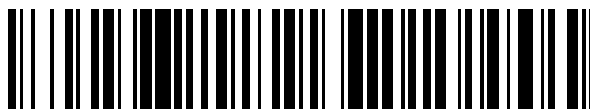


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 719**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/275 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2009** **E 09734943 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014** **EP 2282772**

54 Título: **Composiciones y métodos para mejorar el sistema inmunitario**

30 Prioridad:

23.04.2008 EP 08155011

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2014

73 Titular/es:

STICHTING SANQUIN BLOEDVOORZIENING
(100.0%)
Plesmanlaan 125
1066 CX Amsterdam, NL

72 Inventor/es:

VAN DEN BERG, TIMO KARS

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 444 719 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

Composiciones y métodos para mejorar el sistema inmunitario

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la medicina molecular. En particular, se refiere a composiciones y métodos para mejorar la eliminación de células aberrantes, p. ej., células cancerosas o células infectadas por virus, por parte del sistema inmunitario del hospedador. Entre otras cosas, proporciona una eficiencia mejorada del tratamiento de sujetos humanos con un anticuerpo terapéutico, en particular, mediante un aumento de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés).

El sistema inmunitario defiende al cuerpo frente a infecciones, enfermedades y sustancias extrañas. Está compuesto por un gran número de órganos y células. Un antígeno es una sustancia que provoca que el sistema inmunitario desarrolle una respuesta específica, denominada respuesta inmunitaria. Los virus, las bacterias, los gérmenes y los parásitos contienen sustancias que no suelen estar presentes en el cuerpo y, en consecuencia, provocan una respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria puede conllevar la destrucción del antígeno y cualquier cosa de la que forme parte o a la que esté unido. En la respuesta del sistema inmunitario ante un antígeno participan distintos tipos de células. Entre las células se encuentran los macrófagos, los granulocitos, las células dendríticas, las células asesinas naturales y los linfocitos. Entre los linfocitos se encuentran las células B (linfocitos B), las células T (linfocitos T), las células T Asesinas y las células T Colaboradoras.

Las células cancerosas tienen sustancias en sus superficies externas que pueden actuar como antígenos y, así, "marcar" las células como diferentes o anormales. Los virus, las bacterias y los parásitos tienen componentes que son sustancialmente distintos a las células humanas normales porque son realmente extraños para el cuerpo y son detectados por el sistema inmunitario. Sin embargo, las diferencias entre las células cancerosas y las células humanas normales pueden resultar más difíciles de detectar para el sistema inmunitario. Las inmunoterapias contra el cáncer, que normalmente utilizan anticuerpos monoclonales, están diseñadas para ayudar al sistema inmunitario a reconocer células cancerosas y/o fortalecer la respuesta inmunitaria a las células cancerosas y, así, destruir el cáncer.

Varias estrategias terapéuticas en seres humanos están basadas en el uso de anticuerpos terapéuticos. Entre ellas se incluyen, por ejemplo, el uso de anticuerpos terapéuticos desarrollados para destruir las células objeto de tratamiento, particularmente células enfermas tales como células infectadas por virus, células tumorales u otras células patógenas. Dichos anticuerpos suelen ser anticuerpos monoclonales, de la clase IgG, normalmente con parte Fc de IgG1 o IgG3 humana. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos nativos o recombinantes, anticuerpos de ratón humanizados (es decir, que comprenden dominios funcionales de varias especies, normalmente la parte Fc de origen humano o de primate no humano, y la región variable o la región determinante de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) de origen de ratón). Como alternativa, el anticuerpo monoclonal puede ser completamente humano mediante la inmunización en ratones transgénicos con locus de Ig humana u obteniéndose mediante bibliotecas de ADNc elaboradas a partir de células humanas. Un ejemplo concreto de dichos anticuerpos terapéuticos es rituximab (Mabthera™; Rituxana), que es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico fabricado con regiones constantes $\gamma 1$ y κ humanas (por tanto, con parte Fc de IgG1 humana) unidas a dominios variables murinos que le confieren la especificidad contra CD20. En los últimos años, rituximab ha modificado notablemente la estrategia terapéutica frente a las malignidades linfoproliferativas, especialmente linfomas no Hodgkin (LNH). Otros ejemplos de IgG1 humanizados incluyen alemtuzumab (Campath™, que se utiliza en el tratamiento de malignidades de células B o trastuzumab (Herceptin™), que se utiliza en el tratamiento del cáncer de mama.

Los anticuerpos terapéuticos alcanzan su efecto terapéutico mediante varios mecanismos. Pueden tener efectos directos al producir apoptosis o muerte celular programada en, p. ej., células tumorales. Pueden bloquear receptores de factores de crecimiento, deteniendo de manera efectiva la proliferación de las células tumorales.

Los efectos indirectos incluyen reclutar células que tienen citotoxicidad, tales como monocitos y macrófagos. Este tipo de destrucción celular mediada por anticuerpos se denomina citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los anticuerpos monoclonales también pueden unirse al complemento, dando lugar a una toxicidad celular directa, conocida como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Si bien los anticuerpos terapéuticos representan un nuevo enfoque específico y eficiente a la terapia humana, en especial, para el tratamiento de tumores, no siempre muestran una eficacia sólida. Por ejemplo, aunque rituximab, solo o en combinación con la quimioterapia, demostró ser eficaz en el tratamiento del LNH tanto de grado bajo-intermedio como de grado alto, del 30% al 50% de los pacientes con LNH de grado bajo no tienen respuesta clínica al rituximab. Se ha sugerido que el nivel de expresión de CD20 en las células de linfoma, la presencia de una alta carga tumoral en el momento del tratamiento o bajas concentraciones séricas de rituximab pueden explicar la falta de eficacia de rituximab en determinados pacientes. No obstante, siguen sin conocerse en gran parte los motivos reales del fracaso del tratamiento. En consecuencia, en la técnica existe la necesidad de aumentar la eficiencia de los anticuerpos terapéuticos.

Así mismo, considerando el número de anticuerpos que se han ensayado en indicaciones de cáncer, se podría haber adelantado que los anticuerpos contra el cáncer incluirían la gran mayoría de los agentes incluidos en la lista de los medicamentos aprobados por el Organismo para el Control de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, solamente 4 de los 12 anticuerpos terapéuticos incluidos en esta lista están dirigidos a la terapia contra el cáncer, y parece que esto se debe principalmente a la falta de beneficios para el paciente. De manera interesante, ahora está empezando a estar claro que uno de los principales motivos es que las células cancerosas (como sus equivalentes sanas) son relativamente resistentes a mecanismos de destrucción mediados por el sistema inmunitario. El mecanismo de esta resistencia aparente de las células cancerosas a la inmunidad del hospedador no se ha determinado.

Un objetivo de la presente invención es, por tanto, identificar medios y métodos para mejorar la inmunidad y la inmunoterapia contra células aberrantes como, por ejemplo, células cancerosas. En particular, un objetivo es mejorar la eficacia *in vivo* de un compuesto terapéutico que puede inducir la activación de células efectoras inmunes del hospedador contra una célula aberrante.

De manera interesante, los presentes inventores descubrieron un mecanismo endógeno que limita la destrucción de células aberrantes, p. ej., células cancerosas, por células efectoras inmunes (véase la Figura 1). Este mecanismo implica la interacción molecular entre CD47, que está presente en la superficie de la práctica totalidad de las células dentro del cuerpo del hospedador, incluidas las células cancerosas, y SIRPα, que está expresada específicamente en células inmunitarias, concretamente en macrófagos y granulocitos (Adams et al., 1998. J. Immunol. 161:1853-18592). De manera importante, resultó que bloquear la interacción entre CD47 y SIRPα con anticuerpos antagonistas contra cualquiera de los dos componentes mejoraba espectacularmente la destrucción *in vitro* de células cancerosas en presencia de anticuerpos anti-células cancerosas (Figura 2). Este efecto se confirmó en un modelo de tumor pulmonar murino en ratones mutantes de SIRPα (Figura 3). Estos datos muestran que la unión de CD47 a SIRPα genera una señal inhibitoria que reprime la ADCC por el sistema inmunitario. Sin ceñirnos a la teoría, se supone que la interferencia con la señal inhibitoria mediante SIRPα se traduce en una actividad mejorada de las células efectoras inmunes contra una célula aberrante, presuntamente mediante un aumento del mecanismo de ADCC.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende (i) un compuesto terapéutico que puede inducir la activación de células efectoras inmunes del hospedador contra una célula aberrante y (ii) al menos un agente capaz de reducir o prevenir la transducción de señales inhibitorias iniciada mediante SIRPα. Por ejemplo, se utiliza un agente que sea capaz de inhibir la interacción entre SIRPα y CD47, de forma que se reduzca la señal inhibitoria mediante la interacción CD47- SIRPα. Un hospedador es un mamífero, preferentemente un primate o un roedor, y más preferentemente, un sujeto humano.

El compuesto terapéutico es un anticuerpo terapéutico, en particular, un anticuerpo que induce o promueve la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Según se utiliza en el presente documento, la ADCC está concebida para abarcar también la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, por sus siglas en inglés). Dicho anticuerpo terapéutico es capaz de formar un complejo inmunitario. En una realización, el anticuerpo terapéutico tiene una parte Fc de IgG de origen humano o de primate no humano. Preferentemente, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional o un derivado del mismo, y más preferentemente un anticuerpo humanizado, humano o quimérico. Dicho fragmento o derivado del mismo preferentemente se selecciona de un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, una CDR y un scFv. En una realización particular, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo terapéutico aprobado por el FDA, tal como rituximab, herceptin, trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab o panitumumab. Véase, por ejemplo, Strome et al., Oncologist 2007; 12; 1084-1095.

De acuerdo con la invención, se utiliza un agente capaz de reducir o prevenir la transducción de señales inhibitorias iniciada mediante SIRPα para bloquear parcial o totalmente la señal inhibitoria mediante el complejo CD47- SIRPα. En la técnica se conocen agentes capaces de reducir o prevenir la transducción de señales inhibitorias iniciada mediante SIRPα, p. ej., al inhibir la interacción entre SIRPα y CD47, y se pueden identificar otros agentes utilizando técnicas conocidas basadas en una lectura de eventos de señalización aguas abajo. Por ejemplo, se sabe que la interacción de CD47 asociada a células con SIRPα expresada en la superficie de células mieloides provoca fosforilación de tirosina de SIRPα y promueve el reclutamiento y/o activación de las fosfatasa de tirosina SHP-1 y SHP-2, así como de una serie de proteínas de señalización distintas a la parte citoplásmica de la proteína SIRPα (Oldenberg PA et al. (2000) Science 288: 2051-4, Oshima et al. (2002) FEBS letters 519:1-7). Se sabe que estos componentes y, en particular, SHP-1, y quizá también SHP-2, median los efectos negativos de la inducción de SIRPα con respecto a varios efectos aguas abajo, incluyendo la fagocitosis de glóbulos rojos recubiertos por anticuerpos o complemento (Oldenberg PA et al. (2001) J Exp Med. 193:855-62) y, por tanto, es previsible que también medien la regulación inhibitoria de ADCC. De igual forma, los agentes terapéuticos que inhiben la interacción CD47- SIRPα también prevendrán el reclutamiento y/o activación de SHP-1, SHP-2 y/o algunas de las demás moléculas de señalización indicadas. Se puede seleccionar una sustancia para reducir o prevenir la transducción de señales inhibitorias iniciada mediante interacciones CD47-SIRPα humanas durante la ADCC utilizando una serie de ensayos orientados a detectar: i) la reducción de interacciones CD47- SIRPα en general (Liu et al. (2007) J Mol Biol. 365:680-93, Liu et al. (2004) J. Immunol. 172:2578-85) (Figura 4), ii) la reducción de la

fosforilación de tirosina dependiente de CD47 de SIRP α , y/o el reclutamiento de SHP-1 hacia SIRP α y la activación resultante de la actividad de fosfatasa de tirosina de SHP-1 (Oldenborg PA et al. (2000) Science 288:2051-4), y/o iii) la mejora de la ADCC utilizando anticuerpos terapéuticos (p. ej., trastuzumab, rituximab) contra el tumor (Mimura K et al. (2007) Oncology. 72:172-80, Shimadoi S et al. (2007) Cancer Sci. 98: 1368-72, Lefebvre ML et al. (2006) J Immunother. 29: 388-97) u otras células (p. ej., glóbulos rojos).

El documento WO99/40940 desvela ligandos de CD47 y agentes que se unen a dichos ligandos, tales como anticuerpos CD47 y SIRP α , para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, autoinmunes y alérgicas, rechazos de injertos y/o leucemia linfocítica crónica.

Se ha revelado que la unión de SIRP α con fragmentos Fab de anticuerpos específicos puede reprimir la producción de mediadores inflamatorios por macrófagos (Van den Berg et al., J. Leukocyte Biol. 1999; pg. 16)

El documento WO02/092784 se refiere a polinucleótidos y polipéptidos asociados a la modulación de interacciones SIRP α -CD47.

Armant et al. desvelan que anticuerpos monoclonales anti-CD47 reprimen de forma selectiva la liberación de IL-12 por monocitos (J. Exp. Med. Vol. 190, 1999, pg. 1175-1181).

Van den Berg et al. revelan que los macrófagos activados son la causa principal de los daños en tejidos durante la inflamación en el SNC. Se seleccionaron tres anticuerpos que se unen al receptor de SIRP α de la rata (J. Neuroimmunology, Vol. 90, 1998, pg. 53).

El documento US2003/0026803 desvela un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria con participación del macrófago, que comprende administrar un agente que inhibe la interacción entre CD47 y SIRP α . En el presente documento también se describen métodos para identificar dichos agentes.

Sin embargo, el uso de un agente inhibidor de CD47/SIRP α según se desvela en el presente documento, es decir, para mejorar las células efectoras inmunes de un hospedador, no se ha desvelado ni surgido en la técnica.

Un "agente" o "antagonista", según se menciona en el presente documento, puede ser prácticamente cualquier molécula o proceso que sea capaz de conseguir la función requerida, es decir, de reducir o prevenir la supresión inducida por CD47/SIRP α de la respuesta citolítica y/o fagocítica de células efectoras inmunes (véase la Fig. 1). Esta función se consigue convenientemente inhibiendo o interfiriendo con la interacción CD47-SIRP α . "Inhibir" la interacción CD47/SIRP α significa que la relación funcional entre las dos moléculas se altera de forma tal que CD47 reduce o elimina los efectos supresores de destrucción sobre el macrófago. Por ejemplo, la interacción biológica entre SIRP α y CD47 se puede reducir o modificar, evitando así la señalización inhibidora inducida mediante SIRP α . De forma alternativa, la señalización inhibidora mediante SIRP α se puede evitar sin afectar realmente la interacción con CD47. Se proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que antagoniza CD47/SIRP α , donde dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-CD47 o anti-SIRP α o un fragmento del mismo, y un anticuerpo terapéutico adicional que comprende una parte Fc de IgG1 de humano o de primate no humano que induce la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), para su uso en el tratamiento del cáncer, donde dicho anticuerpo antagonista mejora la destrucción mediada por anticuerpos de células tumorales inducida por dicho anticuerpo terapéutico adicional.

En la técnica se conocen moléculas inhibidoras de una variedad de tipos, y pueden utilizarse como base para el diseño de agentes de acuerdo con la presente invención. Se pueden utilizar uno o varios agentes del mismo tipo o de un tipo distinto (p. ej., una molécula pequeña y un anticuerpo). En una realización, una composición comprende una sustancia proteica capaz de inhibir la interacción entre SIRP α y CD47. Es un péptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se pueden preparar y ensayar fácilmente como se describe a continuación, utilizando técnicas conocidas en este campo. Por ejemplo, una composición comprende, como antagonista de la señalización inducida por CD47/SIRP α , un anticuerpo anti-CD47, un anticuerpo anti-SIRP α , o un fragmento de los mismos.

Se pueden seleccionar agentes inhibidores de CD47/SIRP α convenientes para su uso en la presente invención utilizando un ensayo *in vitro* (alto rendimiento) que incluya la co-incubación de células tumorales y macrófagos en presencia de un anticuerpo terapéutico contra las células tumorales y ensayando la eficacia de agentes candidatos, p. ej., un panel de anticuerpos monoclonales contra CD47 o SIRP α , para mejorar la destrucción dependiente de anticuerpos. Véase también el Ejemplo 1. Por ejemplo, se pueden establecer la fagocitosis y la citólisis de células cancerosas cultivadas de mama humana por macrófagos derivados de monocitos (MDM) o líneas celulares mielomonocíticas mediadas por un anticuerpo terapéutico, en presencia y ausencia de un agente antagonista candidato. Dichos sistemas de ensayo se conocen en la técnica. Por ejemplo, se pueden cultivar monocitos purificados con GM-CSF, M-CSF, o sin citocina durante cinco o seis días. Se pueden realizar ensayos de fagocitosis (ADCP) y citólisis (ADCC) celulares dependientes de anticuerpos con los MDM y las células objeto de tratamiento

positivas para HER-2/neu (SK-BR-3). La ADCP se puede medir mediante citometría de flujo fluorescente de dos colores utilizando PKH2 (tinte fluorescente verde) y anticuerpos monoclonales (MoAb) conjugados con ficoeritrina (rojos) contra CD14 y CD11b humanos. La ADCC se puede medir convenientemente con ensayos de liberación de 51-Cr radioactivo establecidos, o con un kit de detección comercial de LDH no radiactivo. Sin embargo, también se pueden utilizar otros métodos.

Como se entenderá, la presente invención se utiliza ventajosamente para mejorar la eficacia *in vivo* de un compuesto terapéutico que pueda inducir la activación de células efectoras inmunes de un hospedador contra cualquier tipo de célula aberrante. Según se utiliza en el presente documento, "célula aberrante" se refiere a cualquier célula enferma o no deseada de otro modo en un organismo hospedador.

En una realización, se trata de una célula cancerosa. Por ejemplo, es una célula de un linfoma no Hodgkin, una célula de cáncer de mama, una célula de leucemia linfocítica crónica o una célula de cáncer colorrectal.

Está claro que el bloqueo de interacciones CD47-SIRP α realizado por antagonistas convenientes es una gran promesa para mejorar la destrucción mediada por anticuerpos de células cancerosas. Principalmente, el valor añadido de resolver las limitaciones de la terapia con anticuerpos contra cánceres se puede producir, al menos, a tres niveles distintos:

1. Al reducir el umbral de destrucción de células cancerosas, se puede rebajar la dosificación y/o frecuencia del tratamiento con anticuerpos, generando una reducción significativa de los costes. Esto es importante, ya que la producción de terapias con anticuerpos, que suelen ser proteínas recombinantes humanizadas, es cara.
2. Los índices de curación y supervivencia pueden subir notablemente al aumentar la eficacia global de la terapia con anticuerpos.
3. El aumento de la ADCC puede tener un efecto espectacular en la variedad de terapias con anticuerpos cuya aplicación clínica sería adecuada. Numerosas terapias con anticuerpos que no hubieran tenido efectos beneficiosos de otro modo, pueden resultar efectivas en combinación con antagonistas de CD47-SIRP α . De hecho, quizás habría que volver a tener en cuenta varias de las terapias con anticuerpos que no han demostrado suficiente actividad en los ensayos hasta hoy.

Uno de los puntos fuertes del concepto de la presente invención reside en su amplia aplicabilidad. En principio, se puede esperar potenciar los efectos de cualquier anticuerpo terapéutico contra el cáncer, en particular, aquellos que ejercen sus efectos, al menos en parte, por la ADCC. Así mismo, los anticuerpos terapéuticos que no han mostrado ningún componente de ADCC en ausencia de la interferencia CD47-SIRP α , pueden ser capaces de crear una respuesta ADCC beneficiosa tras el bloqueo de las interacciones CD47-SIRP α . Según se ha indicado anteriormente, la mayoría de los anticuerpos terapéuticos aprobados por el FDA son de la subclase IgG1 humana, de los que, en principio, se puede esperar que resulten ser inductores efectivos de la ADCC. En consecuencia, la presente invención puede ponerse en práctica en combinación con la mayoría de los anticuerpos terapéuticos.

Una realización de la invención se refiere al uso de un agente capaz de reducir o evitar la transducción de señales inhibitoras iniciada mediante SIRP α inhibiendo la interacción entre SIRP α y CD47, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o un trastorno que se beneficiaría de una fagocitosis mejorada por parte de los macrófagos. Algunos ejemplos de enfermedades que se beneficiarían de la fagocitosis mejorada por parte de los macrófagos incluyen cánceres, tales como el linfoma no Hodgkin, el cáncer de mama, la leucemia linfocítica crónica o el cáncer colorrectal.

De hecho, el tratamiento o la profilaxis de cualquier enfermedad o trastorno en el que intervengan células aberrantes o no deseadas de otro modo se puede beneficiar del uso de un agente inhibidor según se desvela en el presente documento. En un aspecto, dicha enfermedad es una infección viral, en particular, una infección causada por un miembro de la familia Poxviridae. Se entenderá que se puede utilizar un agente inhibidor, o una combinación de dos o más agentes inhibidores distintos, en la elaboración de un medicamento en combinación con un compuesto terapéutico adicional. En una realización preferida, dicho compuesto terapéutico adicional puede inducir la activación de las células efectoras inmunes de un hospedador contra una célula aberrante.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para aumentar la ADCC en un sujeto que está recibiendo tratamiento contra el cáncer, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto con anterioridad, simultáneamente, o con posterioridad a la administración de un medicamento contra el cáncer, un agente capaz de reducir o prevenir la transducción de señales inhibitoras iniciada mediante SIRP α en una cantidad suficiente como para aumentar la ADCC. Por ejemplo, dicho medicamento contra el cáncer es un anticuerpo terapéutico que inhibe la interacción entre SIRP α y CD47. El sujeto que se va a someter a tratamiento es, por ejemplo, un paciente que sufre de linfoma no Hodgkin, cáncer de mama, leucemia linfocítica crónica o cáncer colorrectal.

En un aspecto relacionado, se proporciona un método para aumentar la ADCC en un sujeto que está recibiendo tratamiento con anticuerpos terapéuticos, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto con anterioridad, simultáneamente, o con posterioridad a la administración de dicho anticuerpo terapéutico, un agente capaz de reducir o prevenir la transducción de señales inhibitoras iniciada mediante SIRP α en una cantidad suficiente como

para aumentar la ADCC.

La invención también proporciona un método para aumentar la eficacia de un tratamiento con anticuerpos terapéuticos en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto con anterioridad, simultáneamente, o con posterioridad a la administración de dicho anticuerpo terapéutico, un agente capaz de reducir o prevenir la transducción de señales inhibitoras iniciada mediante SIRP α .

También se desvela el uso de un agente capaz de reducir o prevenir la transducción de señales inhibitoras iniciada mediante SIRP α para el tratamiento o la profilaxis de una infección viral. En general, es probable que cualquier método que promueva el sistema inmunitario del hospedador para responder más eficazmente al virus aumente su inmunidad natural y adquirida (p. ej., mediante vacunación) contra el virus. Se desvela el uso de un agente capaz de inhibir la interacción entre SIRP α y CD47 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades causadas por poxvirus. Los poxvirus (miembros de la familia Poxviridae) pueden infectar como familia tanto a animales vertebrados como a invertebrados. El prototipo de la familia poxvirus es el virus vaccinia, que se ha utilizado como vacuna de éxito para erradicar el virus de la viruela humana. El virus vaccinia también se utiliza como herramienta efectiva para la expresión de proteínas extrañas con el fin de obtener una fuerte respuesta inmunitaria del hospedador. El nombre de la familia, Poxviridae, es herencia de la agrupación original de virus asociados a enfermedades que dejaban marcas en la piel. La clasificación viral moderna está basada en la forma y las características moleculares de los virus, y el virus de la viruela humana sigue siendo el miembro más importante de la familia. Aparte de éste, el único poxvirus que se conoce que infecte específicamente a seres humanos es el virus molluscum contagiosum (VMC). Si bien la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el virus oficialmente erradicado en 1977, tras el 11 de septiembre de 2001, los gobiernos estadounidense y británico están cada vez más preocupados por el uso de enfermedades similares a la viruela o la viruela humana en el bioterrorismo.

Se ha determinado que los poxvirus codifican un homólogo de CD47, denominado CD47 viral (vCD47). Al interactuar con SIRP α en células efectoras inmunes, los presentes inventores proponen la hipótesis de que vCD47, junto con CD47 endógeno, puede proporcionar señales negativas que previenen la destrucción y/o fagocitosis de células infectadas por poxvirus. Se desvela una composición que comprende (i) un compuesto terapéutico que puede inducir la activación de las células efectoras inmunes de un hospedador contra una célula infectada por un virus, tal como una célula infectada por el virus de la viruela, y (ii), al menos, un agente capaz de reducir o prevenir la transducción de señales inhibitoras iniciada mediante SIRP α . Entre los compuestos terapéuticos adecuados se incluyen las vacunas virales, preferentemente una vacuna contra poxvirus.

También se desvela el uso de un agente inhibidor para reducir o prevenir la transducción de señales inhibitoras iniciada mediante SIRP α , por ejemplo, inducida por la interacción vCD47-SIRP α , para (i) aumentar la resistencia natural del hospedador frente a infecciones con patógenos del grupo poxvirus, (ii) para mejorar la eficacia de la vacunación contra patógenos del grupo poxvirus) y/o para (iii) mejorar la efectividad de la vacunación con vectores de poxvirus, tales como vaccinia.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Modelo de la función que desempeñan CD47 y SIRP α en la limitación de la destrucción dependiente de anticuerpos de células tumorales por el sistema inmunitario y la potenciación de la destrucción de células tumorales mediante el bloqueo de interacciones CD47-SIRP α . Los receptores Fc de células inmunitarias reconocen los anticuerpos dirigidos contra las células tumorales y esto induce la destrucción de células tumorales. En condiciones normales (panel de la izquierda), esta destrucción inducida por anticuerpos está limitada por la interacción de CD47 en las células tumorales con SIRP α en la célula inmunitaria, que genera una señal intracelular que regula negativamente la respuesta asesina. Mediante el bloqueo de la interacción entre CD47 y SIRP α (panel de la derecha) la destrucción inducida por anticuerpos de células tumorales mejora porque se elimina esta limitación.

Figura 2: El bloqueo de las interacciones CD47-SIRP α con anticuerpos monoclonales antagonistas mejora la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos CC52 de células de carcinoma de colon CC531 de rata por macrófagos NR8383 de rata. Las células tumorales CC531 y los macrófagos NR8383 se incubaron en placas de cultivo con medio en ausencia o presencia del anticuerpo CC52 contra células CC531 y/o anticuerpos monoclonales bloqueantes contra CD47 o SIRP α . Después de 1,5 horas se determinó el porcentaje de ADCC. Para consultar detalles, véase el Ejemplo 1.

Figura 3: Las señales obtenidas de SIRP α limitan la destrucción de células tumorales B16 *in vivo*. Se inyectaron células de melanoma B16 con expresión de CD47 en ratones de control (es decir, ratones silvestres) o en ratones que no tenían la cola citoplásmica de SIRP α que media la señalización intracelular en células inmunitarias (es decir, SIRP α -/-). Los grupos de ratones se trataron en días alternos, durante dos semanas, con una dosis por debajo del nivel óptimo del anticuerpo terapéutico TA99 dirigido contra el antígeno tumoral gp75 presente en las células B16. Una semana después, se sacrificaron los animales y se cuantificó la carga de tumor de pulmón. Las imágenes representativas (panel A) de los pulmones de estos ratones muestran que

prácticamente no hay formación tumoral en los ratones mutantes SIRP α -/- tratados con anticuerpos en comparación con los ratones silvestres tratados con anticuerpos, identificándose una función negativa de la señalización de SIRP α en la eliminación de células tumorales *in vivo*. Cada punto en la gráfica (panel B) representa la evaluación de un solo animal. *, $p < 0,005$, ensayo T de student.

Figura 4: La ADCC de monocitos humanos contra células Jurkat de leucemia T aguda se mejora bloqueando las interacciones CD47-SIRP α . (A) Expresión en superficie de CD3 (utilizando el mAb CLB-T3/4.2a) y CD47 (utilizando el mAb B6H12) y sobre células Jurkat evaluada mediante citometría de flujo. (B) ADCC de monocitos humanos frente a células Jurkat después de la pre-incubación con IgG_{2a} anti-CD3 (20 mg/ml) y/o F(ab')₂ anti-CD47 B6H12 (50 mg/ml) de ratón. La saturación de células Jurkat con F(ab')₂ anti-CD47 se confirmó mediante tinción citométrica de flujo en paralelo (no se muestran datos). Obsérvese que prácticamente no se induce destrucción mediante anti-CD3 en ausencia de bloqueo de CD47-SIRP α , mientras que se provocan niveles importantes de destrucción en presencia de F(ab')₂ anti-CD47. Los datos que se muestran son medias $\pm$ DT (n=3) de un experimento representativo de cada tres.

Figura 5: La ADCC mediada por Rituximab de monocitos humanos frente a células Raji de linfoma de células B se mejora bloqueando las interacciones CD47-SIRP α . (A) Expresión en superficie de CD20 (utilizando Rituximab anti CD20) y CD47 (utilizando mAb B6H12 anti-CD47) y sobre células Raji evaluada mediante citometría de flujo. El histograma rojo representa el control y el histograma azul representa la tinción de Rituximab (histograma superior) o CD47 (histograma inferior) (B) ADCC de monocitos humanos frente a células Raji después de la pre-incubación con Rituximab (20 mg/ml) y/o B6H12 (10 mg/ml) anti-CD47. La ADCC se realizó en una relación efector:diana de 50:1. Obsérvese que la destrucción mediada por Rituximab de células Raji aumentó notablemente mediante el mAb anti-CD47. Los valores que se muestran son medias $\pm$ DT (n=3) de un experimento representativo. * diferencia significativa estadísticamente, $p < 0,05$.

La invención se ejemplifica mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Pruebas *in vitro* de la función de interacciones CD47-SIRP α en la ADCC.

Con el fin de investigar la aportación de la interacción CD47-SIRP α durante la ADCC de células tumorales por macrófagos, se realizó un ensayo en el que se incubaron células de carcinoma de colon CC531 con anticuerpo CC52 y macrófagos efectores NR8383 de rata.

Materiales y métodos:

Se cultivaron rutinariamente células de carcinoma de colon CC531 de rata y macrófagos alveolares de rata NR8383 en un medio RPMI-1640 que contenía un 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL) y antibióticos. Se separaron CC531 de los matraces para el cultivo de tejidos mediante el raspado, se lavaron en PBS, y se marcaron con 5 μ M de Dil (Molecular Probes) durante 15 minutos a TA. Después de lavar $3,75 \times 10^5$ células CC531, preincubadas o no durante 15 minutos con 5 μ g/ml de anticuerpo anti-CD47 de rata OX101, se incubaron en una placa de plástico de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo redondo en 200 μ l de RPMI-1640 tamponado con HEPES que contenía un 0,5% de BSA, con $1,25 \times 10^5$ células NR8383, preincubadas o no durante 15 minutos con 5 μ g/ml de anticuerpo anti-SIRP α de rata ED9 o sus fragmentos Fab', en presencia o ausencia de mAb CC52 (1 μ g/ml) reactivo con CC531. Tras la incubación durante 90 minutos a 37°C, las células se lavaron y tiñeron utilizando el anticuerpo ED3 biotinilado específico de macrófagos (dirigido contra la sialoadhesina de rata) y estreptavidina marcada con FITC. La ADCP (expresada como el % de NR8383 que ha fagocitado células CC531 marcadas con Dil) se determinó en un citómetro de flujo FACScan (Becton and Dickinson).

Resultados:

En ausencia de anticuerpos bloqueantes contra CD47 (OX101) o SIRP α (ED9), solamente se observa una fagocitosis celular dependiente de anticuerpos muy pequeña, mientras que en presencia de dichos anticuerpos, CC531 se fagocita inmediatamente (Fig. 2). Esto demuestra que las interacciones entre CD47-SIRP α en células tumorales y macrófagos efectores, respectivamente, pueden regular de forma negativa la ADCC *in vitro*.

Ejemplo 2: Pruebas *in vivo* de una función de la señalización de SIRP α en la destrucción de células tumorales dependiente de anticuerpos.

Con el fin de demostrar que SIRP α proporciona señales que inhiben la destrucción de células tumorales *in vivo*, comparamos la destrucción de células tumorales dependiente de anticuerpos en ratones silvestres y ratones mutantes de SIRP α (Yamao (2002) J Biol Chem. 277: 39833-9) utilizando un modelo de melanoma de ratón B16F10 *in vivo* (Bevaart L et al. (2006) Cancer Res. 66:1261-4). Los ratones mutantes de SIRP α no tienen la cola citoplásmica completa, incluidos los motivos ITIM que actúan como sitios de acoplamiento para SHP-1 y SHP-2.

Materiales y métodos:

Se inyectaron en ratones adultos jóvenes (de 7 semanas) de tipo silvestre C57B1/6 o en ratones mutantes de SIRP α (Yamao (2002) J Biol Chem. 277: 39833-9) $1,5 \times 10^5$ células de melanoma B16F10 por vía intravenosa (en 100 μ l de solución salina; obtenida en el National Cancer Institute (Frederick, MD), en ausencia o presencia del anticuerpo terapéutico TA99 (10 μ g/por ratón en los días 0, 2, 4, 7, 9, y 11 después de la inyección de células tumorales). Transcurridos 21 días, se sacrificó a los animales y el número de metástasis y carga tumoral en los pulmones se determinó del modo descrito (Bevaart L et al. (2006) Cancer Res. 66:1261-4).

Resultados:

Según se observa en la Figura 3, el nivel de desarrollo tumoral en los ratones mutantes de SIRP α fue notablemente inferior en comparación con los ratones silvestres utilizando concentraciones por debajo del nivel óptimo del anticuerpo monoclonal terapéutico TA99. Estos resultados demuestran que SIRP α es un regulador negativo de la destrucción de células tumorales *in vivo*.

Ejemplo 3:

Para proporcionar más pruebas de una función negativa de las interacciones CD47-SIRP α en la destrucción de células tumorales por células mieloides, se puso en marcha un ensayo de ADCC utilizando células humanas Jurkat de leucemia de células T que expresan CD47, opsonizadas con un anticuerpo anti-CD3 IgG_{2a} murino (Van Lier RA et al. Eur J Immunol. 1987; 17:1599-1604) como diana (Fig. 4A), y monocitos humanos que expresan SIRP α como células efectoras, y se utilizó para ensayar el efecto de los anticuerpos que bloquean las interacciones CD47-SIRP α .

Ensayo de ADCC

Se aislaron monocitos mediante separación magnética de células utilizando cuentas recubiertas con anti-CD14 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec B.V., Utrecht, Países Bajos) de PBMC (siglas en inglés de células mononucleares de sangre periférica) aisladas por centrifugación por densidad utilizando Percoll isotónico (Pharmacia Uppsala, Suecia) de sangre heparinizada obtenida de voluntarios sanos. Las células se cultivaron durante 16 h en RPMI completo suplementado con 5 ng/ml de GM-CSF humano recombinante (Pepro Tech Inc, EE.UU.), se recogieron mediante un tratamiento suave con tripsina, y se lavaron. Se recogieron células Jurkat (5×10^6 células) y se marcaron con 100 μ Ci de ^{51}Cr (Perkin-Elmer, EE.UU.) en 1 ml durante 90 min a 37°C. En los casos indicados, las células se preincubaron con anti-CD47 y/o anti-CD3, y se volvieron a lavar. Se recogieron y se sembraron monocitos en placas de cultivo de tejidos de 9 pocillos de fondo en U en RPMI con un 10% de medio FCS. Las células diana (5×10^3 /pocillo) se cultivaron conjuntamente con las células efectoras en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo en U en un medio completo en una relación de E:D=50:1 durante 4 horas a 37°C, con un 5% de CO₂. Se recogieron y analizaron alícuotas de sobrenadante a efectos de radiactividad en un contador gamma. La citotoxicidad relativa porcentual se determinó como [(cpm experimental - cpm espontánea) / (cpm total - cpm espontánea)] x 100%. Todas las muestras se ensayaron por triplicado.

Resultados:

Como puede observarse en la Fig. 4B, la ADCC mediada por anti-CD3 contra células Jurkat, que expresan altos niveles de CD47 en la superficie (Fig. 4A), mejora potente y sinérgicamente por concentraciones de saturación de fragmentos F(ab)₂ del anticuerpo B6H12 que bloquea la unión de CD47 a SIRP α . En particular, en ausencia del anticuerpo anti-CD3 efector, no se observó ningún efecto del F(ab)₂ anti-CD47, lo cual sugiere que las interacciones CD47-SIRP α actúan de manera selectiva para limitar los efectos mediados por anticuerpos y receptores de Fc sobre la destrucción de células tumorales.

En conjunto, estos datos demuestran que las interacciones CD47-SIRP α , y las señales intracelulares resultantes generadas a través de SIRP α en células mieloides, forman una barrera para la destrucción de células tumorales mediada por anticuerpos. Estos resultados proporcionan un fundamento para emplear antagonistas de la interacción CD47-SIRP α en pacientes de cáncer, con el objetivo de mejorar la eficacia clínica de los anticuerpos terapéuticos contra el cáncer.

Ejemplo 4: El bloqueo de las interacciones CD47-SIRP α mejora el efecto de los anticuerpos terapéuticos contra el cáncer.

Con el fin de demostrar que el bloqueo de las interacciones CD47-SIRP α efectivamente mejora el efecto de los anticuerpos terapéuticos contra el cáncer establecidos, se desarrolló un ensayo ADCC utilizando células humanas Raji de linfoma B de Burkitt como dianas, monocitos humanos como células efectoras, y un anticuerpo terapéutico aprobado por el FDA contra CD20 (Rituximab). Para consultar detalles experimentales, véase la leyenda a la Figura 5. Según se observa en la Figura 5, el anticuerpo bloqueante contra CD47, B6H12, fue capaz de mejorar notablemente la citotoxicidad mediada por Rituximab contra células Raji.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que antagoniza CD47/SIRP α , donde dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-CD47 o anti-SIRP α o un fragmento de los mismos, y un anticuerpo terapéutico adicional que comprende una parte Fc de IgG1 humana o de primate no humano que induce la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), para su uso en el tratamiento de cánceres, donde dicho anticuerpo antagonista mejora la destrucción mediada por anticuerpos de células tumorales inducida por dicho anticuerpo terapéutico adicional.
2. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que antagoniza CD47/SIRP α y un anticuerpo terapéutico adicional de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo antagonista es un antagonista de la interacción CD47/SIRP α .
3. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que antagoniza CD47/SIRP α y un anticuerpo terapéutico adicional de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicho anticuerpo antagonista es un anticuerpo anti-CD47 o un fragmento del mismo.
4. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que antagoniza CD47/SIRP α y un anticuerpo terapéutico adicional de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicho anticuerpo antagonista es un anticuerpo anti-SIRP α o un fragmento del mismo.
5. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que antagoniza CD47/SIRP α y un anticuerpo terapéutico adicional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicho fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ o un scFv.
6. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que antagoniza CD47/SIRP α y un anticuerpo terapéutico adicional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicho anticuerpo terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en rituximab, herceptin, trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab y panitumumab.
7. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que antagoniza CD47/SIRP α y un anticuerpo terapéutico adicional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicho anticuerpo antagonista se administra con anterioridad, simultáneamente, o con posterioridad a la administración de dicho anticuerpo terapéutico adicional.
8. Una composición que comprende (i) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que antagoniza CD47/SIRP α , donde dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-CD47 o anti-SIRP α o un fragmento de los mismos, y (ii) un anticuerpo terapéutico adicional, donde dicho anticuerpo terapéutico adicional se selecciona del grupo formado por rituximab, herceptin, trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab y panitumumab.
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho anticuerpo antagonista es un antagonista de la interacción CD47/SIRP α .
10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, donde dicho anticuerpo antagonista es un anticuerpo anti-CD47 o un fragmento del mismo.
11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en la que dicho anticuerpo antagonista es un anticuerpo anti-SIRP α o un fragmento del mismo.
12. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde dicho fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ o un scFv.

Figura 1

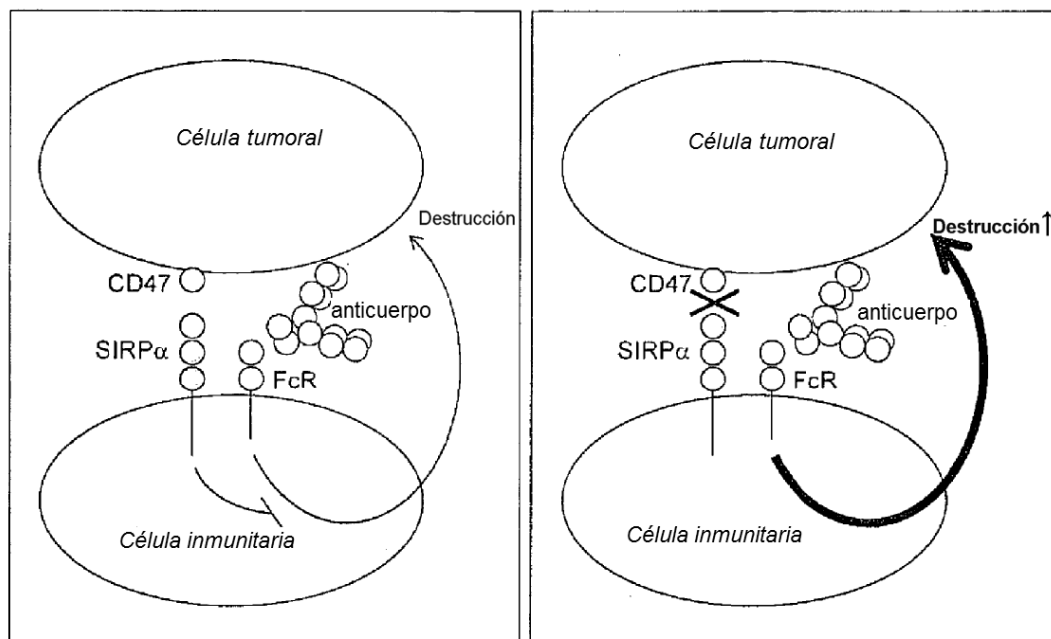


Figura 2

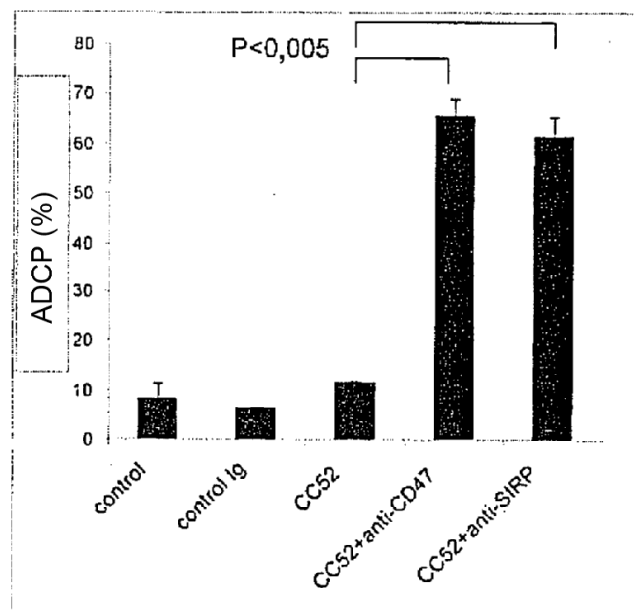


Figura 3

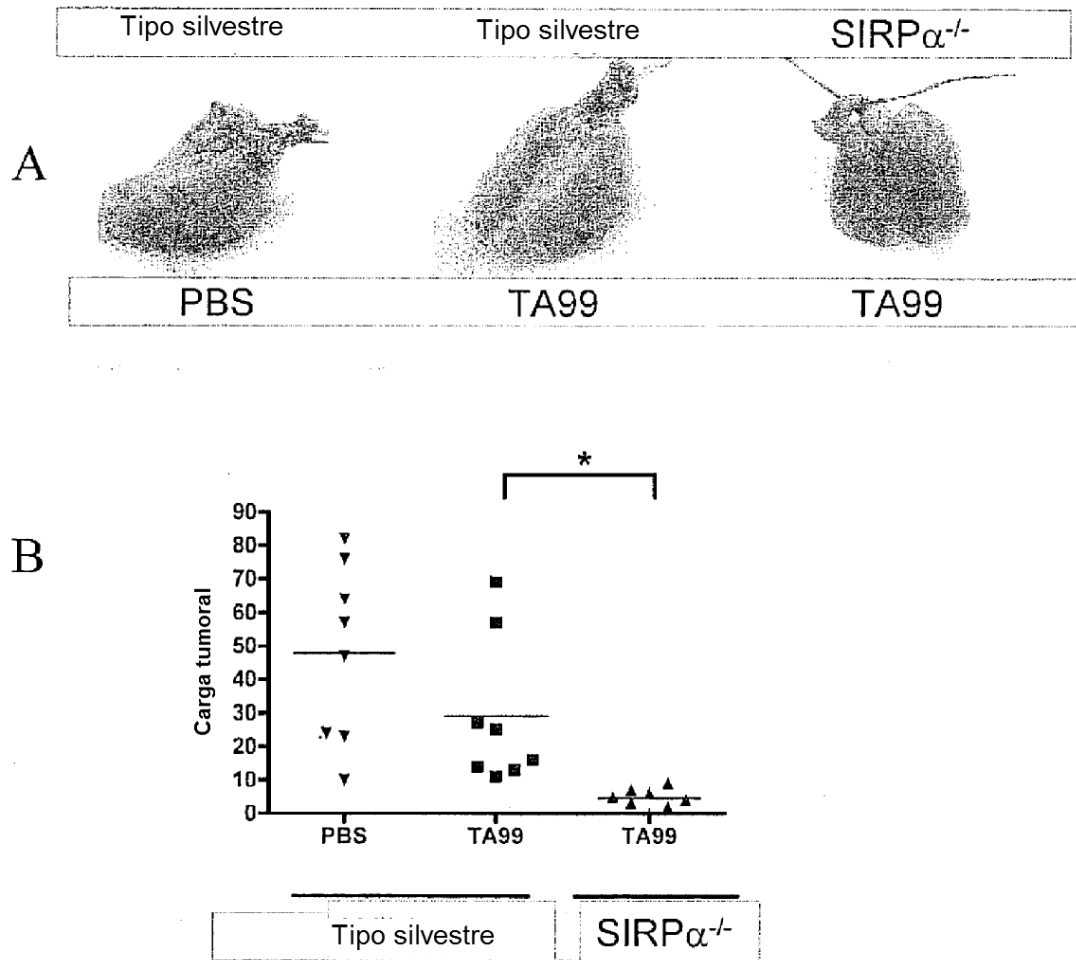


Figura 4

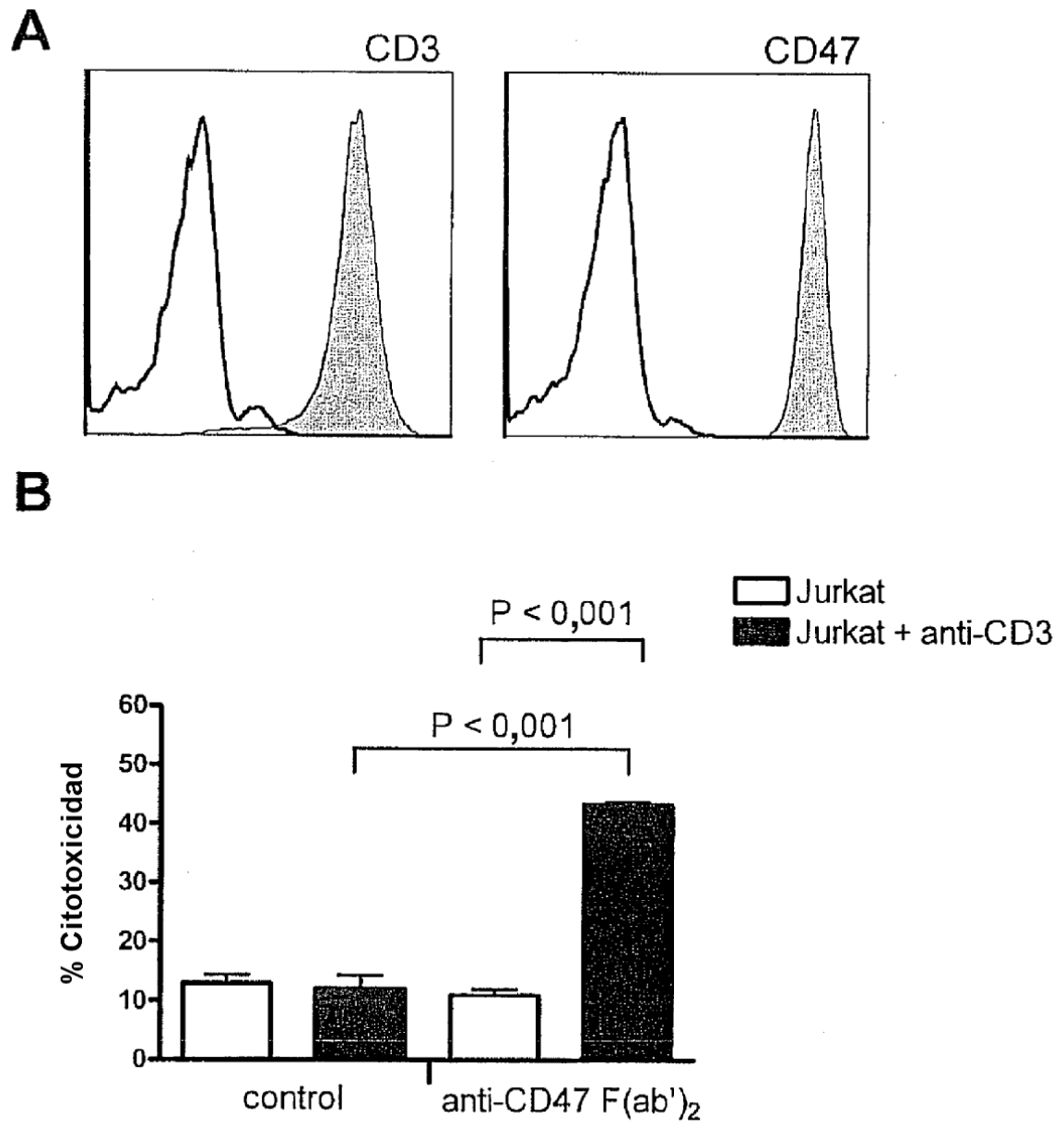


Figura 5

