

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 845 898**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 35/28** (2015.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2015 E 19198976 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **09.04.2025 EP 3656869**

54 Título: **Injerto de células madre con una combinación de un agente dirigido a las células madre y modulación de señalización inmunoreguladora**

30 Prioridad:

**26.08.2014 US 201462041989 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:  
**17.06.2025**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND  
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.00%)  
Office of the General Counsel Building 170, Third  
Floor, Main Quad P.O. Box 20386  
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**SHIZURU, JUDITH, A.;  
WEISKOPF, KIPP ANDREW;  
RING, AARON MICHAEL;  
CHHABRA, AKANKSHA;  
SCHNORR, PETER y  
WEISSMAN, IRVING L.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 845 898 T5**

## DESCRIPCIÓN

Injerto de células madre con una combinación de un agente dirigido a las células madre y modulación de señalización inmunoreguladora.

5 Las células madre proporcionan los medios para que los organismos mantengan y reparen ciertos tejidos, a través de la capacidad de estas células para renovarse y generar células diferenciadas. Clínicamente, el trasplante de médula ósea y de células madre hematopoyéticas se utilizan ampliamente como un medio para proporcionar a los pacientes la capacidad de generar células sanguíneas, generalmente cuando se han agotado en el paciente las células madre endógenas por dosis altas de quimioterapia o radiación.

15 El trasplante de células hematopoyéticas (TCH) generalmente implica la infusión intravenosa de células formadoras de sangre autólogas o alogénicas, cuyo subpoblación activo son las células madre hematopoyéticas [HSC]; estos se obtienen de la médula ósea, la sangre periférica o la sangre del cordón umbilical y se trasplantan para restablecer la función hematopoyética en pacientes cuya médula ósea o sistema inmunitario está dañado o defectuoso. Este procedimiento a menudo se realiza como parte de la terapia para eliminar un proceso infiltrativo de la médula ósea, como la leucemia, o para corregir trastornos de inmunodeficiencia congénita. Además, el TCH se usa para permitir que los pacientes con cáncer reciban dosis de quimioterapia más altas que las que normalmente puede tolerar la médula ósea; La función de la médula ósea se recupera reemplazando la médula con células madre previamente recolectadas. Las poblaciones enriquecidas o purificadas de HSC también se pueden trasplantar, y no están contaminadas con otras células, muchas de las cuales son perjudiciales para el huésped.

25 La lista de enfermedades para las cuales se está utilizando HSCT está aumentando rápidamente. Más de la mitad de los trasplantes autólogos se realizan para mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin y la gran mayoría de los trasplantes alogénicos se realizan para cánceres hematológicos y linfoides.

30 El régimen de preparación o acondicionamiento es un elemento crítico en el trasplante de células hematopoyéticas (TCH). En un trasplante satisfactorio se debe lograr la eliminación de nichos de médula ósea para que las células madre hematopoyéticas (HSC) del donante se injerten. El régimen preparatorio también puede proporcionar inmunosupresión suficiente para evitar el rechazo del injerto trasplantado y erradicar la enfermedad para la que se realiza el trasplante. Los procedimientos actuales para liberar espacio en el nicho dependen de la radiación y/o la quimioterapia, que pueden impartir efectos adversos tóxicos que limitan en gran medida la posible utilidad clínica de TMO. Tradicionalmente, se realiza el acondicionamiento mieloablatoivo.

35 Los regímenes mieloablatoivos se pueden clasificar como regímenes con o sin radiación, terapias que se desarrollaron al aumentar la dosis de radiación o de un medicamento en particular a la dosis máxima tolerada. La irradiación total del cuerpo y ciclofosfamida o busulfán y ciclofosfamida son las terapias mieloablatoivas comúnmente utilizadas. Estos regímenes se usan especialmente en neoplasias malignas agresivas, como las leucemias. Sin embargo, dicho tratamiento conlleva una serie de desventajas en términos de toxicidad para el paciente.

40 Weiskopf y col. (2013) Oncoimmunology 2(9): e25773 describe cómo mejorar las respuestas de los macrófagos a los anticuerpos terapéuticos mediante ingeniería molecular de las variantes de SIRP $\alpha$ . El documento WO 2011/034969 describe una terapia sinérgica anti-CD47 para cánceres hematológicos. El documento US 2009/191202 describe procedimientos para manipular la fagocitosis mediada por CD47. El documento US 45 2010/226927 describe la inmunodepleción selectiva del nicho de células madre endógenas para el injerto. El documento WO 2013/109752 describe variantes de SIRP $\alpha$  de alta afinidad. El documento WO 2013/056352 describe anticuerpos y fragmentos de anticuerpos dirigidos a SIRP $\alpha$  y su uso en el tratamiento de cánceres hematológicos.

50 Los procedimientos mejorados para el injerto de células madre, incluidas las células madre hematopoyéticas, son de gran interés clínico. La presente invención aborda esta necesidad.

## Sumario de la invención

55 La invención proporciona un agente que bloquea la interacción entre CD47 y SIRP $\alpha$  para su uso en un procedimiento de injerto de células madre hematopoyéticas en un paciente humano que padece de un trastorno sanguíneo genético, en donde el procedimiento comprende: poner en contacto a dicho paciente humano concomitantemente con:

60 (i) un agente que se une específicamente a células madre hematopoyéticas endógenas en la médula ósea, en donde el agente es un anticuerpo monoclonal específico para CD117, y

(ii) el agente que bloquea la interacción entre CD47 y SIRP $\alpha$ , en donde el agente se selecciona de un anticuerpo anti-CD47, un polipéptido de SIRP $\alpha$  soluble o una proteína de fusión que comprende un polipéptido SIRP $\alpha$ ;

65

en una dosis eficaz en la ablación de células madre hematopoyéticas endógenas específicas de dicho paciente humano;  
e introducir células madre hematopoyéticas exógenas de un fenotipo normal en dicho paciente humano.

5 La presente divulgación se refiere a procedimientos para el injerto de células madre hematopoyéticas en un receptor con un régimen de acondicionamiento previo al trasplante que comprende un agente que se dirige a las células madre, que incluye, sin limitación, un anticuerpo específico para CD117; y agente(s) que modulan la señalización inmunorreguladora, en el que el agente o agentes comprenden un agente que bloquea la interacción entre CD47 y SIRPα. Los agentes moduladores inmunorreguladores pueden comprender ambos (i) un agente que bloquea la actividad de CD47; y (ii) un agente que agoniza una molécula inmunoestimuladora, por ejemplo, CD137. 10 Un agonista de CD137, cuando está presente, se puede administrar antes del bloqueo de CD47, después del bloqueo de CD47 o concomitantemente con el bloqueo de CD47. En algunas realizaciones, el trasplante se realiza en ausencia de acondicionamiento mieloablativo. En algunas realizaciones, el receptor es inmunocompetente. La administración del régimen de acondicionamiento previo al trasplante se repite según sea necesario para lograr el nivel deseado de ablación. 15

En algunas realizaciones, el bloqueo de CD47 se logra mediante la administración de un polipéptido SIRPα soluble, que puede ser un polipéptido variante SIRPα de alta afinidad. En otras realizaciones, se administran anticuerpos específicos para CD47. Opcionalmente, el procedimiento incluye administrar un agonista de una molécula coestimuladora, por ejemplo, un agonista de CD137, que puede incluir, sin limitación, el ligando nativo (TNFSF9), aptámeros y anticuerpos. 20

Después del trasplante con células madre del donante, el receptor puede ser una quimera o quimera mixta para las células del donante. Los procedimientos descritos en el presente documento permiten un injerto eficaz de células madre en ausencia de procedimientos de ablación no selectivos, por ejemplo, radiación o quimioterapia, que tienen el efecto indeseable de la ablación de las células diferenciadas involucradas en la función del tejido objetivo, así como los efectos secundarios indeseables sobre otros tejidos (por ejemplo, en las células del sistema gastrointestinal, el crecimiento del cabello), así como el aumento del riesgo de secundaria tumores malignos 25

En una realización descrita en la presente, las células madre son una o más de células madre hematopoyéticas autólogas, células madre hematopoyéticas modificadas genéticamente y células madre hematopoyéticas alogénicas. Tales células madre encuentran uso en el tratamiento de una variedad de trastornos sanguíneos, por ejemplo, trastornos genéticos que incluyen anemia aplásica; enfermedad de célula falciforme; talasemias; inmunodeficiencia severa; estados de falla de la médula ósea, deficiencias inmunes, hemoglobinopatías, leucemias, linfomas, inducción de tolerancia inmunológica, trastornos genéticos tratables mediante trasplante de médula ósea y otros trastornos sanguíneos, y similares. 30 35

Los procedimientos de la divulgación también son útiles en la inducción de tolerancia en un paciente, por ejemplo tolerancia al tejido donante, por ejemplo, en trasplantes de órganos; tolerancia a los autoantígenos, por ejemplo, en el contexto del tratamiento de la enfermedad autoinmune; y similares. En una realización, se proporciona un procedimiento para inducir tolerancia en un paciente, que comprende administrar a un paciente una dosis combinada terapéuticamente eficaz de anticuerpos contra un marcador de células madre, y un agente que proporciona el bloqueo de CD47. Opcionalmente, un agonista de una molécula coestimuladora, por ejemplo, CD137, también está incluido. Este régimen de acondicionamiento se puede combinar con anticuerpos y agentes que deplecionan las células linfoides que se dirigen a las células T, células B y células NK, como, entre otras, anti-CD4, anti-CD8, anti-NK y anti-B220 para facilitar el trasplante alogénico de HSC como demostrado por nuestros estudios a continuación. 40 45

Breve descripción de las figuras

50 Figura 1. Expresión de c-Kit durante la hematopoyesis. Resumen de la expresión de c-Kit en células madre y progenitoras hematopoyéticas y células diferenciadas en órganos hematopoyéticos principales de Gene Expression Commons.

55 Figura 2. La depleción de HSC por el anticuerpo anti-c-Kit ACK2 depende de la actividad del receptor Fc. a, Número total de linajes fenotípicos-c-Kit + Sca-1 + CD150 + Flt3-CD34- HSC a largo plazo en ratones de tipo salvaje (WT) en comparación con ratones inmunocomprometidos Rag2 -/- cy -/- después del tratamiento con anticuerpo anti c-Kit ACK2 (n = 3-5). b, Frecuencia total de linaje-c-Kit + Sca-1 + CD150 + Flt3-CD34- HSC a largo plazo en ratones Rag2 -/- cy -/- seis días después del tratamiento con concentraciones crecientes de ACK2 en comparación con 500 µg de ACK2 Fabuloso (n = 3) c, Número de linaje-c-Kit + Sca-1 + CD150 + Flt3-CD34- HSC a largo plazo en ratones FcR -/- seis días después del tratamiento con ACK2 en comparación con los controles no tratados (n = 3, el experimento fue replicado por triplicado). d, Frecuencia de los HSC de linaje-c-Kit + Sca-1 + derivados de donantes presentes 18 semanas después del trasplante en receptores irradiados. Los receptores fueron trasplantados con 1.000.000 de células de médula ósea donante y 1.000.000 de células GFP + de soporte (n = 3, el experimento fue replicado por duplicado). Los datos y las 60 65

barras de error en los paneles b, c y d representan la media  $\pm$  s.e.m. NS, no significativo; \*\*\*\* p <0,0001, \*\*\* p <0,0005, \*\* p <0,005.

5 Figura 3. Ingeniería de un 'microcuerpo' CV1 (CV1mb) como antagonista de CD47 murino. a, Esquema de CV1 y CV1mb. CV1mb es una fusión de CV1 con el dominio dimérico CH3 de IgG1 humana unida por una bisagra que contiene disulfuro. b, Fagocitosis de células de cáncer de colon EGFR + DLD1 por macrófagos humanos después del tratamiento con cetuximab (anti-EGFR) con y sin CV1 y CV1mb, como se indica como un porcentaje de respuesta máxima.

10 Figura 4. El anticuerpo anti-c-Kit combinado con el bloqueo de CD47 con CV1mb produce un agotamiento profundo de las HSC en ratones inmunocompetentes y la eliminación del nicho de la médula ósea. a, Número total de linajes-c-Kit + Sca-1 + CD150 + Flt3-CD34- HSC a largo plazo en ratones de tipo salvaje (WT) después de 7 días de tratamiento con el anticuerpo anti-c-Kit ACK2, antagonista de CD47 CV1mb y combinación de ACK2 y CV1mb en comparación con los controles no tratados (n = 3, el experimento se repitió 4 veces). b, frecuencia de HSC derivadas de donantes en la médula ósea presentes 24 semanas después del trasplante en receptores irradiados. Los receptores fueron trasplantados con 1.000.000 de células de médula ósea donante y 1.000.000 de células de médula ósea GFP + de soporte (n = 5). c, El número total de progenitores mieloides posteriores se reduce después de 7 días de tratamiento con ACK2 y CV1mb en comparación con ACK2 solo. CMP, progenitor mieloides común (Lin-Sca-1 + c-Kit + FcRgloCD34 +); GMP, progenitor de granulocitos y macrófagos (Lin-Sca-1-c-Kit + FcRghiCD34 +); MEP, progenitor eritroide de megacariocitos (Lin-Sca-1-c-Kit + FcRgloCD34-). d, recuentos sanguíneos completos de sangre periférica de ratones WT 7 días después del tratamiento con el anticuerpo anti-c-Kit ACK2, el antagonista CD47 CV1mb y la combinación de ACK2 y CV1mb en comparación con los controles no tratados (n = 3, el experimento se replicó por triplicado). e, tinción con hematoxilina y eosina de la sección de la médula ósea que representa la pérdida de la celularidad de la médula ósea a los 7 días en ratones tratados con ACK2 y CV1mb en comparación con los ratones tratados con ACK2 solo. Los datos y las barras de error en los paneles b, c y d representan la media  $\pm$  s.e.m. NS, no significativo; \*\*\*\* p <0,0001, \*\*\* p <0,005, \*\* p <0,01, \* p <0,05.

30 Figura 5 El preacondicionamiento con bloqueo anti-c-Kit y CD47 permite el injerto a largo plazo de HSC en ratones inmunocompetentes. a, Esquema del protocolo para el acondicionamiento de los receptores con el anticuerpo anti-c-Kit ACK2 y el antagonista de CD47 CV1mb. Los ratones F1 que expresan ambos alelos CD45.1 y CD45.2 fueron tratados con 500  $\mu$ g de ACK2 una vez y 500  $\mu$ g de CV1mb diariamente durante 5 días. En el sexto día posterior al tratamiento, se trasplantaron diariamente 1.000.000 de células de linaje donante CD45.2 + durante 3 días. Se administraron transfusiones de sangre a ratones severamente anémicos (n = 3-5, el experimento se replicó por triplicado). b, Frecuencia de los HSC de linaje-c-Kit + Sca-1 + CD150 + de donantes donados en la médula ósea 24 semanas después del trasplante en receptores tratados con ACK2 y CV1 mb en comparación con ratones tratados con ACK2 solo (n = 3-5, el experimento fue replicado por triplicado). c, quimerismo del donante de granulocitos Gr-1 + Mac-1 +. d, quimerismo derivado del donante de células B CD19 +. e, quimerismo derivado de donantes de células asesinas naturales NK1.1 +. f, quimerismo derivado del donante de células T CD3 +. Todos los análisis se realizaron para sangre periférica 20 semanas después del trasplante en receptores tratados con ACK2 y CV1mb en comparación con los ratones tratados con ACK2 solo (n = 3-5, el experimento se replicó por triplicado). Los datos y las barras de error en los paneles b - f representan la media  $\pm$  s.e.m. \*\*\*\* p <0,0001, \*\*\* p <0,005

45 Figura 6. El preacondicionamiento con anti-c-Kit y CV1mb permite el injerto hematopoyético multilínea a largo plazo en ratones inmunocompetentes 20 semanas después del trasplante. Quimerismo del donante de granulocitos Gr-1 + Mac-1 + en a, médula ósea y e, bazo. b, quimerismo derivado del donante de células B CD19 + en la médula ósea. Quimerismo derivado de donantes de células asesinas naturales NK1.1 + en c, médula ósea y g, bazo. d, quimerismo derivado del donante de células T CD3 + en la médula ósea. f, células B CD19 + B220 + derivadas de donante y h, células T CD3 + TCR $\beta$  + en bazo. I, quimerismo de células T CD4 + Thy1.1 + en el timo. Los datos y las barras de error en los paneles representan la media  $\pm$  s.e.m. \*\*\*\* p <0,0001, \*\*\* p <0,005.

55 Figura 7. El tratamiento con el anticuerpo anti-c-Kit ACK2 combinado con reactivos de bloqueo CD47 agota las HSC funcionales a, Esquema de los reactivos dirigidos a CD47. b, Frecuencia de granulocitos Mac1 + Gr-1 + derivados de donantes en la sangre periférica 8 semanas después del trasplante en receptores irradiados. Los receptores fueron trasplantados con 1.000.000 de células de médula ósea donante tratadas y 1.000.000 de células de médula ósea de soporte. b representa la media  $\pm$  s.e.m. \* p <0,05, n = 3-6).

60 Figura 8. El anticuerpo ACK2 anti-c-Kit combinado con reactivos de bloqueo CD47 permite el quimerismo de granulocitos en receptores inmunocompetentes. Frecuencia de los granulocitos derivados de donantes a, Mac-1 + Gr-1 + y b, células B CD19 + en la sangre periférica 8 semanas después del trasplante en receptores tratados con ACK2 y los reactivos dirigidos a CD47 indicados en comparación con ratones no tratados (media  $\pm$  sem \* p <0,05, n = 3-5).

Figura 9: el anticuerpo anti-c-Kit ACK2 combinado con el anti-CD47 CV1mb, en combinación con los anticuerpos que deplecionan las células T, permite el injerto en un modelo de trasplante de HSC no coincidente con MHC menor. En combinación con un enfoque de todos los anticuerpos (anti-CD4 y anti-CD8) para la depleción de las células inmunes, nuestros datos demuestran que este régimen puede aplicarse en situaciones en las que existe un desajuste genético entre el donante y el receptor. a, los HSC LSK se clasificaron de donantes B10.D2 y se trasplantaron según nuestro régimen de acondicionamiento en ratones Balb/C tratados con anti-c-Kit y anti-CD47. El quimerismo de granulocitos se determinó mediante análisis FACS de células Mac-1 + Gr-1 +. b, los HSC LSK se clasificaron de donantes B10.D2 y se trasplantaron según nuestro régimen de acondicionamiento en ratones Balb/C tratados con anti-c-Kit y anti-CD47. El quimerismo de células B se determinó mediante análisis FACS de células CD19 +. c, los HSC LSK se clasificaron de donantes B10.D2 y se trasplantaron según nuestro régimen de acondicionamiento en ratones Balb/C tratados con anti-c-Kit y anti-CD47. El quimerismo de células B se determinó mediante análisis FACS de células CD3 +. Se observó quimerismo estable de linaje múltiple (mieloide y linfoide).

Figura 10. Quimerismo de granulocitos de donantes BA (CD45.2) tratado en ratones BA (CD45.1XCD45.2) BA irradiados letalmente (CD45.2) fueron tratados con anti-c-Kit ACK2 y anti-CD47 (MIAP410) así como anti-CD137. El día seis del régimen de tratamiento, estos ratones fueron sacrificados y las células de médula ósea entera se aislaron de sus fémures.  $1 \times 10^6$  células de médula ósea entera de ratones tratados se cotransplantaron con  $1 \times 10^6$  células de médula ósea completa aisladas de ratones HZ no tratados (CD45.1) en ratones hospedadores F1 irradiados letalmente (CD45.1XCD45.2). El quimerismo de granulocitos del donante se evaluó a las cuatro semanas después del trasplante. Tanto el tratamiento anti-CD47 + anti-CD117 como la triple terapia (anti-CD137 + anti-CD47 + anti-CD117) muestran un quimerismo de granulocitos de donantes esencialmente mínimo/nulo BA (CD45.2) que implica un agotamiento profundo de las células madre hematopoyéticas en el animales BA tratados inicialmente.

Figura 11. a, Quimerismo de granulocitos BA (CD45.2) en animales tratados con F1 (CD45.2 X CD45.1) a las cuatro semanas después del trasplante. Los ratones F1 (CD45.2 X CD45.1) recibieron los regímenes de anticuerpos indicados y luego recibieron tres trasplantes negativos de linaje. El quimerismo de granulocitos del donante se midió cuatro semanas después del trasplante mediante clasificación celular activada por fluorescencia. Los ratones tratados con triple terapia (anti-CD137 + anti-CD47 (MIAP410) + anti-CD117) tuvieron un aumento de más de cuatro veces en el quimerismo de granulocitos de donantes que los ratones tratados con anti-CD47 + anti-CD117 solo (valor  $p < 0,0001$ ). Anti-CD137 aumenta enormemente la eficacia de anti-CD47 en el contexto del trasplante. b, quimerismo de células B BA (CD45.2) en animales tratados con F1 (CD45.2 X CD45.1) a las cuatro semanas después del trasplante. Los ratones F1 (CD45.2 X CD45.1) recibieron los regímenes de anticuerpos indicados y luego recibieron tres trasplantes negativos de linaje. El quimerismo de la célula B del donante se midió cuatro semanas después del trasplante mediante clasificación celular activada por fluorescencia. Los ratones tratados con terapia triple (anti-CD137 + anti-CD47 + anti-CD117) tuvieron un aumento de más de ocho veces en el quimerismo de las células B del donante que los ratones tratados con anti-CD47 + anti-CD117 solo (valor  $p = 0,0028$ ). Anti-CD137 aumenta enormemente la eficacia del anticuerpo anti-CD47 en el contexto del trasplante.

Figura 12. Trasplante alogénico de HSC en un modelo menor de trasplante de MHC no coincidente usando anticuerpos anti-c-Kit, anti-CD47 y anti-CD137 en conjunción con anticuerpos de agotamiento de células T. Nuestros datos demuestran que este régimen de combinación triple puede aplicarse más allá del trasplante de HSC autólogo al trasplante de HSC autólogas y alogénicas modificadas por genes. Los HSC LSK se clasificaron de donantes B10.D2 y se trasplantaron según nuestro régimen de acondicionamiento en ratones Balb/C tratados con anti-c-Kit, anti-CD47 y anti-CD137. a, el quimerismo de granulocitos se determinó mediante análisis FACS de células Mac-1 + Gr-1 +. b, el quimerismo de células B se determinó mediante análisis FACS de células CD19 +. Se observó quimerismo de linaje múltiple (mieloide y linfoide).

Figura 13. Trasplante alogénico de HSC en un modelo de trasplante haploide de HSC utilizando anticuerpos anti-c-Kit, anti-CD47 y anti-CD137 en conjunción con anticuerpos de células T y NK (anti-CD4: GK1.5, anti-CD8 : yts169.4, anti-NK: asialoGM1). Nuestros datos demuestran que este régimen de combinación triple puede aplicarse más allá del trasplante autólogo de HSC al trasplante alogénico de HSC clasificadas. Los HSC LSK se clasificaron de donantes B6XSJL F1 y se trasplantaron según nuestro régimen de acondicionamiento en ratones B6XBalb/C F1 tratados con anti-c-Kit, anti-CD47 y anti-CD137. a, el quimerismo de granulocitos se determinó mediante análisis FACS de células Mac-1 + Gr-1 +. b, el quimerismo de células B se determinó mediante análisis FACS de células CD19 +. Se observó quimerismo de linaje múltiple (mieloide y linfoide).

Figura 14. Trasplante alogénico de HSC en un modelo de trasplante de HSC con desajuste MHC principal usando anticuerpos anti-c-Kit, anti-CD47 y anti-CD137 en conjunción con anticuerpos de agotamiento de células T y células NK (anti-CD4: GK1.5, anti -CD8: yts169.4, anti-NK: asialoGM1). Nuestros datos demuestran que este régimen de combinación triple puede aplicarse más allá del trasplante autólogo de HSC

al trasplante alogénico de HSC clasificadas. Los HSC LSK se clasificaron de donantes Akr/J y se trasplantaron según nuestro régimen de acondicionamiento en ratones tratados con anti-c-Kit, anti-CD47 y anti-CD137 HZ (C57/BL6 CD45.1 Thy1.1). a, el quimerismo de granulocitos se determinó mediante análisis FACS de células Mac-1 + Gr-1 +. b, el quimerismo de células B se determinó mediante análisis FACS de células CD19 +. Se observó quimerismo de linaje múltiple (mieloide y linfoide).

Figura 15: La variante SIRPα de alta afinidad CV1 mejora la depleción de HSC mediado por anti-CD117.

Figura 16: El dímero CV1 variante de SIRPα de alta afinidad mejora la depleción de HSC mediado por anti-CD117 y la pérdida de células hematopoyéticas.

Figura 17: Se logran altos niveles de quimerismo en ratones tratados con anticuerpo anti-CD117 y antagonista de CD47.

#### Descripción detallada de las realizaciones

Se proporcionan procedimientos para el injerto de células madre en un sujeto, donde las células madre endógenas se extirpan selectivamente mediante una terapia combinada de un agente, por ejemplo, anticuerpos, que se unen selectivamente a un marcador de células madre, y uno o más agentes que modulan las vías inmunorreguladoras en el sujeto. Generalmente, al menos un agente que modifica la señalización inmunorreguladora bloquea la señalización de CD47. Opcionalmente, un agonista de una molécula inmunoestimuladora, por ejemplo, CD137, puede incluirse en la combinación de agentes. Después de la ablación, y después de un período de tiempo suficiente para eliminar sustancialmente los agentes ablativos de células madre de la circulación del paciente, se introducen células madre exógenas en el paciente, donde las células madre exógenas ocupan el mismo nicho que las células madre endógenas ablacionadas. Las células madre exógenas pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas en relación con el paciente.

El período de tiempo requerido para la eliminación del agente ablativo puede determinarse empíricamente o puede basarse en la experiencia previa de la farmacocinética del agente. Cuando el agente es un anticuerpo, la determinación puede controlarse convenientemente al contener células madre con suero receptor y determinar la presencia de anticuerpos que se unen a las células madre. Alternativamente, el suero del paciente puede monitorizarse para detectar la presencia de inhibición selectiva del crecimiento de células madre. El tiempo para el aclaramiento suele ser el tiempo suficiente para que el nivel de agente ablativo disminuya al menos aproximadamente 10 veces desde los niveles máximos, generalmente al menos aproximadamente 100 veces, 1000 veces, 10,000 veces o más. Es preferible introducir las células madre del donante dentro de la "ventana" de nicho vacía después de la ablación, generalmente dentro de aproximadamente 3 días, aproximadamente 2 días, aproximadamente 1 día, o en el momento del despeje.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un nuevo procedimiento clínicamente aplicable de trasplante de células madre que facilite el injerto y reconstituya la inmunocompetencia del receptor sin requerir radioterapia o quimioterapia, o el desarrollo de EICH o rechazo de injerto. Los aspectos de la presente invención se basan en el descubrimiento de que un agotamiento del nicho de células madre endógenas que facilita el injerto eficiente de células madre hematopoyéticas (HSC) se logra combinando el uso de un agente que se dirige a las células madre endógenas, por ejemplo, anticuerpo anti-CD117, con un agente que mejora la destrucción de células madre endógenas al bloquear la interacción de CD47 y SIRPα. Opcionalmente, un agonista de CD137 también se incluye en el procedimiento. En particular, la presente invención combina esta ablación selectiva mejorada de células madre endógenas, en combinación con la administración al receptor de células madre exógenas, dando como resultado un injerto y tolerancia eficientes a largo plazo.

Para facilitar la comprensión de la invención, a continuación se definen varios términos.

Antes de que se describan los presentes agentes y procedimientos activos, debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología, productos, aparatos y factores particulares descritos, ya que tales procedimientos, aparatos y formulaciones pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

Debe notarse que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "a", "y" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un candidato a fármaco" se refiere a uno o mezclas de tales candidatos, y la referencia a "el procedimiento" incluye referencia a pasos y procedimientos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

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

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

20 En general, los procedimientos convencionales de síntesis de proteínas, cultivo celular recombinante y aislamiento de proteínas, y técnicas de ADN recombinante dentro de la habilidad de la técnica se emplean en la presente invención. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura, ver, por ejemplo, Maniatis, Fritsch & Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982).; Sambrook, Russell y Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2001); Harlow, Lane y Harlow, *Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. 1*, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); y Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988).

25 Definiciones

30 *Agente anti-CD47*. CD47 es una glicoproteína transmembrana ampliamente expresada con un solo dominio similar a Ig y cinco regiones que abarcan la membrana, que funciona como un ligando celular para SIRP $\alpha$  con unión mediada a través del dominio similar a V NH<sub>2</sub>-terminal de SIRP $\alpha$ . SIRP $\alpha$  se expresa principalmente en las células mieloides, incluidos los macrófagos, los granulocitos, las células dendríticas mieloides (DC), los mastocitos y sus precursores, incluidas las células madre hematopoyéticas. Los determinantes estructurales en SIRP $\alpha$  que median la unión a CD47 son discutidos por Lee y col. (2007) *J. Immunol.* 179: 7741-7750; Hatherley y col. (2008) *Mol Cell.* 31 (2): 266-77; Hatherley y col. (2007) *J.B.C.* 282: 14567-75; y el papel de la dimerización cis SIRP $\alpha$  en la unión a CD47 es discutido por Lee y col. (2010) *J.B.C.* 285: 37953-63. De acuerdo con el papel de CD47 para inhibir la fagocitosis de las células normales, existe evidencia de que está regulada de forma transitoria en las células madre hematopoyéticas (HSC) y los progenitores justo antes y durante su fase migratoria, y que el nivel de CD47 en estas células determina la probabilidad de que estén engullidos in vivo.

40 Como se usa en el presente documento, el término "agente anti-CD47" o "agente que proporciona el bloqueo de CD47" se refiere a cualquier agente que reduce la unión de CD47 (por ejemplo, en una célula diana) a SIRP $\alpha$  (por ejemplo, en una célula fagocítica). Los ejemplos no limitantes de reactivos anti-CD47 adecuados incluyen reactivos SIRP $\alpha$ , que incluyen, sin limitación, polipéptidos SIRP $\alpha$  de alta afinidad, anticuerpos anti-SIRP $\alpha$ , polipéptidos CD47 solubles y anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-CD47. En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 adecuado (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47, un reactivo SIRP $\alpha$ , etc.) se une específicamente a CD47 para reducir la unión de CD47 a SIRP $\alpha$ .

50 La eficacia de un agente anti-CD47 adecuado puede evaluarse analizando el agente. En un ensayo ejemplar, las células diana se incuban en presencia o ausencia del agente candidato. Un agente para usar en los procedimientos de la invención regulará la fagocitosis al menos en un 5% (por ejemplo, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 100%, al menos 120%, al menos 140%, al menos 160%, al menos 180%, al menos 200%, al menos 500%, al menos 1000%) en comparación con la fagocitosis en ausencia del agente. Del mismo modo, un *in vitro* El análisis de los niveles de fosforilación de tirosina de SIRP $\alpha$  mostrará una disminución de la fosforilación de al menos 5% (por ejemplo, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50 %, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o 100%) en comparación con la fosforilación observada en ausencia del agente candidato.

60 En algunas realizaciones, el agente anti-CD47 no activa CD47 tras la unión. Cuando se activa CD47, puede ocurrir un proceso similar a la apoptosis (es decir, muerte celular programada) (Manna y Frazier, *Cancer Research*, 64, 1026-1036, febrero. 1 2004) Por lo tanto, en algunas realizaciones, el agente anti-CD47 no induce directamente la muerte celular de una célula que expresa CD47.

65 *Reactivo SIRP $\alpha$* . Un reactivo SIRP $\alpha$  comprende la porción de SIRP $\alpha$  que es suficiente para unir CD47 a una afinidad reconocible, que normalmente se encuentra entre la secuencia señal y el dominio transmembrana, o un

fragmento de la misma que retiene la actividad de unión. Un reactivo SIRPα adecuado reduce (por ejemplo, bloquea, previene, etc.) la interacción entre las proteínas nativas SIRPα y CD47. El reactivo SIRPα generalmente comprenderá al menos el dominio d1 de SIRPα.

5 En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 sujeto es un "reactivo SIRPα de alta afinidad", que incluye polipéptidos derivados de SIRPα y análogos de los mismos (por ejemplo, CV1-hlgG4 y monómero CV1). Los reactivos SIRPα de alta afinidad se describen en la solicitud internacional WO 2013/109752. Los reactivos SIRPα de alta afinidad son variantes de la proteína SIRPα nativa. Los cambios de aminoácidos que proporcionan una mayor afinidad se localizan en el dominio d1 y, por lo tanto, los reactivos SIRPα de alta afinidad comprenden un dominio d1  
10 de SIRPα humano, con al menos un cambio de aminoácido relativo a la secuencia de tipo salvaje dentro del dominio d1. Tal reactivo SIRPα de alta afinidad opcionalmente comprende secuencias de aminoácidos adicionales, por ejemplo secuencias de anticuerpos Fc; porciones de la proteína SIRPα humana de tipo salvaje distintas del dominio d1, que incluyen, sin limitación, los residuos 150 a 374 de la proteína nativa o fragmentos de la misma, generalmente fragmentos contiguos con el dominio d1; y similares. Los reactivos SIRPα de alta afinidad pueden ser monoméricos o multiméricos, es decir, dímero, trímero, tetrámero, etc. En algunas realizaciones, un reactivo SIRPα de alta afinidad es soluble, donde el polipéptido carece del dominio transmembrana SIRPα y comprende al menos un cambio de aminoácido con respecto a la secuencia SIRPα de tipo salvaje, y en donde el cambio de aminoácido aumenta la afinidad del polipéptido SIRPα se une a CD47, por ejemplo, disminuyendo la velocidad de apagado en al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces o más.

20 Opcionalmente, el reactivo SIRPα es una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada en marco con un segundo polipéptido. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es capaz de aumentar el tamaño de la proteína de fusión, por ejemplo, para que la proteína de fusión no se elimine de la circulación rápidamente. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina. La región Fc ayuda a la fagocitosis al proporcionar una señal de "comerme", que mejora el bloqueo de la señal de "no comerme" proporcionada por el reactivo SIRPα de alta afinidad. En otras realizaciones, el segundo polipéptido es cualquier polipéptido adecuado que sea sustancialmente similar a Fc, por ejemplo, que proporcione un mayor tamaño, dominios de multimerización y/o unión o interacción adicional con moléculas de Ig.

30 *Anticuerpos anti-CD47.* En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 sujeto es un anticuerpo que se une específicamente a CD47 (es decir, un anticuerpo anti-CD47) y reduce la interacción entre CD47 en una célula (por ejemplo, una célula infectada) y SIRPα en otra célula (por ejemplo, una célula fagocítica). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD47 adecuado no activa CD47 tras la unión. Algunos anticuerpos anti-CD47 no reducen la unión de CD47 a SIRPα (y, por lo tanto, no se consideran como un "agente anti-CD47" en el presente documento) y dicho anticuerpo puede denominarse un "anticuerpo anti-CD47 no bloqueante". Un anticuerpo anti-CD47 adecuado que es un "agente anti-CD47" puede denominarse un "anticuerpo bloqueador de CD47". Los ejemplos no limitantes de anticuerpos adecuados incluyen los clones B6H12, 5F9, 8B6 y C3 (por ejemplo, como se describe en la publicación de patente internacional WO 2011/143624) Los anticuerpos anti-CD47 adecuados incluyen versiones completamente humanas, humanizadas o quiméricas de tales anticuerpos. Los anticuerpos humanizados (por ejemplo, hu5F9-G4) son especialmente útiles para aplicaciones in vivo en humanos debido a su baja antigenicidad. De manera similar, los anticuerpos caninizados, felinizados, etc. son especialmente útiles para aplicaciones en perros, gatos y otras especies, respectivamente. Los anticuerpos de interés incluyen anticuerpos humanizados, o anticuerpos caninizados, felinizados, equinizados, bovinizados, porcinizados, etc., y variantes de los mismos.

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

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

65 En ciertas realizaciones, el polipéptido CD47 soluble comprende el dominio extracelular de CD47, incluido el péptido señal, de modo que la porción extracelular de CD47 tiene típicamente 142 aminoácidos de longitud. Los polipéptidos CD47 solubles descritos en el presente documento también incluyen variantes de dominio extracelular

CD47 que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos 65% -75%, 75% -80%, 80-85%, 85% -90% o 95% -99% ( o cualquier porcentaje de identidad no enumerado específicamente entre 65% a 100%), cuyas variantes retienen la capacidad de unirse a SIRPα sin estimular la señalización de SIRPα.

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

10 En otras realizaciones, el polipéptido CD47 soluble comprende un dominio extracelular de CD47 que carece del péptido señal. Como se describe en el presente documento, los péptidos señal no están expuestos en la superficie celular de una proteína secretada o transmembrana porque el péptido señal se escinde durante la translocación de la proteína o el péptido señal permanece anclado en la membrana celular externa (a dicho péptido también se le llama señal de anclaje). Se cree que la secuencia del péptido señal de CD47 se escinde del polipéptido CD47 precursor in vivo.

15 En otras realizaciones, un polipéptido CD47 soluble comprende una variante de dominio extracelular CD47. Tal polipéptido CD47 soluble retiene la capacidad de unirse a SIRPα sin estimular la señalización de SIRPα. 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 identidad entre cualquiera de los rangos descritos) a la secuencia CD47 nativa.

20 *Marcadores de células madre.* Los marcadores ejemplares para la ablación mediada por anticuerpos de células madre hematopoyéticas humanas incluyen CD34; CD90 (tu-1); CD59; CD110 (c-mpl); kit c (CD-117); etc. Los marcadores útiles para la ablación de células madre mesodérmicas incluyen FcyRII, FcyRIII, Thy-1, CD44, VLA-4α, LFA-1β, HSA, ICAM-1, CD45, Aa4.1, Sca-1, etc. Las células madre de la cresta neural pueden seleccionarse positivamente con anticuerpos específicos para el receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (LNGFR). Las células madre/progenitoras neurales se han descrito en la técnica, y su uso en una variedad de protocolos terapéuticos se ha discutido ampliamente. por ejemplo, *Entre otros*, Uchida y col. (2000) Proc Natl Acad Sci Estados Unidos. 97 (26): 14720-5. Patentes de Estados Unidos n.º 6.638.501, Bjornson et al.; documento U.S. 6.541.255, Snyder et al.; documento U.S. 6,498,018, Carpenter; solicitud de patente de Estados Unidos 20020012903 Goldman et al.; Palmer y col. (2001) Nature 411 (6833): 42-3; Palmer y col. (1997) Mol Cell Neurosci. 8 (6): 389-404; Svendsen y col. (1997) Exp. Neurol 148 (1): 135-46 y Shihabuddin (1999) Mol Med Today. 5 (11): 474-80. Human mesenchymal stem cells may be ablated using the markers such as SH2 (CD105), SH3 and SH4 and Stro-1.

25 En una realización de la invención, el marcador para la ablación es c-kit (CD117). CD117 es un receptor de tirosina quinasa tipo III, que se une al factor de células madre (una sustancia que causa el crecimiento de ciertos tipos de células), también conocido como "factor de acero" o "ligando c-kit". Cuando este receptor se une al factor de células madre (SCF), forma un dímero que activa su actividad intrínseca de tirosina quinasa, que a su vez fosforila y activa las moléculas de transducción de señales que propagan la señal en la célula. Véanse, por ejemplo, las entradas de reseq humano Genbank NM\_000222; NP\_000213. CD117 es un importante marcador de la superficie celular que se usa para identificar ciertos tipos de progenitores hematopoyéticos (de sangre) en la médula ósea. Las células madre hematopoyéticas (HSC), los progenitores multipotentes (MPP) y los progenitores mieloides comunes (CMP) expresan altos niveles de CD117. Se conocen varios anticuerpos que se unen específicamente a CD117 humano en la técnica y están disponibles comercialmente, incluidos, entre otros, 2B8, ACK2, YB5-B8, 57A5, 104D2, etc.

30 *Moléculas de señalización inmunorreguladoras.* Además del eje CD47/SIRPα, las moléculas de señalización inmunorreguladoras pueden incluir polipéptidos coestimuladores expresados en células inmunes. La activación, es decir, el agonismo, de la molécula coestimuladora mejora la función de la célula efectora. Muchas de estas moléculas coestimuladoras son miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), por ejemplo, OX40, GITR, CD30, ICOS, etc. Las moléculas relacionadas con TNFR no tienen ninguna actividad enzimática conocida y dependen del reclutamiento de proteínas citoplasmáticas para la activación de las vías de señalización aguas abajo.

35 Una molécula coestimuladora de interés es CD137, que también puede denominarse Ly63, ILA o 4-1BB, y que es miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Los miembros de esta familia de receptores y sus ligandos estructuralmente relacionados son reguladores importantes de una amplia variedad de procesos fisiológicos y juegan un papel importante en la regulación de las respuestas inmunes. CD137 se expresa mediante células NK activadas, linfocitos T y B y monocitos/macrófagos. El gen codifica una proteína de 255 aminoácidos con 3 motivos ricos en cisteína en el dominio extracelular (característico de esta familia de receptores), una región transmembrana y una porción citoplasmática corta N-terminal que contiene sitios potenciales de

fosforilación. La expresión en células primarias es estrictamente dependiente de la activación. El ligando para el receptor es TNFSF9. Se informa que el CD137 humano se une solo a su ligando. Los agonistas incluyen el ligando nativo (TNFSF9), los aptámeros (ver McNamara y col. (2008) J. Clin. Invertir. 118: 376-386) y anticuerpos.

5 Los agonistas incluyen los ligandos nativos, como se describió anteriormente, aptámeros, anticuerpos específicos para una molécula coestimuladora inducible que activa el receptor, y derivados, variantes y fragmentos de anticuerpos biológicamente activos que se unen selectivamente a una molécula coestimuladora. Un polipéptido "variante" significa un polipéptido biológicamente activo como se define a continuación que tiene una identidad de secuencia inferior al 100% con un polipéptido de secuencia nativa. Dichas variantes incluyen polipéptidos en los que se añaden uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N o C, o dentro de la secuencia nativa; se eliminan de aproximadamente uno a cuarenta residuos de aminoácidos, y opcionalmente se sustituyen por uno o más residuos de aminoácidos; y derivados de los polipéptidos anteriores, en los que un residuo de aminoácido se ha modificado covalentemente para que el producto resultante tenga un aminoácido que no se produce naturalmente. Normalmente, una variante biológicamente activa tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de secuencia nativa, preferiblemente al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente 99%. Los polipéptidos variantes pueden estar glicosilados de forma natural o no natural, es decir, el polipéptido tiene un patrón de glicosilación que difiere del patrón de glicosilación encontrado en la proteína natural correspondiente.

20 Fragmentos del ligando o anticuerpos específicos para una molécula coestimuladora, particularmente fragmentos biológicamente activos y/o fragmentos correspondientes a dominios funcionales, son de interés. Los fragmentos de interés típicamente tendrán al menos aproximadamente 10 aa a al menos aproximadamente 15 aa de longitud, generalmente al menos aproximadamente 50 aa de longitud, pero generalmente no excederán aproximadamente 200 aa de longitud, donde el fragmento tendrá un tramo contiguo de amino ácidos que son idénticos al polipéptido del que se deriva. Un fragmento de "al menos 20 aa de longitud", por ejemplo, pretende incluir 20 o más aminoácidos contiguos de, por ejemplo, un anticuerpo específico para CD137 o de TNFSF9. En este contexto, "aproximadamente" incluye el valor particularmente recitado o un valor mayor o menor por varios (5, 4, 3, 2 o 1) aminoácidos. Las variantes de proteínas descritas aquí están codificadas por polinucleótidos que están dentro del alcance de la divulgación. El código genético se puede usar para seleccionar los codones apropiados para construir las variantes correspondientes. Los polinucleótidos pueden usarse para producir polipéptidos, y estos polipéptidos pueden usarse para producir anticuerpos por procedimientos conocidos. Un polipéptido de "fusión" es un polipéptido que comprende un polipéptido o porción (por ejemplo, uno o más dominios) del mismo fusionado o unido al polipéptido heterólogo.

35 En algunas realizaciones, el agonista de la molécula coestimuladora es un anticuerpo. El término "anticuerpo" o "resto de anticuerpo" pretende incluir cualquier estructura molecular que contenga cadena de polipéptido con una forma específica que se ajuste y reconozca un epítipo, donde una o más interacciones de unión no covalente estabilizan el complejo entre la estructura molecular y el epítipo. Los anticuerpos utilizados en la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales, aunque se prefieren los anticuerpos monoclonales porque pueden reproducirse mediante cultivo celular o recombinantemente, y pueden modificarse para reducir su antigenicidad.

45 Como se usa en el presente documento, "anticuerpo" incluye referencia a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno particular, e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales. El término también incluye formas genéticamente modificadas, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados. El término "anticuerpo" también incluye formas de unión a antígeno de anticuerpos, incluidos fragmentos con capacidad de unión a antígeno (por ejemplo, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv y rIgG. El término también se refiere a fragmentos Fv recombinantes de cadena sencilla (scFv). El término anticuerpo también incluye moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos.

50 La selección de anticuerpos para la ablación de células madre endógenas puede basarse en una variedad de criterios, que incluyen selectividad, afinidad, citotoxicidad, etc. La frase "se une específicamente (o selectivamente) a un anticuerpo o" inmunorreactivo específicamente (o selectivamente) con "cuando se refiere a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína, en forma heterogénea población de proteínas y otros productos biológicos. Por lo tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a secuencias de proteínas particulares al menos dos veces el fondo y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo. En general, los anticuerpos de la presente invención se unen a antígenos en la superficie de las células diana en presencia de células efectoras (como las células asesinas naturales o los macrófagos). Los receptores Fc en las células efectoras reconocen los anticuerpos unidos. La reticulación de los receptores Fc indica a las células efectoras que eliminen las células diana por citólisis o apoptosis. En una realización, la inducción se logra mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En realizaciones alternativas, los anticuerpos son activos en la inhibición del crecimiento de las células objetivo, se logra una ablación al interferir con la señalización del factor de crecimiento, por ejemplo, anticuerpos específicos para receptores de factor de crecimiento como c-kit.

65

Se puede generar un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular mediante procedimientos recombinantes tales como la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, o inmunizando un animal con el antígeno o con ADN que codifica el antígeno. Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por el experto en la materia. Los anticuerpos pueden, alternativamente, ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando procedimientos de hibridoma. En un procedimiento de hibridoma, un animal huésped apropiado se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados. *in vitro* Los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma.

Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluidas las bibliotecas de presentación de fagos. De manera similar, los anticuerpos humanos pueden fabricarse mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras el desafío, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en humanos en todos los aspectos, incluida la reorganización de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos.

Los anticuerpos también existen como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por lo tanto, la pepsina digiere un anticuerpo debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir  $F(ab)'_2$ , un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a  $V_H-DO_{H1}$  por un enlace disulfuro. El  $F(ab)'_2$  puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región de la bisagra, convirtiendo así el  $F(ab)'_2$  dímero en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región de bisagra. Si bien varios fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos pueden sintetizarse *de novo* ya sea químicamente o mediante el uso de metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados *de novo* utilizando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla) o aquellas identificadas utilizando bibliotecas de presentación de fagos.

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

Los anticuerpos de interés para la ablación pueden ser probados por su capacidad para inducir ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). La actividad de ADCC asociada a anticuerpos se puede controlar y cuantificar mediante la detección de la liberación de la etiqueta o la lactato deshidrogenasa de las células lisadas, o la detección de la viabilidad reducida de la célula diana (por ejemplo, ensayo de anexina). Los ensayos para la apoptosis se pueden realizar mediante el ensayo de marcaje de nick nickenigen-11-dUTP (TUNEL) mediado por desoxinucleotidiltransferasa terminal (Lazebnik et al., Nature: 371, 346 (1994) La citotoxicidad también se puede detectar directamente mediante kits de detección conocidos en la técnica, como el Kit de detección de citotoxicidad de Roche Applied Science (Indianapolis, Ind.). Preferiblemente, los anticuerpos de la presente invención inducen al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% u 80% de citotoxicidad de las células diana.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un resto efector. El resto efector puede ser cualquier número de moléculas, incluidos los restos de marcado, como los marcadores radiactivos o los marcadores fluorescentes, o puede ser un resto citotóxico. Los agentes citotóxicos son numerosos y variados e incluyen, entre otros, fármacos citotóxicos o toxinas o fragmentos activos de tales toxinas. Las toxinas adecuadas y sus fragmentos correspondientes incluyen cadena A de difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina, auristatina-E y similares. Los agentes citotóxicos también incluyen radioquímicos elaborados mediante la conjugación de radioisótopos con anticuerpos. Dirigir el resto citotóxico a las proteínas transmembrana sirve para aumentar la concentración local del resto citotóxico en el área objetivo.

El término célula madre se usa en el presente documento para referirse a una célula de mamífero que tiene la capacidad de autorrenovarse y generar una progenie diferenciada (ver Morrison y col. (1997) Cell 88: 287-298) En

general, las células madre también tienen una o más de las siguientes propiedades: la capacidad de experimentar una replicación asíncrona o simétrica, que es donde las dos células hijas después de la división pueden tener fenotipos diferentes; amplia capacidad de autorrenovación; capacidad de existencia en una forma mitóticamente inactiva; y la regeneración clonal de todos los tejidos en los que existen, por ejemplo, la capacidad de las células madre hematopoyéticas para reconstituir todos los linajes hematopoyéticos.

Las células madre de interés incluyen células madre hematopoyéticas; células madre de la cresta neural (ver Morrison y col. (1999) *Cell* 96: 737-749); células madre mesenquimales; células madre mesodérmicas; etc. Las células de interés son típicamente mamíferos, donde el término se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, laboratorio, deportes o mascotas, como perros, caballos, gatos, vacas, ratones ratas conejos etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.

Para fines de injerto, se administra a un paciente una composición que comprende células madre, que incluye, sin limitación, células madre hematopoyéticas. Tales procedimientos son bien conocidos en la técnica. Las células madre están opcionalmente, aunque no necesariamente, purificadas. Abundantes informes exploran varios procedimientos para la purificación de células madre y el posterior injerto, incluida la citometría de flujo; un sistema isolex (Klein et al. (2001) *Bone Marrow Transplant.* 28(11):1023-9; Prince et al. (2002) *Cytotherapy* 4(2):137-45); immunomagnetic separation (Prince et al. (2002) *Cytotherapy* 4(2):147-55; Handgretinger et al. (2002) *Bone Marrow Transplant.* 29(9):731-6; Chou et al. (2005) *Breast Cancer.* 12(3):178-88); y similares.

Las células madre hematopoyéticas se pueden obtener mediante la recolección de médula ósea o de sangre periférica. La médula ósea generalmente se aspira de las crestas ilíacas posteriores mientras el donante se encuentra bajo anestesia regional o general. Se puede obtener médula ósea adicional de la cresta ilíaca anterior. Una dosis de  $1 \times 10^8$  y  $2 \times 10^8$  Las células mononucleares de médula por kilogramo generalmente se consideran deseables para establecer el injerto en trasplantes de médula autólogos y alogénicos, respectivamente. La médula ósea se puede preparar con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF; filgrastim [Neupogen]) para aumentar el recuento de células madre.

La movilización de células madre desde la médula ósea hacia la sangre periférica por parte de citocinas como G-CSF o GM-CSF ha llevado a la adopción generalizada de la recolección de células progenitoras de sangre periférica por aféresis para el trasplante de células madre hematopoyéticas. La dosis de G-CSF utilizada para la movilización es de  $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ . Sin embargo, en donantes autólogos que reciben un tratamiento previo intenso, se pueden administrar dosis de hasta  $40 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ . Mozobil puede usarse junto con G-CSF para movilizar células madre hematopoyéticas a sangre periférica para su recolección.

Las pautas actuales indican que la dosis mínima requerida para el injerto es de  $1-2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> células/kg de peso corporal para trasplantes autólogos y alogénicos. Dosis más altas darían como resultado un mejor injerto, pero dosis en el rango de  $8 \times 10^6$  puede estar asociado con un mayor riesgo de EICH extensiva.

Las células que se emplean pueden ser frescas, congeladas o haber sido sometidas a cultivo previo. Pueden ser fetales, neonatos, adultos, etc. Las células madre hematopoyéticas pueden obtenerse a partir de hígado fetal, médula ósea, sangre, particularmente sangre periférica movilizada por G-CSF o GM-CSF, o cualquier otra fuente convencional. Las células para injerto se aíslan opcionalmente de otras células, donde la manera en que las células madre se separan de otras células del linaje hematopoyético u otro no es crítica para la presente invención. Si se desea, se puede obtener una población sustancialmente homogénea de células madre o células progenitoras mediante el aislamiento selectivo de células libres de marcadores asociados con células diferenciadas, mientras se muestran características epitópicas asociadas con las células madre.

Las células pueden modificarse genéticamente para introducir genes útiles en la célula diferenciada, por ejemplo, reparación de un defecto genético en un marcador individual, seleccionable, etc., o genes útiles en la selección contra células ES no diferenciadas. Las células también pueden modificarse genéticamente para mejorar la supervivencia, controlar la proliferación y similares. Las células pueden estar genéticamente alteradas por transfección o transducción con un vector adecuado, recombinación homóloga u otra técnica apropiada, de modo que expresen un gen de interés. En una realización, las células se transfectan con genes que codifican un componente catalítico de la telomerasa (TERT), típicamente bajo un promotor heterólogo que aumenta la expresión de la telomerasa más allá de lo que ocurre bajo el promotor endógeno (véase la Solicitud de Patente Internacional WO 98/14592) En otras realizaciones, se introduce un marcador seleccionable, para proporcionar una mayor pureza de la célula de diferenciación deseada. Las células pueden alterarse genéticamente usando un vector que contiene sobrenadantes durante un período de 8-16 h, y luego intercambiarse en medio de crecimiento durante 1-2 días. Las células alteradas genéticamente se seleccionan usando un agente de selección de fármacos como puomicina, G418 o blastidina, y luego se recultivan.

Las células también se pueden alterar genéticamente para mejorar su capacidad de participar en la regeneración de tejidos o para entregar un gen terapéutico a un sitio de administración. Se diseña un vector usando la secuencia de codificación conocida para el gen deseado, unido operativamente a un promotor que es constitutivo,

específico de pan, específicamente activo en un tipo celular diferenciado, *etc.* Los promotores inducibles adecuados se activan en un tipo de célula objetivo deseado, ya sea la célula transfectada o la progenie de la misma. Por activación transcripcional, se pretende que la transcripción se incremente por encima de los niveles basales en la célula objetivo en al menos aproximadamente 100 veces, más usualmente en al menos aproximadamente 1000 veces. Se conocen varios promotores que son inducidos en diferentes tipos de células.

Están disponibles muchos vectores útiles para transferir genes exógenos a células de mamífero objetivo. Los vectores pueden ser episomales, por ejemplo, plásmidos, vectores derivados de virus tales como citomegalovirus, adenovirus, *etc.*, o puede integrarse en el genoma de la célula diana, mediante recombinación homóloga o integración aleatoria, por ejemplo, vectores derivados de retrovirus tales como MMLV, HIV-1, ALV, *etc.* Para la modificación de células madre, se prefieren los vectores lentivirales. Los vectores lentivirales como los basados en secuencias gag de VIH o FIV se pueden usar para transfectar células que no se dividen, como la fase de reposo de las células madre humanas. Las combinaciones de retrovirus y una línea de envasado apropiada también pueden ser útiles, donde las proteínas de la cápside serán funcionales para infectar las células diana. Por lo general, las células y el virus se incubarán durante al menos aproximadamente 24 horas en el medio de cultivo. Luego, se permite que las células crezcan en el medio de cultivo durante cortos intervalos en algunas aplicaciones, por ejemplo, 24-73 horas, o al menos durante dos semanas, y se puede permitir que crezca durante cinco semanas o más, antes del análisis. Los vectores retrovirales de uso común son "defectuosos", es decir incapaz de producir proteínas virales necesarias para una infección productiva. La replicación del vector requiere crecimiento en la línea celular de empaquetamiento. Los vectores pueden incluir genes que luego deben eliminarse, por ejemplo, utilizando un sistema recombinasa como Cre/Lox, o las células que las expresan destruidas, por ejemplo, al incluir genes que permiten la toxicidad selectiva como el herpesvirus TK, bcl-xs, *etc.*

Un "paciente" para los fines de la presente invención es un humano. Un "paciente" para los propósitos de la presente divulgación incluye tanto humanos como otros animales, particularmente mamíferos, incluyendo mascotas y animales de laboratorio, por ejemplo, ratones, ratas, conejos, *etc.* Por lo tanto, los procedimientos son aplicables tanto a la terapia humana como a las aplicaciones veterinarias. En una realización, el paciente es un mamífero, preferiblemente un primate. En otras realizaciones, el paciente es humano.

*Términos adicionales.* Los términos "tratamiento", "tratar", "tratar" y similares se usan en el presente documento para referirse generalmente a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o síntoma (s) de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una estabilización o cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. El término "tratamiento" abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad y/o los síntomas ocurran en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o síntoma pero aún no ha sido diagnosticado como que lo tiene; (b) inhibir la enfermedad y/o los síntomas, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar los síntomas de la enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad y/o los síntomas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos ya infligidos (por ejemplo, aquellos con cáncer, aquellos con una infección, *etc.*) así como aquellos en los que se desea prevención (por ejemplo, aquellos con mayor susceptibilidad al cáncer, aquellos con una mayor probabilidad de infección, los sospechosos de tener cáncer, los sospechosos de albergar una infección, *etc.*).

#### Procedimientos de injerto

Los procedimientos de la divulgación proporcionan un injerto mejorado de células madre después del trasplante en un receptor. El receptor puede ser inmunocompetente, y el trasplante puede realizarse en ausencia de acondicionamiento mieloablativo, es decir, en ausencia de radiación y/o fármacos quimioterapéuticos. El receptor está condicionado con la administración combinada de una dosis efectiva de un agente, por ejemplo, un anticuerpo, específico para un marcador de células madre, y un agente que bloquea la interacción de CD47 con SIRP $\alpha$ . Opcionalmente, el procedimiento también comprende la administración de un agonista de una molécula inmunorreguladora, por ejemplo, CD137. El régimen de acondicionamiento ablaciona selectivamente las células madre endógenas. Después del régimen de acondicionamiento, se administra una dosis efectiva de una composición celular que comprende células madre exógenas al receptor. Las células madre pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas.

Las células madre son células madre hematopoyéticas. Los agentes de interés del agente específico para células madre hematopoyéticas incluyen, sin limitación, anticuerpos que se unen a CD117. Una dosis efectiva de anticuerpo es la dosis que, cuando se combina con el agente anti-CD47, agota las células madre hematopoyéticas endógenas en al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, al menos 100,000 veces o más. La dosis efectiva dependerá del individuo y el anticuerpo específico, pero generalmente será de al menos aproximadamente 50  $\mu$ g/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 250  $\mu$ g/kg, al menos aproximadamente 500  $\mu$ g/kg, al menos aproximadamente 750  $\mu$ g/kg, al menos aproximadamente 1 mg/kg, y hasta aproximadamente 2,5 mg/kg, hasta aproximadamente 5 mg/kg, hasta aproximadamente 7,5 mg/kg, hasta aproximadamente 10 mg/kg, hasta aproximadamente 15 mg/kg, hasta aproximadamente 25 mg/kg, hasta aproximadamente 50 mg/kg, hasta aproximadamente 100 mg/kg.

El agente anti-CD47 se proporciona en una dosis que, cuando se combina con el agente específico de células madre, agota las células madre hematopoyéticas endógenas en al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, al menos 100,000 veces o más. La dosis efectiva dependerá del individuo y del agente específico, pero generalmente será de al menos aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 250 µg/kg, al menos aproximadamente 500 µg/kg, al menos aproximadamente 750 µg/kg, al menos aproximadamente 1 mg/kg, y hasta aproximadamente 2,5 mg/kg, hasta aproximadamente 5 mg/kg, hasta aproximadamente 7,5 mg/kg, hasta aproximadamente 10 mg/kg, hasta aproximadamente 15 mg/kg, hasta aproximadamente 25 mg/kg, hasta aproximadamente 50 mg/kg, hasta aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, el agente es un monómero CV1 (SIRPα de alta afinidad) o un dímero de microcuerpo CV1.

El agonista de CD137, cuando está presente, se proporciona en una dosis que, cuando se combina con el agente específico de células madre y el agente anti-CD47, agota las células madre hematopoyéticas endógenas en al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, o más relativo al procedimiento en ausencia del agonista CD137. La dosis efectiva dependerá del individuo y del agente específico, pero generalmente será de al menos aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 250 µg/kg, al menos aproximadamente 500 µg/kg, al menos aproximadamente 750 µg/kg, al menos aproximadamente 1 mg/kg, y hasta aproximadamente 2,5 mg/kg, hasta aproximadamente 5 mg/kg, hasta aproximadamente 7,5 mg/kg, hasta aproximadamente 10 mg/kg, hasta aproximadamente 15 mg/kg, hasta aproximadamente 25 mg/kg, hasta aproximadamente 50 mg/kg, hasta aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, el agente es un anticuerpo agonista específico para CD137.

Los agentes acondicionadores, que pueden proporcionarse en ausencia de radiación mieloablativa o quimioterapia, se administran diariamente, dos veces al día, cada dos días, cada tercer día, etc. durante un período de tiempo suficiente para efectuar la ablación deseada de las células madre endógenas, al menos aproximadamente 1 día, hasta aproximadamente 2 días, hasta aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más días. En algunas realizaciones, de 4 a 7 días es suficiente. Los agentes pueden formularse juntos o por separado, pero se administran concomitantemente. "Concomitante" y "concomitantemente", como se usa en el presente documento, se refieren a la administración de al menos dos agentes, o al menos tres agentes, a un paciente simultáneamente o dentro de un período de tiempo durante el cual los efectos del primer agente administrado siguen siendo operativos en el paciente. Por lo tanto, si el primer fármaco es, por ejemplo, el anticuerpo anti-CD117 y el segundo fármaco es un SIRPα soluble, la administración concomitante del segundo agente puede ocurrir uno o dos días después del primero, preferiblemente dentro de uno a siete días, después de la administración del primer agente. Cuando se incluye un agonista de CD137, puede administrarse con uno, dos, tres, cuatro, cinco días del anticuerpo anti-CD117, y puede formularse conjuntamente o formularse por separado con el agente anti-CD47.

La infusión de médula ósea o células progenitoras de sangre periférica (PBPC) es un proceso relativamente simple que se realiza al lado de la cama. El producto de médula ósea generalmente se usa fresco y se infunde a través de una vena central durante un período de varias horas. Los productos autólogos son frecuentemente criopreservados; si es así, se descongelan al lado de la cama y se infunden rápidamente durante un período de varios minutos. La dosis de HSC es de al menos aproximadamente  $10^5$  CD34<sup>+</sup> células/kg de peso corporal, al menos aproximadamente  $0.5 \times 10^6$ , al menos unos  $10^6$  y hasta aproximadamente  $2.5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $7.5 \times 10^6$ ,  $10^7$  CD34<sup>+</sup> células/kg de peso corporal.

Cuando el donante es alogénico para el receptor, el tipo de HLA del donante y el receptor pueden ser probados para una coincidencia. Tradicionalmente, los loci críticos para la correspondencia son *HLA-A*, *HLA-B*, y *HLA-DR*. *HLA-C* y *HLA-DQ* ahora también se consideran al determinar la idoneidad de un donante. Un donante hermano completamente compatible generalmente se considera el donante ideal. Para los donantes no relacionados, se considera aceptable una coincidencia completa o un único desajuste para la mayoría de los trasplantes, aunque en ciertas circunstancias, se tolera un desajuste mayor. Preferiblemente el emparejamiento es tanto serológico como molecular. Cuando el donante es sangre del cordón umbilical, el grado de disparidad tolerable de HLA es mucho mayor, y una coincidencia de 3-4 de los 6 antígenos HLA-A, HLA-B y HLA-DRB1 es suficiente para el trasplante. Las células T donadoras inmunocompetentes se pueden extirpar usando una variedad de procedimientos para reducir o eliminar la posibilidad de que se desarrolle la enfermedad de injerto contra huésped (EICH).

Para una selección positiva de CD34<sup>+</sup> células, se pueden emplear instrumentos comerciales para eliminar las células deseadas, usando anticuerpos monoclonales anti-CD34 en fase sólida. Con la selección negativa, los anticuerpos monoclonales anticancerígenos pueden usarse para eliminar células tumorales, dejando células madre en el injerto.

Para la ablación, los agentes ablativos se formulan en una composición farmacéutica. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y será comprobada por un experto en la técnica utilizando técnicas conocidas (por ejemplo, Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery*; Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992), Dekker, ISBN 0824770846, 082476918X, 0824712692, 0824716981; Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); and Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

Como se sabe en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para la condición del paciente, el parto sistémico versus localizado, así como la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la interacción del fármaco y la gravedad de la condición, y será comprobable con la experimentación de rutina por los expertos en la materia.

5 La administración de los agentes se puede realizar de varias maneras como se discutió anteriormente, incluyendo, pero no limitado a, oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal o intraocular.

10 En una realización, las composiciones farmacéuticas están en una forma soluble en agua, tal como estando presentes como sales farmacéuticamente aceptables, lo que pretende incluir sales de adición de ácido y base. La "sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la efectividad biológica de las bases libres y que no son biológicamente indeseables, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, 15 ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Las "sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables" incluyen aquellas derivadas de bases inorgánicas tales como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Particularmente útiles son las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina.

25 Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más de los siguientes: proteínas transportadoras tales como albúmina sérica; tampones cargados tales como celulosa microcristalina, lactosa, maíz y otros almidones; agentes aglutinantes; edulcorantes y otros agentes aromatizantes; agentes colorantes; y polietilenglicol.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una variedad de formas de dosificación unitarias dependiendo del procedimiento de administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitarias adecuadas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, polvo, tabletas, píldoras, cápsulas y pastillas. Se reconoce que las composiciones de la invención, cuando se administran por vía oral, deben protegerse de la digestión. Esto se logra típicamente al formar complejos las moléculas con una composición para hacerlas resistentes a la hidrólisis ácida y 35 enzimática, o al empacar las moléculas en un vehículo resistente apropiado, como un liposoma o una barrera de protección. Los medios de protección de los agentes contra la digestión son bien conocidos en la técnica.

Las composiciones para administración comprenderán comúnmente un anticuerpo u otro agente ablativo disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Se puede usar una 40 variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de materia indeseable. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste y tamponamiento del pH, agentes de ajuste de toxicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de agente activo en estas 45 formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente en función de los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., 1980) y Goodman & Gillman, La base farmacológica de la terapéutica (Hardman et al., Eds., 1996)).

50 Las composiciones que contienen agentes ablativos, por ejemplo, anticuerpos, SIRPα soluble, etc. pueden administrarse para tratamiento terapéutico. Las composiciones se administran a un paciente en una cantidad suficiente para eliminar sustancialmente las células madre endógenas dirigidas, como se describió anteriormente. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente efectiva". Las administraciones 55 únicas o múltiples de las composiciones pueden administrarse dependiendo de la dosis y frecuencia según sea requerido y tolerado por el paciente. La dosis particular requerida para un tratamiento dependerá de la condición médica y el historial del mamífero, así como de otros factores como la edad, el peso, el sexo, la ruta de administración, la eficiencia, etc.

60 En los procedimientos descritos en el presente documento, los agentes se administran como un curso corto de terapia antes del trasplante. Por lo general, el tratamiento se completa al menos aproximadamente una semana antes del trasplante, al menos aproximadamente 5 días antes del trasplante, al menos aproximadamente 3 días antes del trasplante. El proceso puede repetirse si es necesario, por ejemplo, puede repetirse dos, tres veces, cuatro veces, cinco veces o más, según sea necesario para despejar el nicho.

65

Condiciones para el tratamiento

Las indicaciones para el trasplante de células madre varían según las categorías de enfermedad y están influenciadas por factores tales como anomalías citogenéticas, respuesta a la terapia previa, edad del paciente y estado funcional, estado de la enfermedad (remisión frente a recaída), factores pronósticos específicos de la enfermedad, disponibilidad de un adecuado fuente del injerto, tiempo de derivación y tiempo de trasplante.

El HSCT autólogo se usa actualmente para tratar las siguientes afecciones: mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, leucemia mieloide aguda, neuroblastoma, tumores de células germinales, trastornos autoinmunes: lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis sistémica, amiloidosis.

El HSCT alogénico se usa actualmente para tratar los siguientes trastornos: leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crónica; Leucemia linfocítica crónica, trastornos mieloproliferativos, síndromes mielodisplásicos, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, anemia aplásica, aplasia pura de glóbulos rojos, hemoglobinuria paroxística nocturna, anemia de Fanconi, talasemia mayor, anemia de células falciformes, inmunodeficiencia combinada severa (SCID), síndrome de Wiskott-Aldrich, linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), errores congénitos del metabolismo: por ejemplo, mucopolisacaridosis, enfermedad de Gaucher, leucodistrofias metacromáticas y adrenoleucodistrofias, epidermólisis ampollosa, neutropenia congénita severa, síndrome de Shwachman- Diamond, anemia de Diamond-Blackfan, deficiencia de adhesión leucocitaria y similares.

Las realizaciones incluyen el trasplante a un paciente que padece un trastorno sanguíneo genético, donde las células madre exógenas de un fenotipo normal se trasplantan al paciente. Dichas enfermedades incluyen, sin limitación, el tratamiento de anemias causadas por síntesis defectuosa de hemoglobina (hemoglobinopatías).

Las enfermedades de células falciformes incluyen la enfermedad de HbS; anemia drepanocítica; meniscocitosis La anemia hemolítica crónica ocurre casi exclusivamente en negros y se caracteriza por eritrocitos en forma de hoz causados por la herencia homocigota de Hb S. Los homocigotos tienen anemia de células falciformes; los heterocigotos no son anémicos, pero se puede demostrar el rasgo falciforme (siclemia) *in vitro*. En Hb S, la valina se sustituye por ácido glutámico en el sexto aminoácido de la cadena beta. Desoxi-Hb S es mucho menos soluble que desoxi-Hb A; forma un gel semisólido de tactoides en forma de varilla que hace que los glóbulos rojos se retiren en sitios de bajo PO<sub>2</sub>. Los eritrocitos distorsionados e inflexibles se adhieren al endotelio vascular y tapan arteriolas y capilares pequeños, lo que conduce a la oclusión y al infarto. Debido a que los eritrocitos falciformes son demasiado frágiles para soportar el trauma mecánico de la circulación, la hemólisis ocurre después de que ingresan a la circulación. En los homocigotos, las manifestaciones clínicas son causadas por anemia y eventos vasooclusivos que resultan en isquemia e infarto de tejidos. El crecimiento y el desarrollo se ven afectados y aumenta la susceptibilidad a la infección. La anemia suele ser grave, pero varía mucho entre los pacientes. La anemia puede exacerbarse en niños por el secuestro agudo de células falciformes en el bazo.

Las talasemias son un grupo de anemias microcíticas crónicas heredadas caracterizadas por una síntesis defectuosa de Hb y eritropoyesis ineficaz, particularmente común en personas de ascendencia mediterránea, africana y del sudeste asiático. La talasemia es uno de los trastornos hemolíticos hereditarios más comunes. Es el resultado de una síntesis de Hb desequilibrada causada por una producción disminuida de al menos una cadena de polipéptidos de globina (β, α, γ, δ).

La anemia aplásica es el resultado de una pérdida de precursores de glóbulos rojos, ya sea por un defecto en el conjunto de células madre o una lesión en el microambiente que sostiene la médula, y a menudo con valores límite de VCM. El término anemia aplásica habitualmente implica una panhipoplasia de la médula con leucopenia y trombocitopenia asociadas.

La inmunodeficiencia combinada es un grupo de trastornos caracterizados por deficiencia congénita y generalmente hereditaria de los sistemas de células B y T, aplasia linfóide y displasia tímica. Las inmunodeficiencias combinadas incluyen inmunodeficiencia combinada severa, agammaglobulinemia suiza, inmunodeficiencia combinada con deficiencia de adenosina desaminasa o nucleósido fosforilasa e inmunodeficiencia combinada con inmunoglobulinas (síndrome de Nezelof). La mayoría de los pacientes tienen un inicio temprano de infección con aftas, neumonía y diarrea. Si no se tratan, la mayoría muere antes de los 2 años. La mayoría de los pacientes tienen una deficiencia profunda de células B e inmunoglobulina. Los siguientes son característicos: linfopenia, niveles bajos o ausentes de células T, respuesta proliferativa pobre a mitógenos, anergia cutánea, sombra tímica ausente y tejido linfóide disminuido. La neumonía por *Pneumocystis* y otras infecciones oportunistas son comunes.

Sección experimental

Ejemplo 1

Trasplante de HSC en un huésped inmunocompetente sin radiación ni quimioterapia

El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) puede tratar diversas enfermedades del sistema sanguíneo, incluidas neoplasias hematológicas, anemias y trastornos autoinmunes. Sin embargo, los pacientes deben someterse a regímenes de acondicionamiento tóxico, como quimioterapia y/o radiación, para eliminar las HSC del huésped y permitir el injerto de HSC del donante. Anteriormente hemos demostrado que el anticuerpo monoclonal anti-c-Kit agota las HSC de los nichos de la médula ósea y facilita el injerto de HSC del donante en ratones inmunodeficientes. Aquí demostramos que el anticuerpo anti-c-Kit depleciona las HSC de una manera dependiente de Fc, lo que implica la participación de células efectoras, y que el bloqueo de la molécula 'no me comas' CD47 se sinergia con el anticuerpo anti-c-Kit como un agente acondicionador en ratones inmunocompetentes. El tratamiento combinado conduce a la eliminación de > 99 % de las HSC del huésped y la reconstitución de sangre robusta multilínea después del trasplante de HSC en ratones inmunocompetentes. Este acondicionamiento dirigido con agentes biológicos tiene el potencial de transformar la práctica del trasplante de HSC y extender su uso a un espectro más amplio de pacientes.

Las células madre hematopoyéticas (HSC) son células madre multipotentes que dan lugar a todas las células del sistema sanguíneo durante la vida de un individuo. Los HSC residen en 'nichos' especializados dentro de la médula ósea que les permiten renovarse y permanecer en un estado indiferenciado. El trasplante de HSC en un huésped puede regenerar un sistema sanguíneo saludable y, al hacerlo, curar muchos trastornos sanguíneos que amenazan la vida, enfermedades autoinmunes y neoplasias hematológicas. Sin embargo, para un injerto exitoso de HSC exógenas para injertar, se deben superar dos obstáculos. En primer lugar, las HSC del donante deben escapar del rechazo inmune del receptor y, en segundo lugar, las células trasplantadas deben tener acceso a un espacio nicho dentro de la médula ósea del receptor.

Los regímenes de acondicionamiento actuales de radiación y/o quimioterapia inmunosupresan simultáneamente al receptor por linfoblación y matan a los HSC residentes para liberar nichos de médula ósea. Sin embargo, estos procedimientos también provocan lesiones inespecíficas en otros tejidos y pueden causar neoplasias secundarias. Por lo tanto, buscamos regímenes de acondicionamiento de trasplante que carecen de quimioterapia o radioterapia. En consecuencia, el trasplante de HSC está reservado para aquellos con trastornos potencialmente mortales en los que se cree que los beneficios superan los riesgos del procedimiento. Los protocolos de acondicionamiento más seguros y específicos podrían mejorar la seguridad del trasplante y ampliar la utilidad clínica existente de esta poderosa forma de terapia celular. El trasplante alogénico de HSC da como resultado el reemplazo sin GvH de células hematopoyéticas enfermas, así como también induce tolerancia permanente al trasplante de células, tejidos u órganos del donante de HSC y, por lo tanto, representa la plataforma sobre la que descansa la medicina regenerativa.

Las HSC y los progenitores hematopoyéticos posteriores expresan c-Kit (CD117), un receptor de tirosina quinasa dimérico transmembrana. La señalización activada por el ligando c-Kit (KL) es esencial para numerosas funciones de HSC, que incluyen el recorrido de referencia, la proliferación, la adhesión, el mantenimiento y la supervivencia. El papel crítico de c-Kit en la regulación HSC se evidencia en *W41/W41* ratones que albergan alelos hipomórficos de c-Kit. *W41/W41* los ratones tienen un número reducido de HSC y pueden ser reconstituidos de manera robusta por HSC exógenos con radiación mínima. Del mismo modo, inmunocomprometido *c-Kit* Los ratones mutantes pueden ser injertados por HSC humanos sin ninguna irradiación. Además, la eliminación dirigida de KL en células perivasculares da como resultado la pérdida de HSC *en vivo*, estableciendo así el requisito para el ligando c-Kit además del receptor c-Kit. Administración de un anticuerpo monoclonal antiratón c-Kit (ACK2) en Rag2 inmunocomprometido<sup>+</sup>  $c^{-/-}$  y Rag2<sup>-/-</sup> los ratones deplecionan las HSC del huésped y permiten que las HSC exógenas se injerten (Fig. 4a). Del mismo modo, la administración de ACK2 *en el útero*, elimina HSC en el desarrollo de embriones de ratón y permite el injerto de HSC en neonatos. Sin embargo, ACK2 como agente único es incapaz de condicionar ratones adultos inmunocompetentes para aceptar HSC de donantes. Se requiere una dosis baja de radiación para la depleción de HSC mediado por ACK2 y el injerto en ratones inmunocompetentes.

*Los anticuerpos anti-c-Kit deplecionan las HSC de una manera dependiente de Fc.* Primero comparamos la capacidad del anticuerpo anti-c-Kit ACK2 para agotar las HSC en el tipo salvaje (WT) versus Rag2 inmunodeficiente<sup>-</sup>  $c\gamma^{-/-}$  ratones. Como se observó anteriormente, la depleción de Lin inmunofenotípico mediado por ACK2<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup> Flt3<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> a largo plazo (LT) -HSC fue mucho mayor en Rag2<sup>-/-</sup>  $c\gamma^{-/-}$  que en ratones WT (Fig. 4a). En Rag2<sup>-/-</sup>  $c\gamma^{-/-}$  ratones, una sola dosis de 500 µg de ACK2 redujo los números de LT-HSC en más de cuatro órdenes de magnitud seis días después de la administración. Por el contrario, en ratones WT, la administración de ACK2 produjo una disminución moderada (<10 veces) en las HSC con la recuperación completa del compartimento de HSC 6-9 días después (Fig. 4a).

Para determinar si la actividad depletiva de ACK2 podría mejorarse en animales de tipo salvaje, investigamos el mecanismo de eliminación de HSC mediada por ACK2. Anteriormente, se suponía que ACK2 actúa principalmente al bloquear la interacción entre c-Kit y KL en base a estudios que mostraron una falta comparativa de efectividad de 2B8, un anticuerpo anti-c-Kit diferente que no bloquea. Sin embargo, múltiples factores gobiernan la eficacia del anticuerpo; tales como el isotipo del anticuerpo, la orientación de unión y la internalización del receptor, lo que también podría explicar la actividad diferencial de 2B8 frente a ACK2.

Los inventores preguntaron si ACK2 depleciona las HSC a través de la participación de células efectoras. Para abordar esta pregunta, preparamos fragmentos Fab de ACK2 que carecen de la porción Fc. La porción Fc de un anticuerpo juega un papel crítico en la destrucción celular mediada por el sistema inmune, incluida la activación de las células efectoras y la fagocitosis de las células diana. Administración de ACK2 a Rag2<sup>-/-</sup>cy<sup>-/-</sup> los ratones causaron la depleción de HSC de una manera dependiente de la dosis. En contraste, el fragmento F [ab] 'de ACK2 no tuvo un efecto discernible sobre la frecuencia de HSC, lo que sugiere que la depleción de HSC mediado por ACK2 depende del receptor de Fc (Fig. 4b). Para probar aún más si la porción Fc de ACK2 es necesaria para la depleción de HSC, explotamos el FcγR1<sup>-/-</sup> ratones que son deficientes en la subunidad de la cadena γ del receptor FcγRIII y FcεRI y carecen de actividad ADCC funcional de las células NK, y capacidad fagocítica funcional de macrófagos y neutrófilos, y actividades alérgicas funcionales de mastocitos y basófilos. Tratamiento de ACK2 en FcγR1<sup>-/-</sup> los ratones no tuvieron efecto sobre el número de HSC en el BM (Fig. 4c). Estos datos sugieren que ACK2 induce la depleción de HSC a través de funciones efectoras Fc.

Para evaluar la presencia de HSC funcionales en estos ratones, realizamos un análisis de trasplante competitivo en receptores irradiados letalmente. Un número igual de células de médula ósea completa de ratones con deficiencia de receptor Fc que habían sido tratados con y sin tratamiento con ACK2 se transplantaron juntamente con soporte de médula ósea completa de un ratón que expresaba un alelo CD45 diferente para asegurar la supervivencia del huésped. Los receptores se irradiaron letalmente y se determinó la fuente de células hematopoyéticas basándose en el tipo de alelo CD45. A las 18 semanas después del trasplante no hay diferencia significativa en Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup> (LSK) se observó quimerismo hematopoyético de células madre y progenitoras (HSPC) entre receptores que recibieron médula ósea de ratones con deficiencia de receptor de Fc tratados o no tratados con ACK2 (Fig. 4d). Tomados en conjunto, los resultados de estos estudios que usan fragmentos Fab ACK2 y ratones inactivados con el receptor Fc establecen que las funciones efectoras de anticuerpos Fc provocadas por ACK2 son necesarias para su *in vivo* HSC actividad de depleción.

CD47, una proteína transmembrana expresada en HSC y muchos otros tipos de células, es una señal de 'no me comas' que es un punto de control inmune innato, y actúa como un "marcador de sí mismo" crítico para atenuar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos/fagocitosis (ADCC/ADCP) a través de su interacción con SIRPα en neutrófilos y macrófagos. Las HSC movilizadas o que circulan naturalmente en la periferia regulan al alza la expresión de la superficie CD47 para evitar la destrucción por los macrófagos en los espacios perisinusoidales en la médula ósea, el bazo y el hígado. Los altos niveles de expresión de CD47 en muchas células cancerosas diferentes confieren de manera similar la protección de las células cancerosas contra la fagocitosis. Bloqueo del eje CD47: SIRPα mejora drásticamente la actividad ADC de los anticuerpos monoclonales opsonizantes de tumores *in vitro* y *en vivo*. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que la interrupción de la interacción CD47: SIRPα podría mejorar de manera similar la depleción de las HSC endógenas utilizando ACK2 u otros anticuerpos anti-c-Kit.

*El bloqueo de CD47 aumenta la eficacia de ACK2 para el acondicionamiento del trasplante.* Anteriormente diseñamos fragmentos de SIRPα humano como antagonistas de alta afinidad de CD47. La más potente de estas variantes, CV1 (variante de consenso 1), se une a CD47 humano (hCD47) con una afinidad de 11 pM, pero reacciona débilmente con CD47 de ratón (mCD47) con una afinidad > 1000 veces menor que hCD47. Por lo tanto, buscamos rediseñar CV1 como antagonista de mCD47 fusionando CV1 al dominio CH3 de IgG1 humana a través de una bisagra que contiene disulfuro (Fig. 3a). Razonamos que esta nueva molécula, que denominamos un "microcuerpo" CV1 (CV1mb), habría aumentado la afinidad por mCD47 debido a la aidez de su arquitectura dimérica.

*In vitro*, CV1mb fue funcionalmente equivalente a CV1 monomérico, ya que no indujo fagocitosis por sí solo, sino que sinergizó de manera sólida con un anticuerpo monoclonal opsonizante, cetuximab, que se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) presente en una línea celular de cáncer de colon (Fig. 3b). Por lo tanto, las propiedades favorables de unión, funcionales y farmacocinéticas de CV1mb indicaron que podría antagonizar eficazmente mCD47 *en vivo*.

Luego estudiamos el efecto de combinar el bloqueo de CD47 usando CV1mb con el tratamiento con ACK2 en animales C57BL/6.CD90.1 (BA) completamente inmunocompetentes. Como se vio anteriormente, la administración de 500 µg de ACK2 solo en ratones BA no produjo una reducción sostenida de las HSC inmunofenotípicas después de siete días. De manera similar, las inyecciones intraperitoneales (IP) diarias durante cinco días con 500 µg de CV1mb solo no tuvieron un efecto apreciable sobre los números de HSC inmunofenotípicos en el mismo punto de tiempo. Sin embargo, la combinación de ACK2 y CV1mb dio como resultado una reducción dramática (> 10.000 veces) de LSK CD150 + Flt3-CD34-LT-HSC según lo determinado por análisis de citometría de flujo.

Para confirmar que las HSC funcionales se eliminaron, la médula ósea completa de ratones tratados con ACK2/CV1mb se cotrasplantó con un número igual de células de médula ósea GFP + de ratones no manipulados en receptores irradiados letalmente. El quimerismo de HSC medido a las 24 semanas después del trasplante se redujo significativamente en los receptores trasplantados con médula ósea de ratones tratados con ACK2 más CV1mb. Por

el contrario, se observó un fuerte quimerismo del donante en receptores de médula de ratones no tratados y tratados con ACK2 (Fig. 6b). Como c-Kit se expresa en las células progenitoras hematopoyéticas aguas abajo de HSC (Fig. 8a), planteamos la hipótesis de que estas poblaciones también podrían ser blanco de ACK2 combinado con CV1mb. Se observó una pérdida significativa de todos los progenitores mieloides posteriores en ratones tratados con la combinación de ACK2 y CV1mb (Fig. 6c). En consecuencia, los ratones tratados con ACK2 y CV1mb combinados desarrollaron anemia severa con reducción del hematocrito, glóbulos rojos y hemoglobina, así como una disminución en los glóbulos blancos (Fig. 6d). Por examen histológico, la administración de ACK2 con CV1mb causó una marcada reducción de la celularidad de la médula ósea. El aclaramiento de la médula ósea a los 7 días después del tratamiento se caracterizó por una dramática pérdida de células mononucleares y glóbulos rojos que revelaron adipocitos de médula. Por lo tanto, la depleción casi completo de las HSC y las células precursoras hematopoyéticas, y la eliminación aparente del espacio nicho de la médula ósea por ACK2 más CV1mb indicaron que esta combinación podría precondicionar eficazmente a los ratones WT para el trasplante de HSC.

*El precondicionamiento con bloqueo de ACK2 y CD47 permite el trasplante de HSC en ratones WT.* Para evaluar si la combinación de bloqueo anti-c-Kit y CD47 podría permitir el injerto de HSC del donante en ausencia de quimioterapia o radiación, tratamos ratones adultos completamente inmunocompetentes CD45.1/CD45.2 con una dosis única de 500 µg de ACK2 y cinco inyecciones diarias de 500 µg de CV1mb. Ratones severamente anémicos recibieron transfusiones de sangre para asegurar la supervivencia. A partir del día 6 después del tratamiento, se trasplantaron diariamente células CD45.2 + de médula ósea sin linaje durante 3 días consecutivos. Mientras que los ratones tratados con ACK2 solo tenían niveles muy bajos de injerto de HSC, los ratones que recibieron la combinación de ACK2 y CV1mb exhibieron altos niveles de injerto de HSC 20 semanas después del trasplante, aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor que el anticuerpo solo. Se observó más del 60% de células de granulocitos derivadas de donantes en sangre periférica de ratones tratados con ACK2 y CV1mb, así como en médula ósea y bazo. El injerto no se limitó al compartimento mieloides ya que observamos 40-50% de células B, aproximadamente el 30 % de células T y aproximadamente el 60 % de injerto de células asesinas naturales en la sangre, así como el bazo y la médula ósea. El injerto de células T también se observó en el timo, de acuerdo con la expresión de c-kit en las primeras células pre-T funcionales en el timo.

Dada la sólida sinergia entre ACK2 y CV1mb, los inventores buscaron determinar si el acondicionamiento con ACK2 podría generalizarse a otros antagonistas de CD47. De este modo, administramos ACK2 con CV1 monomérico (CV1) y un anticuerpo anti-CD47 que bloquea CD47 de ratón y humano (MIAP410; Fig. 10). Estas combinaciones mejoraron efectivamente la depleción de HSC funcionales mediado por ACK2, según lo determinado por un ensayo de trasplante de competición. Además, CV1 y MIAP410 permitieron el trasplante de HSC cuando se combinaron con ACK2 para el acondicionamiento, produciendo 29% y 35% de quimerismo de granulocitos respectivamente (Fig. 11a). Sin embargo, el quimerismo de las células B se mantuvo bajo, con CV1 y ACK2 produciendo 1.5% y MIAP410 combinado con ACK2 resultando en 7% de células B donantes (Fig. 11b). Estos resultados indican que el bloqueo farmacológico de CD47 actúa para potenciar la actividad de depleción de HSC de los anticuerpos anti-c-Kit, y que la magnitud del efecto está influenciada por el tamaño, la afinidad/avidéz y/o el isotipo de anticuerpo del antagonista de CD47.

Una limitación principal del trasplante de células madre hematopoyéticas sigue siendo la liberación segura y fácil del espacio de nicho para aceptar el injerto del donante. Nuestros resultados establecen que el tratamiento de ratones inmunocompetentes adultos con dos agentes biológicos, los anticuerpos opsonizantes anti-c-Kit y un antagonista de CD47, conduce al agotamiento extenso de HSC y células progenitoras, y permite que los HSC exógenos se injerten de manera robusta. Este enfoque puede obviar la necesidad de terapias tóxicas no específicas que son el estándar actual. El desarrollo de un acondicionamiento más seguro y mejor tolerado permitirá que el trasplante de HSC se extienda a un conjunto más amplio de pacientes. Esta perspectiva es particularmente atractiva en la era de las tecnologías modernas de edición de genes, y es fácilmente concebible que un anticuerpo anti-c-Kit más CV1mb o anti-CD47, como el régimen Hu5F9G426, permita que los trasplantes de HSC autólogos editados con genes puedan curar efectivamente la herencia. inmunodeficiencia, errores innatos del metabolismo y otras enfermedades. Además, al agotar las HSC y el linaje eritroide, dicho acondicionamiento podría resultar beneficioso para el tratamiento de pacientes con hemoglobinopatías que se sabe que son altamente resistentes al injerto hematopoyético cuando se administran regímenes convencionales.

La extensión de este enfoque al alotrasplante de HSC puede utilizar la sinergia de los reactivos anti-CD47 con las células anti-T, y para los trasplantes de haplo-HLA, los anticuerpos anti-NK para eliminar las barreras inmunes del huésped al trasplante, junto con los anticuerpos anti-c-kit para proporcionar un nicho funcional para el donante HSC. Finalmente, estos resultados sugieren una amplia aplicación terapéutica para el bloqueo de la vía CD47/SIRPα. Hasta ahora, el bloqueo de CD47 se ha aplicado en gran medida para dirigir las respuestas efectoras mieloides contra los cánceres. La sólida sinergia entre el antagonismo farmacológico de CD47 y los anticuerpos anti-c-Kit que se muestran aquí en un modelo completamente singenico proporciona una fuerte evidencia del valor del uso del bloqueo de CD47 para aumentar la capacidad de agotamiento celular de los anticuerpos terapéuticos que se dirigen a las células no malignas. El perfil terapéutico convincente que exhibieron los anticuerpos anti-c-Kit combinados con el antagonismo de CD47 al permitir un injerto robusto de HSC sugiere que dicha terapia dirigida

puede suplantar pronto las terapias tóxicas que se han utilizado durante décadas para lograr el reemplazo de HSC en pacientes con trastornos no malignos corregibles con trasplantes de TCH o HSC.

Procedimientos

5 *Expresión y purificación de proteínas.* CV-1 se expresó y purificó a partir de células *E. coli* BL21 (DE3) como se describió previamente. Para la producción de CV1mb, la secuencia de codificación CV1mb se clonó en el marco con una secuencia líder GP67 N-terminal y una etiqueta de histidina 8x C-terminal en el vector de expresión de baculovirus pAcGP67. El baculovirus CV1mb recombinante se preparó en células Sf9 y proteína CV1mb  
10 expresada por infección de células Hi5. 60 horas después de la infección, el CV1mb secretado se purificó del medio de cultivo mediante cromatografía de Ni-NTA. La endotoxina se eliminó mediante lavados de columna con Triton X-114 como se describió previamente. Las proteínas purificadas se desalaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se pasaron a través de un filtro estéril de 0,22 µM.

15 *Producción y purificación de fragmentos ACK2 F [ab].* El anticuerpo ACK2 intacto se digirió usando papaína inmovilizada (Thermo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos ACK2 y Fc no digeridos se eliminaron por paso de la mezcla de reacción sobre una columna de proteína A, seguido de cromatografía de intercambio iónico con una columna monoQ. Los fragmentos Fab purificados se desalaron en PBS y se filtraron con un filtro de 0,22 µM.

20 *Ratones.* Los ratones utilizados fueron ratones CD45.1, CD45.2 o CD45.1/CD45.2 C57Bl/Ka o C57Bl/Ka.CD90.1 distinguibles congénitamente de 8-12 semanas de edad, Rag2<sup>-/-</sup>cy<sup>-/-</sup> ratones o Fcγ1<sup>-/-</sup> ratones. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Internacional de Cuidado y Uso de Animales. Las cepas de ratones fueron criadas y mantenidas en el Centro de Investigación de Animales de la Universidad de Stanford.

25 *Ensayos de fagocitosis.* Los macrófagos humanos se obtuvieron por diferenciación de monocitos de sangre periférica humana y se realizó la fagocitosis con células de cáncer de colon GFP + DLD-1 como se describió previamente. Brevemente, se cultivaron 50,000 macrófagos y 100,000 células GFP + DLD-1 por pocillo de una placa de 96 pocillos y se incubaron con los tratamientos dados en IMDM sin suero a 37 ° C durante dos horas. Las mezclas celulares se lavaron con AutoMACS Running Buffer (Miltenyi) y se tificaron con anti-CD45 (BioLegend) para marcar los macrófagos y DAPI (Sigma) para evaluar la viabilidad celular. La fagocitosis se determinó por citometría de flujo como el porcentaje de macrófagos GFP + (células CD45 +) con un LSRFortessa. Los datos de citometría de flujo se analizaron usando FlowJo y se trazaron en Prism 6 después de la normalización como el porcentaje de fagocitosis máxima. La significación estadística se determinó en Prism por ANOVA de dos vías con corrección para comparaciones múltiples.

30 *Análisis de recuento sanguíneo completo.* 20Se recogió ul de sangre completa por ratón a través de la vena de la cola. Se realizaron recuentos sanguíneos completos utilizando el analizador hematológico veterinario Heska Hematruue.

40 *Preparación de células sanguíneas periféricas para citometría de flujo.* Se recogieron aproximadamente 100 ul de sangre completa a través de la vena de la cola. La sangre se incubó en dextrano al 2% en PBS durante 45 minutos a 37 ° C. El sobrenadante se extrajo y se lisó en tampón de lisis ACK durante 7 minutos en hielo.

45 *Preparación de células de médula ósea.* Los ratones fueron sacrificados y se recogieron fémures y tibias. Los huesos se trituraron en PBS suplementado con 2% de FBS inactivado por calor. Las células se filtraron a través de un filtro de 70 µm (Falcon). Las células de la médula ósea se lisaron en tampón de lisis ACK durante 7 minutos en hielo. Las células se filtraron a través de un filtro de 70 µm (Falcon) y luego se contaron en un contador de células automatizado Countess (Invitrogen).

50 *Aislamiento celular negativo de linaje de la médula ósea para trasplante.* Se sacrificaron los ratones y se recogieron fémures, tibias, húmero y huesos de coxa. Los huesos se trituraron en PBS suplementado con 2% de FBS inactivado por calor. Las células se filtraron a través de un filtro de 70 µm (Falcon). Las células de la médula ósea se lisaron en tampón de lisis ACK durante 7 minutos en hielo. Las células se filtraron a través de un filtro de 70 µm (Falcon) y luego se contaron en un contador de células automatizado Countess (Invitrogen). Los agotamientos de las células de linaje se realizaron usando kits de agotamiento de células de linaje Miltenyi de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

55 *Preparación de bazo y células de timo para tinción y análisis.* Los bazos y el tomillo se machacaron directamente en un filtro de 70 µm con el émbolo de una jeringa de 3 ml. Las células se lisaron en tampón de lisis ACK durante 7 minutos en hielo. Las células se filtraron a través de un filtro de 70 µm (Falcon) y luego se contaron en un contador de células automatizado Countess (Invitrogen).

60 *Citometría de flujo.* Todas las tinciones se realizaron en FBS al 2% durante 20-45 minutos en hielo. Las células se tificaron con diluciones óptimas de anticuerpos ebioscience. Los reactivos utilizados fueron: Mac-1 PE-Cy7  
65

(M1/70), Mac- 1 APC-Cy5 (M1/70), Mac-1 BV421 (M1/70), Mac-1 PE (M1/70), Gr- 1 PE (RB6-8C5), GR-1 FITC (RB6-8C5), GR-1 BV421 (RB6-8C5), GR-1 PE (RB6-8C5), CD19 PE (ebio103), CD3 APC-Cy7 (17A2 ), CD45.1 APC (A20), CD45.1 BV421 (A20), CD45.1 APC (A20), CD45.2 APC (104), CD45.2 FITC 331 (104), CD45.2 BV421 (104), B220 PE-Cy7 (RA3-6B2), B220 PE (RA3-6B2), B220 BV421 (RA3-6B2), NK1.1 FITC (PK136), Nk1.1 Pe-Cy7 (PK136), TCR $\beta$  APC (H57- 597), Thy1.1 Pe-Cy7 (HISS1), CD4 PE (GK1.5), CD4 BV421 (GK1.5), CD8a PE (53-6.7), CD8a BV421 (53-6.7), SCA1 Pe-Cy7 ( D7), CD117 APC-Cy7 (2B8), CD117 APC (2B8), CD150 BV421 (TC15-12 F 12.2), CD135 APC (A2F10), CD34 FITC (RAM34), CD16/32 PE (93), CD34, CD127 BV421 (A7R34), CD3 PE (17A2), CD3 BV421 (17A2), CD5 PE (53-7.3), CD5 BV421 (53-7.3), Ter119 PE (TER119), Ter119 BV421 (TER119). El yoduro de propidio se utilizó para distinguir entre células vivas/muertas. Las células se analizaron en BD LSRII en el Stanford Shared FACS Facility. Los datos se analizaron usando FlowJo 9.5 (Tree Star). La significación estadística se determinó en Prism por ANOVA de dos vías con corrección para comparaciones múltiples.

*Transplante de médula ósea.* Los ratones recibieron inyecciones retroorbitales de células de médula ósea con linaje negativo o de médula ósea entera para ensayos de trasplante competitivos. Las células se suspendieron en 100  $\mu$ l PBS.

*Histología de la médula ósea.* Los fémures se diseccionaron y fijaron en formol tamponado al 10% durante la noche. Los huesos se descalcificaron posteriormente usando Immunocal, un tampón de descalcificación basado en ácido fórmico. La incrustación y el seccionamiento de parafina fue realizada por el Laboratorio Histo-Tec.

## Ejemplo 2

### Combinación de bloqueo de CD47 y agonismo de CD137 en acondicionamiento

El anticuerpo anti-c-Kit ACK2 combinado con reactivos de bloqueo CD47 permite el quimerismo de granulocitos en receptores inmunocompetentes. Se muestra en la Figura 8, la frecuencia de los granulocitos Mac-1 + Gr-1 + y CD19 derivados del donante<sup>+</sup> Las células B en la sangre periférica 8 semanas después del trasplante en receptores tratados con ACK2 y los reactivos dirigidos a CD47 indicados en comparación con los ratones no tratados.

Los ratones F1 (CD45.1XCD45.2) fueron tratados con 500  $\mu$ g de un anticuerpo monoclonal anti-CD117 (ACK2) administrado retroorbitalmente en conjunción con 500  $\mu$ g de un anticuerpo monoclonal anti-cd47 (MIAP410) el día 0. Posteriormente, los ratones tratado con 500  $\mu$ g de anti-CD47 (MIAP410) en los días 1, 2, 3 y 4 posteriores a la inyección inicial de anti-CD117 (ACK2). El día 1 a los ratones se les dieron 500  $\mu$ g de un anticuerpo monoclonal anti-CD137 (LOB12.3), y el día 2 a los ratones se les dieron 100  $\mu$ g de LOB12.3. El día 6, 7 y 8 ratones recibieron  $1 \times 10^6$  el linaje agotó las células de médula ósea CD45.2 que están enriquecidas para células madre hematopoyéticas y células progenitoras. El quimerismo se evaluó a partir de las 4 semanas después del trasplante (Figura 12). Los ratones tratados con este régimen se compararon con ratones de control que recibieron (i) ningún acondicionamiento; (ii) anti-CD117 solo; (iii) anti-CD47 solo y (iv) anti-CD47 + anti-CD117 siguiendo el mismo protocolo.

Quimerismo de granulocitos de donantes BA (CD45.2) tratado en F1 letalmente irradiado (CD45.1XCD45.2). Los ratones BA (CD45.2) fueron tratados con el régimen descrito anteriormente. El día seis del régimen de tratamiento, estos ratones fueron sacrificados y las células de médula ósea entera se aislaron de sus fémures.  $1 \times 10^6$  células de médula ósea entera de ratones tratados se cotransplantaron con  $1 \times 10^6$  células de médula ósea completa aisladas de ratones HZ no tratados (CD45.1) en ratones hospedadores F1 irradiados letalmente (CD45.1XCD45.2). El quimerismo de granulocitos del donante se evaluó a las cuatro semanas después del trasplante. Tanto el tratamiento anti-CD47 + anti-CD117 como la triple terapia (anti-CD137 + anti-CD47 + anti-CD117) muestran un quimerismo de granulocitos de donantes BA (CD45.2) esencialmente cero, lo que implica la depleción total de las células madre hematopoyéticas en el inicio animales BA tratados (Figura 13).

BA (CD45.2) Quimerismo de granulocitos en animales tratados con F1 (CD45.2 X CD45.1) a las cuatro semanas después del trasplante. Los ratones F1 (CD45.2 X CD45.1) recibieron los regímenes de anticuerpos indicados (Figura 14A) y luego recibieron tres trasplantes negativos de linaje. El quimerismo de granulocitos del donante se midió cuatro semanas después del trasplante mediante clasificación celular activada por fluorescencia. Los ratones tratados con triple terapia (anti-CD137 + anti-CD47 + anti-CD117) tuvieron un aumento de más de cuatro veces en el quimerismo de granulocitos del donante en relación con los ratones tratados con anti-CD47 + anti-CD117 solo (valor de  $p < 0,0001$ ).

Anti-CD137 aumenta enormemente la eficacia de anti-CD47 en el contexto del trasplante. BA (CD45.2) Quimerismo de células B en animales tratados con F1 (CD45.2 X CD45.1) a las cuatro semanas después del trasplante (Figura 14B). Los ratones F1 (CD45.2 X CD45.1) recibieron los regímenes de anticuerpos indicados y luego recibieron tres trasplantes negativos de linaje. El quimerismo de la célula B del donante se midió cuatro semanas después del trasplante mediante clasificación celular activada por fluorescencia. Los ratones tratados con triple terapia (anti-CD137 + anti-CD47 + anti-CD117) tuvieron un aumento de más de ocho veces en el quimerismo

de las células B del donante en relación con los ratones tratados con anti-CD47 + anti-CD117 solo (valor  $p = .0028$ ). Anti-CD137 aumenta enormemente la eficacia de anti-CD47 en el contexto del trasplante.

### Ejemplo 3

5 El injerto con éxito de células madre hematopoyéticas en receptores inmunocompetentes usando solo anticuerpos anti-CD117 y bloqueo de CD47 como acondicionamiento

10 El trasplante de médula ósea (TMO) es una terapia eficaz para muchos tumores malignos hematológicos incurables y trastornos que afectan la producción de células hematopoyéticas, incluidas las anemias potencialmente mortales y los síndromes de inmunodeficiencia. En un trasplante exitoso, se debe lograr la eliminación de nichos de médula ósea para que las células madre hematopoyéticas (HSC) del donante se injerten. Los procedimientos actuales para liberar espacio en el nicho dependen de la radiación y/o la quimioterapia, que pueden impartir efectos adversos tóxicos que limitan en gran medida la posible utilidad clínica de TMO. Por lo tanto, existe una gran necesidad clínica de regímenes de acondicionamiento más seguros. Con este fin, se ha demostrado que un anticuerpo monoclonal contra CD117 (ACK2) agota transitoriamente las HSC en ratones inmunocomprometidos y permite el injerto de células donantes. Sin embargo, este régimen ha demostrado ser ineficaz en animales inmunocompetentes.

20 La depleción de HSC por el anticuerpo CD117 puede ocurrir, en parte, a través de funciones efectoras mediadas por Fc, como la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). Por lo tanto, buscamos mejorar la actividad ADCP de los anticuerpos anti-CD117 mediante el bloqueo de la vía inhibitoria CD47-SIRP $\alpha$  "no me comas". De acuerdo con informes anteriores, encontramos que el tratamiento de ratones de tipo salvaje (C57BL/6) con ACK2 solo dio como resultado un agotamiento modesto y transitorio de las células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC). En las Figuras 15-17 se muestran los resultados.

30 Sorprendentemente, la adición del antagonista de CD47 CV1 en combinación con ACK2 dio como resultado un agotamiento rápido y prolongado de HSPC de médula ósea, así como la eliminación del nicho de médula ósea. Este agotamiento fue acompañado por reducciones profundas en los recuentos de hematocrito y leucocitos en sangre que no se observaron en ratones tratados con ACK2 solo. En apoyo del papel de los receptores Fc en el régimen de tratamiento, no se observó la depleción de las HSC en ratones que carecían de receptores Fc funcionales, ni en animales tratados con fragmentos F(ab) de altas dosis de ACK2. Finalmente, se lograron altos niveles de quimerismo de granulocitos (~70%) después de TMO en ratones que recibieron la combinación de ACK2 y CV1 en comparación con la ausencia de quimerismo en animales tratados con ACK2 solo (valor  $p < 0.0001$ ). Nuestros resultados muestran que los agentes biológicos específicos tienen el potencial de reemplazar las terapias de preacondicionamiento tóxicas que actualmente se utilizan clínicamente. Esto puede conducir a regímenes preparativos más seguros, lo que permitirá que el TMO trate una población de pacientes más amplia y un espectro más amplio de trastornos hematológicos.

40 Figura 15. Cuantificación del número total de células madre hematopoyéticas (HSC) a largo plazo según el análisis FACS. Los ratones de tipo salvaje se trataron con 500  $\mu$ g de anticuerpo anti-CD117 ACK2, antagonista de CD47 CV1 (500  $\mu$ g administrados diariamente), así como una combinación de los dos. La depleción completa de HSC se observa en los ratones tratados con ACK2 + CV1. B. La depleción funcional de las HSC se observa en ratones tratados con ACK2 + CV1, pero los ratones tratados con ACK2 solo retienen HSC trasplantables. Para demostrar este agotamiento, la médula ósea entera de ratones tratados se trasplantó en receptores irradiados letalmente. Se proporcionó médula ósea a los receptores de rescate

50 Figura 16, A. Análisis de CBC de ratones después de 8 días de tratamiento con ACK2 (dosis única IV de 500UG), CV1mb (IP inyectada 500ug diariamente) y ACK2 + CV1mb en comparación con los controles no tratados. La combinación de ACK2 y CV1mb condujo a una pérdida severa de hematocrito, hemoglobina y glóbulos rojos. También se observó una ligera pérdida de WBC. B Cuantificación del análisis FACS que representa la depleción de las HSC fenotípicas, así como de los progenitores mieloides (CMP - progenitor mielóide común, GMP - progenitor de macrófagos granulocitos, MEP - progenitor eritroide megacariota) 9 días después del tratamiento combinado. C. La depleción funcional de HSC se observa en ratones tratados con ACK2 + CV1mb pero los ratones tratados con ACK2 solo retienen HSC trasplantables. Para demostrar este agotamiento, la médula ósea entera de ratones tratados se trasplantó en receptores irradiados letalmente. Se dio soporte a la médula ósea para los receptores de rescate. D. Tinción con H&E de una sección transversal del fémur que representa una pérdida extensa de la celularidad de la médula ósea en ratones tratados con ACK2 + CV1mb 8 días después del tratamiento en comparación con ACK2 solo.

60 Figura 17. A. Cuantificación del quimerismo de granulocitos evaluado por análisis FACS. Se observó un quimerismo de granulocitos de ~ 70% 3-4 semanas después del trasplante de células de médula ósea en ratones tratados con ACK2 + CV1mb. Se administraron tres trasplantes consecutivos de médula ósea 6 días después del tratamiento con ACK2. El quimerismo fue mínimo en ratones tratados con ACK2 solo. B. Se observó quimerismo de células B en ratones tratados con ACK2 + CV1mb, mediante análisis FACS de sangre periférica.

Debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología particular, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales, y los reactivos descritos, ya que tales pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada solo por las reivindicaciones adjuntas

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "a", "y" y "el" incluyen referentes plurales 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 al "cultivo" incluye referencia a uno o más cultivos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. Todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la materia al que pertenece la presente invención, a menos que se indique claramente lo contrario.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un agente que bloquea la interacción entre CD47 y SIRP $\alpha$  para su uso en un procedimiento de injerto de células madre hematopoyéticas en un paciente humano que padece un trastorno sanguíneo genético, en donde el procedimiento comprende:
- 5 poner en contacto dicho paciente humano concomitantemente con:
- (i) un agente que se une específicamente a células madre hematopoyéticas endógenas en la médula ósea, en donde el agente es un anticuerpo monoclonal específico para CD117, y
- 10 (ii) el agente que bloquea la interacción entre CD47 y SIRP $\alpha$ , en donde el agente se selecciona de un anticuerpo anti-CD47, un polipéptido de SIRP $\alpha$  soluble o una proteína de fusión que comprende un polipéptido SIRP $\alpha$ ;
- 15 en una dosis eficaz en la ablación de células madre hematopoyéticas endógenas específicas de dicho paciente humano; e introducir células madre hematopoyéticas exógenas de fenotipo normal en dicho paciente humano.
2. El agente para el uso de la reivindicación 1, en donde el trastorno sanguíneo genético es anemia aplásica.
- 20 3. El agente para el uso de la reivindicación 1, en donde el trastorno sanguíneo genético es anemia de células falciformes.
4. El agente para el uso de la reivindicación 1, en donde el trastorno sanguíneo genético es una talasemia.
- 25 5. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el injerto se realiza en ausencia de acondicionamiento mieloablativo.
6. El agente para uso de la reivindicación 1, o de la reivindicación 5 cuando depende de la reivindicación 1, en el que el paciente humano es inmunocompetente.
- 30 7. El agente para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dichas células madre exógenas son células madre alogénicas.
8. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde las células madre exógenas son células madre autólogas modificadas genéticamente.
- 35 9. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en donde el agente que bloquea la interacción entre CD47 y SIRP $\alpha$  es un anticuerpo anti-CD47.
- 40 10. El agente para el uso de la reivindicación 9, en donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.
11. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el agente que bloquea la interacción entre CD47 y SIRP $\alpha$  es un polipéptido de SIRP $\alpha$  soluble o una proteína de fusión que comprende un polipéptido de SIRP $\alpha$ .
- 45

50

55

60

65

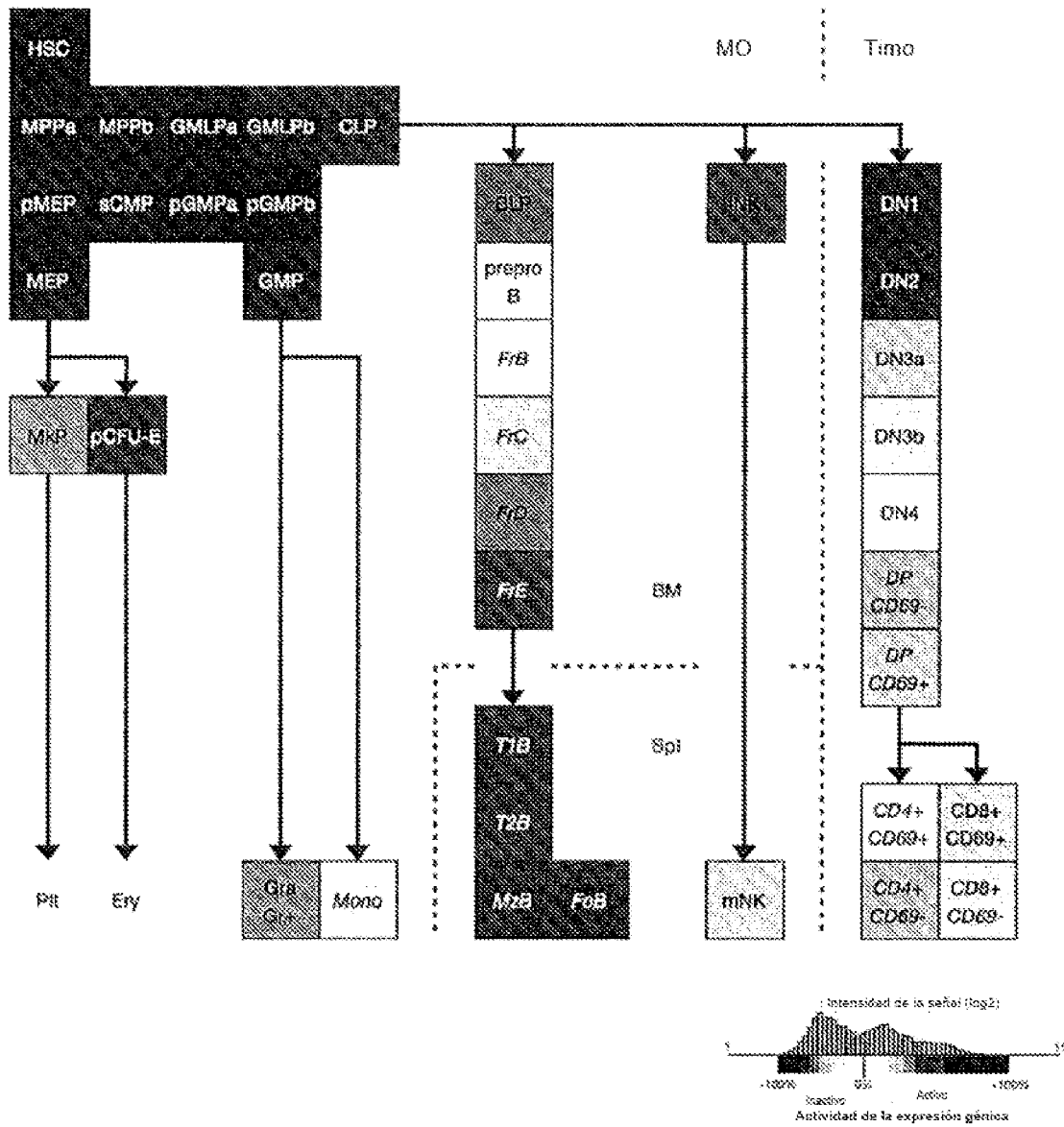


Figura 1

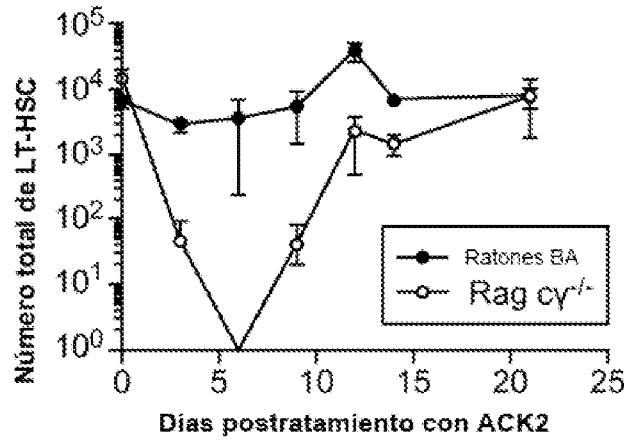


FIG. 2a

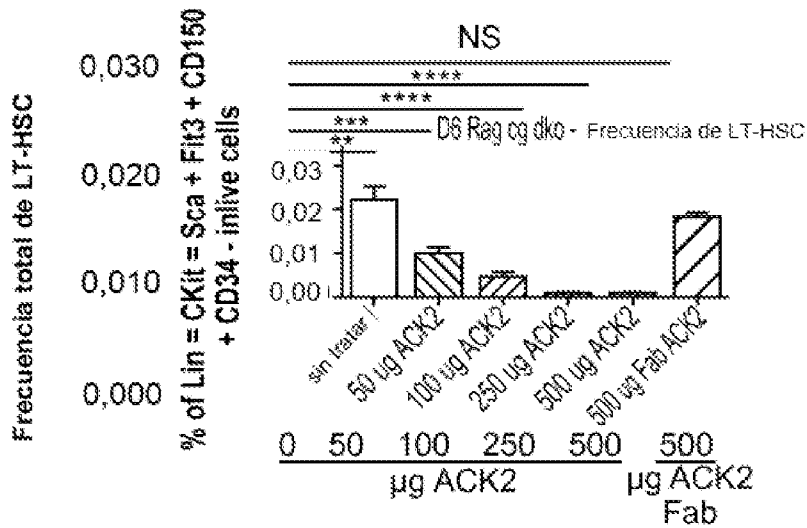


FIG. 2b

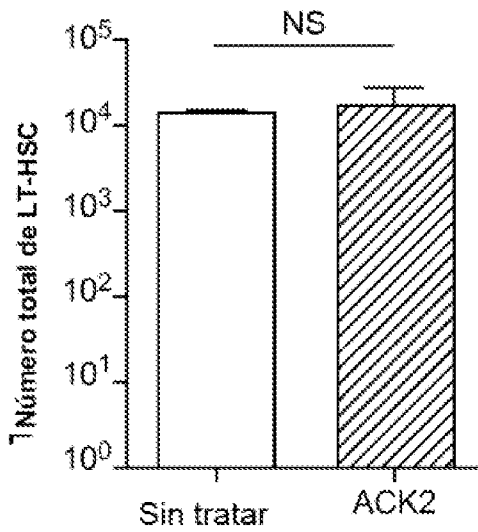


FIG. 2c

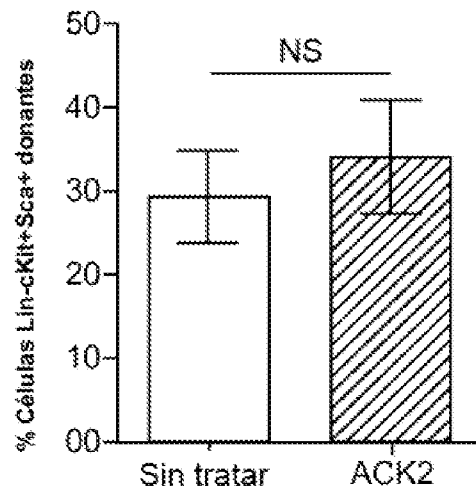


FIG. 2d

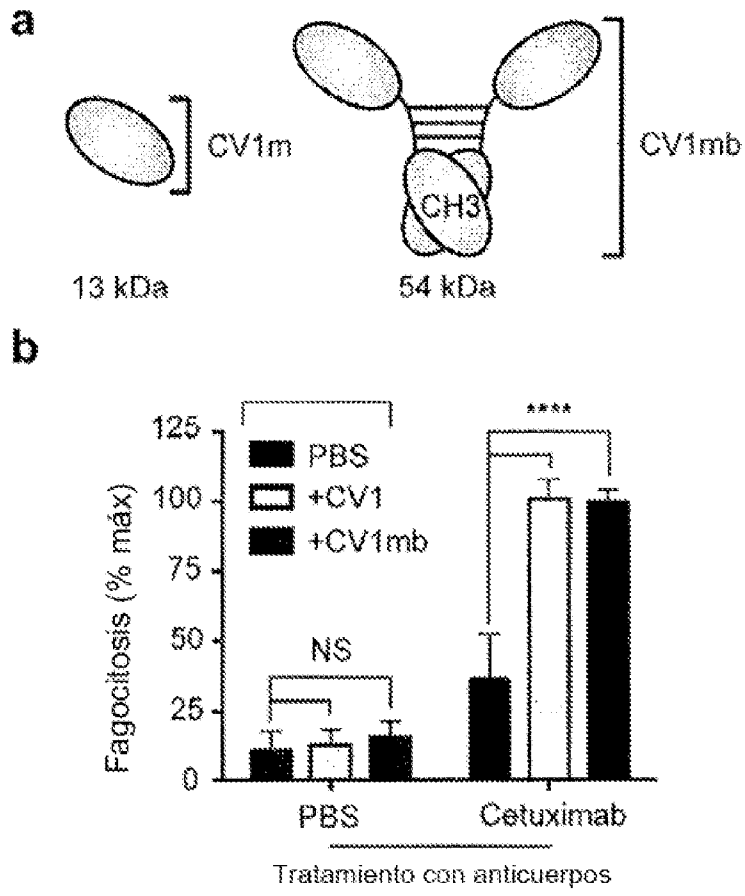


Figura 3

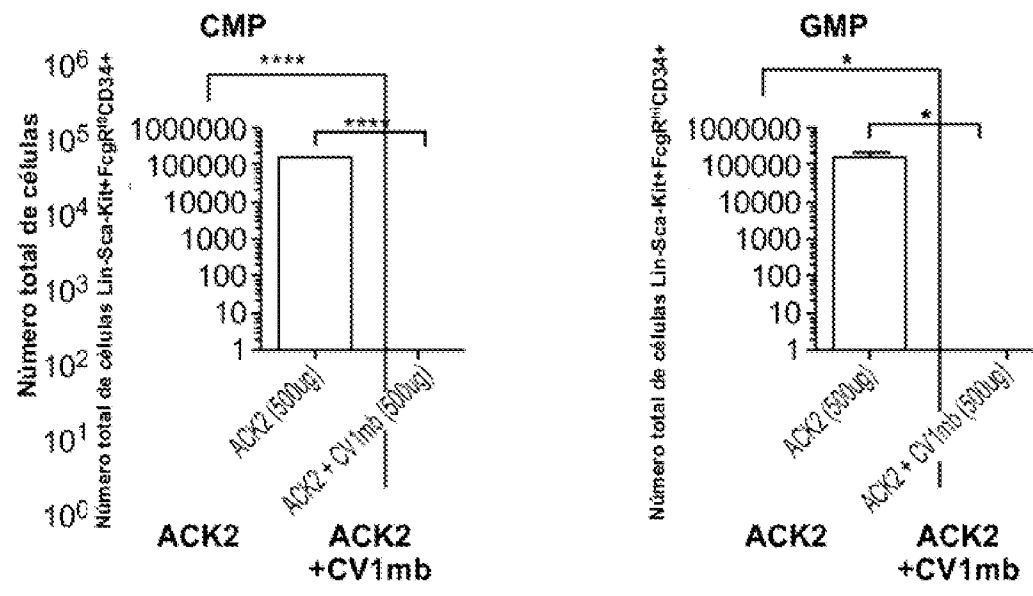
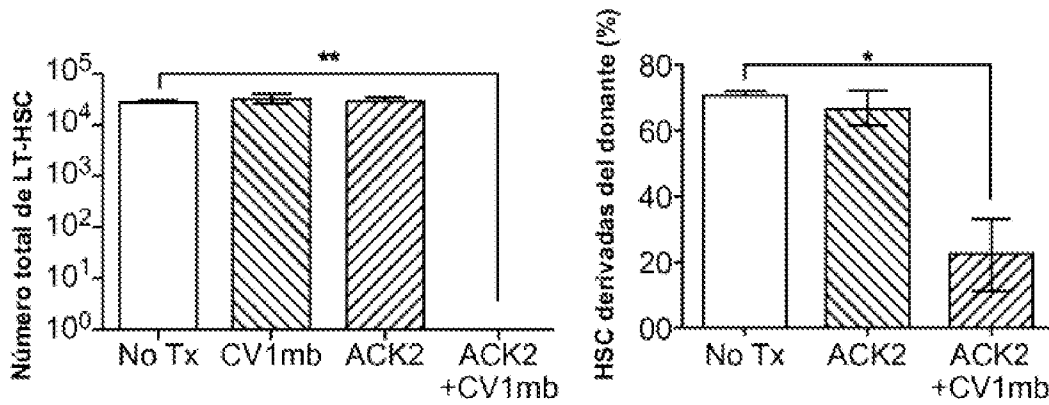


FIG. 4c

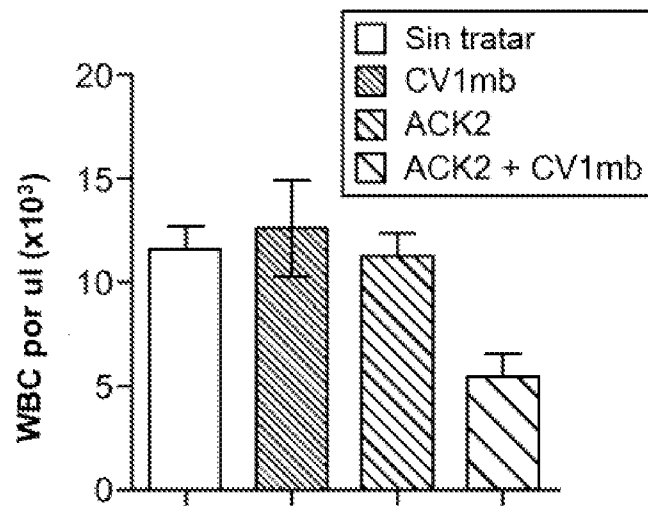
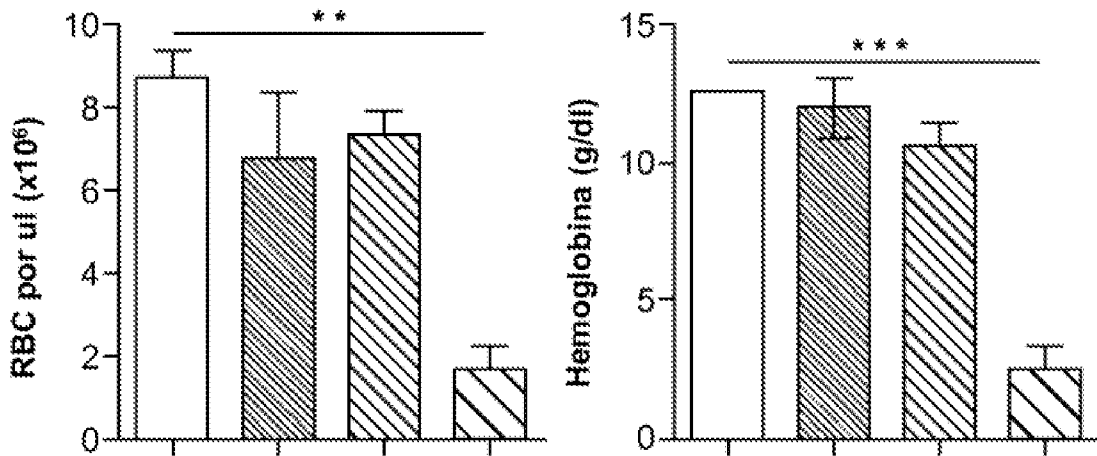


FIG. 4d

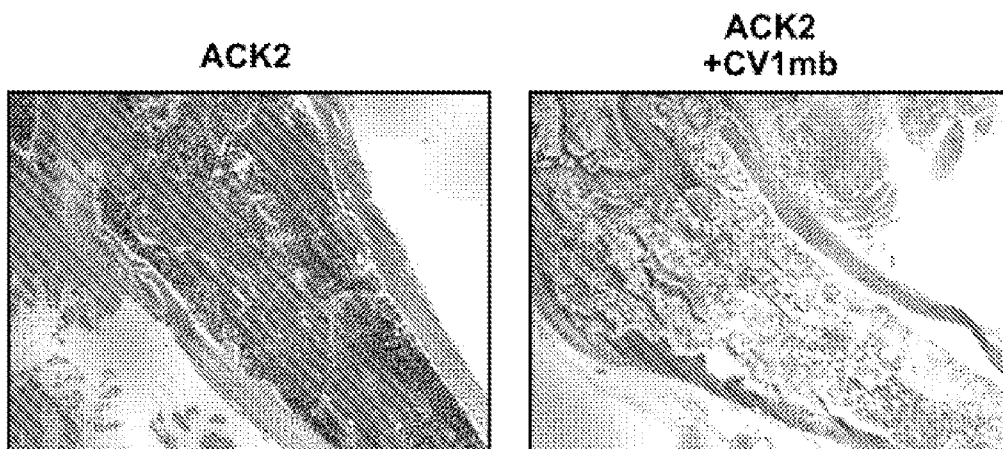


FIG. 4e

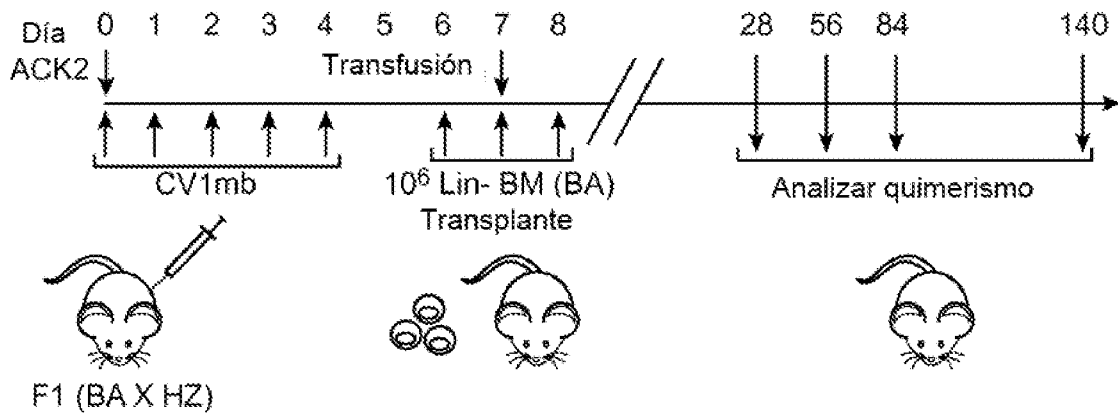


FIG. 5a

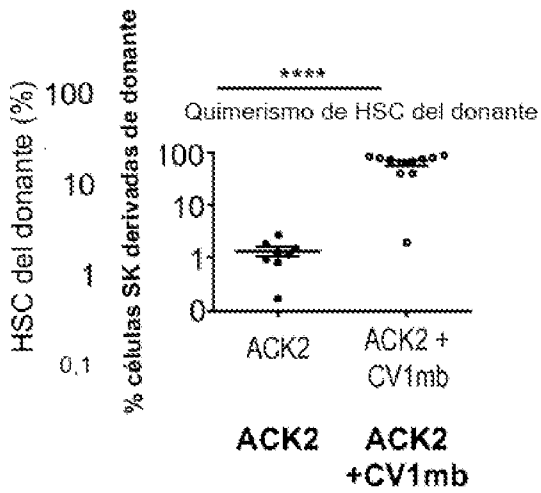


FIG. 5b

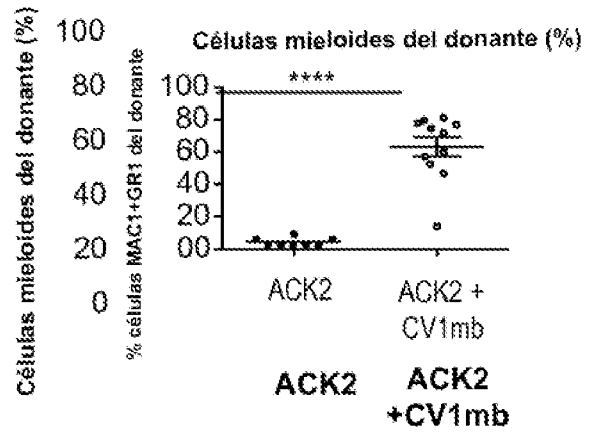


FIG. 5c

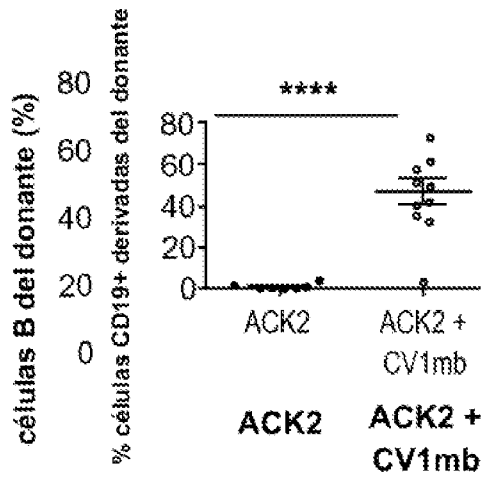


FIG. 5d

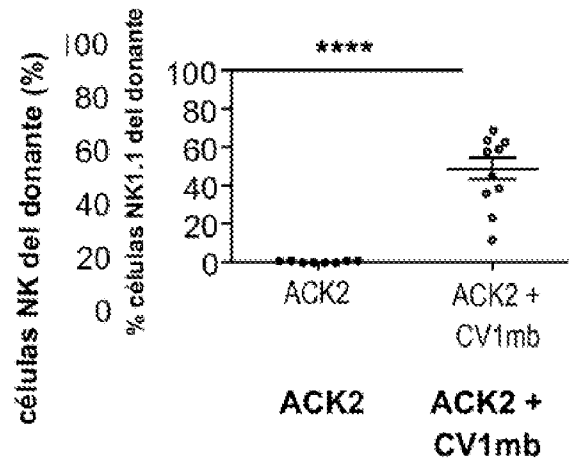


FIG. 5e

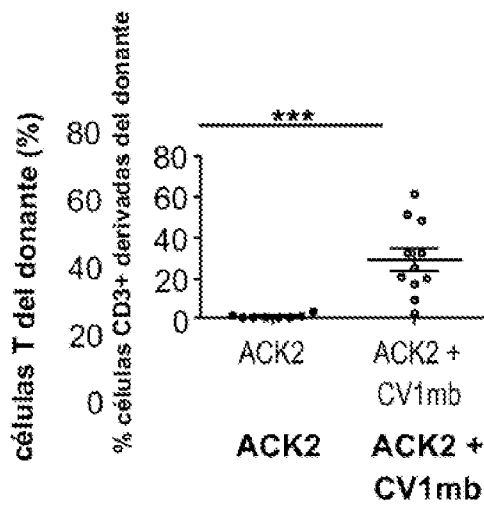


FIG. 5f

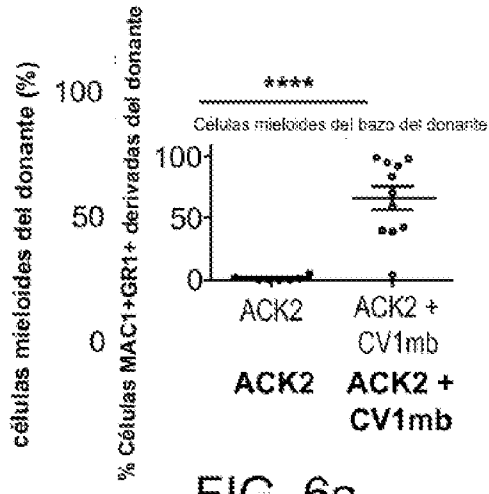


FIG. 6a

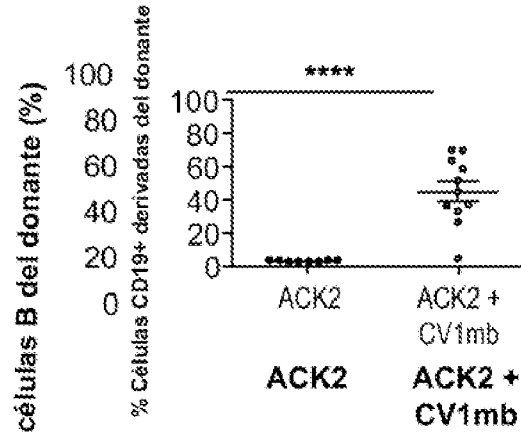


FIG. 6b

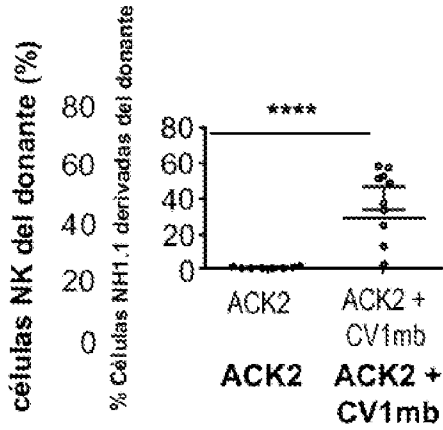


FIG. 6c

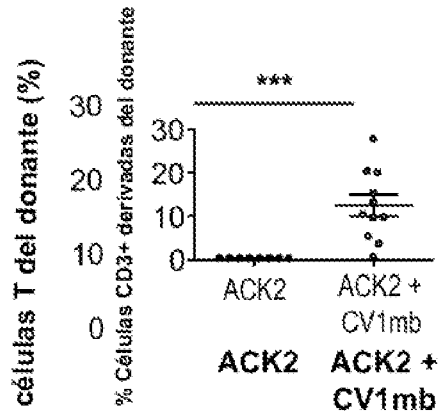


FIG. 6d

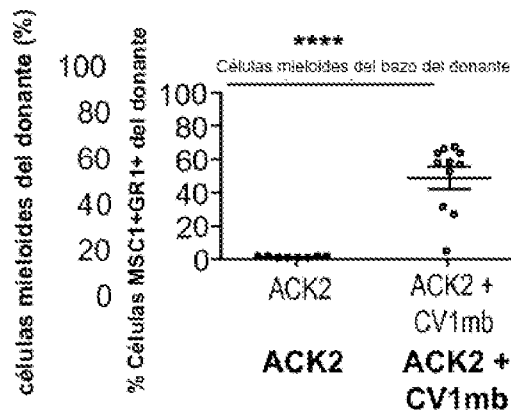


FIG. 6e

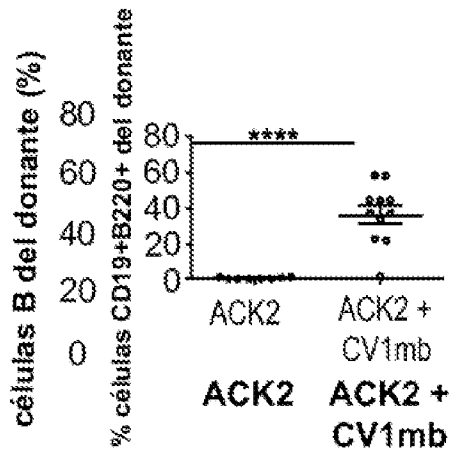


FIG. 6f

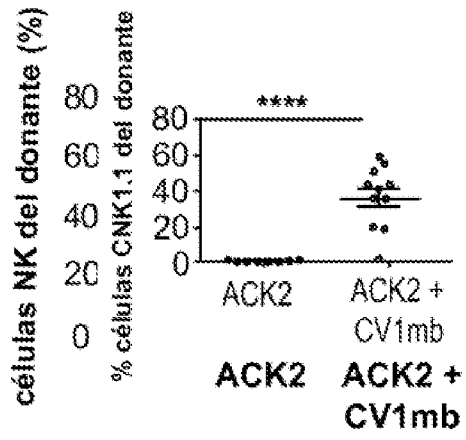


FIG. 6g

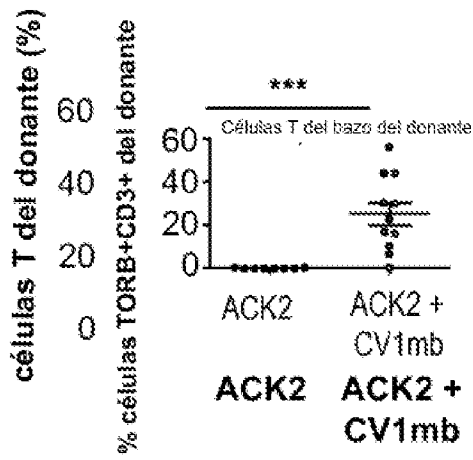


FIG. 6h

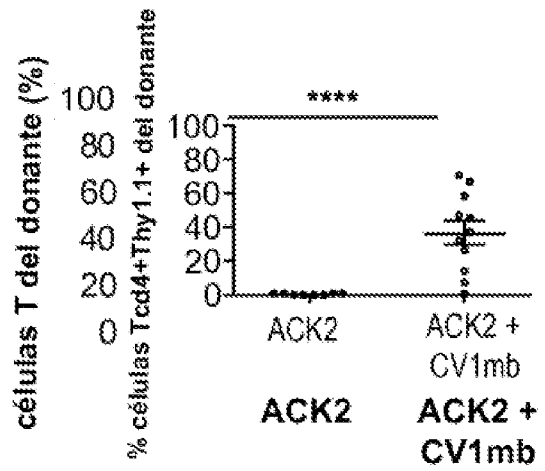


FIG. 6i

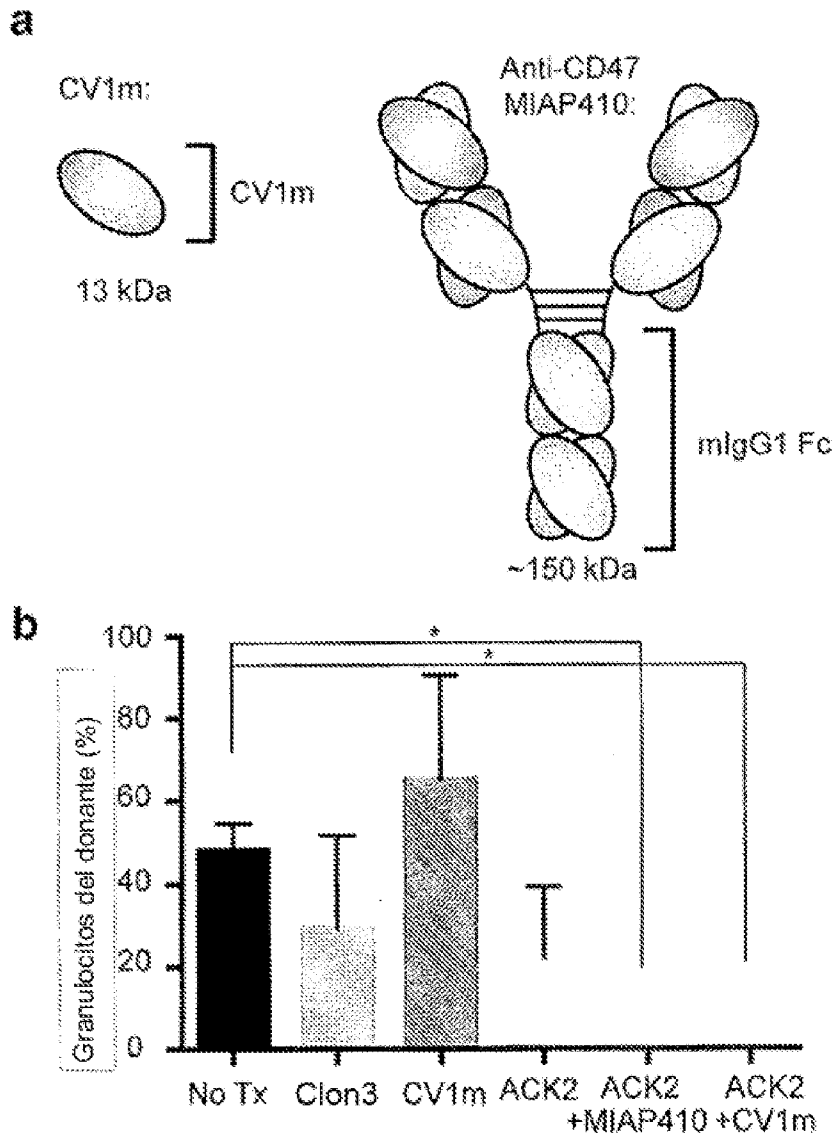


Figura 7

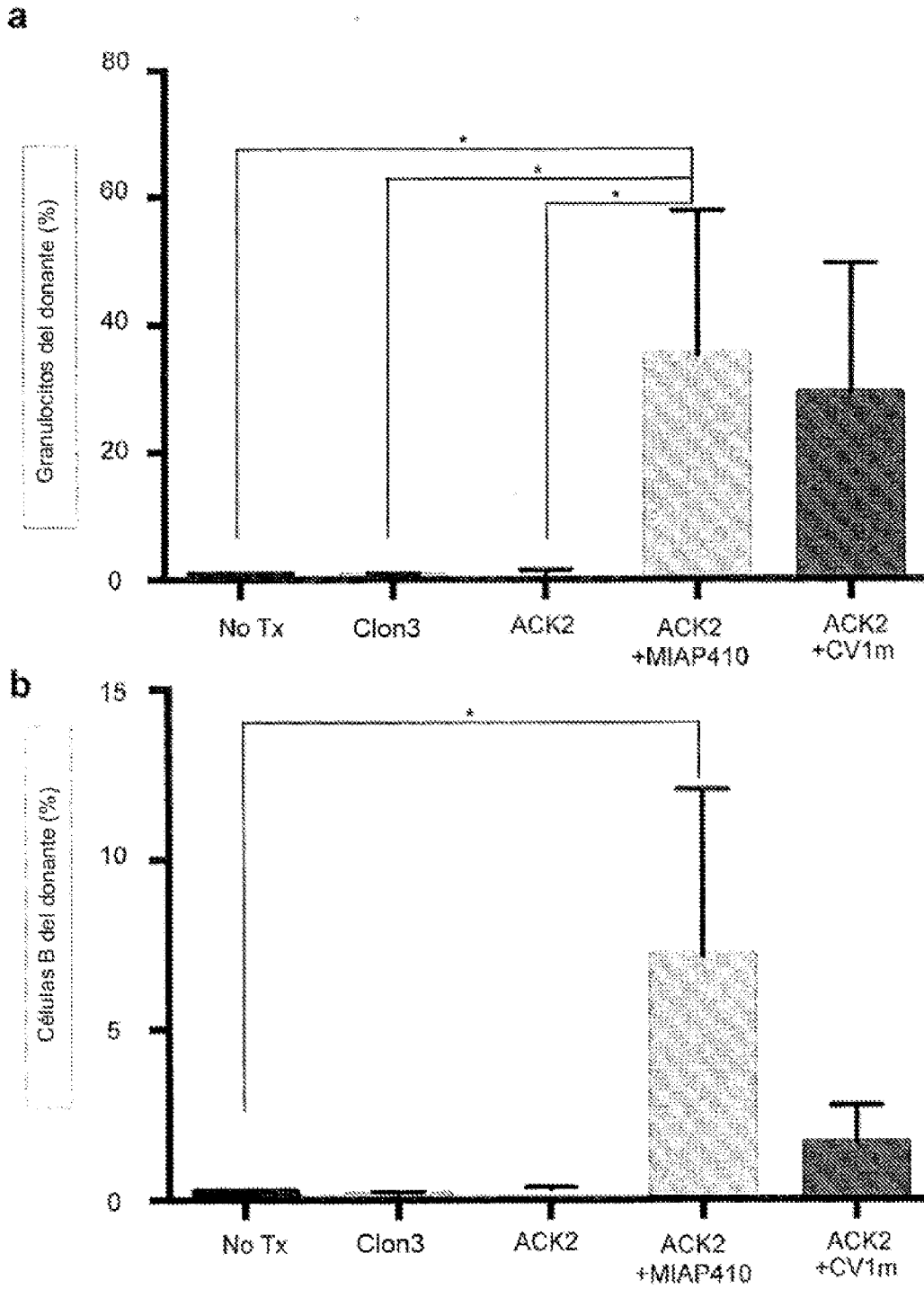
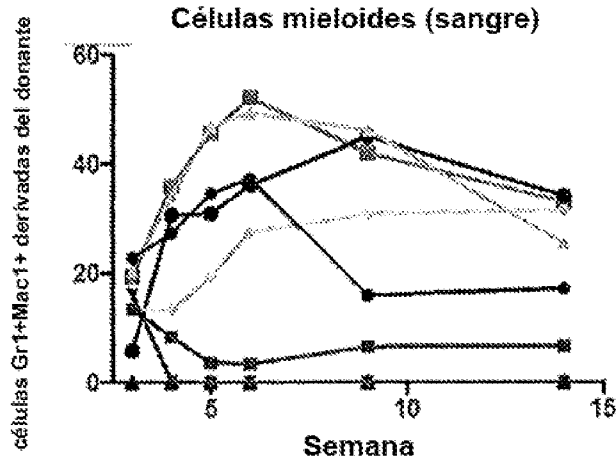


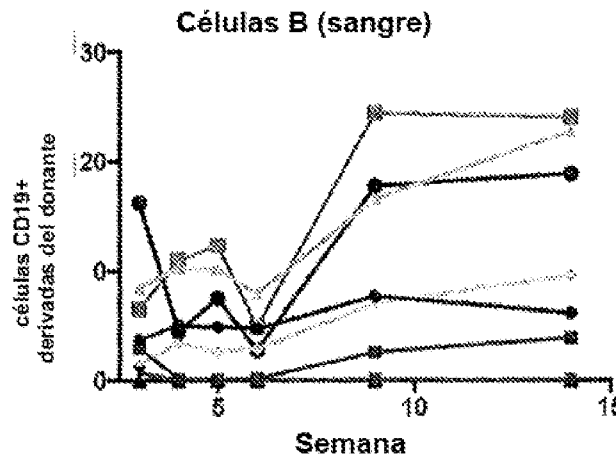
Figura 8

**Transplante alogénico de HSC  
(apareamiento erróneo de mHC-Acondicionamiento de ACK2+CV1mb)**

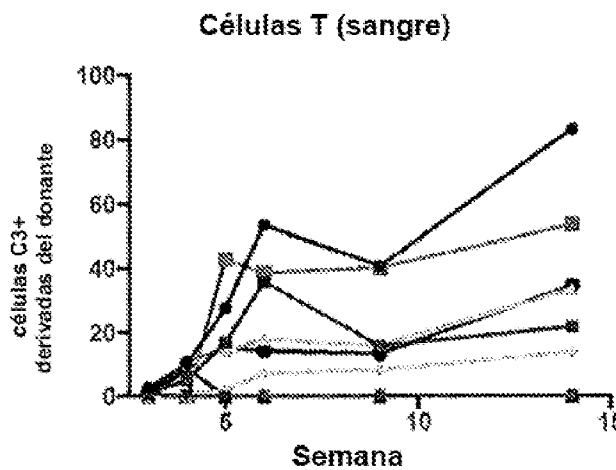
A



B



C



- Macho 1
- Macho 2
- ◇ Macho 3
- ▲ Macho 4
- ▽ Macho 5
- Hembra 1
- Hembra 2
- ▲ Hembra 3

Figura 9

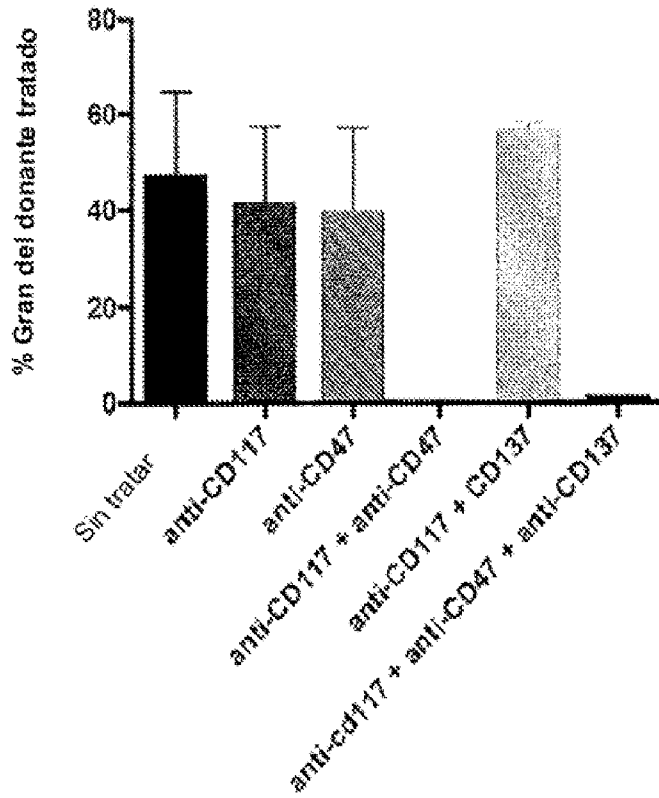


Figura 10

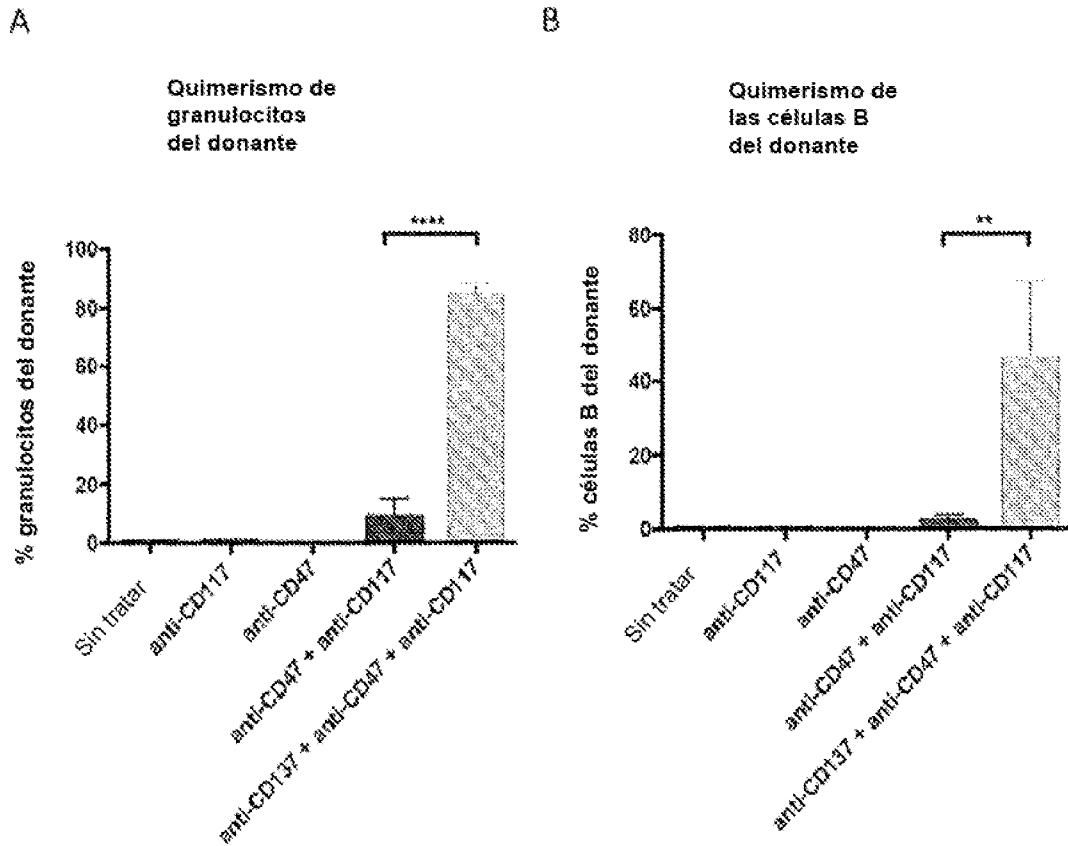


Figura 11

Transplante alogénico de HSC (apareamiento erróneo mHC, Sem 4)

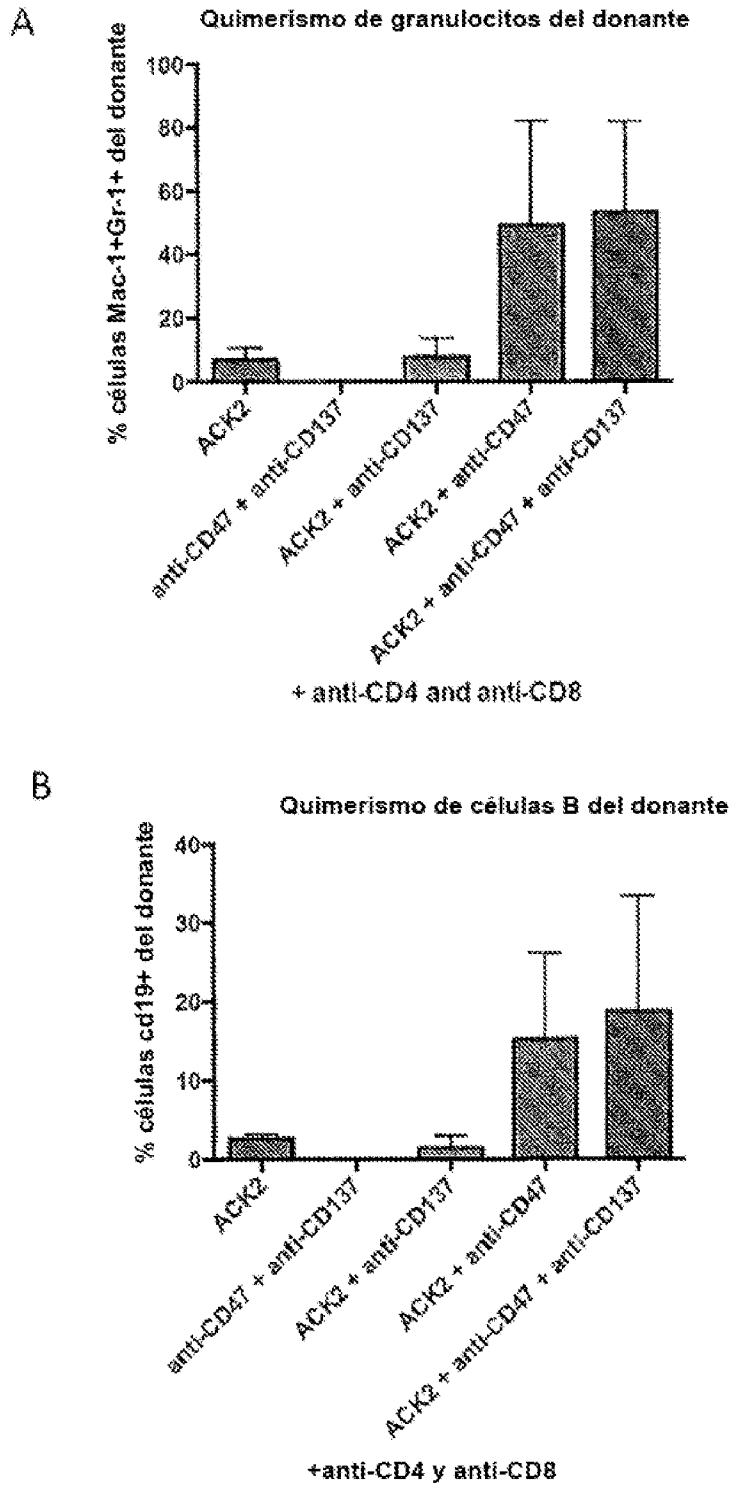


Figura 12

Transplante alogénico de HSC (haploidéntico, Sem 4)

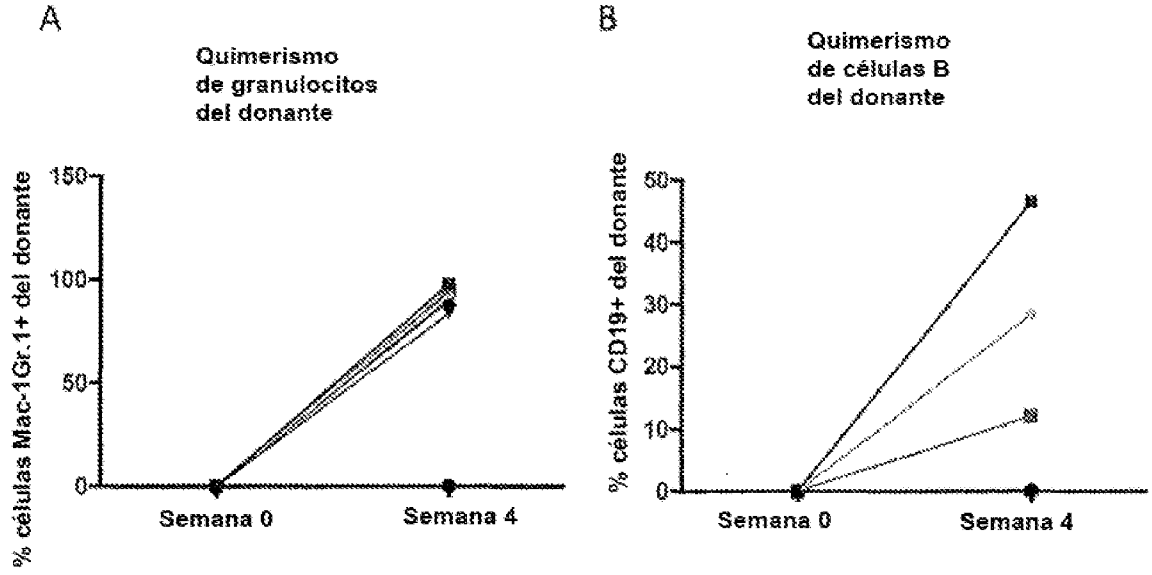


Figura 13

Transplante alogénico de HSC (apareamiento erróneo de MHC, Sem 4)

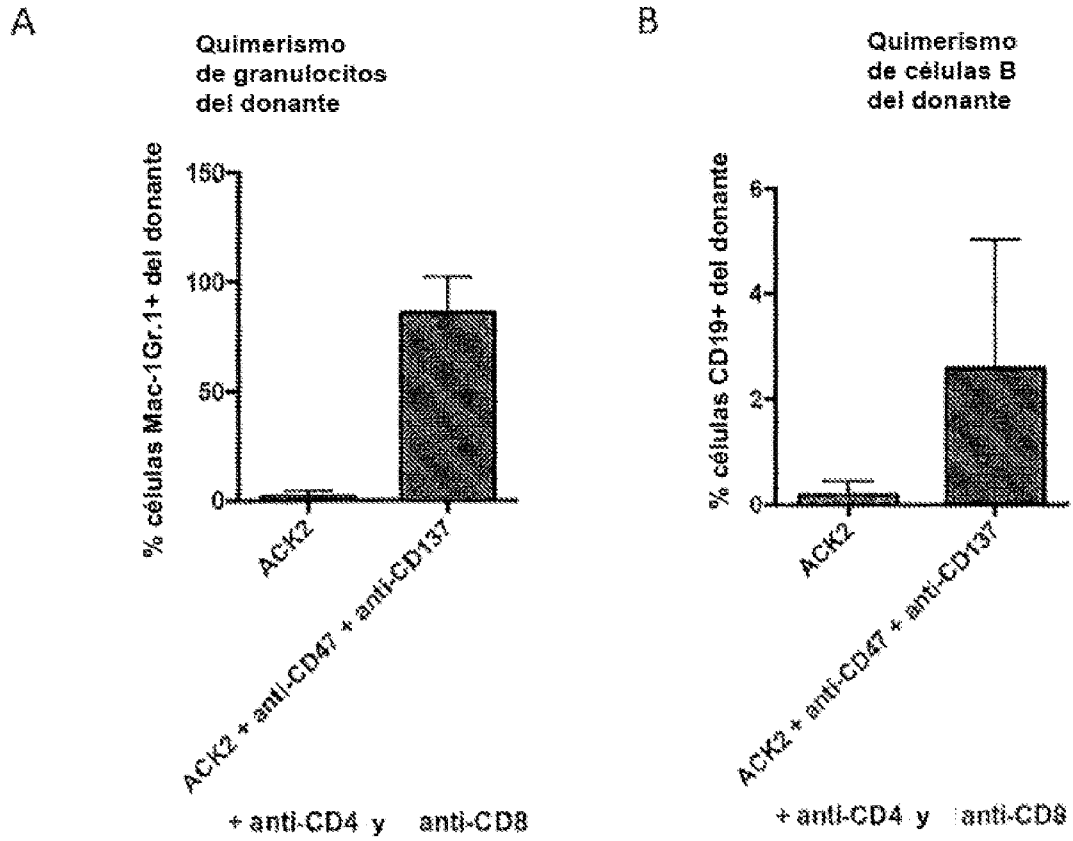


Figura 14

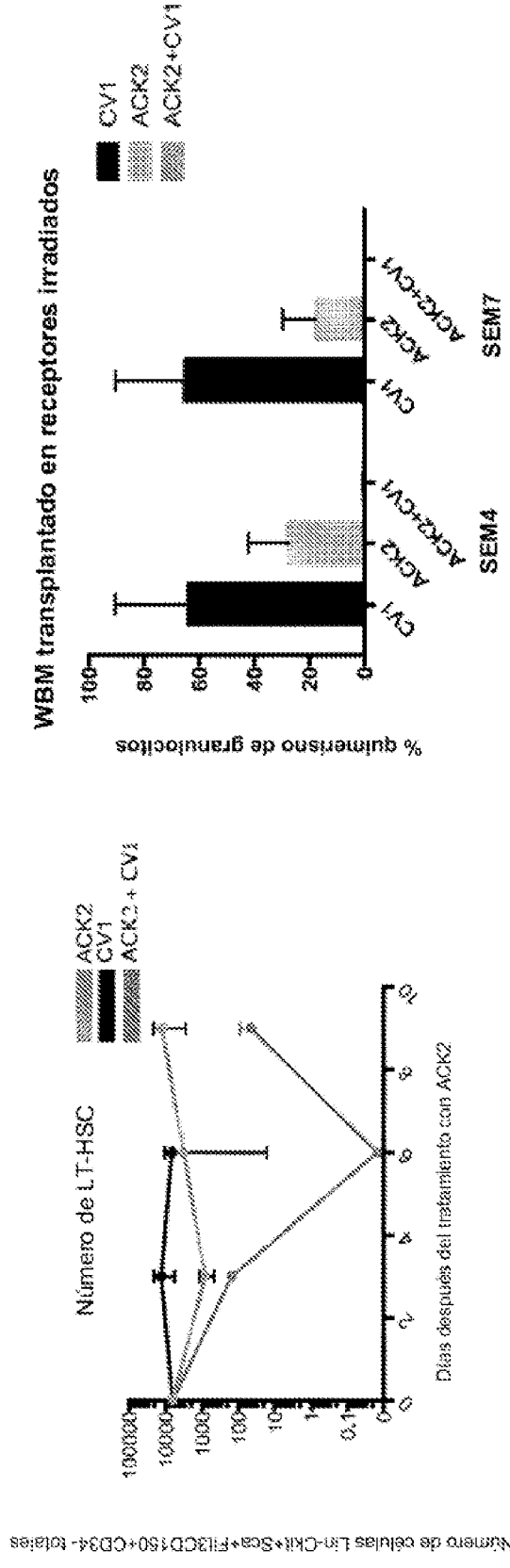


Figura 15

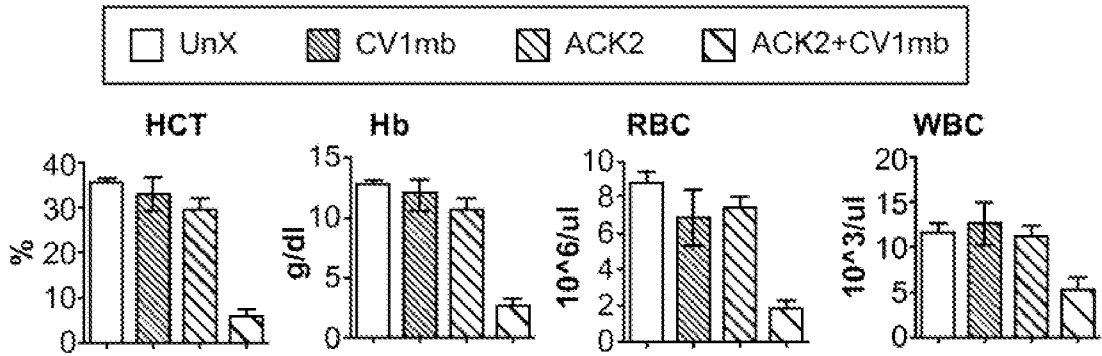


FIG. 16a

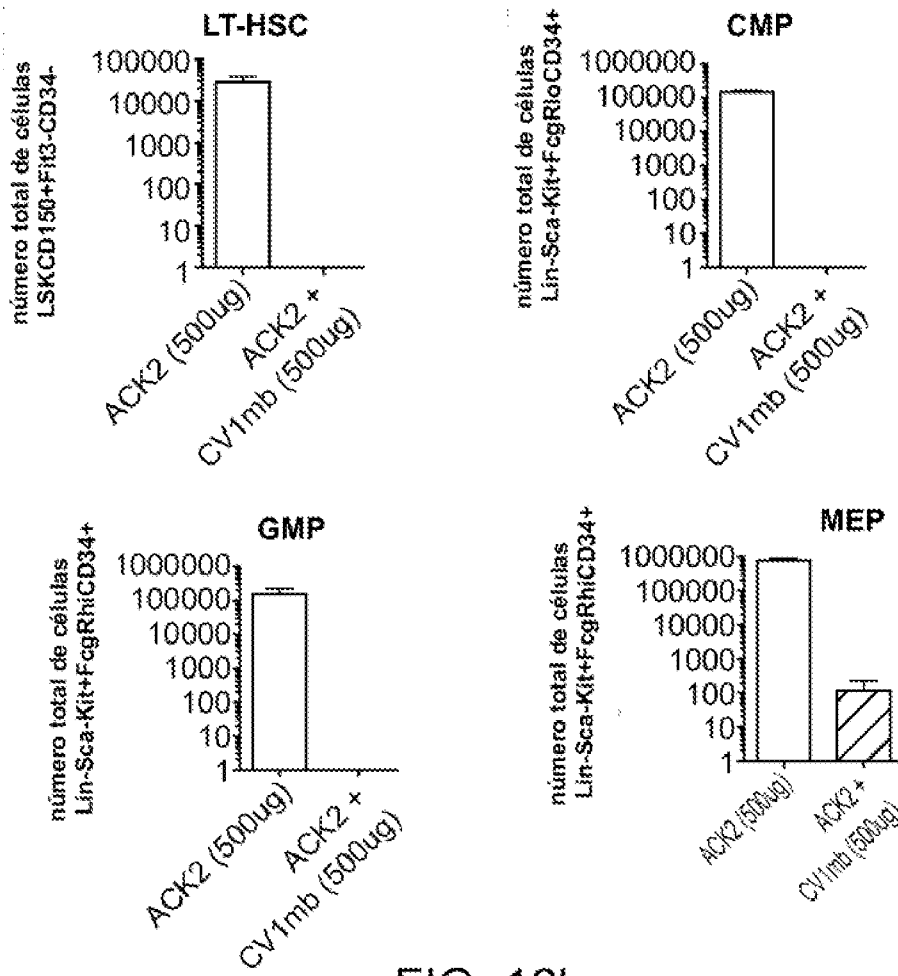


FIG. 16b

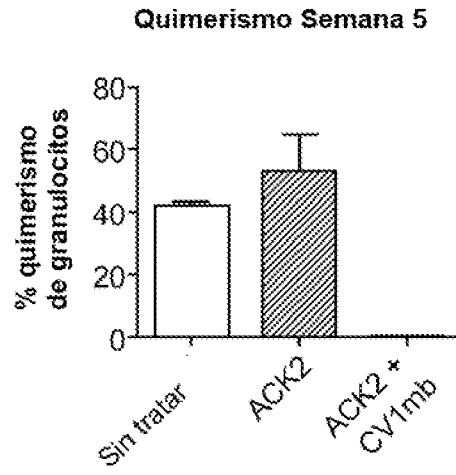


FIG. 16c

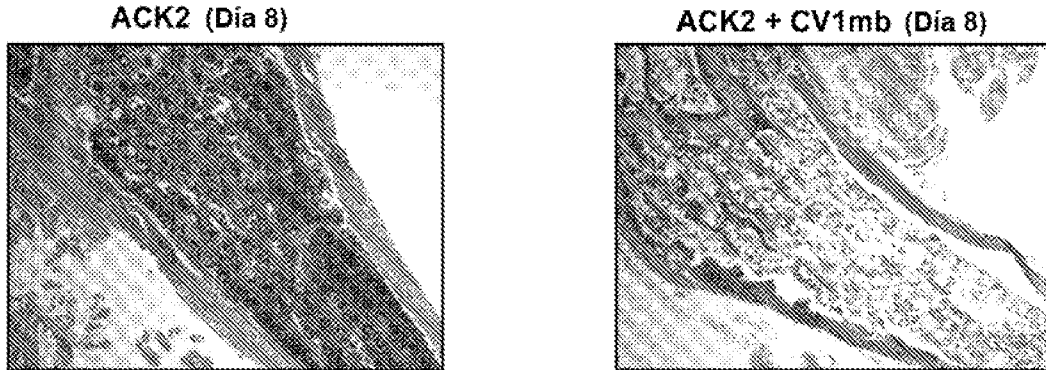


FIG. 16d

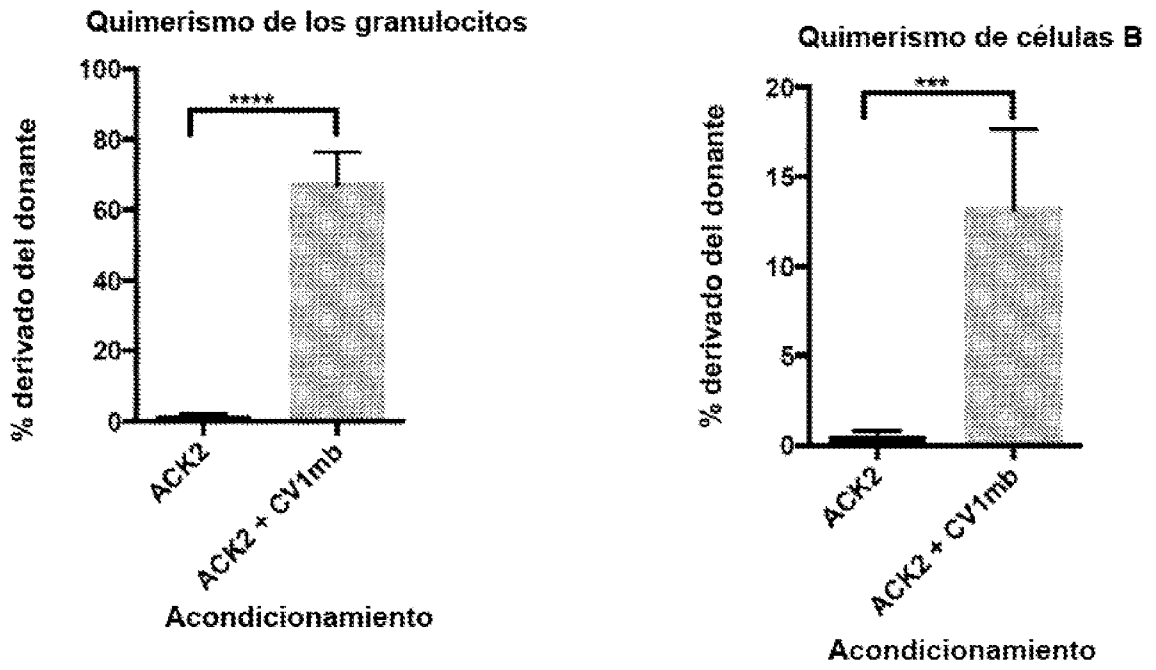


FIGURA 17