteriores al trasplante, en comparación con el 22% en remisión negativa para MRD. En la AML se han utilizado varios métodos para el seguimiento de la MRD, entre los que se incluyen: 1) citometría de flujo multiparamétrica para la detección de antígenos de superficie hematopoyéticos aberrantes; 2) seguimiento molecular de la carga mutacional específica de la leucemia; 3) seguimiento citogenético de las anomalías cromosómicas asociadas a la leucemia.

35 **[0146]** En estudios preclínicos y clínicos iniciales, Hu5F9-G4 ha demostrado una mayor actividad en una menor carga tumoral de la enfermedad. Así pues, Hu5F9-G4 puede ser más eficaz en contextos en los que se detecta una carga tumoral mínima, especialmente en pacientes con enfermedad residual mínima.
Ejemplo 10 Ensayo de ocupación de receptores

40 **[0147]** En la Figura 7 se muestra un esquema del ensayo. Los aspirados de sangre periférica y de médula ósea de los pacientes se recogen en los momentos programados (p. ej., el día 1 antes de la administración de Hu5F9-G4, el día 1 después de Hu5F9-G4, etc.). Estas muestras se dividen en dos tubos, "RO_{test}" y "RO_{saturada}". "RO_{saturada}" se saturan artificialmente *ex vivo* con 200 µg/ml de Hu5F9-G4 para simular una ocupación del receptor del 100% (previamente determinada para saturar). RO_{test} no están saturados artificialmente. A continuación, estos dos tubos se tiñen con 200 µg/ml de un anti-IgG4 conjugado con AlexaFlour-647 (clon G17-4) para determinar la intensidad fluorescente en los glóbulos rojos y los glóbulos blancos, incluidos los blastos. La ocupación del receptor de cada fracción sanguínea se determinará como el cociente porcentual de la intensidad fluorescente media (IFM) del RO_{test} dividido por la IFM del RO_{saturada}.

50 Ejemplo 11

55 **[0148]** En la Figura 8 se proporciona un protocolo de dosificación clínico ejemplar. La tabla superior proporciona rangos de dosificación inferiores para el uso en ensayos clínicos de fase 1, y la tabla inferior proporciona esquemas de dosificación clínicamente relevantes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-CD47 que reduce la unión de CD47 a SIRP α y azacitidina para su uso en un método de tratamiento de un paciente para un cáncer hematológico.
2. El anticuerpo anti-CD47 y azacitidina para uso de la reivindicación 1, en el que el cáncer hematológico es:
- 10 (a) a leukemia,
(b) Leucemia mieloide aguda (AML), o
(c) Síndrome mielodisplásico (MDS).
3. El anticuerpo anti-CD47 y azacitidina para uso de la reivindicación 1, en el que el paciente es:
- 15 (a) un paciente con AML sin tratamiento que no es elegible para quimioterapia de inducción estándar o trasplante alogénico de células hematopoyéticas debido a su edad y/o comorbilidades,
(b) un paciente con AML en recaída y/o refractario, ya sea al agente hipometilante de primera línea o a las terapias estándar,
(c) un paciente con síndrome mielodisplásico (MDS) de riesgo intermedio o alto no tratado previamente, o
- 20 (d) un paciente con MDS en recaída y/o refractario a un agente hipometilante de primera línea.
4. El anticuerpo anti-CD47 y azacitidina para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el método comprende:
- 25 administrar el anticuerpo anti-CD47 en un régimen de dosis escalonada para alcanzar una dosis terapéutica en la que se consiga una ocupación del receptor superior al 80% en células blásticas de la médula ósea del paciente;
y
administrar la dosis terapéutica durante un periodo de tiempo suficiente para tratar el cáncer hematológico.
- 30 5. El anticuerpo anti-CD47 y azacitidina para uso de la reivindicación 4, en el que una dosis inicial del anticuerpo anti-CD47 es de 1 mg/kg/dosis.
6. El anticuerpo anti-CD47 y azacitidina para uso de la reivindicación 5, en el que la dosis se escala de 1 a 30 mg/kg/dosis.
- 35 7. El anticuerpo anti-CD47 y azacitidina para uso de la reivindicación 6, en el que la dosis se escala de forma quincenal a bisemanal.
- 40 8. El anticuerpo anti-CD47 y azacitidina para uso de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que el anticuerpo anti-CD47 se administra de forma quincenal a bisemanal.

FIG. 1

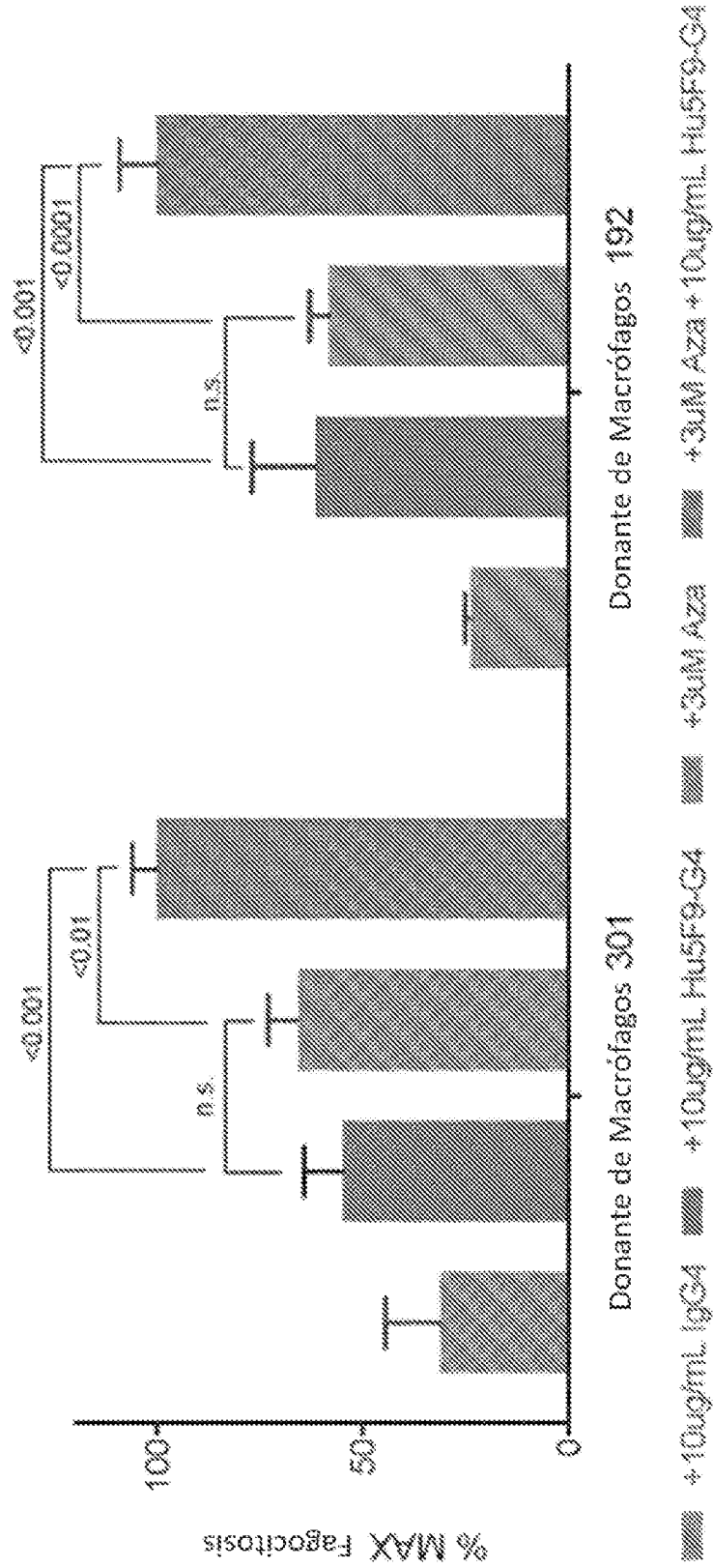


FIG. 2

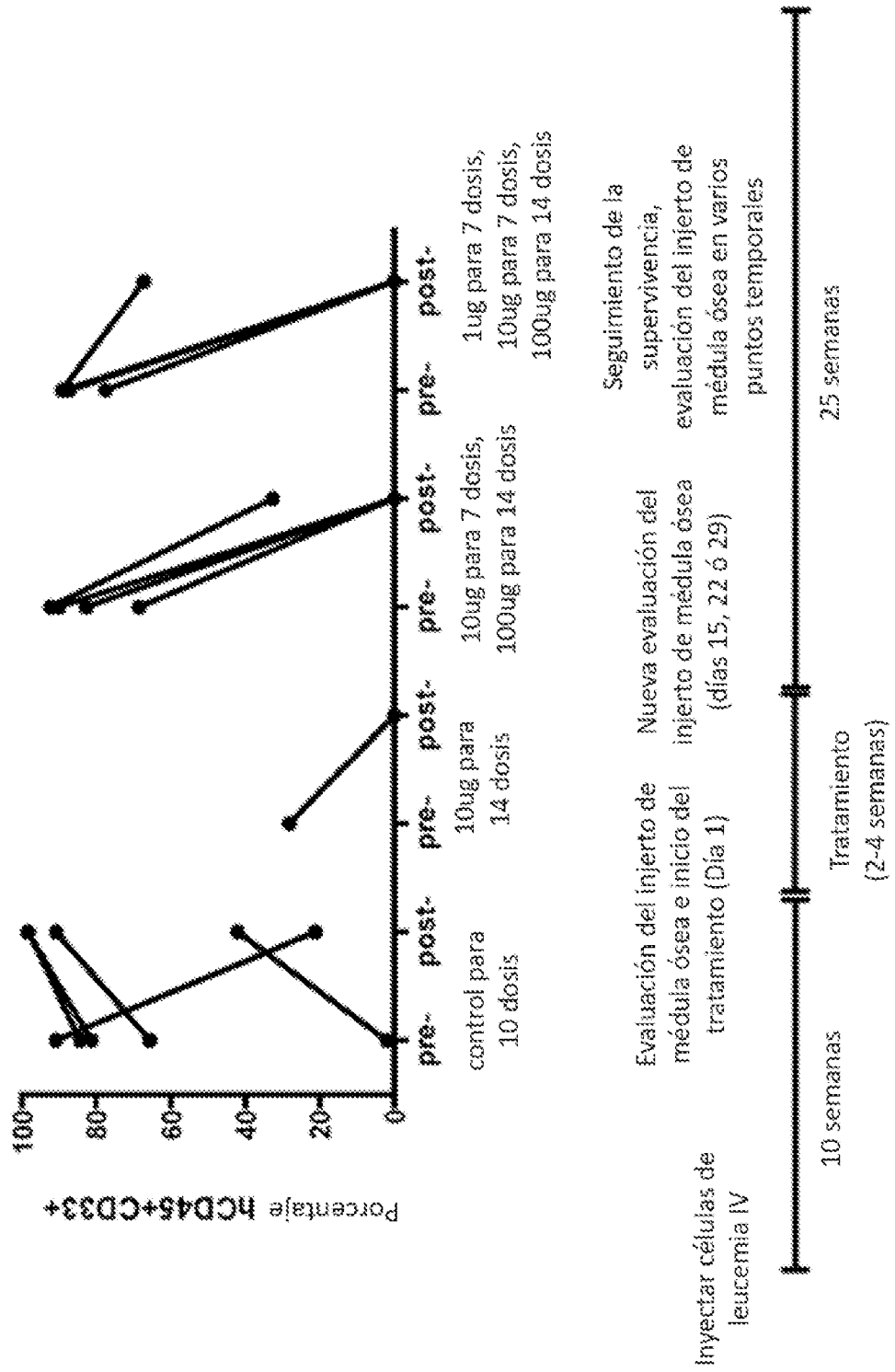


FIG. 3B

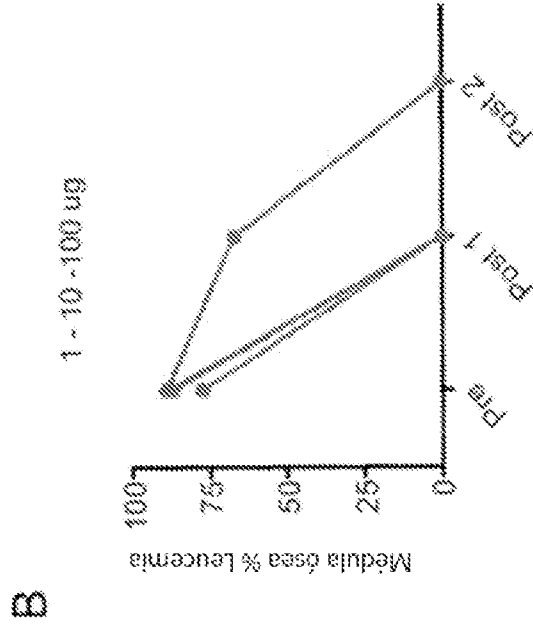


FIG. 3A

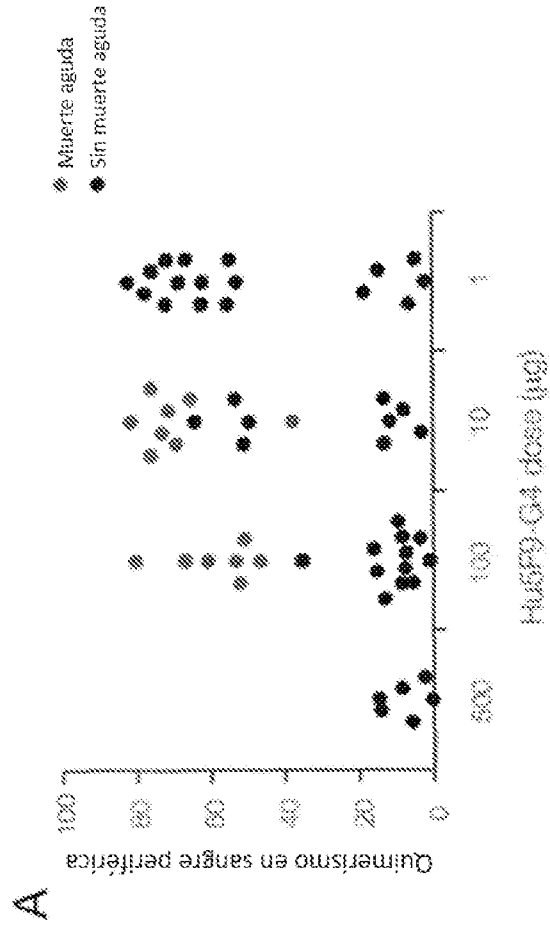


FIG. 4

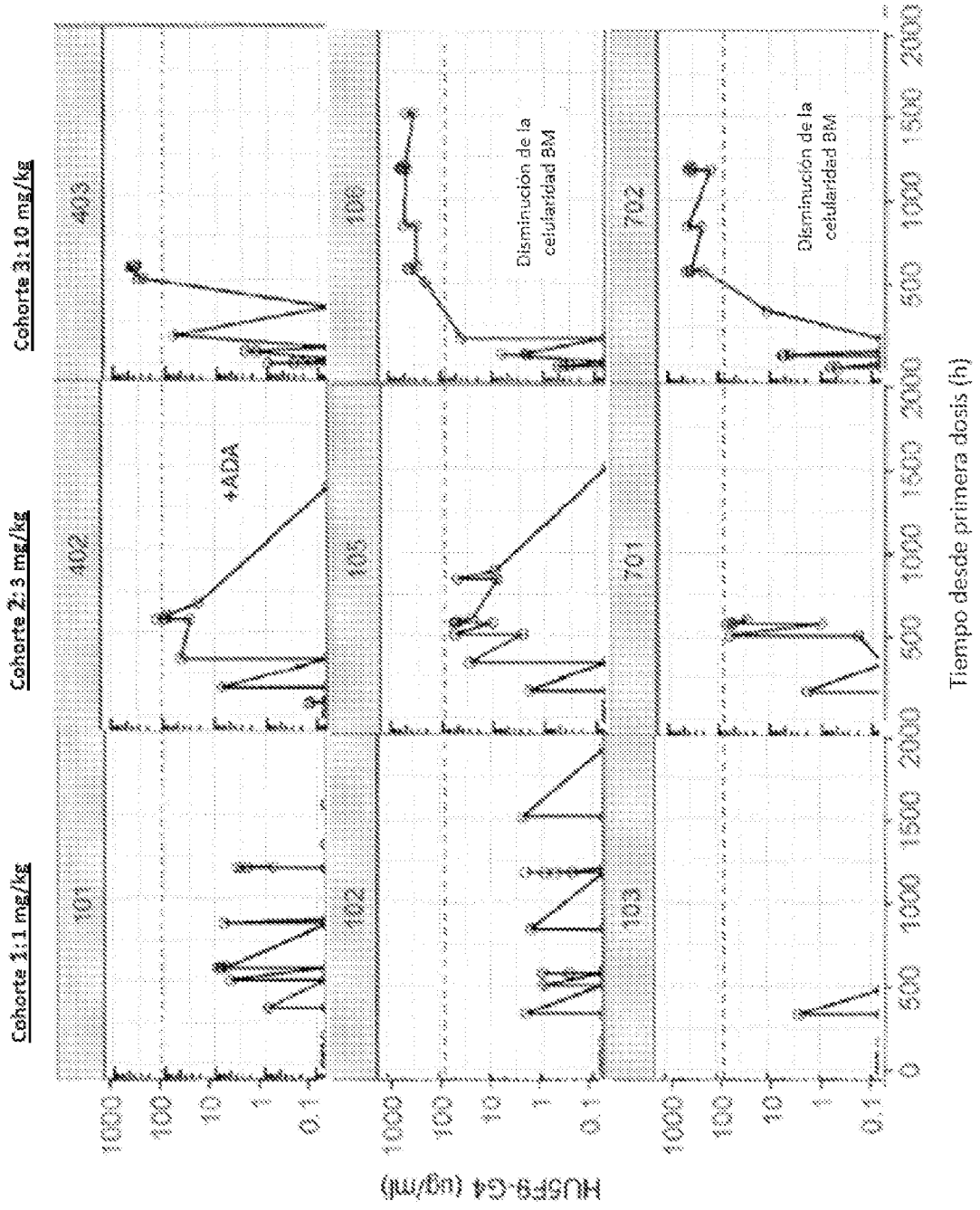
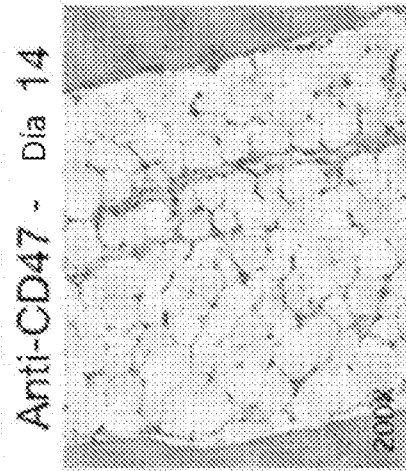
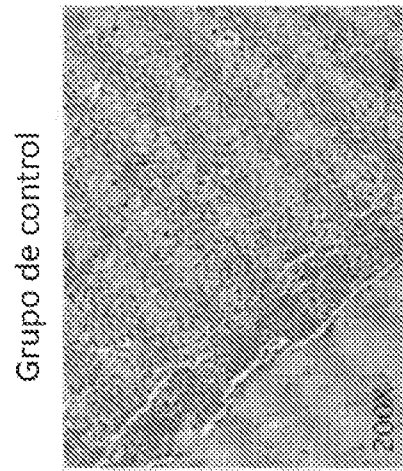


FIG. 5

Modelo de ratón de xenoinjerto
de paciente con AML

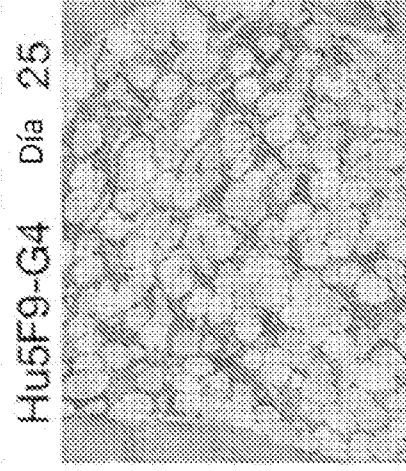
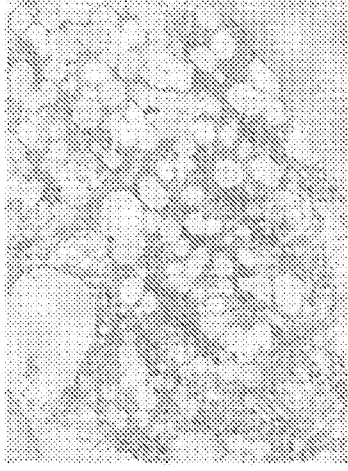


Ensayo fase I cohorte 3 de AML
1-10 mg/kg dos veces por semana

Paciente 702
Pretratamiento



Paciente 106
Pretratamiento



Majeti, Weissman et al., Cell 2009

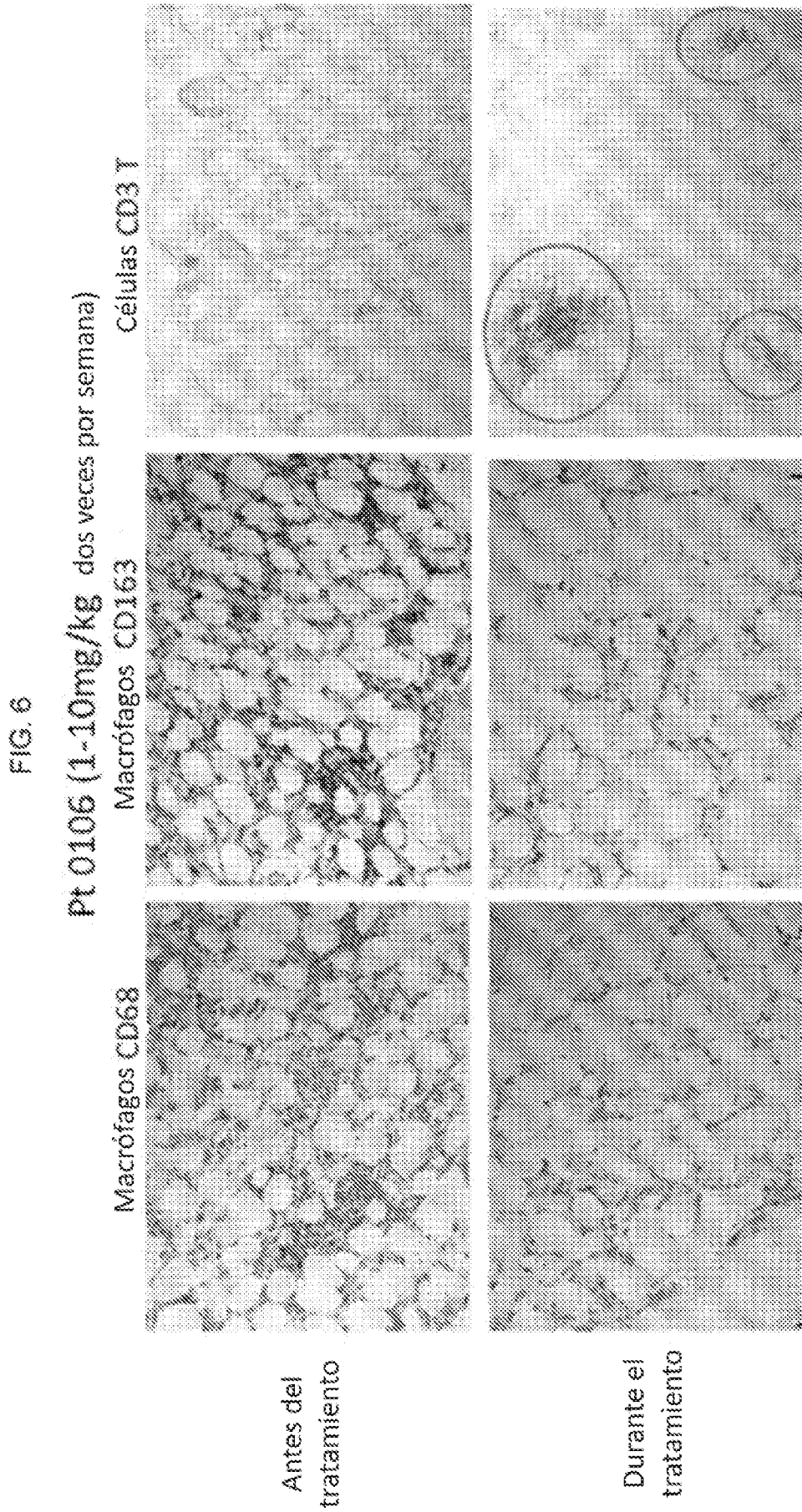


FIG. 7

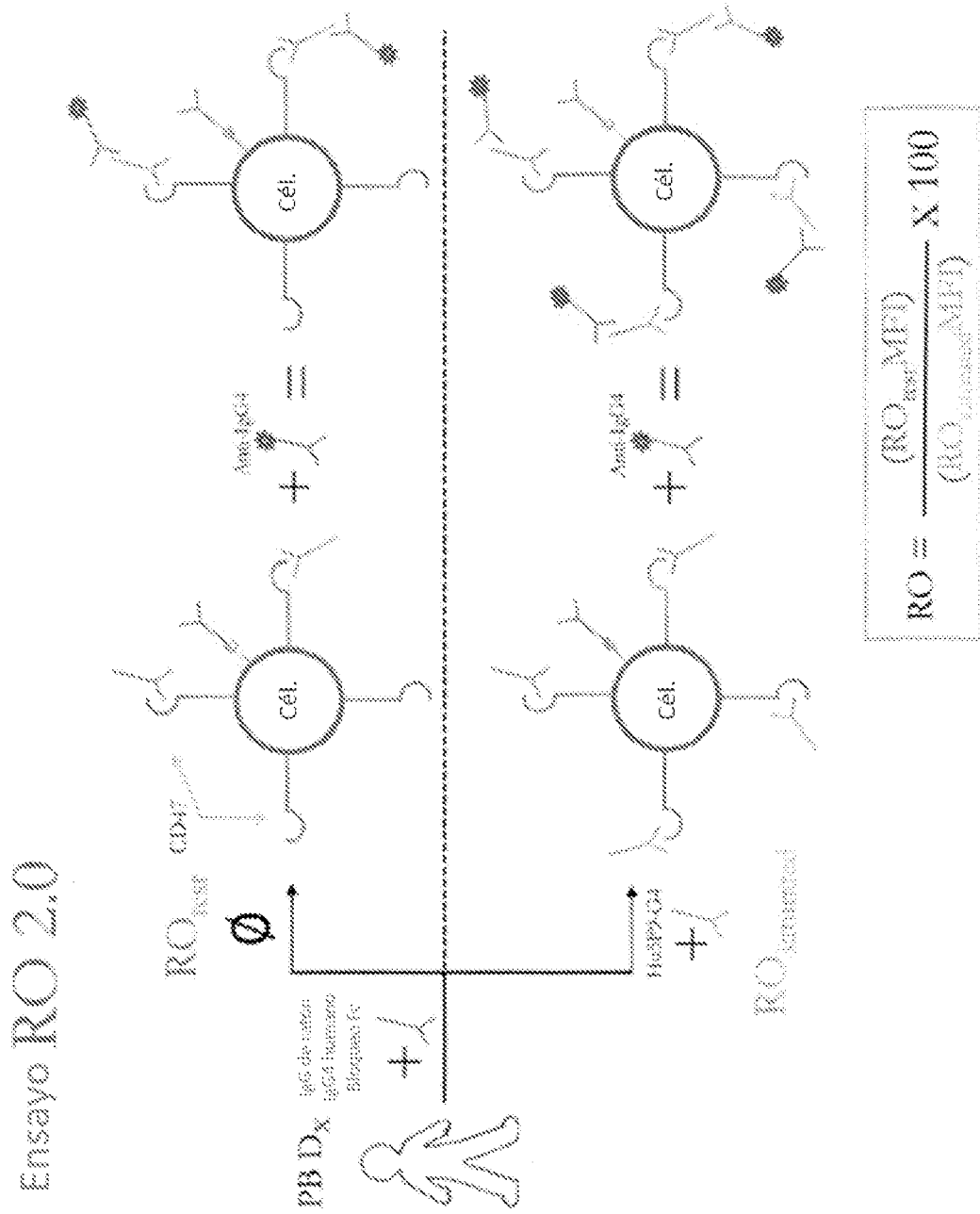


FIG. 8

Intervalo de perfil posológico de AML Hu5F9-G4 : Ensayo de fase 1 en AML

Cohorte	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5+
	D1	D4	D8	D11	D15	D18	D22	D25	D29+
1	0.1 mg/kg	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg	0.3 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg 2x semana
2	0.3 mg/kg	0.3 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	3 mg/kg	3 mg/kg	3 mg/kg	3 mg/kg 2x semana
3	1 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg 2x semana
4	1 mg/kg	1 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg 2x semana
5	1 mg/kg	1 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg 2x semana

Perfil posológico terapéutico

Semana 1	Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5+
	D4	D8	D11	D15	D22	D25	D29+
1 mg/kg	1 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg	30 mg/kg 2x semana
1 mg/kg	1 mg/kg	30 mg/kg	60 mg/kg	60 mg/kg	60 mg/kg	60 mg/kg	60 mg/kg 2x semana

FIGURA 9

Ocupación del receptor CD47

Ocupación del receptor CD47 de Leucemia mieloide aguda

