

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 894 335**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2016** **PCT/US2016/049016**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2017** **WO17035480**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2016** **E 16840215 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **27.12.2023** **EP 3341015**

54 Título: **Reducción mejorada de células objetivo con bloqueo de CD47 y un agonista coestimulador inmune**

30 Prioridad:

26.08.2015 US 201562210279 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
27.06.2024

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
Office of the General Counsel, Building 170, Third
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 894 335 T5

DESCRIPCIÓN

Reducción mejorada de células objetivo con bloqueo de CD47 y un agonista coestimulador inmune

5 La renovación de las células comienza con la inducción de un programa apoptótico u otros cambios celulares que las marcan para su eliminación, y el posterior reconocimiento de los marcadores por parte de los fagocitos, incluyendo los macrófagos, las células dendríticas y similares. Este proceso requiere una eliminación específica y selectiva de células no deseadas. La discriminación de las células sanas de las no deseadas/envejecidas/moribundas muestra marcadores o ligandos llamados señales de "cómeme", es decir, "yo alterado", que a su vez pueden ser reconocidos por receptores en los fagocitos. Las células sanas pueden mostrar señales de "no me comas" que inhiben activamente la fagocitosis; estas señales están reguladas por disminución en las células moribundas o están presentes en una conformación alterada. La proteína de superficie celular CD47 en células sanas y su participación de un receptor de fagocitos, SIRPα, constituye una señal de "no me comas" clave que puede desactivar la absorción mediada por múltiples modalidades, incluyendo la depuración de células apoptóticas y la fagocitosis mediada por FcR. El bloqueo de la participación de SIRPα mediada por CD47 en un fagocito, o la pérdida de la expresión de CD47 en ratones knockout, puede provocar la eliminación de células vivas y eritrocitos no envejecidos. Alternativamente, el bloqueo del reconocimiento de SIRPα también permite la absorción de objetivos que normalmente no se fagocitan.

20 La CD47 es una glicoproteína transmembrana ampliamente expresada con un único dominio extracelular similar a Ig y cinco regiones que abarcan la membrana. La CD47 funciona como un ligando celular para SIRPα con unión mediada a través del dominio tipo V terminal de NH₂ de SIRPα. SIRPα se expresa principalmente en células mieloides, incluyendo macrófagos, granulocitos, células dendríticas mieloides (DC), mastocitos y sus precursores, incluyendo monocitos y células madre hematopoyéticas. Los determinantes estructurales en SIRPα que median la unión de CD47 se analizan por Lee et al. (2007) J. Immunol. 179:7741-7750; Hatherley et al. (2007) J.B.C. 282:14567-75; y el papel de la dimerización cis de SIRPα en la unión de CD47 es analizado por Lee et al. (2010) J.B.C. 285: 37953-63.

30 Las células inmunes como las células T y las células NK también están reguladas por las vías de señalización, incluyendo una señal coestimuladora no específica de antígeno, que puede ser proporcionada por moléculas en células que presentan antígenos que se acoplan a receptores coestimuladores particulares en las células inmunes. La coestimulación es crucial para el desarrollo de una respuesta inmune eficaz de la inmunidad adaptativa.

35 Uno de los receptores coestimuladores mejor caracterizados expresados por las células T es el CD28, que interactúa con CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) en la membrana de las APC. El CD28 se expresa constitutivamente en casi todas las células T y es el principal receptor coestimulador de las células T vírgenes. Varios miembros de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) funcionan después de la activación inicial de las células T para mantener las respuestas de las células T o de las células NK. Los efectos de estos miembros de la familia de TNFR coestimuladores pueden a menudo segregarse funcional, temporal o espacialmente de los de CD28 y entre sí.

40 Los miembros de la familia TNFR pueden reclutar proteínas adaptadoras del factor asociado al receptor de TNF (TRAF) y activar la vía de señalización del factor nuclear κB (NF-κB), haciéndolos fundamentalmente distintos de los coestimuladores como CD28 o ICOS. CD40 y su ligando, CD154, fueron las primeras moléculas coestimuladoras identificadas como miembros de la superfamilia TNFR/TNF y son cruciales para las funciones de las células B y las células dendríticas (DC). Estudios de las vías CD27/CD70, CD30/CD30L, OX40/OX40L, 4-1BB (CD137)/4-1BBL, receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR)/ligando de GITR, las vías del mediador de entrada del virus del herpes (HVEM)/(LIGHT) indican que estos miembros de la familia TNFR/TNF proporcionan importantes señales coestimuladoras. Con la excepción de CD27, los TNFR se expresan solo tras la activación de células T o células NK.

45 Un trabajo reciente indica que las interacciones OX40/OX40L y CD137/CD137L tienen funciones clave en la regulación del equilibrio entre las respuestas efectoras y Treg. Un papel importante de CD137 es la supervivencia de las células T activadas y de memoria, con efectos preferenciales sobre las células T CD8+. Sin embargo, cuando otras señales coestimuladoras son limitantes, las señales de CD137 pueden cooperar con las señales inducidas por TCR para potenciar la proliferación y el desarrollo de la función efectora. Tras la activación del receptor Fc, las células NK humanas regulan por incremento CD137, potenciando de este modo la función de destrucción de estas células NK activadas. Los anticuerpos monoclonales anti-CD137 agonistas (BMS-663513; Urelumab) se encuentran actualmente en ensayos clínicos como monoterapia o combinados con anticuerpos específicos de tumores para el tratamiento del cáncer.

50 Lucido et al. (2014) Vaccines 2(4):841-853 describe la mejora de CD137 de la depuración de tumor de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello positivo para HPV. La WO 2015/069703 describe regímenes de dosificación inmunoterapéuticos y combinaciones de los mismos. La WO 2015/105995 describe terapia dirigida para cáncer de pulmón de células pequeñas.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona un agente que reduce la unión de CD47 a SIRP α , en donde el agente se selecciona de un anticuerpo anti-CD47, un anticuerpo anti-SIRP- α , un polipéptido de SIRP α soluble o una proteína de fusión que comprende un polipéptido de SIRP α , para su uso en un método para tratar, reducir o prevenir el cáncer, el método comprendiendo:

poner en contacto una población de células que comprenden las células tumorales dirigidas y una población de células inmunitarias con:

- (i) el agente que reduce la unión de CD47 a SIRP α ;
- (ii) un agente que agoniza una molécula coestimuladora inmunitaria, en donde el agente es un anticuerpo anti-CD137; y
- (iii) un anticuerpo específico de tumor;

en una dosis eficaz para aumentar la reducción de las células objetivo, en donde el contacto se realiza en un mamífero in vivo.

La invención proporciona además un método in vitro para dirigirse a células tumorales para inmunoreducción, el método comprendiendo:

poner en contacto una población de células que comprende las células objetivo y una población de células inmunitarias con:

- (i) un agente que reduce la unión de CD47 a SIRP α , en donde el agente se selecciona de un anticuerpo anti-CD47, un anticuerpo anti-SIRP α , un polipéptido de SIRP α soluble o una proteína de fusión que comprende un polipéptido de SIRP α ;
- (ii) un agente que agoniza una molécula coestimuladora inmunitaria, en donde el agente es un anticuerpo anti-CD137; y
- (iii) un anticuerpo específico de tumor;

en una dosis eficaz para aumentar la reducción de las células objetivo.

En la presente se divulgan métodos para dirigirse a células para su reducción, incluyendo, sin limitación, células tumorales, en un régimen que comprende poner en contacto las células objetivo con una combinación de agentes que modulan la señalización inmunorreguladora. Los agentes moduladores inmunorreguladores incluyen (i) un agente que bloquea la actividad de CD47; y (ii) un agente que agoniza una molécula coestimuladora inmunitaria, por ejemplo, CD137. El régimen puede comprender además un agente que se une específicamente a la célula objetivo, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento biológicamente activo o derivado del mismo. El nivel de reducción de la célula objetivo aumenta con respecto a un régimen en el que se usa un único agente modulador inmunorregulador; y el efecto puede ser sinérgico con respecto a un régimen en el que se usa un único agente modulador inmunorregulador.

Los agentes en la combinación se administran concomitantemente, es decir, cada agente se administra en el plazo de aproximadamente 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, 1 día o sustancialmente simultáneamente con respecto a los otros agentes en la combinación. La administración puede repetirse según sea necesario para la reducción de la población de células objetivo.

En algunas realizaciones, el bloqueo de CD47 se logra administrando un polipéptido de SIRP α soluble, que puede ser un polipéptido variante de SIRP α de alta afinidad. En otras realizaciones, se administran anticuerpos específicos para uno o ambos de SIRP α y CD47. El agonista coestimulador es un anticuerpo que se une selectivamente a la molécula coestimuladora, en particular, un anticuerpo anti-CD137 agonista.

El contacto de una célula objetivo puede realizarse in vivo, por ejemplo, con propósitos terapéuticos, e in vitro, por ejemplo, para ensayos de selección y similares. En realizaciones relacionadas, las células tumorales, por ejemplo, tumores sólidos como carcinomas, sarcomas, melanomas, etc.; leucemias; linfomas, etc., son objetivo para reducción poniendo en contacto las células inmunitarias, incluyendo células fagocíticas, células NK, células T, etc., en las proximidades de las células tumorales con una combinación de un agente bloqueador de CD47 que es eficaz para bloquear la interacción entre CD47 y SIRP α , y un agente que agoniza una molécula coestimuladora inmunitaria, por ejemplo, CD137. Opcionalmente, se incluye en la combinación un agente que se une específicamente a la célula objetivo. En estos aspectos, la combinación de agentes inmunorreguladores puede combinarse con anticuerpos monoclonales dirigidos contra uno o más marcadores de células tumorales adicionales, tales composiciones pueden ser sinérgicas para potenciar la fagocitosis y la eliminación de células tumorales en comparación con el uso de agentes individuales. La dosis eficaz de los agentes combinados aumenta la reducción de las células tumorales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Curva de supervivencia del mastocitoma.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

5 En la presente se divulgan métodos para la reducción dirigida de células en un sujeto, donde las células objetivo se eliminan selectivamente mediante una combinación de agentes que modulan las vías inmunorreguladoras en el sujeto. Un agente que modifica la señalización inmunorreguladora bloquea la señalización de CD47. El segundo agente es un agonista de una molécula coestimuladora inmunitaria, por ejemplo, CD137.

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

15 Antes de que se describan los presentes agentes activos y métodos, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, productos, aparatos y factores particulares descritos, ya que tales métodos, aparatos y formulaciones pueden, por supuesto, variarse. También debe entenderse que la terminología usada en la presente tiene solamente el propósito de describir realizaciones particulares, y que no se pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

20 Cabe señalar que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un fármaco candidato" se refiere a uno o mezclas de tales candidatos, y la referencia al "método" incluye la referencia a pasos y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, y demás.

25 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

30 Cuando se proporciona un intervalo 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 intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo indicado está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños que también están incluidos dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera de los dos límites incluidos también se incluyen en la invención.

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

40 En general, en la presente invención se emplean métodos convencionales de síntesis de proteínas, cultivo de células recombinantes y aislamiento de proteínas, y técnicas de ADN recombinante dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, 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 y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988).

Definiciones

50 *Agente anti-CD47.* CD47 es una glicoproteína transmembrana ampliamente expresada con un único dominio similar a Ig y cinco regiones que abarcan la membrana, que funciona como un ligando celular para SIRPα con unión mediada a través del dominio tipo V NH₂-terminal de SIRPα. SIRPα se expresa principalmente en células mieloides, incluyendo macrófagos, granulocitos, células dendríticas mieloides (DC), mastocitos y sus precursores, incluyendo las células madre hematopoyéticas. Los determinantes estructurales en SIRPα que median la unión de CD47 se analizan por Lee et al. (2007) J. Immunol. 179:7741-7750; Hatherley et al. (2008) Mol Cell. 31(2):266-77; Hatherley et al. (2007) J.B.C. 282:14567-75; y el papel de la dimerización cis de SIRPα en la unión de CD47 se analiza por Lee et al. (2010) J.B.C. 285: 37953-63. De acuerdo con el papel de CD47 para inhibir la fagocitosis de células normales, hay evidencia que está regulada por incremento transitoriamente en células madre hematopoyéticas (HSC) y progenitoras justo antes y durante su fase migratoria, y que el nivel de CD47 en estas células determina la probabilidad que se absorban in vivo.

60 Como se usa en la presente, el término "agente anti-CD47" o "agente que proporciona bloqueo de CD47" se refiere a cualquier agente que reduce la unión de CD47 (por ejemplo, en una célula objetivo) a SIRPα (por ejemplo, en una célula fagocítica). Los ejemplos no limitativos de reactivos anti-CD47 adecuados incluyen reactivos de SIRPα, que incluyen, sin limitación, polipéptidos de SIRPα de alta afinidad, anticuerpos anti-SIRPα, polipéptidos

de 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 de SIRP α , etc.) se une específicamente a CD47 para reducir la unión de CD47 a SIRP α .

En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 adecuado (por ejemplo, un anticuerpo anti-SIRP α) se une específicamente a SIRP α para reducir la unión de CD47 a SIRP α . Un agente anti-CD47 adecuado que se une a SIRP α no activa SIRP α (por ejemplo, en la célula fagocítica que expresa SIRP α). La eficacia de un agente anti-CD47 adecuado puede evaluarse analizando el agente. En un ensayo ejemplar, las células objetivo se incuban en presencia o ausencia del agente candidato. Un agente para su uso en los métodos de la invención regulará por incremento la fagocitosis en por lo menos un 5% (por ejemplo, por lo menos un 10%, por lo menos un 20%, por lo menos un 30%, por lo menos un 40%, por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 90%, por lo menos un 100%, por lo menos un 120%, por lo menos un 140%, por lo menos un 160%, por lo menos un 180%, por lo menos un 200%, por lo menos un 500%, por lo menos un 1000%) en comparación con la fagocitosis en ausencia del agente. De manera similar, un ensayo in vitro para los niveles de fosforilación de tirosina de SIRP α mostrará una disminución en la fosforilación de por lo menos un 5% (por ejemplo, por lo menos un 10%, por lo menos un 15%, por lo menos un 20%, por lo menos un 30%, por lo menos un 40%, por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 90% o un 100%) en comparación con la fosforilación observada en ausencia del agente candidato.

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

Reactivo de SIRP α . Un reactivo de SIRP α comprende la porción de SIRP α que es suficiente para unirse a CD47 con una afinidad reconocible, que normalmente se encuentra entre la secuencia señal y el dominio transmembrana, o un fragmento del mismo que retiene la actividad de unión. Un reactivo de SIRP α adecuado reduce (por ejemplo, bloquea, previene, etc.) la interacción entre las proteínas nativas SIRP α y CD47. El reactivo de SIRP α comprenderá habitualmente por lo menos el dominio d1 de SIRP α .

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

Opcionalmente, el reactivo de SIRP α 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, de tal manera que la proteína de fusión no se depure rápidamente de la circulación. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido es parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina. La región Fc ayuda en la fagocitosis al proporcionar una señal de "cómeme", que potencia el bloqueo de la señal de "no me comas" proporcionada por el reactivo de SIRP α de alta afinidad. En otras realizaciones, el segundo polipéptido es cualquier polipéptido adecuado que sea sustancialmente similar a Fc, por ejemplo, que proporcione un tamaño aumentado, dominios de multimerización y/o unión o interacción adicional con moléculas de Ig.

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 SIRP α 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 SIRP α (y por lo tanto no se consideran un "agente anti-CD47" en la presente) y dicho anticuerpo puede denominarse "anticuerpo anti-CD47 no bloqueante". Un anticuerpo anti-CD47 adecuado que es un "agente anti-CD47" puede denominarse "anticuerpo bloqueador de CD47". Los ejemplos no limitativos 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.

Anticuerpos anti-SIRP α . En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 sujeto es un anticuerpo que se une específicamente a SIRP α (es decir, un anticuerpo anti-SIRP α) y reduce la interacción entre CD47 en una célula (por ejemplo, una célula infectada) y SIRP α en otra célula (por ejemplo, una célula fagocítica). Los anticuerpos anti-SIRP α adecuados pueden unirse a SIRP α sin activar o estimular la señalización a través de SIRP α porque la activación de SIRP α inhibiría la fagocitosis. En cambio, los anticuerpos anti-SIRP α adecuados facilitan la fagocitosis preferencial de las células infligidas sobre las células normales. Aquellas células que expresan niveles más altos de CD47 (por ejemplo, células infectadas) con respecto a otras células (células no infectadas) serán fagocitadas preferencialmente. Por tanto, un anticuerpo anti-SIRP α adecuado se une específicamente a SIRP α (sin activar/estimular una respuesta de señalización suficiente para inhibir la fagocitosis) y bloquea una interacción entre SIRP α y CD47. Los anticuerpos anti-SIRP α adecuados incluyen versiones completamente humanas, humanizadas o quiméricas de tales anticuerpos. Los anticuerpos humanizados 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.

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

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

En ciertos casos, el polipéptido de CD47 soluble comprende el dominio extracelular de CD47, incluyendo el péptido señal, de tal manera que la porción extracelular de CD47 tiene típicamente 142 aminoácidos de longitud. Los polipéptidos de CD47 solubles descritos en la presente también incluyen variantes de dominio extracelular de CD47 que comprenden una secuencia de aminoácidos de por lo menos un 65%-75%, 75%-80%, 80-85%, 85%-90% o 95%-99% (o cualquier porcentaje de identidad no enumerado específicamente entre el 65% y el 100%), tales variantes retienen la capacidad de unirse a SIRP α sin estimular la señalización de SIRP α .

En ciertos casos, la secuencia de aminoácidos del péptido señal puede sustituirse por una secuencia de aminoácidos del péptido señal que se deriva de otro polipéptido (por ejemplo, una inmunoglobulina o CTLA4). Por ejemplo, a diferencia del CD47 de longitud completa, que es un polipéptido de la superficie celular que atraviesa la membrana celular externa, se secretan los polipéptidos de CD47 solubles; por consiguiente, un polinucleótido que codifica un polipéptido de CD47 soluble puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que está asociada con un polipéptido que normalmente se secreta de una célula.

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

En otros casos, un polipéptido de CD47 soluble comprende una variante de dominio extracelular de CD47. Tal polipéptido de CD47 soluble conserva la capacidad de unirse a SIRP α sin estimular la señalización de SIRP α . La variante del dominio extracelular de CD47 puede tener una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 65%-75%, 75%-80%, 80-85%, 85%-90% o 95%-99% idéntica (que incluye cualquier porcentaje identidad entre cualquiera de los intervalos descritos) a la secuencia nativa de CD47.

Moléculas de señalización inmunorreguladoras. Además del eje CD47/SIRP α , las moléculas de señalización inmunorreguladoras pueden incluir polipéptidos coestimuladores expresados en células inmunitarias, por ejemplo, células T, células NK, células que presentan antígenos, etc. La activación, es decir, el agonismo, de la molécula coestimuladora potencia la función de las células efectoras. Muchas de tales moléculas coestimuladoras son miembros de la familia del receptor 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 en sentido descendente.

Una molécula coestimuladora de interés es CD137, a la que también puede hacerse referencia como Ly63, ILA o 4-1BB, y que es un 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 desempeñan un papel importante en la regulación de las respuestas inmunitarias. 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 citoplásmica N-terminal corta que contiene sitios potenciales de fosforilación. La expresión en células primarias depende estrictamente 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), aptámeros (ver McNamara et al. (2008) J. Clin. Invest. 118: 376-386) y anticuerpos.

Se han desarrollado dos mAAb completamente humanizados de CD137, urelumab (BMS-663513) y PF-05082566, para uso clínico. El urelumab es un mAAb de IgG4 completamente humano y PF-05082566 es un mAAb de IgG2 completamente humano.

CD134. OX40 (CD134) y su compañero de unión, OX40L (CD252), son miembros de la superfamilia TNFR. La expresión de OX40 se induce tras la reticulación de TCR/CD3 y por la presencia de citoquinas inflamatorias, que incluyen IL-1, IL-2 y TNF- α . En humanos, una proporción sustancial de células T CD4 infiltrantes de tumores expresan OX40. De manera similar, también se ha demostrado que las células T CD8 periféricas activadas expresan OX40. La ligadura de OX40 en células T CD8 y CD4 convencionales (no reguladoras), usando o su ligando natural (OX40L) o anticuerpos agonistas, promueve su supervivencia y expansión.

El tratamiento con anticuerpos monoclonales (mAAb) anti-OX40 agonistas junto con la estimulación de TCR en animales de tipo salvaje induce la expansión, diferenciación y supervivencia aumentada de las células T CD4 y CD8. La administración de anti-OX40 puede superar la tolerancia de las células T CD8 a un autoantígeno y restaurar su actividad citotóxica, destacando el potencial terapéutico para los agonistas de OX40. Esto es de particular importancia para los pacientes con cáncer, ya que la tolerancia de las células T al tumor es un obstáculo importante para las modalidades terapéuticas.

El uso de monoterapia anti-OX40 se probó en un ensayo de fase 1 en pacientes con tumores sólidos. Ensayos clínicos de fase 1 que investigan agonistas de OX40, incluyen NCT02318394, NCT02205333 y NCT02221960, con el MEDI6383 biológico.

Los agentes de OX40 agonistas pueden potenciar la eficacia de los agentes anti-CD47. Los agentes de OX40 agonistas pueden administrarse sustancialmente de forma simultánea con agentes anti-CD47; o pueden administrarse antes y concurrentemente con el tratamiento con anti-CD47 para simular el cebado de clones de células T específicos de tumores que pueden expandirse a través del agente de OX40.

CD30. El receptor transmembrana CD30 (TNFRSF8) y su ligando CD30L (CD153, TNFSF8) son miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y muestran una expresión restringida en subpoblaciones de células inmunitarias activadas. CD30 es una glicoproteína transmembrana de tipo I de la superfamilia de receptores de TNF. El ligando de CD30 es CD30L (CD153). La unión de CD30 a CD30L media los efectos pleiotrópicos que incluyen la proliferación celular, activación, diferenciación y muerte celular apoptótica. Los anticuerpos en ensayos clínicos para el cáncer incluyen los agonistas de CD30 SGN-30; XmAb2513 y MDX-1401.

GITR. La proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR) pertenece a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral/factor de necrosis tumoral y estimula tanto la inmunidad adquirida como la innata. Se expresa en varias células y tejidos, incluyendo las células T y asesinas naturales (NK) y es activada por su ligando, GITRL, expresado principalmente en células que presentan y células endoteliales. El sistema GITR/GITRL participa en el desarrollo de respuestas autoinmunes/inflamatorias y potencia la respuesta a infecciones y tumores mediante mecanismos que incluyen la coactivación de células NK. Los anticuerpos en ensayos clínicos incluyen el agonista de GITR TRX518.

Coestimulador inducible (ICOS). ICOS es miembro de la familia CD28. La expresión de ICOS puede detectarse fácilmente en reposo, pero se regula por incremento tras la activación. ICOS e ICOS-L parecen ser una

pareja monógama. La coestimulación ICOS potencia las funciones efectoras. Los anticuerpos agonistas específicos de ICOS GSK3359609 o JTX-2011 se dirigen y se unen a ICOS expresado en células T CD4 positivas que se infiltran en el tumor. Esto estimula la proliferación de células T positivas para ICOS, potencia la supervivencia de los linfocitos T citotóxicos (CTL) y aumenta las respuestas inmunes mediadas por CTL contra las células tumorales.

5 ICOS, una molécula coestimuladora de la superfamilia CD28 específica de células T y una proteína de punto de control inmune, normalmente se expresa en ciertas células T activadas y desempeña un papel clave en la proliferación y activación de las células T.

10 Los agonistas incluyen los ligandos nativos, como se ha descrito anteriormente, aptámeros, anticuerpos específicos para una molécula coestimuladora inducible que activa el receptor y derivados, variantes y fragmentos biológicamente activos de anticuerpos que se unen selectivamente a una molécula coestimuladora. Un polipéptido "variante" significa un polipéptido biológicamente activo como se define a continuación que tiene menos del 100% de identidad de secuencia con un polipéptido de secuencia nativa. Tales variantes incluyen polipéptidos en los que se añaden uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N- o C-terminal de, o dentro de, la secuencia nativa; se eliminan de aproximadamente uno a cuarenta residuos de aminoácidos y opcionalmente se sustituyen con uno o

15 más residuos de aminoácidos; y derivados de los polipéptidos anteriores, en los que un residuo de aminoácido se ha modificado covalentemente de tal manera que el producto resultante tiene un aminoácido de origen no natural. Normalmente, una variante biológicamente activa tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de secuencia nativa, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un

20 99%. Los polipéptidos variantes pueden estar glicosilados de manera natural o no natural, es decir, el polipéptido tiene un patrón de glicosilación que difiere del patrón de glicosilación encontrado en la proteína de origen natural correspondiente.

25 Son de interés fragmentos del ligando o anticuerpos específicos para una molécula coestimuladora, particularmente fragmentos biológicamente activos y/o fragmentos correspondientes a dominios funcionales. Los fragmentos de interés tendrán típicamente por lo menos de aproximadamente 10 aa a por lo menos aproximadamente 15 aa de longitud, habitualmente por lo menos aproximadamente 50 aa de longitud, pero habitualmente no excederán de aproximadamente 200 aa de longitud, donde el fragmento tendrá un tramo contiguo

30 de aminoácidos que es idéntico al polipéptido del que se deriva. Se pretende que un fragmento de "por lo menos 20 aa de longitud", por ejemplo, incluya 20 o más aminoácidos contiguos de, por ejemplo, un anticuerpo específico para CD137 o de TNFSF9. En este contexto, "aproximadamente" incluye el valor enumerado particularmente o un valor mayor o menor en varios (5, 4, 3, 2 o 1) aminoácidos. Las variantes de proteínas descritas en la presente están codificadas por polinucleótidos. Puede usarse el código genético para seleccionar los codones apropiados para

35 construir las variantes correspondientes. Los polinucleótidos pueden usarse para producir polipéptidos y estos polipéptidos pueden usarse para producir anticuerpos mediante métodos conocidos. Un polipéptido de "fusión" es un polipéptido que comprende un polipéptido o una porción (por ejemplo, uno o más dominios) del mismo fusionado o unido a un polipéptido heterólogo.

40 En algunos casos, el agonista de la molécula coestimuladora es un anticuerpo. El término "anticuerpo" o "fracción de anticuerpo" se pretende que incluya cualquier estructura molecular que contenga una cadena polipeptídica 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

45 pueden reproducirse mediante cultivo celular o recombinantemente, y pueden modificarse para reducir su antigenicidad.

En algunas realizaciones, la administración de una combinación de agentes de la invención se combina con una dosis eficaz de un agente que aumenta el hematocrito del paciente, por ejemplo, agentes estimulantes de eritropoyetina (AEE). Tales agentes son conocidos y usados en la técnica, incluyendo, por ejemplo, Aranesp® (darbepoetin alfa), Epogen®/NF/Procrit®/NF (epoetin alfa), Omontys® (peginesatida), Procrit®, etc.

50

Otras terapias de combinación incluyen la administración con anticuerpos específicos de células, por ejemplo, anticuerpos selectivos para marcadores de células tumorales, radiación, cirugía y/o privación hormonal (Kwon et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 96: 15074-9, 1999). Actualmente, están en uso clínico una serie de anticuerpos para el tratamiento del cáncer y otros se encuentran en distintas etapas de desarrollo clínico. Los anticuerpos de interés para los métodos de la invención pueden actuar a través de ADCC y típicamente son selectivos para células tumorales, aunque un experto en la técnica reconocerá que algunos anticuerpos clínicamente

55 útiles actúan sobre células no tumorales, por ejemplo, CD20.

60 Actualmente, están en uso clínico una serie de anticuerpos para el tratamiento del cáncer y otros se encuentran en distintas etapas de desarrollo clínico. Por ejemplo, hay varios antígenos y los correspondientes anticuerpos monoclonales para el tratamiento de las enfermedades malignas de células B. Un antígeno objetivo es CD20. El rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico no conjugado dirigido al antígeno CD20. CD20 tiene un

65 papel funcional importante en la activación, proliferación y diferenciación de las células B. El antígeno CD52 está

dirigido por el anticuerpo monoclonal alemtuzumab, que está indicado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica. El CD22 es el objetivo de una serie de anticuerpos y recientemente ha demostrado su eficacia combinada con una toxina en la leucemia de células pilosas resistente a la quimioterapia. Dos nuevos anticuerpos monoclonales dirigidos a CD20, tositumomab e ibritumomab, se han presentado a la Food and Drug Administration (FDA). Estos anticuerpos se conjugan con radioisótopos. El alemtuzumab (Campath) se usa en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica; el gemtuzumab (Mylotarg) encuentra uso en el tratamiento de la leucemia mielógena aguda; el ibritumomab (Zevalin) encuentra uso en el tratamiento del linfoma no Hodgkin; El panitumumab (Vectibix) encuentra uso en el tratamiento del cáncer de colon.

El antígeno CD52 está dirigido por el anticuerpo monoclonal alemtuzumab, que está indicado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica; cáncer de colon y cáncer de pulmón. El CD22 es el objetivo de varios anticuerpos y recientemente ha demostrado su eficacia combinada con una toxina en la leucemia de células pilosas resistente a la quimioterapia.

El gemtuzumab (Mylotarg) encuentra uso en el tratamiento de la leucemia mielógena aguda; el ibritumomab (Zevalin) encuentra uso en el tratamiento del linfoma no Hodgkin; el panitumumab (Vectibix) encuentra uso en el tratamiento del cáncer de colon.

El cetuximab (Erbix) también es de interés para su uso en los métodos de la divulgación. El anticuerpo se une al receptor de EGF (EGFR) y se ha usado en el tratamiento de tumores sólidos incluyendo el cáncer de colon y el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN).

Los anticuerpos monoclonales útiles en los métodos de la divulgación que se han usado en tumores sólidos incluyen, sin limitación, edrecolomab y trastuzumab (herceptin). El edrecolomab se dirige al antígeno 17-1A que se observa en el cáncer de colon y recto, y ha sido aprobado para su uso en Europa para estas indicaciones. El trastuzumab se dirige al antígeno HER-2/neu. Este antígeno se observa en el 25% al 35% de los cánceres de mama. El cetuximab (Erbix) también es de interés para su uso en los métodos de la divulgación. El anticuerpo se une al receptor de EGF (EGFR) y se ha usado en el tratamiento de tumores sólidos, incluyendo el cáncer de colon y el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN).

Como se usa en la presente, "anticuerpo" incluye referencia a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno particular e incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. El término también incluye formas modificadas por ingeniería genética como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados. El término "anticuerpo" también incluye formas de anticuerpos de unión a antígeno, incluyendo fragmentos con capacidad de unión a antígeno (por ejemplo, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv y rIgG. El término también se refiere a fragmentos Fv de cadena sencilla recombinantes (scFv). El término anticuerpo también incluye moléculas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos bivalentes o biespecíficos.

La selección de anticuerpos puede basarse en una variedad de criterios, que incluyen selectividad, afinidad, citotoxicidad, etc. La frase "se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo o "específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con", cuando se refiere a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína, en una población heterogénea de proteínas y otros agentes biológicos. Por tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a secuencias de una proteína particular por lo 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 objetivo en presencia de células efectoras (como células asesinas naturales o macrófagos). Los receptores de Fc de las células efectoras reconocen los anticuerpos unidos. La reticulación de los receptores de Fc señala a las células efectoras que destruyan las células objetivo mediante citólisis o apoptosis. En una realización, la inducción se logra mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Puede generarse un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular mediante métodos recombinantes 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 expertos en la técnica conocen métodos para preparar anticuerpos policlonales. Los anticuerpos pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando métodos de hibridomas. En un método de hibridoma, un animal huésped apropiado se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para provocar linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse in vitro. Luego, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma.

Los anticuerpos humanos pueden producirse usando varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos. De manera similar, los anticuerpos humanos pueden elaborarse mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos 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, incluyendo el reordenamiento de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos.

Los anticuerpos también existen como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con varias peptidasas. Por tanto, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab)_2$, un dímero de Fab que a su vez es una cadena ligera unida a V_H-C_{H1} mediante un enlace disulfuro. El $F(ab)_2$ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de esta manera el dímero $F(ab)_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región de bisagra. Aunque varios fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos pueden sintetizarse de novo ya sea químicamente o usando metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo, como se usa en la presente, también incluye fragmentos de anticuerpos ya sea producidos por la modificación de anticuerpos completos, o aquellos sintetizados de novo usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla) o aquellos identificados usando bibliotecas de presentación de fagos.

Un "anticuerpo humanizado" es una molécula de inmunoglobulina que contiene una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del marco de 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 la CDR importada o en las secuencias marco. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo 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 todas o sustancialmente todas las regiones marco (FR) son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos de interés pueden probarse para determinar su capacidad para inducir la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). La actividad de ADCC asociada a anticuerpos puede monitorizarse y cuantificarse mediante la detección de la liberación de marcado o lactato deshidrogenasa de las células lisadas, o la detección de la viabilidad de la célula objetivo reducida (por ejemplo, ensayo de anexina). Los ensayos de apoptosis pueden realizarse mediante el ensayo de marcado de extremos de digoxigenina-11-dUTP nick mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) (Lazebnik et al., Nature: 371, 346 (1994)). La citotoxicidad también puede detectarse directamente mediante kits de detección conocidos en la técnica, como el kit de detección de citotoxicidad de Roche Applied Science (Inobjektivopolis, Ind.).

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

Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan indistintamente en la presente para referirse a un mamífero que está siendo evaluado para tratamiento y/o que está en tratamiento. En una realización, el mamífero es un humano. Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" abarcan, sin limitación, individuos que tienen cáncer. Los sujetos pueden ser humanos, pero también incluyen otros mamíferos, particularmente aquellos mamíferos útiles como modelos de laboratorio para enfermedades humanas, por ejemplo, ratón, rata, etc.

Los términos "cáncer", "neoplasia" y "tumor" se usan indistintamente en la presente para referirse a células que muestran un crecimiento autónomo, no regulado, de tal manera que presentan un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control sobre la proliferación celular. Las células de interés para detección, análisis o tratamiento en la presente solicitud incluyen células precancerosas (por ejemplo, benignas), malignas, premetastásicas, metastásicas y no metastásicas. Se conocen cánceres de prácticamente todos los tejidos. La frase "carga de cáncer" se refiere a la cantidad de células cancerosas o al volumen de cáncer en un sujeto. Por consiguiente, reducir la carga del cáncer se refiere a reducir el número de células cancerosas o el volumen de cáncer en un sujeto. El término "célula cancerosa", como se usa en la presente, se refiere a cualquier célula que sea una célula cancerosa o que se derive de una célula cancerosa, por ejemplo, un clon de una célula cancerosa. Los expertos en la técnica conocen muchos tipos de cánceres, incluyendo tumores sólidos como carcinomas, sarcomas, glioblastomas, melanomas, linfomas, mielomas, etc., y cánceres circulantes como leucemias. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, carcinoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de cerebro.

La "patología" del cáncer incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, crecimiento celular anormal o incontrolable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de las células colindantes, liberación de citoquinas u otros productos secretorios a niveles anormales, supresión o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, neoplasia, premalignidad, malignidad, invasión de tejidos u órganos circundantes o distantes, como ganglios linfáticos, etc.

Como se usa en la presente, los términos "recurrencia del cáncer" y "recurrencia del tumor" y variantes gramaticales de los mismos, se refieren al crecimiento adicional de células neoplásicas o cancerosas después del diagnóstico de cáncer. En particular, la recurrencia puede producirse cuando se produce un mayor crecimiento de células cancerosas en el tejido canceroso. La "diseminación del tumor", de manera similar, se produce cuando las células de un tumor se diseminan hacia tejidos y órganos locales o distantes; por lo tanto, la diseminación del tumor abarca la metástasis del tumor. La "invasión tumoral" se produce cuando el crecimiento del tumor se disemina localmente para comprometer la función de los tejidos implicados por compresión, destrucción o prevención de la función normal del órgano.

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

El término "muestra" con respecto a un paciente incluye sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido como un espécimen de biopsia o cultivos de tejido o células derivadas de los mismos y la progenie de los mismos. La definición también incluye muestras que hayan sido manipuladas de alguna manera después de su obtención, como por ejemplo mediante tratamiento con reactivos; lavado; o enriquecimiento para ciertas poblaciones de células, como las células cancerosas. La definición también incluye muestras que han sido enriquecidas para tipos particulares de moléculas, por ejemplo, ácidos nucleicos, polipéptidos, etc. El término "muestra biológica" abarca una muestra clínica, y también incluye tejido obtenido por resección quirúrgica, tejido obtenido por biopsia, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, muestras de tejido, órganos, médula ósea, sangre, plasma, suero y similares. Una "muestra biológica" incluye una muestra obtenida de la célula cancerosa de un paciente, por ejemplo, una muestra que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos que se obtiene de la célula cancerosa de un paciente (por ejemplo, un lisado celular u otro extracto celular que comprende polinucleótidos y/o polipéptidos); y una muestra que comprende células cancerosas de un paciente. Una muestra biológica que comprende una célula cancerosa de un paciente también puede incluir células no cancerosas.

El término "diagnóstico" se usa en la presente para hacer referencia a la identificación de un estado enfermedad o afección molecular o patológico, como la identificación de un subtipo molecular de cáncer de mama, cáncer de próstata u otro tipo de cáncer.

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

Como se usa en la presente, los términos "tratamiento", "tratar" y similares, se refieren a la administración de un agente, o la realización de un procedimiento, con el propósito de obtener un efecto. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de efectuar una cura parcial o completa de una enfermedad y/o síntomas de la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en la presente, puede incluir el tratamiento de un tumor en un mamífero, particularmente en un humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad o un síntoma de una enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero aún no se ha diagnosticado que la tenga (por ejemplo, incluyendo las enfermedades que pueden estar asociadas con o provocadas por una enfermedad primaria; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad.

El tratamiento puede referirse a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora o prevención de un cáncer, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo, como la reducción; remisión; disminución de los síntomas o hacer que el estado de la enfermedad sea más tolerable para el paciente; ralentización en la tasa de degeneración o declive; o hacer que el punto final de la degeneración sea menos debilitante. El tratamiento o la mejora de los síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen realizado por un médico. Por consiguiente, el término "tratar" incluye la administración de los compuestos o

agentes de la presente invención para prevenir o retrasar, aliviar o detener o inhibir el desarrollo de los síntomas o afecciones asociadas con el cáncer u otras enfermedades. El término "efecto terapéutico" se refiere a la reducción, eliminación, o prevención de la enfermedad, síntomas de la enfermedad, o efectos secundarios de la enfermedad en el sujeto.

"En combinación con", "terapia de combinación" y "productos de combinación" se refieren, en ciertas realizaciones, a la administración concurrente a un paciente de un primer agente terapéutico y los compuestos como se usan en la presente. Cuando se administran en combinación, cada componente puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos temporales. Por tanto, cada componente puede administrarse por separado pero lo suficientemente cerca en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

Además de las terapias contra el cáncer, la combinación de agentes divulgada en la presente es útil en otras terapias en las que se administran anticuerpos monoclonales con el propósito de reducir las células, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades inflamatorias por reducción de las células inmunitarias. Para tales propósitos, la combinación de agentes se administra en combinación con un anticuerpo terapéutico, por ejemplo, con rituximab para la reducción de las células B en enfermedades inflamatorias y afecciones autoinmunes; alemtuzumab para la esclerosis múltiple; OKT3 para inmunosupresión; otros para acondicionamiento de trasplantes de médula ósea; y similares.

La "administración concomitante" de un fármaco terapéutico contra el cáncer, ESA o anticuerpo dirigido contra un tumor con una composición farmacéutica significa la administración con el reactivo de CD47 de alta afinidad en el momento en que tanto el fármaco, el ESA o el anticuerpo como la composición tendrá un efecto terapéutico. Tal administración concomitante puede implicar la administración concurrente (es decir, al mismo tiempo), previa o posterior del fármaco, ESA o anticuerpo con respecto a la administración de un compuesto de la divulgación. Una persona con experiencia normal en la técnica no tendría dificultad para determinar la cadencia, la secuencia y las dosificaciones apropiadas de administración para fármacos y composiciones particulares de la presente divulgación.

Como se usa en la presente, la frase "supervivencia libre de enfermedad" se refiere a la falta de tal recurrencia y/o diseminación tumoral y el destino de un paciente después del diagnóstico, con respecto a los efectos del cáncer sobre la esperanza de vida del paciente. La frase "supervivencia global" se refiere al destino del paciente después del diagnóstico, a pesar de la posibilidad de que la causa de muerte en un paciente no se deba directamente a los efectos del cáncer. Las frases, "probabilidad de supervivencia libre de enfermedad", "riesgo de recurrencia" y variantes de las mismas, se refieren a la probabilidad de recurrencia o diseminación tumoral en un paciente posterior al diagnóstico de cáncer, en donde la probabilidad se determina de acuerdo con el proceso de la divulgación.

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

"Unidad de dosificación" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el individuo en particular que se va a tratar. Cada unidad puede contener una cantidad predeterminada del compuesto o compuestos activos calculada para producir el efecto o efectos terapéuticos deseados en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación puede ser dictada por (a) las características únicas del o los compuestos activos y el efecto o efectos terapéuticos particulares alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de dicho compuesto o compuestos activos.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil para preparar una composición farmacéutica que es generalmente seguro, no tóxico y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano. Tales excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos.

"Sales y ésteres farmacéuticamente aceptables" significa sales y ésteres que son farmacéuticamente aceptables y tienen las propiedades farmacológicas deseadas. Tales sales incluyen sales que pueden formarse donde los protones ácidos presentes en los compuestos son capaces de reaccionar con bases inorgánicas y orgánicas. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen las formadas con los metales alcalinos, por ejemplo, sodio y potasio, magnesio, calcio y aluminio. Las sales orgánicas adecuadas incluyen las formadas con bases orgánicas como bases de amina, por ejemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N metilglucamina y similares. Tales sales también incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo,

ácidos clorhídrico y bromhídrico) y ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, y los ácidos alcanosulfónicos y arenosulfónicos como ácido metanosulfónico y ácido bencenosulfónico). Los ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen ésteres formados a partir de grupos carboxi, sulfoniloxi y fosfonoxi presentes en los compuestos, por ejemplo, ésteres de alquilo C₁₋₆. Cuando hay dos grupos ácidos presentes, una sal o éster farmacéuticamente aceptable puede ser una sal o éster mono-ácido-mono o una di-sal o éster; y de manera similar, cuando hay más de dos grupos ácidos presentes, algunos o todos estos grupos pueden salificarse o esterificarse. Los compuestos nombrados en esta invención pueden estar presentes en forma no salificada o no esterificada, o en forma salificada y/o esterificada, y se pretende que la denominación de tales compuestos incluya tanto el compuesto original (no salificado y no esterificado) como sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables. Además, ciertos compuestos nombrados en esta invención pueden estar presentes en más de una forma estereoisomérica, y se pretende que la denominación de dichos compuestos incluya todos los estereoisómeros individuales y todas las mezclas (ya sean racémicas o de otro tipo) de tales estereoisómeros.

Los términos "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y variaciones gramaticales de los mismos, en la medida que se refieren a composiciones, portadores, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales pueden administrarse a o sobre un humano sin la producción de efectos fisiológicos no deseados en un grado que prohibiría la administración de la composición.

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

MÉTODOS DE USO

En la presente se divulgan métodos para tratar, reducir o prevenir el cáncer, que incluyen, sin limitación, linfomas, leucemias, carcinomas, melanomas, glioblastomas, sarcomas, mielomas, etc., como cánceres primarios o metastásicos, mediante un régimen que comprende poner en contacto las células objetivo con una combinación de agentes que modulan la señalización inmunorreguladora. Los agentes moduladores inmunorreguladores incluyen (i) un agente que bloquea la actividad de CD47; y (ii) un agente que agoniza una molécula coestimuladora inmunitaria, por ejemplo, CD137, aumentando de este modo la fagocitosis in vivo de las células tumorales. El régimen puede comprender además un agente que se une específicamente a la célula objetivo, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento biológicamente activo o derivado del mismo. Tales métodos incluyen administrar a un sujeto con necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis eficaz de los agentes combinados de la divulgación, incluyendo sin limitación combinaciones del reactivo con un fármaco quimioterapéutico, un anticuerpo específico del tumor, o un ESA.

Las dosis eficaces de los agentes combinados de la presente divulgación, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos, por ejemplo, animales de compañía como perros, gatos, caballos, etc., mamíferos de laboratorio como conejos, ratones, ratas, etc., y similares. Las dosificaciones de tratamiento pueden titularse para optimizar la seguridad y la eficacia.

En algunas realizaciones, la dosificación terapéutica de cada agente puede variar de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Las entidades terapéuticas de la presente invención se administran habitualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares según se indique midiendo los niveles en sangre de la entidad terapéutica en el paciente. Alternativamente, las entidades terapéuticas de la presente invención pueden administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del polipéptido en el paciente.

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

En otros casos más, los métodos de la presente divulgación incluyen tratar, reducir o prevenir el crecimiento tumoral, la metástasis tumoral o la invasión tumoral de cánceres que incluyen linfomas, leucemias, carcinomas, melanomas, glioblastomas, sarcomas, mielomas, etc. Para aplicaciones profilácticas, composiciones farmacéuticas o los medicamentos se administran a un paciente susceptible o en riesgo de padecer la enfermedad en una cantidad

suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad.

5 Las composiciones para el tratamiento del cáncer pueden administrarse por medios parenterales, tópicos, intravenosos, intratumorales, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares. Una vía de administración típica es intravenosa o intratumoral, aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces.

10 Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas como poliláctida, poliglicólido o copolímero para un efecto adyuvante mejorado, como se ha analizado anteriormente. Langer, Science 249: 1527, 1990 y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. Los agentes de esta
15 invención pueden administrarse en forma de inyección de depósito o preparación de implante que pueden formularse de tal manera que permitan una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente como estériles, sustancialmente isotónicas y en cumplimiento completo con todas las regulaciones de la Good Manufacturing Practice (GMP) de la U.S. Food and Drug Administration.

20 La toxicidad de los agentes combinados descritos en la presente puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, determinando la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) o la LD₁₀₀ (la dosis letal para el 100% de la población). La proporción de dosis entre el efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación
25 que no sea tóxico para su uso en humanos. La dosificación de las proteínas descritas en la presente se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la dosis eficaz con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. El médico individual puede elegir la formulación, la vía de administración y la dosificación exactas en vista del estado del paciente.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una variedad de formas de dosificación unitarias dependiendo del método de administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración oral incluyen, pero no se limitan a, polvo, comprimidos, píldoras, cápsulas y grageas. Se reconoce que las composiciones de la invención, cuando se administran por vía oral, deben protegerse de la
35 digestión. Esto se logra típicamente o formando complejos de las moléculas con una composición para hacerlas resistentes a la hidrólisis ácida y enzimática, o envasando las moléculas en un portador adecuadamente resistente, como un liposoma o una barrera protectora. Los medios para proteger a los agentes de la digestión son bien conocidos en la técnica.

40 Las composiciones para administración comprenderán comúnmente un anticuerpo u otro agente ablativo disuelto en un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un portador acuoso. Pueden usarse una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente están libres de materia indeseable. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares
45 farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar las condiciones fisiológicas como agentes de ajuste y tamponadores del pH, agentes de ajuste de la 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 formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente en base a volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado y las
50 necesidades del paciente (por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., 1980) y Goodman & Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman et al., eds., 1996)).

También se divulgan en la presente kits que comprenden las composiciones (por ejemplo, agonista de
55 moléculas coestimuladoras; agentes anti-CD47, opcionalmente anticuerpos que se unen específicamente a las células objetivo y formulaciones de las mismas) de la divulgación e instrucciones de uso. El kit puede contener además por lo menos un reactivo adicional, por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico, anticuerpo antitumoral, ESA, etc. Los kits incluyen típicamente una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier escritura o material grabado suministrado en o con el kit, o que acompaña de otro modo al kit.

60 Las composiciones pueden administrarse para tratamiento terapéutico. Las composiciones se administran a un paciente en una cantidad suficiente para extirpar sustancialmente las células objetivo, como se ha descrito anteriormente. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Pueden administrarse administraciones individuales o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosificación y la
65 frecuencia según lo requiera y tolere el paciente. La dosis particular requerida para un tratamiento dependerá de la condición médica y el historial del mamífero, así como de otros factores como la edad, el peso, el género, la vía de

administración, la eficacia, etc.

Experimental

5 Ejemplo 1

Combinación de bloqueo de CD47 y agonismo de CD137 en células objetivo para inmunodepleción

10 Como se describe en la solicitud internacional en tramitación que reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos 62/041.989, la reducción de las células hematopoyéticas que expresan CD117 se mejora significativamente mediante la administración de una combinación de un agente anti-CD47, un agonista de CD137, y un anticuerpo dirigido a CD117; con respecto a un tratamiento comparable en el que se administra un agente anti-CD47 con anti-CD117 en ausencia de un agonista de CD137. Estos datos demuestran el principio de combinar actividades para reducir una población de células objetivo, principio que se extiende en la presente para la reducción dirigida de las células tumorales.

20 En la Figura 1 se muestra que se inyectó a ratones DBA/2J de 8 semanas de edad con la línea celular de mastocitoma de ratón p815. A 3 ratones se les inyectaron 250.000 células p815 sin tratar incubadas durante dos horas a 37 grados C y se administraron mediante inyecciones retroorbitales. A 2 ratones se les inyectaron 250.000 células p815 incubadas con 100 ug/ml de anticuerpo anti-c-Kit (ACK2) + 100 ug/ml de Clon 3 (MIAP 410, anticuerpo anti-CD47) durante dos horas a 37 grados C, luego se inyectaron RO. A los ratones se les administró una inyección IP de 500 ug de anti-CD137 (Lob12.3) los días 0, 2 y 4.

25 Se evaluó la muerte de los ratones, ya que las células P815 no son GFP+. Un ratón de control sin tratar murió 4 semanas después de la inyección RO, otro ratón murió 12 semanas después de la inyección. Ambos ratones del grupo de prueba tratados con terapia de combinación estaban vivos durante 12 semanas después de la inyección.

30 Ejemplo 2

Experimento de sinergia in vitro

35 Se realiza un ensayo de ADCC usando células NK de ratón o humanas (efectoras) y células cancerosas de ratón o humanas (células objetivo). Las células NK de ratón se aíslan de sangre periférica, médula ósea o bazo; las células NK humanas se aíslan de sangre periférica. Las líneas celulares de cáncer humano o las muestras primarias se marcan para su uso como células objetivo (por ejemplo, con cromo o colorante fluorescente).

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

- Control de vehículo (por ejemplo, PBS)
- Agonista de CD137 solo
- Antagonista de CD47 solo
- Antagonista de CD47 más agonista de CD137
- 45 • Anticuerpo de unión al tumor solo
- Anticuerpo de unión al tumor + agonista de CD137 solo
- Anticuerpo de unión al tumor + antagonista de CD47 solo
- Anticuerpo de unión al tumor + antagonista de CD47 más agonista de CD137

50 La ADCC se mide mediante un ensayo de liberación de cromo o ensayos de muerte celular por citometría de flujo (por ejemplo, tinción con Anexina V/DAPI). La liberación de citoquinas de células NK (por ejemplo, IFN-gamma) se mide mediante ELISA. El cambio en la muerte celular y la liberación de citoquinas en presencia de anticuerpo de unión al tumor + antagonista de CD47 más agonista de CD137 se determina con respecto a las monoterapias y terapias duales enumeradas anteriormente.

55 Ejemplo 3

Protocolo de experimento in vivo

60 Las células cancerosas se inyectan en ratones mediante inyección de sangre subcutánea, retroperitoneal o periférica y se dejan injertar. Los animales se aleatorizan en cuatro grupos de tratamiento:

- Control de vehículos (por ejemplo, PBS)
- Agonista de CD137 solo
- 65 • Antagonista de CD47 solo

- Antagonista de CD47 más agonista de CD137

Los ratones se tratan diariamente, tres veces a la semana, dos veces a la semana o una vez a la semana con los tratamientos respectivos. La carga tumoral se mide mediante mediciones del volumen tumoral, bioluminiscencia usando células cancerosas marcadas (por ejemplo, células positivas para luciferasa) y/o análisis de sangre periférica. La expresión de CD137 en células NK se mide en sangre periférica y en tumores. También se mide la supervivencia global de los ratones.

Ejemplo 4

Protocolo de experimento in vivo para sinergia con anticuerpos monoclonales específicos de tumores

Las células cancerosas se inyectan en ratones mediante inyección subcutánea, retroperitoneal o de sangre periférica y se dejan injertar. Los animales se aleatorizan en cuatro grupos de tratamiento:

- Anticuerpo de unión al tumor solo
- Anticuerpo de unión al tumor + agonista de CD137 solo
- Anticuerpo de unión al tumor + antagonista de CD47 solo
- Anticuerpo de unión al tumor + antagonista de CD47 más agonista de CD137

Los ratones se tratan diariamente, tres veces a la semana, dos veces a la semana o una vez a la semana con los tratamientos respectivos. La carga tumoral se mide mediante mediciones del volumen tumoral, bioluminiscencia usando células cancerosas marcadas (por ejemplo, células positivas para luciferasa) y/o análisis de sangre periférica. La expresión de CD137 en células NK se mide en sangre periférica y en tumores. También se mide la supervivencia global de los ratones.

Las combinaciones específicas de anticuerpos y tumores incluyen, sin limitación, las siguientes:

- Injertar células de mastocitoma de ratón P815 en ratones DBA/2, tratar con terapias dirigidas a CD47/CD137 de ACK2 (anticuerpo c-kit anti-ratón).
- Injertar células TUBO-EGFR en ratones de tipo salvaje, tratar con cetuximab (anti-EGFR humano) y terapias dirigidas a CD47/CD137.
- Injertar células SK-Mel-3 de melanoma humano en ratones RAG-/-, tratar con SR-1 (c-kit anti-humano) y terapias dirigidas a CD47/CD137.
- Injertar células de melanoma B16 en ratones de tipo salvaje, tratar con TA99 (anticuerpos dirigidos a células B16 de ratón) y terapias dirigidas a CD47/CD137.
- Injertar células de linfoma de ratón A20 en ratones de tipo salvaje, tratar con anticuerpos anti-CD20 de ratón y terapias dirigidas a CD47/CD137.

Debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos, líneas celulares, especies o géneros de animales, y reactivos descritos, ya que pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en la presente, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia a "el cultivo" incluye la referencia a uno o más cultivos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y demás. Todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención, a menos que se indique claramente lo contrario.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente que reduce la unión de CD47 a SIRP α , en donde el agente se selecciona de un anticuerpo anti-CD47, un anticuerpo anti-SIRP α , un polipéptido de SIRP α soluble o una proteína de fusión que comprende un polipéptido de SIRP α , para su uso en un método para tratar, reducir o prevenir el cáncer, el método comprendiendo: poner en contacto una población de células que comprenden las células tumorales dirigidas y una población de células inmunitarias con:
 - 10 (i) el agente que reduce la unión de CD47 a SIRP α ;
 - (ii) un agente que agoniza una molécula coestimuladora inmunitaria, en donde el agente es un anticuerpo anti-CD137; y
 - (iii) un anticuerpo específico de tumor;
- 15 en una dosis eficaz para aumentar la reducción de las células objetivo, en donde el contacto se realiza en un mamífero in vivo.
- 20 2. Un método in vitro para dirigirse a células tumorales para inmunoreducción, el método comprendiendo: poner en contacto una población de células que comprende las células objetivo y una población de células inmunitarias con:
 - (i) un agente que reduce la unión de CD47 a SIRP α , en donde el agente se selecciona de un anticuerpo anti-CD47, un anticuerpo anti-SIRP α , un polipéptido de SIRP α soluble o una proteína de fusión que comprende un polipéptido de SIRP α ;
 - 25 (ii) un agente que agoniza una molécula coestimuladora inmunitaria, en donde el agente es un anticuerpo anti-CD137; y
 - (iii) un anticuerpo específico de tumor;
- en una dosis eficaz para aumentar la reducción de las células objetivo.
- 30 3. El agente para su uso en la reivindicación 1, o el método in vitro de la reivindicación 2, en donde las células inmunitarias comprenden una o ambas de células NK y células fagocíticas, opcionalmente en donde las células inmunitarias comprenden células NK y macrófagos.
- 35 4. El agente para el uso de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, o el método in vitro de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde el agente que reduce la unión de CD47 a SIRP α es un anticuerpo anti-CD47.
- 40 5. El agente para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el método in vitro de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde el agente que reduce la unión de CD47 a SIRP α es una proteína de fusión que comprende un polipéptido de SIRP α , opcionalmente en donde: (i) el agente es un monómero o un dímero, y/o (ii) el polipéptido de SIRP α está fusionado en marco con parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina.
- 45 6. El agente para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el método in vitro de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde el agente que reduce la unión de CD47 a SIRP α es un anticuerpo anti-SIRP α .
7. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6, en donde dicho mamífero es un ratón.
8. El agente para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6, en donde dicho mamífero es un humano.

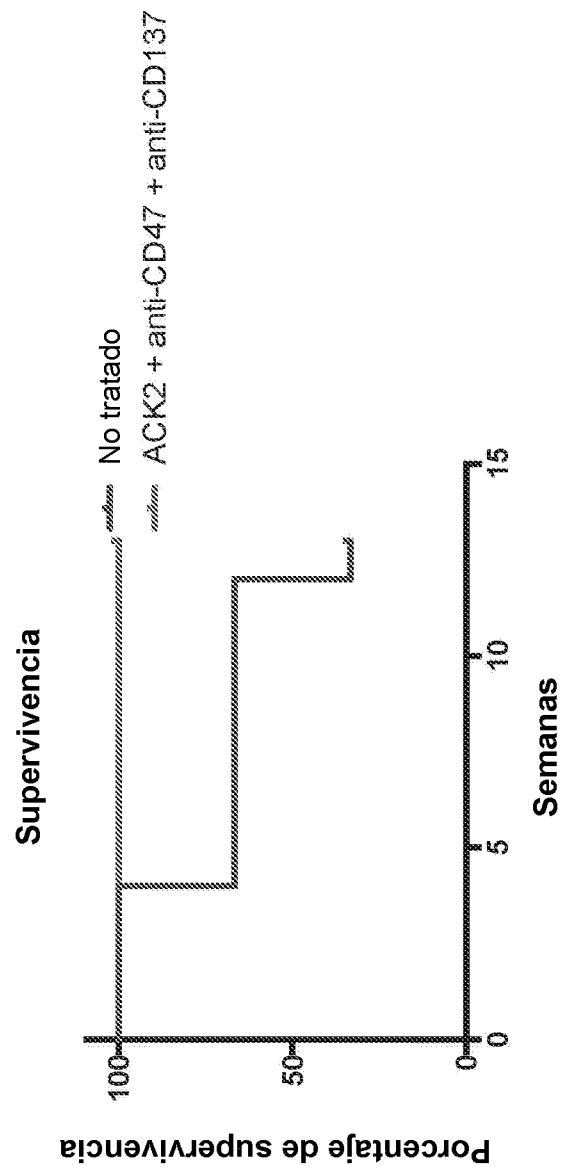


Figura 1