

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 838 925**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2016** **PCT/US2016/019633**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016** **WO16138306**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2016** **E 16756389 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2020** **EP 3261671**

54 Título: **Terapia de combinación para el tratamiento de la aterosclerosis**

30 Prioridad:

27.02.2015 US 201562126260 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2021

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:

**LEEPER, NICHOLAS J. y
WEISSMAN, IRVING L.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 838 925 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia de combinación para el tratamiento de la aterosclerosis

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ASCVD) sigue siendo la causa principal de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Los pacientes con ASCVD representan un grupo heterogéneo de individuos, con una enfermedad que progresa a diferentes velocidades y con patrones claramente diferentes. A pesar de los tratamientos apropiados basados en la evidencia para los pacientes con ASCVD, las tasas de recurrencia y mortalidad permanecen entre el 2 y el 4% al año.

En general, se cree que la aterosclerosis es una enfermedad compleja que implica múltiples vías biológicas. Las variaciones en la historia natural del proceso de la enfermedad aterosclerótica, así como la respuesta diferencial a los factores de riesgo y las variaciones en la respuesta individual a la terapia, reflejan en parte diferencias en los antecedentes genéticos y sus intrincadas interacciones con los factores ambientales que son responsables del inicio y modificación de la enfermedad. La enfermedad aterosclerótica también se ve influenciada por la naturaleza compleja del propio sistema cardiovascular, donde la anatomía, la función y la biología desempeñan todas un papel importante tanto en la salud como en la enfermedad.

Los factores de riesgo tradicionales representan aproximadamente la mitad del riesgo de enfermedad cardiovascular de por vida de un individuo. El equilibrio, por lo tanto, se explica por una combinación de exposiciones ambientales no medidas y factores genéticos. El reciente advenimiento de la plataforma del estudio de asociación del genoma completo (GWAS) ha hecho posible investigar el componente hereditario de trastornos poligénicos complejos, como la enfermedad arterial coronaria aterosclerótica (CAD). Usando este enfoque, una región en el cromosoma 9p21.3 ha sido identificada repetidamente en el GWAS como el locus superior para la enfermedad cardiovascular compleja (Helgadottir et al. (2007) Science 316:1491-1493; McPherson et al. (2007) Science 316:1488-1491).

Los datos disponibles sugieren que los polimorfismos asociados al riesgo: 1) son muy comunes, con hasta una quinta parte de la población mundial portadora de dos copias del alelo de riesgo (frecuencia del alelo menor ~50%) (Deloukas et al. (2013) Nat Genet 45:25-33); 2) son independientes de todos los factores de riesgo establecidos, lo que sugiere un nuevo mecanismo de acción (Cunnington y Keavney (2011) Curr Atheroscler Rep 13:193-201); 3) son responsables de hasta el 21% del riesgo atribuible de infarto de miocardio (MI); y 4) promueven el riesgo en un espectro de enfermedades vasculares, incluyendo CAD, ataque cerebral, enfermedad arterial periférica (EAP) y aneurisma aórtico abdominal (AAA) (Helgadottir et al. (2008) Nat Genet 40:217-224).

La placa aterosclerótica consiste de lípidos intracelulares y extracelulares acumulados, células de músculo liso, tejido conectivo y glicosaminoglicanos. La lesión detectable más temprana de la aterosclerosis es la veta grasa, que consiste de células espumosas cargadas de lípidos, que son macrófagos que han migrado como monocitos de la circulación a la capa subendotelial de la íntima, que luego evoluciona hacia la placa fibrosa, que consiste de una células musculares lisas de la íntima rodeadas de tejido conectivo y lípidos intracelulares y extracelulares.

La WO 2015/041987 describe la modulación de las vías de la eferocitosis para el tratamiento de la enfermedad aterosclerótica. La WO 2016/044021 describe dirigirse a la enfermedad de aneurisma modulando las vías de fagocitosis. Kojima et al. (2016) Nature 536 (7614):86-90 informa de que los anticuerpos bloqueadores de CD47 restauran la fagocitosis y evitan la aterosclerosis. Faruqi (2016) Nature Reviews Drug Discovery 15(9):602-603 informa que la reactivación de la eliminación de la basura celular mejora la aterosclerosis, la restenosis, y trastornos relacionados. Narizhneva et al. (2005) The FASEB Journal 19(9):1158-1160 informa que la tromboespondina-1 regula por incremento la expresión de moléculas de adhesión celular y promueve la unión de monocitos al endotelio. LA WO 2012/170250 describe oligonucleótidos de morfolino capaces de inhibir el daño celular mediado por cd47 y usos de los mismos. La US 2012/039896 describe un método para inhibir la activación celular por el factor de crecimiento 1 tipo insulina. La US 2010/092467 describe la prevención de isquemia tisular, métodos y composiciones relacionados. La US 2014/161799 describe anticuerpos para CD47 terapéuticos. La US 2001/021380 describe el tratamiento con receptor de factor de necrosis tumoral soluble de trastornos médicos. La WO 2014/124028 describe terapias dirigidas a CD47 para el tratamiento de enfermedad infecciosa. La WO 2013/032883 describe métodos para detectar y tratar enfermedades cardiovasculares. La WO 2014/149477 describe métodos para lograr dosis terapéuticamente eficaces de agentes anti-CD47.

60 SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona un agente anti-CD47 para su uso en un método para tratar a un sujeto para aterosclerosis, el método comprendiendo:

65 administrar al sujeto una dosis eficaz de un agente anti-CD47 y un agente anti-TNFa,

en donde el agente anti-CD47 es un anticuerpo anti-CD47 o un anticuerpo anti-SIRP α , en donde el anticuerpo reduce la unión de CD47 en una célula apoptótica para SIRP α en una célula fagocítica, y en donde el agente anti-TNF α es un anticuerpo anti-TNF α .

En la presente se divulgan métodos para la prevención y el tratamiento de la enfermedad de las arterias coronarias (CAD) en un sujeto, que incluyen, sin limitación, métodos para prevenir o tratar la aterosclerosis. En los métodos, se administra al sujeto una dosis combinada eficaz de un agente anti-CD47 y un agente anti-TNF α en una dosis y durante un período de tiempo eficaces para estabilizar, prevenir o reducir la placa aterosclerótica en el individuo. En algunas realizaciones, la dosificación combinada proporciona una respuesta sinérgica relacionada con la respuesta obtenida con el agente anti-CD47 o con el agente anti-TNF α administrado como monoterapia. En algunos casos, la dosis eficaz del agente anti-CD47 en la terapia combinada es menor que la dosis eficaz requerida como monoterapia. En algunos casos la dosis eficaz del agente anti-TNF α en la terapia combinada es menor que la dosis eficaz requerida como monoterapia.

En algunas realizaciones, el sujeto es homocigoto o heterocigoto para un alelo de riesgo 9p21. En algunas de tales realizaciones, los métodos incluyen pruebas genéticas del sujeto para detectar la presencia de un alelo de riesgo 9p21. En otras de tales realizaciones, al sujeto se le ha diagnosticado previamente la presencia de un alelo de riesgo 9p21, donde tales métodos pueden incluir, sin limitación, analizar una muestra de ADN genómico del individuo para detectar la presencia de secuencias del cromosoma humano 9p21 asociadas a riesgo de CAD, incluyendo los SNP asociados con el locus de riesgo.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere al uso de una dosis combinada eficaz de un agente anti-CD47 y un agente anti-TNF α en la fabricación de un medicamento para estabilizar, prevenir o reducir la placa aterosclerótica, en donde el medicamento se administra a una individuo que tiene o está en riesgo de tener aterosclerosis.

Otro aspecto más de la presente divulgación se refiere a un kit para estabilizar, prevenir o reducir la placa aterosclerótica. El kit incluye una dosis combinada eficaz de un agente anti-CD47 y un agente anti-TNF α , en una cantidad suficiente para estabilizar, prevenir o reducir la placa aterosclerótica. El kit también puede incluir reactivos para la genotipificación en el cromosoma humano 9p21, incluyendo los alelos de rs10757278 y rs1333049. El kit también puede incluir instrucciones de uso, reactivos para monitorizar la enfermedad aterosclerótica y similares.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. La placa aterosclerótica en la aorta torácica se reduce mediante la administración de Ab anti-CD47. Las aortas torácicas de ratones tratados con Ab anti-CD47 (MIAP410) o Ab de control (IgG) se recogieron y se fijaron. El área de la placa aterosclerótica (blanca) se cuantificó bajo microscopía de baja potencia de manera ciega. El porcentaje del área del vaso aórtico cubierto por la placa aterosclerótica se cuantificó para cada animal y se muestra que se reduce significativamente en los animales que recibieron Ab anti-CD47.

Figura 2. Las aortas explantadas representativas de ratones tratados con Ab de control (IgG) revelan una alta incidencia de aneurismas después de la infusión de angiotensina. Las aortas explantadas representativas de ratones tratados con Ab antiCD47 (MIAP410) revelan una baja incidencia de aneurismas después de la infusión de angiotensina. El gráfico representa puntos de datos para el tratamiento con Ab anti-CD47 que reduce el tamaño del aneurisma.

Figura 3. Tinción con DAPI, para caspasa escindida y Tunel. Los gráficos ilustran una disminución en el número de células apoptóticas con tratamiento anti-CD47, como lo demuestra la tinción para la caspasa 3 escindida. El % de caspasa escindida tiene una $p < 0,05$. La tinción TUNEL es confirmatoria.

Figura 4. El índice fagocítico in vivo asociado con la aterosclerosis aumenta con el tratamiento con anti-CD47, como se ilustra por una disminución en el número de cuerpos apoptóticos libres no asociados con macrófagos.

Figura 5. La expresión de CD47 aumenta con TNF- α , que mitiga la reducción de la expresión de CD47 en células del músculo liso debida a la apoptosis.

Figura 6. Gráficos que representan la expresión de CD47 en la superficie celular en HUVEC y mAoSMC en ausencia y presencia de TNF- α .

Figura 7. El CD47 se regula por incremento en la placa aterosclerótica humana en comparación con el tejido vascular normal.

Figura 8. La sobreexpresión de las subunidades de NF- κ B, incluyendo NF κ B1, activa la expresión de CD47.

Figura 9. La expresión de CD47, TNFRSF1A y NF κ B se correlacionan en muestras de endarterectomía carotídea aterosclerótica humana.

Figura 10. La expresión de CD47 y TNF α se correlacionan en muestras de arterias coronarias ateroscleróticas humanas.

Figuras 11A-11 C. (A) Los estímulos pro-ateroscleróticos como oxLDL y los estímulos apoptóticos (STS) inducen la depuración fagocítica de las células del músculo liso (SMC). La presencia de TNF- α mitiga este aumento de la fagocitosis (B). el Ab Anti-CD47 es desproporcionadamente eficaz para promover la fagocitosis incluso en presencia de TNF- α (C).

Figura 12. Datos in vitro que muestran que la terapia anti-CD47 puede sinergizar con la terapia anti-TNF-alfa

para promover la eferocitosis/fagocitosis. La inhibición concomitante de CD47 y TNF α usando anticuerpo anti-CD47 e infliximab, respectivamente, produce un beneficio sinérgico en la depuración de células vasculares enfermas.

Figura 13. Datos mecanicistas que muestran que los inhibidores de TNF (SPD 304 e Infliximab) reducen cada uno la expresión de CD47 y sinergizan con Ab anti-CD47 para promover la eferocitosis. A. El pretratamiento de las células del músculo liso vasculares de ratón con un inhibidor químico (SPD 304) o un anticuerpo monoclonal (infliximab) dirigido contra TNF- α previene el aumento en la expresión de CD47 que se observa normalmente después de la exposición a TNF α . B. La combinación de estos agentes con la terapia con anticuerpos anti-CD47 lleva a un aumento sinérgico de la eferocitosis con los ensayos de fagocitosis in vitro. ***= $p<0,001$, **= $p<0,01$, *= $p<0,05$.

Figura 14. Datos in vivo que muestran que la terapia de combinación (Ab anti-CD47 más el inhibidor de TNF- α Etanercept) reduce la aterosclerosis en mayor medida que el Ab anti-CD47 (MIAP410) solo. Datos presentados como área aterosclerótica positiva para Oil Red O en el seno aórtico de ratones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente divulgación se refiere a métodos para tratar a un sujeto por aterosclerosis, mediante la administración de una dosis combinada eficaz de un agente anti-CD47 y un agente anti-TNF α . En algunas realizaciones, el sujeto es homocigoto o heterocigoto para un alelo de riesgo 9p21.

Enfermedad de las arterias coronarias (CAD): es un estrechamiento o bloqueo de las arterias y vasos que proporcionan oxígeno y nutrientes al corazón. Está provocada por aterosclerosis, una acumulación de materiales grasos en los revestimientos internos de las arterias. El bloqueo resultante restringe el flujo sanguíneo al corazón. Cuando el flujo sanguíneo se interrumpe por completo, el resultado es un ataque cardíaco. La CAD es la causa principal de muerte tanto para hombres como para mujeres en los Estados Unidos.

La aterosclerosis (también denominada arteriosclerosis, enfermedad vascular ateromatosa, enfermedad arterial oclusiva), como se usa en la presente, se refiere a una enfermedad cardiovascular caracterizada por la acumulación de placa en las paredes de los vasos e inflamación vascular. La placa consiste de lípidos intracelulares y extracelulares acumulados, células de músculo liso, tejido conectivo, células inflamatorias y glucosaminoglicanos. La inflamación se produce en combinación con la acumulación de lípidos en la pared del vaso, y la inflamación vascular es el sello distintivo del proceso de la enfermedad de la aterosclerosis.

El infarto de miocardio es una necrosis miocárdica isquémica que resulta habitualmente de una reducción abrupta del flujo sanguíneo coronario a un segmento de miocardio. En la gran mayoría de los pacientes con MI agudo, un trombo agudo, a menudo asociado con la rotura de la placa, ocluye la arteria que irriga el área dañada. La rotura de la placa se produce generalmente en vasos previamente parcialmente obstruidos por una placa aterosclerótica enriquecida en células inflamatorias. La función plaquetaria alterada inducida por disfunción endotelial e inflamación vascular en la placa aterosclerótica presuntamente contribuye a la trombogénesis. El infarto de miocardio puede clasificarse en MI con elevación del ST y sin elevación del ST (también denominado angina inestable). En ambas formas de infarto de miocardio, hay necrosis de miocardio. En el infarto de miocardio con elevación del ST hay una lesión miocárdica transmural que lleva a elevaciones del ST en el electrocardiograma. En el infarto de miocardio sin elevación del ST, la lesión es subendocárdica y no se asocia con elevación del segmento ST en el electrocardiograma. El infarto de miocardio (tanto con ST como sin elevación del ST) representa una forma inestable de enfermedad cardiovascular aterosclerótica. El síndrome coronario agudo abarca todas las formas de enfermedad arterial coronaria inestable. La insuficiencia cardíaca puede producirse como resultado de una disfunción del miocardio provocada por un infarto de miocardio.

La angina se refiere al dolor o malestar en el pecho resultante de un flujo sanguíneo inadecuado al corazón. La angina puede ser un síntoma de enfermedad cardiovascular aterosclerótica. La angina puede clasificarse como estable, que sigue un patrón crónico regular de síntomas, a diferencia de las formas inestables de enfermedad vascular aterosclerótica. La base patofisiológica de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica estable también es complicada, pero es biológicamente distinta de la forma inestable. Generalmente la angina estable no es necrosis del miocardio.

"Tratamiento", "tratando", "tratar" y similares se usan en la presente para referirse en general 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 de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de estabilización o curación parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en la presente, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un humano, e incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad o síntoma en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o síntoma pero que aún no se le ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir el síntoma de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar el síntoma de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o síntoma. Aquellos con necesidad de tratamiento incluyen individuos ya diagnosticados con CAD, por ejemplo, aterosclerosis, así como aquellos en los que la enfermedad debe prevenirse.

Los términos "receptor", "individuo", "sujeto", "huésped" y "paciente" se usan indistintamente en la presente y se refieren a cualquier sujeto mamífero para el que se desea diagnóstico, tratamiento o terapia, particularmente humanos. "Mamífero" para propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o de compañía, como perros, caballos, gatos, vacas, ovejas, cabras, cerdos, etc. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para lograr resultados clínicos beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Para los propósitos de esta invención, una cantidad eficaz de un agente anti-CD47 combinado con un agente anti-TNF α es una cantidad que es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, prevenir, ralentizar o retrasar la progresión del estado patológico, por ejemplo, aterosclerosis o placa aterosclerótica, aumentando la fagocitosis de una célula objetivo. Por ejemplo, en un modelo animal, el porcentaje del área de la superficie aórtica con placa aterosclerótica puede reducirse en un 25%, 50%, 75% o más con respecto a un animal tratado de control. Pueden obtenerse efectos similares con indicaciones apropiadas para pacientes humanos que incluyen, sin limitación, proteína C reactiva [CRP] y fibrinógeno; fosfolipasa A2 [Lp-PLA2] y mieloperoxidasa [MPO] asociadas a lipoproteínas; marcadores inflamatorios del factor de diferenciación del crecimiento-15 [GDF-15]; rigidez arterial ambulatoria, imagenología por IVUS y similares. Ver, por ejemplo, Krintus et al. (2013) Crit Rev Clin Lab Sci. 11:1-17; Kollias et al. (2012) Atherosclerosis 224(2):291-301; y Kollias et al. (2011) Int. J. Cardiovasc. Imaging 27(2):225-37.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citoquina proinflamatoria producida por macrófagos y linfocitos que media la inflamación en una serie de afecciones. Las estrategias para inhibir el TNF que se han estudiado más ampliamente hasta la fecha consisten de anticuerpos anti-TNF α monoclonales, anticuerpos del receptor de anti-TNF y receptores de TNF solubles (sTNF-R). A continuación se enumeran algunos ejemplos específicos de agentes anti-TNF que se encuentran en uso clínico actual.

El infliximab (IFX) es un anticuerpo monoclonal de IgG 1 recombinante específico para TNF- α que impide que la citoquina active el complejo receptor de TNF celular. El IFX debe administrarse mediante infusión intravenosa y tiene una vida media terminal de 8 a 10 días. Convencionalmente se administra cada 4-8 semanas y la dosis varía de 3 a 6 (a 10) mg/kg. Las terapias de combinación de la presente invención pueden usar una dosis o un programa de dosificación que proporcione una dosis más baja o un programa de dosificación reducido con respecto a otros programas convencionales.

El adalimumab es un anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina recombinante (IgG 1) que contiene solo secuencias humanas de péptidos. Es un antagonista del TNF- α , que puede evitar la unión del TNF- α a sus receptores. Tiene una vida media de 10 a 20 días. La dosis convencional de ADA es de 25 mg s.c. dos veces a la semana. Las terapias de combinación de la presente invención pueden usar una dosis o un programa de dosificación que proporcione una dosis más baja o un programa de dosificación reducido con respecto a los programas convencionales.

El golimumab es un anticuerpo monoclonal anti-TNF- α humano que se genera y madura en un sistema in vivo. El GOLI tiene una alta afinidad y especificidad por TNF- α humano y neutraliza eficazmente la bioactividad de TNF- α in vitro. La dosificación convencional es de 50 a 100 mg. Las terapias de combinación de la presente invención pueden usar una dosis o un programa de dosificación que proporcione una dosis más baja o un programa de dosificación reducido con respecto a programas convencionales.

El etanercept es una proteína modificada genéticamente que comprende dos moléculas del dominio extracelular del receptor de TNF II (p75) y la porción Fc de IgG 1. Debido a su vida media de 3-5,5 días, ETN se administra convencionalmente por vía subcutánea (s.c.), ya sea semanalmente (50 mg) o dos veces a la semana (25 mg). Las terapias de combinación de la presente invención pueden usar una dosis o un programa de dosificación que proporcione una dosis más baja o un programa de dosificación reducido con respecto a los programas convencionales.

El certolizumab es un anticuerpo monoclonal anti-TNF- α pegilado. El certolizumab es un fragmento de anticuerpo humanizado (Fab') que se une al polietilenglicol para permitir una administración menos frecuente. El certolizumab tiene una alta afinidad por el TNF- α humano y se dirige selectivamente al TNF- α en el tejido inflamado. Aunque la presencia de una porción Fab' permite que el certolizumab retenga la potencia del anticuerpo completo, el certolizumab es incapaz de unirse a las células fagocíticas o lisar células debido a la falta de una porción Fc. Se demostró que la semivida de eliminación de certolizumab es de 311 horas.

La CD47, también conocida como proteína asociada a integrina (IAP,) es un receptor de membrana de 50 kDa que tiene un dominio IgV N-terminal extracelular, cinco dominios transmembrana y una transmembrana de cola intracelular C-terminal corta, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que interactúa con integrinas, más comúnmente la integrina $\alpha v \beta 3$, la trombospodina-1 (TSP-1) y la proteína reguladora de señales alfa (SIRP α). La secuencia de referencia para el ARNm humano tiene el número de registro de Genbank NM_001025079, y la

secuencia de referencia de la proteína es NP_001768.

La interacción CD47/SIRP α lleva a la señalización bidireccional, lo que da como resultado diferentes respuestas de célula a célula, incluyendo la inhibición de la fagocitosis, la estimulación de la fusión célula-célula y la activación de células T.

Como se usa en la presente, el término "agente anti-CD47" se refiere a cualquier agente que reduzca la unión de CD47 (por ejemplo, en una célula afectada) a SIRP α (por ejemplo, en una célula fagocítica). En algunos casos, el agente anti-CD47 no interfiere ni se une a las regiones de CD47 que se unen a la trombospodina. En algunos casos, el agente anti-CD47 no activa CD47 tras la unión. Cuando se activa CD47, se produce 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 algunos casos, el agente anti-CD47 no induce directamente la muerte celular de una célula que expresa CD47.

Los ejemplos no limitativos de reactivos anti-CD47 adecuados incluyen reactivos SIRP α de alta afinidad, anticuerpos anti-SIRP α y anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-CD47. En algunos casos, un agente anti-CD47 adecuado (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD47, un reactivo SIRP α de alta afinidad, etc.) se une específicamente a CD47 para reducir la unión de CD47 a SIRP α . En algunos casos, un agente anti-CD47 adecuado (por ejemplo, un anticuerpo anti-SIRP α , etc.) 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 ensayando el agente. Un agente para su uso en los métodos de la divulgación regulará por incremento la fagocitosis en por lo menos un 10% (por ejemplo, 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 160% o por lo menos un 200%) 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 un caso, el agente anti-CD47, o una composición farmacéutica que comprende el agente, se proporciona en una cantidad eficaz para inhibir detectablemente la unión de CD47 a SIRP α presente en la superficie de las células fagocíticas. La cantidad eficaz se determina mediante la rutina de pruebas empírica en la técnica, por ejemplo, en una muestra biológica tomada de un individuo infectado. La cantidad eficaz puede variar dependiendo del número de células a las que se dirigen, la localización de las células y los factores específicos del sujeto.

Reactivo SIRP α de alta afinidad. En algunos casos, un agente anti-CD47 sujeto es un "reactivo SIRP α de alta afinidad", que incluye polipéptidos derivados de SIRP α y análogos de los mismos. Los reactivos SIRP α de alta afinidad se describen en la solicitud internacional WO 2013/109752. Los reactivos SIRP α de alta afinidad son variantes de la proteína de SIRP α nativa. En algunos casos, un reactivo SIRP α de alta afinidad es soluble, cuando el polipéptido carece del dominio transmembrana 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 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.

Un reactivo de SIRP α de alta afinidad comprende la porción de SIRP α que es suficiente para unirse a CD47 con una afinidad reconocible, por ejemplo, alta afinidad, que normalmente se encuentra entre la secuencia señal y el dominio transmembrana, o un fragmento de la misma que retiene la actividad de unión. El reactivo de SIRP α de alta afinidad comprenderá habitualmente por lo menos el dominio d1 de SIRP α con residuos de aminoácidos modificados para aumentar la afinidad. En algunos casos, una variante de SIRP α es una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada en marco con un segundo polipéptido. En algunos casos, el segundo polipéptido es capaz de aumentar el tamaño de la proteína de fusión, por ejemplo, de modo que la proteína de fusión no se depure rápidamente de la circulación. En algunos casos, el segundo polipéptido es parte o la totalidad de una región Fc de inmunoglobulina. En otros casos, el segundo polipéptido es cualquier polipéptido adecuado que sea sustancialmente similar a FC, por ejemplo, proporcionando tamaño aumentado, dominios de multimerización, y/o unión o interacción adicionales con moléculas de Ig.

Un reactivo de SIRP α de alta afinidad adecuado reduce (por ejemplo, bloquea, previene, etc.) la interacción entre las proteínas nativas SIRP α y CD47. Los cambios de aminoácidos que proporcionan una afinidad aumentada 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. Dicho reactivo de SIRP α de alta afinidad comprende opcionalmente secuencias de aminoácidos

adicionales, por ejemplo, secuencias de Fc de anticuerpos; porciones de la proteína de 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, habitualmente fragmentos contiguos al dominio d1; y similares. Los reactivos de SIRPα de alta afinidad pueden ser monoméricos o multiméricos, es decir, dímeros, trímeros, tetrameros, etc.

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. 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).

Anticuerpos anti-SIRPα. En algunas realizaciones, un agente anti-CD47 sujeto es un anticuerpo que se une específicamente a SIRPα (es decir, un anticuerpo anti-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). Los anticuerpos anti-SIRPα adecuados pueden unirse a SIRPα sin activar o estimular la señalización a través de SIRPα porque la activación de SIRPα inhibiría la fagocitosis. En cambio, los anticuerpos anti-SIRPα adecuados facilitan la fagocitosis preferencial de las células infectadas sobre las no infectadas. Aquellas células que expresan niveles más altos de CD47 (por ejemplo, células infectadas) con respecto a otras células (células no infectadas) serán preferentemente fagocitadas. Por tanto, un anticuerpo anti-SIRPα se une específicamente a SIRPα sin activar/estimular suficiente de una respuesta de señalización para inhibir la fagocitosis.

Los anticuerpos 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.

Terapia de combinación: como se usa en la presente, el término "terapia de combinación" se refiere a aquellas situaciones en las que un sujeto se expone simultáneamente a dos o más regímenes terapéuticos (por ejemplo, dos o más agentes terapéuticos). En algunas realizaciones, pueden administrarse dos o más agentes simultáneamente; en algunas realizaciones, tales agentes pueden administrarse secuencialmente; en algunas realizaciones, tales agentes se administran en regímenes de dosificación superpuestos.

Comparable: como se usa en la presente, el término "comparable" se refiere a dos o más agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etc., que pueden no ser idénticos entre sí pero que son lo suficientemente similares para permitir la comparación entre ellos de tal manera que puedan extraerse razonablemente conclusiones basadas en las diferencias o similitudes observadas. En algunas realizaciones, conjuntos comparables de condiciones, circunstancias, individuos o poblaciones se caracterizan por una pluralidad de características sustancialmente idénticas y una o un pequeño número de características variadas. Los expertos en la técnica comprenderán, en contexto, qué grado de identidad se requiere en cualquier circunstancia dada para que dos o más de tales agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etc. se consideren comparables. Por ejemplo, los expertos en la técnica apreciarán que los conjuntos de circunstancias, individuos, o poblaciones son comparables entre sí cuando se caracterizan por un número suficiente y tipo de características sustancialmente idénticas para garantizar una conclusión razonable de que las diferencias en los resultados o fenómenos obtenidos observados bajo o con diferentes conjuntos de circunstancias, individuos o poblaciones están provocados o son indicativos de la variación en esas características que han variado.

Composición: Una "composición" o una "composición farmacéutica" de acuerdo con esta invención se refiere a la combinación de dos o más agentes como se describe en la presente para la coadministración o administración como parte del mismo régimen. No se requiere en todas las realizaciones que la combinación de agentes dé como resultado una mezcla física, es decir, la administración como coagentes separados es posible para cada uno de los componentes de la composición; sin embargo, muchos pacientes o médicos en el campo pueden encontrar ventajoso preparar una composición que sea una mezcla de dos o más de los ingredientes en un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, lo que hace posible administrar los ingredientes componentes de la combinación al mismo tiempo.

Comprende: Una composición o método descrito en la presente como "que comprende" uno o más elementos o pasos nombrados tiene un final abierto, lo que significa que los elementos o pasos nombrados son esenciales, pero pueden añadirse otros elementos o pasos dentro del alcance de la composición o método. Para evitar la prolijidad, también se entiende que cualquier composición o método descrito como "que comprende" (o que "comprende") uno o más elementos o pasos nombrados también describe la composición o método correspondiente, más limitado "que consiste esencialmente de" (o que "consiste esencialmente de") los mismos elementos o pasos nombrados, lo que significa que la composición o método incluye los elementos o pasos esenciales nombrados y también puede incluir elementos o pasos adicionales que no afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la composición o método. También se entiende que cualquier composición o método descrito en la

presente como "que comprende" o "que consiste esencialmente de" uno o más elementos o pasos nombrados también describe la composición o método correspondiente, más limitado y cerrado "que consiste de" (o "consiste de") los elementos o pasos nombrados con exclusión de cualquier otro elemento o paso no nombrado. En cualquier composición o método divulgado en la presente, los equivalentes conocidos o divulgados de cualquier elemento o paso esencial nombrado pueden ser sustituidos por ese elemento o paso.

Determinar: muchas metodologías descritas en la presente incluyen un paso de "determinación". Los expertos en la técnica que lean la presente especificación apreciarán que dicha "determinación" puede utilizarse o lograrse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas disponibles para los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, técnicas específicas a las que se hace referencia explícitamente en la presente. En algunas realizaciones, la determinación implica la manipulación de una muestra física. En algunas realizaciones, la determinación implica la consideración y/o manipulación de datos o información, por ejemplo utilizando un ordenador u otra unidad de procesamiento adaptada para realizar un análisis relevante. En algunas realizaciones, la determinación implica recibir información y/o materiales relevantes de una fuente. En algunas realizaciones, la determinación implica comparar una o más características de una muestra o entidad con una referencia comparable.

Forma de dosificación: Como se usa en la presente, el término "forma de dosificación" se refiere a una unidad físicamente discreta de un agente activo (por ejemplo, un agente terapéutico o de diagnóstico) para la administración a un sujeto. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de agente activo. En algunas realizaciones, dicha cantidad es una cantidad de dosificación unitaria (o una fracción completa de la misma) apropiada para la administración de acuerdo con un régimen de dosificación que se ha determinado que se correlaciona con un resultado deseado o beneficioso cuando se administra a una población relevante (es decir, con un régimen de dosificación terapéutico). Los expertos en la técnica apreciarán que la cantidad total de una composición o agente terapéutico administrado a un sujeto particular es determinada por uno o más médicos asistentes y puede implicar la administración de múltiples formas de dosificación.

Régimen de dosificación: como se usa en la presente, el término "régimen de dosificación" se refiere a un conjunto de dosis unitarias (típicamente más de una) que se administran individualmente a un sujeto, típicamente separadas por períodos de tiempo. En algunas realizaciones, un agente terapéutico dado tiene un régimen de dosificación recomendado, que puede implicar una o más dosis. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis, cada una de las cuales está separada entre sí por un período de tiempo de la misma duración; en algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis y por lo menos dos períodos de tiempo diferentes que separan las dosis individuales. En algunas realizaciones, todas las dosis dentro de un régimen de dosificación son de la misma cantidad de dosis unitaria. En algunas realizaciones, diferentes dosis dentro de un régimen de dosificación son de diferentes cantidades. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una primera dosis en una primera cantidad de dosis, seguida de una o más dosis adicionales en una segunda cantidad de dosis diferente de la primera cantidad de dosis. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una primera dosis en una primera cantidad de dosis, seguida de una o más dosis adicionales en una segunda cantidad de dosis igual que la primera cantidad de dosis. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación se correlaciona con un resultado deseado o beneficioso cuando se administra en una población relevante (es decir, es un régimen de dosificación terapéutica).

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 tejidos o células derivadas de los mismos y la progenie de los mismos. La definición también incluye muestras que hayan sido manipuladas de cualquier manera después de su obtención, como por ejemplo mediante tratamiento con reactivos; lavado; o enriquecimiento para ciertas poblaciones celulares. La definición también incluye muestras que se han enriquecido para tipos particulares de moléculas, por ejemplo, ácidos nucleicos, polipéptidos, etc.

Los términos "unión específica", "se une específicamente" y similares, se refieren a la unión preferencial no covalente o covalente a una molécula con respecto a otras moléculas o fracciones en una solución o mezcla de reacción (por ejemplo, un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido o epítipo particular con respecto a otros polipéptidos disponibles; unión de alta afinidad de un polipéptido de SIRP α a CD47; etc.). En algunos casos, la afinidad de una molécula por otra molécula a la que se une específicamente se caracteriza por una K_D (constante de disociación) de 10^{-5} M o menos (por ejemplo, 10^{-6} M o menos, 10^{-7} M o menos, 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-11} M o menos, 10^{-12} M o menos, 10^{-13} M o menos, 10^{-14} M o menos, 10^{-15} M o menos, o 10^{-16} M o menos). "Afinidad" se refiere a la fuerza de la unión, el aumento de la afinidad de unión estando correlacionado con una K_D menor.

El término "miembro de unión específica" como se usa en la presente se refiere a un miembro de un par de unión específico (es decir, dos moléculas, habitualmente dos moléculas diferentes, donde una de las moléculas, por ejemplo, un primer miembro de unión específico, a través de medios no covalentes se une específicamente a la otra molécula, por ejemplo, un segundo miembro de unión específico). Los miembros de unión específicos adecuados incluyen agentes que se unen específicamente a CD47 (es decir, agentes anti-CD47), o que bloquean de otra manera la interacción entre CD47 y SIRP α , agentes que se unen a calreticulina o su receptor LRP, etc.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos también se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímero de aminoácidos de origen no natural.

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 la secuencia nativa o dentro de ella; se eliminan de aproximadamente uno a cuarenta residuos de aminoácidos y opcionalmente se sustituyen con uno o 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 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. Los polipéptidos variantes pueden tener modificaciones postraduccionales que no se encuentran en la proteína natural.

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. Una proteína CRT soluble de fusión, por ejemplo, compartirá por lo menos una propiedad biológica en común con un polipéptido CRT soluble de secuencia nativa. Los ejemplos de polipéptidos de fusión incluyen inmunoadhesinas, como se ha descrito anteriormente, que combinan una porción del polipéptido de interés con una secuencia de inmunoglobulina, y polipéptidos marcados con epítipo, que comprenden un polipéptido soluble de interés o una porción del mismo fusionado a un "polipéptido marcador". El polipéptido marcador tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el que puede elaborarse un anticuerpo, pero es lo suficientemente corto como para que no interfiera con la actividad biológica del polipéptido de interés. Los polipéptidos marcadores adecuados generalmente tienen por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 6-60 residuos de aminoácidos.

Un "derivado funcional" de un polipéptido de una secuencia nativa es un compuesto que tiene una propiedad biológica cualitativa en común con un polipéptido de secuencia nativa. Los "derivados funcionales" incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de una secuencia nativa y derivados de un polipéptido de secuencia nativa y sus fragmentos, siempre que tengan una actividad biológica en común con un polipéptido de secuencia nativa correspondiente. El término "derivado" abarca tanto variantes de secuencias de aminoácidos del polipéptido como modificaciones covalentes de los mismos. Por ejemplo, los derivados y la fusión de CRT soluble encuentran uso como moléculas miméticas de CRT.

Molécula pequeña: como se usa en la presente, el término "molécula pequeña" se refiere a compuestos orgánicos, ya sean de origen natural o creados artificialmente (por ejemplo, mediante síntesis química) que tienen un peso molecular relativamente bajo y que no son proteínas, polipéptidos o ácidos nucleicos. Normalmente, las moléculas pequeñas tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 1500 g/mol. Además, las moléculas pequeñas suelen tener múltiples enlaces carbono-carbono.

Sujeto: por "sujeto" se entiende un mamífero (por ejemplo, un humano, en algunas realizaciones incluyendo formas humanas prenatales). En algunos casos, un sujeto padece una enfermedad, trastorno o afección relevante. En algunos casos, un sujeto es susceptible a una enfermedad, trastorno o afección. En algunos casos, un sujeto muestra uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno o afección. En algunos casos, un sujeto no muestra ningún síntoma o característica de una enfermedad, trastorno o afección. En algunos casos, un sujeto es alguien con uno o más rasgos característicos de susceptibilidad o riesgo de una enfermedad, trastorno o afección. En algunos casos, un sujeto es un paciente. En algunos casos, un sujeto es un individuo al que se le ha administrado y/o un diagnóstico y/o terapia.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa), los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y los fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Los "anticuerpos" (Ab) e "inmunoglobulinas" (Ig) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos muestran especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos de este último tipo se producen, por ejemplo, en niveles bajos por el sistema linfático y en niveles elevados por los mielomas.

"Fragmento de anticuerpo" y todas las variantes gramaticales del mismo, como se usa en la presente, se definen como una parte de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión al antígeno o la región variable del

anticuerpo intacto, en donde la parte está libre de los dominios de la cadena pesada constante (es decir, CH2, CH3 y CH4, dependiendo del isotipo del anticuerpo) de la región Fc del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que sea un polipéptido que tenga una estructura primaria que consista de una secuencia ininterrumpida de residuos de aminoácidos contiguos (a los que se hace referencia en la presente como "fragmento de anticuerpo de cadena sencilla" o "polipéptido de cadena sencilla"), incluyendo, sin limitación (1) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv) (2) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento del mismo que contiene las tres CDR del dominio variable de la cadena ligera, sin una fracción de cadena pesada asociada (3) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo una región variable de cadena pesada, o un fragmento de la misma que contiene las tres CDR de la región variable de la cadena pesada, sin una fracción de cadena ligera asociada y (4) nanocuerpos que comprenden dominios de Ig individuales de especies no humanas u otros módulos de unión de dominio único específicos; y estructuras multiespecíficas o multivalentes formadas a partir de fragmentos de anticuerpos. En un fragmento de anticuerpo que comprende una o más cadenas pesadas, las cadenas pesadas pueden contener cualquier secuencia de dominio constante (por ejemplo, CH1 en el isotipo IgG) que se encuentre en una región no Fc de un anticuerpo intacto, y/o puede contener cualquier secuencia de región bisagra encontrada en un anticuerpo intacto, y/o puede contener una secuencia de cremallera de leucina fusionada o situada en la secuencia de región bisagra o la secuencia de dominio constante de las cadenas pesadas.

Como se usa en esta invención, el término "epítipo" significa cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se une el paratopo de un anticuerpo. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente de agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Riesgo 9p21. Como se usa en la presente, el término "un individuo que porta por lo menos un factor de riesgo 9p21" se refiere a humanos en los que están presentes en el genoma uno o más alelos de riesgo en el locus 9p21. Se ha demostrado que tales individuos tienen un mayor riesgo de: infarto de miocardio de aparición temprana, aneurisma aórtico abdominal, ataque cerebral, enfermedad arterial periférica e infarto de miocardio/enfermedad cardíaca coronaria. Este riesgo es independiente de los factores de riesgo tradicionales, que incluyen diabetes, hipertensión, colesterol y obesidad. Véase, por ejemplo, Helgadottir et al. *Science*. 2007; 316(5830):1491-1493; Helgadottir et al. *Nat Genet*. 2008; 40(2):217-224; Palomaki et al. *JAMA*. 2010; 303(7):648-656; y Roberts et al. *Curr Opin Cardiol*. 2008; 23:629-633

El locus 9p21 está en LD estrecho (desequilibrio de ligamiento), y se ha demostrado que una serie de marcadores de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son útiles en el diagnóstico. Los SNP representativos incluyen, sin limitación rs10757278; rs3217992; rs4977574; rs1333049; rs10757274; rs2383206; rs2383207; Rs3217989; rs1333040; rs2383207; rs10116277; rs7044859; rs1292136; rs7865618; rs1333045; rs9632884; rs10757272; rs4977574; rs2891168; rs6475606; rs1333048; rs1333049; Rs1333045; etc.

Eferocitosis. El proceso mediante el cual los fagocitos profesionales y no profesionales eliminan las células apoptóticas de una manera rápida y eficiente. La eferocitosis implica una serie de moléculas, incluyendo ligandos en las células apoptóticas, por ejemplo, fosfatidilserina; receptores en el eferocito; moléculas puente ligando-receptor solubles; y las llamadas células "encuéntrame" y "no me comas", por ejemplo lisofosfolípidos y CD47, la expresión de las cuales por células moribundas se altera para atraer a fagocitos cercanos. Al depurar células apoptóticas en una etapa relativamente temprana de la muerte celular, cuando el plasma celular y las membranas de los orgánulos todavía están intactos, se evita la necrosis postapoptótica o "secundaria". La prevención de la necrosis celular, a su vez, evita la liberación de moléculas intracelulares potencialmente dañinas en el medio extracelular, incluyendo moléculas que pueden estimular respuestas inflamatorias, proateroscleróticas y/o autoinmunes.

La eficacia de la depuración eferocítica en las lesiones ateroscleróticas desempeña un papel clave en el desarrollo de la enfermedad. Se sabe que la eferocitosis está alterada en la placa aterosclerótica humana. Una característica destacada de las lesiones ateroscleróticas avanzadas es el núcleo necrótico, o núcleo lipídico, que es una colección de macrófagos muertos y necróticos rodeados de células inflamatorias. Se cree que los núcleos necróticos son una característica principal responsable de la "vulnerabilidad" de la placa, es decir, placas capaces de sufrir alteración y desencadenar una trombosis luminal aguda. La alteración de la placa y la trombosis aguda son los eventos que desencadenan los síndromes coronarios agudos, incluyendo el infarto de miocardio, la angina inestable, la muerte cardíaca súbita y el ataque cerebral.

Por "manipular la eferocitosis" se entiende una regulación por incremento o una regulación por disminución en la eferocitosis de una célula objetivo, por ejemplo, SMC apoptótica, en por lo menos aproximadamente un 10%, o hasta un 20%, o un 50% o un 70%, o el 80% o hasta aproximadamente un 90% en comparación con el nivel de eferocitosis observado en ausencia de intervención.

Los términos "células fagocíticas" y "fagocitos" se usan indistintamente en la presente para referirse a una célula que es capaz de fagocitosis. Hay tres categorías principales de fagocitos: macrófagos, células mononucleares

(histiocitos y monocitos); leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) y células dendríticas. Sin embargo, también se sabe que las células "no profesionales" participan en la eferocitosis, como las SMC colindantes en la pared de los vasos sanguíneos.

5 Métodos

En la presente se divulgan métodos para tratar o reducir la aterosclerosis mediante la administración de una dosis combinada eficaz de un agente anti-CD47 y un agente anti-TNF α para aumentar la eferocitosis de los componentes celulares de la placa coronaria o extracardíaca, incluyendo la eferocitosis de células de músculo liso apoptóticas. La administración puede ser simultánea o concomitante, donde el programa de dosificación puede adaptarse a cada uno de los agentes en la combinación. Como ejemplo, una dosificación semanal del agente anti-TNF α puede ser concomitante con una dosificación cada quincenal o bisemanal del agente anti-CD47, o viceversa. Los métodos de administración al sistema cardiovascular son de particular interés.

Las dosis eficaces de la entidad terapéutica de la presente invención varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo la naturaleza del agente, los medios de administración, sitio objetivo, 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 ajustarse para optimizar la seguridad y la eficacia.

En algunas realizaciones, la dosificación terapéutica puede oscilar entre aproximadamente 0,0001 y 500 mg/kg, y más habitualmente entre 0,01 y 100 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 1-50 mg/kg. La dosificación puede ajustarse al peso molecular del reactivo y puede reducirse con respecto a la dosificación requerida para una monoterapia de cualquiera de los agentes en la combinación. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración diaria, bisemanal, semanal, una vez cada dos semanas, una vez al mes, etc. En otro ejemplo, el tratamiento puede administrarse como una infusión continua. 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. Un experto en la técnica entenderá que dichas pautas se ajustarán al peso molecular del agente activo, por ejemplo, en el uso de fragmentos de polipéptidos, en el uso de conjugados de anticuerpos, en el uso de reactivos de SIRP α de alta afinidad, etc. La dosificación también puede variarse para la administración localizada, por ejemplo, intranasal, inhalación, etc., o para la administración sistémica, por ejemplo, i.m., i.p., i.v., y similares.

Para el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada del agente dependerá de la gravedad y el curso de la enfermedad, si el agente se administra con propósitos preventivos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo y la disrescción del médico tratante. El agente se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Pueden proporcionarse agentes adecuados en composiciones farmacéuticas adecuadas para uso terapéutico, por ejemplo, para tratamiento en humanos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen una o más entidades terapéuticas de la presente invención o sales farmacéuticamente aceptables, ésteres o solvatos de las mismas. En algunas otras realizaciones, la dosis combinada eficaz de un agente anti-CD47 y un agente anti-TNF α se combina además con un tercer agente terapéutico, por ejemplo, fármacos útiles en el tratamiento de la aterosclerosis. Tales combinaciones pueden incluir, sin limitación, estatinas. Las estatinas son inhibidores de la enzima reductasa HMG-CoA. Estos agentes están descritos con detalle; por ejemplo, la mevastatina y compuestos relacionados como se divulga en la Patente de Estados Unidos N° 3.983.140; la lovastatina (mevinolina) y compuestos relacionados como se divulga en la Patente de Estados Unidos N° 4.231.938; la pravastatina y compuestos relacionados como se divulga en la Patente de Estados Unidos N° 4.346.227; la simvastatina y compuestos relacionados como se divulga en las Patentes de Estados Unidos N° 4.448.784 y 4.450.171; la fluvastatina y compuestos relacionados como se divulga en la Patente de Estados Unidos N° 5.354.772; la atorvastatina y compuestos relacionados como se divulga en las Patentes de Estados Unidos N° 4.681, 893, 5.273.995 y 5.969.156; y la cerivastatina y compuestos relacionados como se divulga en las Patentes de Estados Unidos N° 5.006.530 y 5.177.080. Agentes y compuestos adicionales se divulgan en las Patentes de Estados Unidos N° 5.208.258, 5.130.306, 5.116.870, 5.049.696, RE 36.481 y RE 36.520. Las estatinas incluyen las sales y/o ésteres de las mismas.

Las formulaciones terapéuticas que comprenden uno o más agentes de la invención se preparan para el almacenamiento mezclando el agente que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o

estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. La composición del agente se formulará, dosificará y administrará de manera coherente con las buenas prácticas médicas. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el lugar de administración del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por los practicantes médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del agente a administrar se registrará por tales consideraciones y es la cantidad mínima necesaria para tratar o prevenir la aterosclerosis.

El agente puede administrarse por cualquier medio adecuado, incluyendo tópico, oral, parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal o subcutánea. Además, el agente puede administrarse adecuadamente mediante infusión pulsada, particularmente con dosis decrecientes del agente.

La combinación de agentes puede usarse en las mismas dosificaciones y con las vías de administración como se usó anteriormente en la presente como agentes individuales, o aproximadamente del 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, al 99% de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

A menudo, un agente se administra como una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico activo y otro excipiente farmacéuticamente aceptable. La forma preferida depende del modo de administración y aplicación terapéutica pretendidos. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, portadores o diluyentes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos comúnmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración animal o humana. El diluyente se selecciona de tal manera que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros portadores, adyuvantes, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

En algunas otras realizaciones más, las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes, de metabolización lenta como proteínas, polisacáridos como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (como Sepharose™ funcionalizado con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lipídicos (como gotitas de aceite o liposomas).

Un portador puede portar los agentes de varias formas, incluyendo enlaces covalentes ya sea directamente o mediante un grupo conector, y asociaciones no covalentes. Los portadores de enlaces covalente adecuados incluyen proteínas como albúminas, péptidos y polisacáridos como aminodextrano, cada uno de los cuales tiene múltiples sitios para la unión de fracciones. Un portador también puede portar un agente anti-CD47 por asociaciones no covalentes, como enlaces no covalentes o por encapsulación. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Los expertos en la técnica conocerán otros portadores adecuados para unir agentes anti-CD47, o serán capaces de determinarlos, usando experimentación rutinaria.

Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones que se usarán para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (para ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Los portadores y conectores específicos para agentes radionúclidos incluyen moléculas pequeñas radiohalogenadas y compuestos quelantes. Un quelato de radionúclido puede formarse a partir de compuestos

quelantes que incluyen aquellos que contienen átomos de nitrógeno y azufre como átomos donantes para unir el radionúclido de metal, u óxido de metal.

Las fracciones radiográficas para su uso como fracciones de imagenología incluyen compuestos y quelatos con átomos relativamente grandes, como oro, iridio, tecnecio, bario, talio, yodo y sus isótopos. Se prefiere que en los métodos de la divulgación se usen fracciones de imagenología radiográfica menos tóxicos, como yodo o isótopos de yodo. Tales fracciones pueden conjugarse con el agente anti-CD47 a través de un conector químico o portador de quelación aceptable. Las fracciones emisoras de positrones incluyen ^{18}F , que pueden conjugarse fácilmente mediante una reacción de fluoración con el agente.

Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, 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 polilactida, 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 invención pueden administrarse en forma de inyección de depósito o preparación de implante que puede formularse de tal manera para permitir una liberación sostenida o pulsátil del ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente como estériles, sustancialmente isotónicas y en conformidad con las regulaciones de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) de la U.S. Food and Drug Administration.

La toxicidad de los agentes puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, determinando la LD_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) o la LD_{100} (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 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.

Pueden usarse sistemas basados en células para identificar compuestos y combinaciones de compuestos que actúan para mejorar los síntomas de las enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, tales sistemas celulares pueden exponerse a una combinación de compuestos de agentes a una concentración suficiente y durante un tiempo suficiente para provocar tal mejora de los síntomas de la enfermedad cardiovascular en las células expuestas. Después de la exposición, las células se examinan para determinar si uno o más de los fenotipos celulares de enfermedad cardiovascular se han alterado para parecerse a un fenotipo de enfermedad no cardiovascular más normal o más del tipo salvaje.

Además, los sistemas de enfermedades basados en animales, como los descritos anteriormente, pueden usarse para identificar compuestos capaces de mejorar los síntomas de la enfermedad. Tales modelos animales pueden usarse como sustratos de prueba para la identificación de fármacos, productos farmacéuticos, terapias e intervenciones que pueden ser eficaces en el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, los modelos animales pueden exponerse a un compuesto, que se sospecha que muestra una capacidad para mejorar los síntomas de la enfermedad cardiovascular, a una concentración suficiente y durante un tiempo suficiente para provocar tal mejora de los síntomas de la enfermedad en los animales expuestos. La respuesta de los animales a la exposición puede monitorizarse evaluando la reversión de los trastornos asociados con la enfermedad, por ejemplo, contando el número de placas ateroscleróticas y/o midiendo su tamaño antes y después del tratamiento.

Con respecto a la intervención, cualquier tratamiento que revierta cualquier aspecto de los síntomas de la enfermedad cardiovascular debe considerarse como candidato para la intervención terapéutica de la enfermedad humana. Las dosificaciones de los agentes de prueba pueden determinarse derivando curvas de respuesta a la dosis.

La toxicidad y eficacia terapéutica de tales compuestos puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción $\text{LD}_{50}/\text{ED}_{50}$. Se prefieren los compuestos que muestran índices terapéuticos grandes. Aunque pueden usarse compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado de diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y los estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos reside preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED_{50} 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. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición de síntomas semimáxima) según se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo realizar y usar la presente invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni se pretende que representen que los experimentos siguientes sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio ponderado, la temperatura está en grados centígrados, y la presión es igual o cercana a la atmosférica.

Ejemplo 1

Se ha estimado que hasta un millón de células experimentan muerte celular programada por segundo cada día en el cuerpo humano. A pesar de la frecuencia de este evento, las células apoptóticas rara vez se observan in vivo, incluso en órganos con altas tasas de recambio basal, como la médula ósea o el timo. Esta observación se atribuye al hecho de que los cuerpos apoptóticos son depurados rápida y eficientemente por fagocitos profesionales (es decir, macrófagos) y no profesionales (es decir, células colindantes). Anteriormente considerado un evento homeostático obligado, ahora se aprecia que el proceso de 'eferocitosis' (del griego: llevar a los muertos a la tumba) se produce como resultado de una señalización paracrina altamente orquestada entre el AB y su fagocito potencial. Durante la muerte celular programada, las células en apoptosis secretan ligandos "encuéntrame" quimiotácticos ligandos, regulan por incremento los ligandos "cómeme" de la superficie celular y reprimen las señales inhibitorias de "no me comas". Sorprendentemente, este proceso se produce de una manera "inmunológicamente silenciosa", donde la ejecución con éxito del proceso de engullimiento desencadena un perfil de citoquinas antiinflamatorias del fagocito, presumiblemente como una señal de que no se requiere más activación inmune. Por el contrario, las células apoptóticas que evaden la depuración rápidamente se vuelven necróticas de manera secundaria e inducen una "respuesta de peligro" inflamatoria, ya que liberan contenido intracelular tóxico y antigénico que se ha secuenciado previamente. La eferocitosis deteriorada se reconoce ahora como un impulsor importante de trastornos autoinmunitarios, inflamatorios y malignos, donde se piensa que la vigilancia inmune fallida da como resultado un desequilibrio en las formas pro- y anti-fagocitosis en las células objetivo.

La aterosclerosis es una afección en la que la apoptosis se acelera drásticamente. Para complicarlo, está el hecho de que la eferocitosis puede reducirse ~20 veces a medida que se desarrolla la placa aterosclerótica humana. La razón de este defecto no está clara, pero probablemente esté relacionada en parte con la competencia por los receptores de fagocitos por la LDL oxidada y/o la generación de autoanticuerpos que enmascaran importantes ligandos de la superficie celular en el cuerpo apoptótico. Además, los modelos experimentales de aterosclerosis pueden acelerarse significativamente al inhibir la expresión de ligandos 'cómeme' en ratones, y estos animales muestran lesiones con núcleos necróticos avanzados repletos de cadáveres apoptóticos. La eferocitosis deteriorada probablemente tenga consecuencias clínicas importantes en la aterogénesis, dado que la depuración retrasada de las SMC moribundas se ha relacionado con la inflamación vascular y la desestabilización de la matriz, y que los desechos necróticos residuales se localizan con frecuencia en las regiones de la lesión más susceptibles a la ruptura. El hecho de que la pérdida de *Cdkn2b* en ratones aumente el tamaño de la placa y su núcleo lipídico a la vez que reduce el grosor y la estabilidad de la capa fibrosa puede explicar parcialmente el vínculo simultáneo en humanos entre 9p21 y la carga total de CAD y los eventos clínicos agudos, como infarto de miocardio. La eferocitosis deteriorada también puede promover la aterosclerosis secundariamente a través del fagocito.

La evidencia emergente ha revelado que el fenotipo de la célula en apoptosis puede tener un impacto dramático sobre el comportamiento del macrófago cercano y su capacidad última para mantener la homeostasis lipídica. En condiciones fisiológicas, los macrófagos que se han acoplado con éxito a un cuerpo apoptótico regulan por incremento las vías de exportación transmembrana en sentido descendente de LRP-1 y una variedad de receptores nucleares, presumiblemente en preparación para la duplicación inminente de su contenido intracelular. Una molécula efectora clave en esta vía es *ABCA1*, que promueve el flujo inverso de colesterol y es importante para limitar la acumulación local de colesterol en la veta grasa. En el estudio actual, los macrófagos presentados con cuerpos apoptóticos deficientes en *CDKN2B* no lograron activar esta vía y no pudieron procesar los lípidos oxidados de manera eficiente. Mecánicamente, esto probablemente ocurrió porque las células deficientes en *CDKN2B* expresan niveles bajos de *CALR*, que es un ligando bien descrito para el receptor de *LRP-1*. Como consecuencia, estos macrófagos por lo demás sanos mostraron un aumento embotado en la expresión de *ABCA1* y tenían más

probabilidades de diferenciarse en células espumosas, un proceso que se reconoce como desadaptativo y proateroesclerótico. Por tanto, aunque la capacidad eferocítica del fagocito no se ve alterada por su expresión de *CDKN2B* basal, su participación final en el proceso de aterogénesis depende en gran medida de si encuentra un AB 'normal' o uno que se ha vuelto 'no comestible' debido a un falta de *CDKN2B*.

CDKN2B media sus efectos fagocíticos a través de calreticulina. La calreticulina es una proteína chaperona de 46 kD conservada evolutivamente que regula una variedad de funciones celulares que incluyen la homeostasis del calcio, la adhesión celular, la curación de heridas, la inmunidad, la fibrosis y la respuesta al estrés. Además, *CALR* se ha implicado como uno de los principales reguladores de la eferocitosis, y es un ligando de engullimiento crítico que es absolutamente necesario para la depuración fagocítica. Durante la apoptosis, *CALR* colocaliza en la superficie del AB con fosfatidilserina expuesta y activa *LRP-1* en la superficie del macrófago adyacente. Curiosamente, estudios anteriores han demostrado que los ratones deficientes en este receptor de *CALR* fenocopian varios aspectos del ratón deficiente en *CDKN2B*, incluyendo la propensión a desarrollar grandes aneurismas aórticos y placas ateroscleróticas avanzadas cargadas de lípidos, sin diferencias en los niveles plasmáticos de lipoproteínas (revisado en Boucher y Herz (2011) *Biochem Pharmacol* 81:1-5). Además, *CALR* también se ha identificado como un regulador clave de la vigilancia de tumores y la depuración de células malignas.

Como el locus 9p21 promueve el riesgo independientemente de todos los factores de riesgo clásicos, una terapia que promueve la eferocitosis puede proporcionar un beneficio incremental más allá de las terapias antihipertensivas, antidiabéticas y reductoras de lípidos.

Nuestros datos demuestran que las terapias que promueven la fagocitosis y/o la eferocitosis (incluyendo, pero no limitado a, la terapia con Ab anti-CD47) reducen drásticamente la aterosclerosis, como se muestra en la Figura 1, y la enfermedad por aneurisma, como se muestra en la Figura 2. Hemos demostrado que tales terapias reducen el número de células apoptóticas presentes en la lesión vascular en desarrollo, que se muestra en la Figura 3, aunque no tienen un efecto directo sobre la muerte celular programada o la propia apoptosis, in vitro. Usando ensayos tanto in vitro como in vivo (mostrados en las Figuras 3 y 4), hemos confirmado que la terapia con Ab anti-CD47 estimula la fagocitosis/eferocitosis de las células vasculares, que por lo tanto explica el número reducido de células apoptóticas en la placa aterosclerótica, y en consecuencia explica el tamaño reducido de la lesión aterosclerótica.

Para comprender por qué la terapia con Ab anti-CD47 es tan potente en la lesión vascular, tratamos células vasculares con la citoquina proateroesclerótica, TNF-alfa, y descubrimos que este agente mitigaba la disminución esperada en la expresión de ARNm de CD47 que se produce durante estrés celular y/o apoptosis a lo largo del tiempo (Figura 5, STS = estaurosporina). De manera similar, el tratamiento con TNF-alfa mitigó la reducción inducida por apoptosis en la expresión en la superficie celular de CD47 en las células vasculares (Figura 6). Como se sabe que el TNF-alfa se expresa en la placa aterosclerótica, y ahora mostramos que el TNF-alfa regula por incremento la expresión de la molécula antifagocítica CD47, estos datos explican por qué las células vasculares enfermas se vuelven resistentes a la fagocitosis/eferocitosis en la enfermedad vascular.

Confirmamos que la expresión de CD47 está regulada por incremento en tejido aterosclerótico humano con respecto al tejido no aterosclerótico (Figura 7) y confirmamos que está regulada por incremento específicamente dentro de la placa aterosclerótica en lesiones humanas. Los estudios de señalización confirman que el promotor de CD47 contiene sitios de unión de factores de transcripción predichos para moléculas que se sabe que están en sentido descendente de TNF-alfa. Los ensayos de indicador de luciferasa confirman que la sobreexpresión de una molécula efectora representativa de TNF-alfa, NFKB1, lleva a la expresión de CD47 en las células vasculares, lo que confirma el mecanismo de acción (Figura 8). Los ensayos de micromatrices revelan que la expresión de CD47 está correlacionada positivamente con NFKB1 en muestras de arterias coronarias humanas (Figura 9, derecha) y TNF-alfa en muestras de placa carotídea humana (Figura 10, izquierda), lo que confirma la asociación en tejido humano.

Los ensayos de fagocitosis in vitro demuestran que TNF-alfa deteriora la fagocitosis de las células vasculares en el valor de referencia y en una serie de enfermedades que incluyen la exposición a lípidos proateroescleróticos y otros estímulos inductores de apoptosis (Figura 11). Nuestros datos confirman que la terapia con Ab anti-CD47 es particularmente eficaz en presencia de TNF-alfa e identifican la inhibición dual de CD47 y TNF-alfa (y sus miembros de señalización relacionados) como un objetivo para la prevención y el tratamiento de enfermedad cardiovascular.

Métodos:

Estudios de aterosclerosis murina. Los animales usados en este estudio incluyeron ratones *Cdkn2b*^{+/+}, *ApoE*^{-/-} macho (n = 27, Jackson Laboratory) y *Cdkn2b*^{-/-}, *ApoE*^{-/-} (n = 27) sobre un fondo C57BL/6, que fueron criados por nuestro laboratorio como se ha descrito anteriormente. A las 4 semanas de edad, los animales fueron destetados e iniciados con una dieta occidental rica en grasas (21% de grasa de leche anhidra, 19% de caseína y 0,15% de colesterol, Dyets N° 101511) durante las semanas siguientes. Los animales se observaron diariamente y, en el caso de muerte súbita prematura, se realizó una necropsia para determinar la causa de la

muerte. El análisis de lípidos se realizó en ratones después de un ayuno nocturno, como se ha descrito anteriormente. En resumen, las concentraciones de colesterol en plasma total (CHOD-PAP; Roche Diagnostics), HDL (HDL-C-plus 2ª generación; Roche Diagnostics) y LDL (GPO-PAP; Roche Diagnostics) se midieron usando kits enzimáticos en un analizador automático (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La glucosa en ayunas se midió en sangre venosa de un pinchazo de cola usando un glucómetro Freestyle y tiras de glucosa (Abbott). A las 16 semanas de edad, los ratones fueron sacrificados y las aortas se aislaron y procesaron para su análisis. A un subconjunto de diez ratones se les implantaron minibombas osmóticas subcutáneas (Alzet, modelo 2004) después de solo cuatro semanas de dieta alta en grasas, para administrar 1,4 mg/kg/día de angiotensina II durante 72 horas antes del sacrificio para mejorar la lesión vascular en lesiones ateroscleróticas en etapa temprana. Todos los estudios fueron aprobados por el Panel Administrativo de la Universidad de Stanford sobre Cuidado de Animales de Laboratorio y se ajustan a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos.

Preparación de tejido aórtico y braquiocefálico, inmunohistoquímica y cuantificación de lesiones ateroscleróticas. El área de la lesión de aterosclerosis aórtica se determinó como se ha descrito anteriormente. Brevemente, el árbol arterial se perfundió con PBS (pH 7,3) y luego se fijó por perfusión con paraformaldehído tamponado con fosfato (3%, pH 7,3). El corazón y toda la longitud de la bifurcación aorta-iliaca se expusieron y se disecaron cuidadosamente de los tejidos circundantes. Luego, se abrieron las aortas a lo largo de la línea media ventral y se hizo una disección para liberarlas del animal y se pincharon planas, con el lado de la íntima hacia arriba, sobre cera negra. Las imágenes aórticas se capturaron con una cámara digital montada en un microscopio estereoscópico Nikon y se analizaron con el software Adobe Photoshop CS5. El porcentaje del área de la lesión se calculó como el área total de la lesión dividida por el área de la superficie total. Las lesiones ateroscleróticas en el área de la válvula aórtica y la arteria braquiocefálica proximal se analizaron como se ha descrito anteriormente. Las muestras se perfundieron con PBS, se fijaron con paraformaldehído (4%), se incrustaron en OCT y se seccionaron con un espesor de 7 μ M. Se recogieron tres secciones a intervalos de 100 μ M de cada ratón y se tiñeron con Oil Red O (Sigma-Aldrich, O0625), Masson Trichrome (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), Picrosirius Red (Polysciences, N° 24901), hematoxilina y eosina (H&E), α -actina de músculo liso (SMA, Abcam, ab5694, 1: 300), Mac-3 (BD Sciences BD 550292, 1:75), CD-3 (Abcam, ab5690, 1: 150) y Calreticulina (Abcam, ab2907, 1: 300). Se usaron anticuerpos secundarios biotinilados seguidos de sustrato de avidina-biotina-fosfatasa alcalina como se ha descrito anteriormente.

Se evaluó la apoptosis in vivo mediante tinción para la positividad de TUNEL con el kit de detección de muerte celular (Roche), según el protocolo. La proliferación celular se midió mediante tinción con PCNA (Abcam, ab2426, 1:500). La celularidad del vaso se midió contando manualmente los núcleos de las secciones teñidas con DAPI. Los controles negativos se realizaron con la omisión del anticuerpo primario. Las áreas de lesión se midieron y cuantificaron usando Adobe Photoshop. Las características de la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica se evaluaron como se ha descrito anteriormente. Brevemente, el tamaño del núcleo necrótico se midió calculando el porcentaje de la lesión que era acelular en la tinción H&E. El grosor de la tapa se midió colocando un compás de 12 puntos en el centro del vaso sanguíneo y promediando el grosor de la tapa en cada punto a medida que cruzaba la lesión. La cobertura de la tapa de SMC se midió calculando el porcentaje de la superficie de la tapa fibrosa que se tiñó positivamente para SMA-actina. Otras características estándar se evaluaron como se describe. Las muestras recogidas de varios lechos de tejido también se congelaron al instante en nitrógeno líquido para el análisis posterior de la expresión génica, como se describe a continuación. La microscopía electrónica se realizó en la Cell Sciences Imaging Facility por el Stanford Electron Microscopy Core en un Jeol TEM1230.

Análisis de red de coexpresión génica y recogida de placa aterosclerótica humana. Los detalles de la recolección de muestras, el aislamiento de ARN y la hibridación por micromatrices se han descrito anteriormente. En resumen, las arterias coronarias epicárdicas se recogieron mediante disección de corazones explantados de 22 pacientes donantes para trasplante de corazón ortotópico. Se identificaron segmentos arteriales que contenían lesiones ateroscleróticas ($n = 38$) o no ($n = 13$) mediante inspección microscópica. Se aisló ARN de cada muestra y se hibridó con una micromatriz de expresión génica de doble colorante a medida (Agilent; Palo Alto, CA) que representa 20.226 transcripciones identificadas mediante clones de secuenciación de células vasculares estimuladas, revisión de la literatura para genes importantes para la función cardiovascular y combinación con un conjunto de clones comerciales (Incyte). Las matrices se escanearon usando el sistema de escáner de micromatrices G2565AA de Agilent y el software de extracción de características de Agilent para generar relaciones log2 y valores P para las características en la matriz. Antes del análisis de la red de coexpresión de genes, los identificadores de conjuntos de sondas se mapearon en la construcción del gen NCBI refseq actual (hg19) y se tomaron valores medianos para las sondas que coincidían con la misma ID de la transcripción. Se describe el marco general para el análisis de redes de coexpresión de genes ponderados.

Se calculó la correlación de Pearson por pares entre los valores de expresión génica para cada gen en el conjunto de datos para a) muestras con lesiones ateroscleróticas, b) muestras sin lesiones ateroscleróticas, c) todas las muestras. Se eligió un parámetro de umbral suave β para satisfacer el criterio de topología libre de escala basado en la maximización de R^2 para un ajuste lineal con pendiente -1 a $\log(k)$ frente a $\log(n(k))$, efectivamente "reduciendo" las correlaciones débiles. La superposición topológica entre genes se calculó de acuerdo con el método

descrito por Yip y Horvath, generando una adyacencia de red basada en vecinos de red compartidos para todos los pares de genes. Luego, usamos agrupación jerárquica de enlace promediada y el algoritmo de corte de árbol dinámico, que busca iterativamente agrupaciones estables, para dividir la red de superposición topológica en módulos. Se usó descomposición de valores singulares para identificar el "eigengene" del módulo (primer componente del principio) que representa la varianza máxima en la expresión génica modular, y la conectividad intramodular y global para cada gen se generó sumando los pesos de margen dentro de los módulos y dentro de la red global, respectivamente.

Para el análisis dirigido de la relación topológica entre *CDKN2B* y 28 genes anotados implicados en la eferocitosis (*CALR*, *MFG8*, *CX3CL1*, *ABCA6*, *ICAM3*, *GAS6*, *APOH*, *PROS1*, *C1QB*, *ANXA1*, *CD47*, *LRP1*, *MBL2*, *SIRPA*, *NR1H3*, *PPARG*, *LRPAP1*, *TGFB1*, *BAI1*, *TIMD4*, *CD14*, *MERTK*, *CD36*, *ELMO1*, *DOCK1*, *AKT1*, *PANX1*, *GULP1*), se realizó agrupación jerárquica de enlace medio en la matriz de superposición topológica reducida que representa todos los enlaces por pares entre estos miembros del conjunto y *CDKN2B*. La asignación de módulos y el cálculo de eigengene se realizaron como se ha descrito anteriormente. El análisis de expresión diferencial de acuerdo con la presencia o ausencia de lesión aterosclerótica se realizó mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon entre valores de expresión de eigengene del módulo. Un valor de p menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo. La visualización de red se realizó usando Cytoscape 2.8.3 (San Diego, CA) para la matriz de superposición topológica.

Métodos de cultivo celular. Se propagaron SMC de arteria coronaria humana (HCASMC, Lonza, Walkersville, MD, pase N° 3-6) en medio de crecimiento SmGM-2 (Lonza) que contenía FBS al 5%. Se cultivaron células monocíticas THP-1 humanas, macrófagos de riñón embrionario humano (HEK-293) y RAW 264.7 (ATCC) en medio de crecimiento DMEM que contenía FBS al 10%. Se recogieron células de músculo liso vascular primarias de las aortas de ratones *Cdkn2b*^{+/+} y *Cdkn2b*^{-/-} como se ha descrito anteriormente. Los macrófagos activados primarios se recogieron de ratones 72 horas después de la inyección intraperitoneal de 2 ml de tioglicolato al 4%, como se ha descrito anteriormente. Para inducir la detención del crecimiento y la expresión de genes de diferenciación, las SMC se privaron de suero en medio basal (SmBM) durante 72 horas, de acuerdo con los protocolos convencionales.

Para inducir la diferenciación de los monocitos THP-1 en macrófagos adherentes, las células se trataron con PMA 100 nM durante 72 horas, como se ha descrito anteriormente. Para los experimentos de atenuación, se transfectaron SMC con 300 nM de anti-*CDKN2B* (*siCDKN2B*) o ARNip de control negativo de GC alto (*siCont*) (Ambion, Silencer Select, N° de catálogo 4390825 y 4390843, respectivamente) usando el sistema Amaxa Nucleofector de alta eficiencia (Lonza, protocolo U-025). La transfección con éxito (>85% de todas las células) se confirmó mediante análisis microscópico fluorescente visual y citometría de flujo de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para el control positivo marcado con fluorescencia, pmax GFP (Amaxa). Las placas se recogieron al 80% de confluencia para el análisis de ARN y proteínas o se usaron para análisis in vitro posteriores. La atenuación reproducible de *CDKN2B* se confirmó en SMC mediante rt-PCR cuantitativa que mostró un silenciamiento selectivo de este gen del orden del -85%. No se observó una atenuación fuera del objetivo para ninguno de los otros genes cercanos, incluyendo *CDKN2A*, *ARF* o *ANRIL*. La apoptosis se indujo tratando HCASMC con 1 µM de estaurosporina (Sigma, S5921) en medio libre de suero durante 6 horas antes del análisis o recogida y uso en experimentos de cocultivo.

Aislamiento de ARNm y transcripción inversa cuantitativa. El ARN de PCR se aisló de los lisados celulares usando el miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se aisló ARN de las muestras de órganos murinos usando el método Trizol (Invitrogen). El ARN se cuantificó con la máquina Nanodrop (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) para la cuantificación de la transcripción génica, se generó ADNc con transcriptasa inversa M-MuLV y luego se amplificó en el ABI PRISM 7900HT con cebadores TaqMan disponibles comercialmente (Applied Biosystems, Foster City, CA) y normalizado a los controles internos 18S, como se ha descrito anteriormente. A continuación se proporciona una lista de los cebadores y sondas usados en estos estudios.

Especie de cebador: Humana *APOH* Hs00979406_m1, *C1QC* Hs00757779_m1, *ANRIL* Hs01390879_m1, *ARF* Hs99999189_m1, *CDKN2A* Hs00923894_m1, *CDKN2B* Hs00793225_m1, *CD47* Hs00179953_m1, *CALR* Hs00189032_m1, *GAS6* Hs01090305_m1, *ICAM3* Hs00233674_m1, *MFG8* Hs00170712_m1, *MTAP* Hs00559618_m1.

Especies: Calreticulina de ratón Mm00482936_m1, *Cdkn2a* Mm00494449_m1, *Arf* Mm01257348_m1, *Cdkn2b* Mm00483241_m1, *Abca1* Mm00442646_m1.

Ensayos in vitro y análisis de promotores, bioinformática in silico. La predicción del sitio de unión del factor de transcripción (TFBS) se determinó usando las siguientes herramientas bioinformáticas en línea: TRANSFAC (BIOBASE), TFSearch, PROMO y MatInspector.

Ensayos de desplazamiento de movilidad en gel electroforético radiactivo. Se generaron oligonucleótidos de cadena doble para los sitios de unión de E2F4 predichos superiores (-150 a -134) dentro del promotor *CALR* hibridando los siguientes oligonucleótidos de cadena sencilla: F:5' TGGCAGGGGCGGGCCCAAGGGCTG 3' y R:5'

CAGCCCTTGGGCGCCCTGCCA 3'. -ATP (Perkin Elmer) usando polinucleótido quinasa T4 (NEB) durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se purificó a través de columnas Sephadex G-50 Quick Spin (Roche). Después de medir la radioactividad, las reacciones se ensamblaron con tampón de unión EMSA 1X, 1 µg de polidIdC, 10 µg de extracto nuclear recogido de HCASMC, sonda sin marcar 100X (para competiciones), sonda marcada con -ATP, e incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la separación de proteínas en un gel TBE al 4%. Los geles se secaron en papel Whatman usando un secador de vacío calentado y las proteínas se detectaron sobre película radiográfica.

Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina: La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizó de acuerdo con el protocolo Millipore EZ-ChIP con ligeras modificaciones. Se cultivaron HCASMC en medio de crecimiento normal hasta aproximadamente un 75% de confluencia, y luego se cultivaron en ausencia de suero y suplementos durante 24 horas. Las células se fijaron en formaldehído al 1% durante 10 minutos para reticular la cromatina, seguido de inactivación con glicina durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron 2×10^7 células por condición, y los lisados nucleares se prepararon como se ha descrito anteriormente (70). Los extractos nucleares de cromatina reticulada se cortaron en fragmentos de aproximadamente 500 pb utilizando un Bioruptor (Diagenode) durante 3 ciclos de 3 minutos (30s ON, 30s OFF). La cromatina sometida a esfuerzo de corte se aclaró mediante centrifugación a 4C durante 15 minutos. Se preaclaron 1×10^6 núcleos por condición con 20 µg de suero preinmune de IgG anti-conejo (Sigma) y 40 µl de Dynabeads de proteína G (Invitrogen) durante 1 hora en una plataforma rotatoria, seguido de incubación con 2 µg de anticuerpo de IgG de conejo o anti-E2F4 (C-20 SC866 Santa Cruz) durante la noche.

Luego se incubaron las muestras de cromatina inmunoprecipitada con 60 µl de Dynabeads de Proteína G durante 2 horas a 4C en una plataforma rotatoria para capturar los complejos de proteína-ADN. Los complejos se lavaron en tampones de bajo contenido de sal, alto contenido de sal, LiCl y TE y luego se eluyeron con un tampón que contenía NaHCO₃ 100 mM y SDS al 1%. Los reticulados de proteína-ADN se invirtieron y las muestras se trataron con RNasa A y Proteinasa K y el ADN libre se purificó usando kits de purificación de PCR de Qiagen. El enriquecimiento total se midió usando cebadores diseñados en base a la secuencia del sitio de unión de E2F4 superior dentro del promotor de calreticulina (F (-199 a -181) :5' AGGTCCAATGGAAAAAGAC 3' y R (+84 a +65) :5' CAGAAACTGCTCCTTGAAGT 3'), o una región reguladora de E2F4 conocida (FGFr1 como control positivo (Devel Dynamics 2005 119), o una región de control negativo usando los cebadores siguientes (F:5' CCGGAAGCACTTCTCCTAGA 3' y R:5' AAGAGAGAGCGGAAGTGACG 3').

Se usó PCR semicuantitativa para verificar los productos de ChIP mediante electroforesis en gel. Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real (ViiA 7, Life Technologies) usando ensayos SYBR Green (Applied Biosystems) y se calcularon las veces de enriquecimiento midiendo delta Ct-delta Ct IgG. También se realizó un análisis de la curva de fusión para cada cebador ChIP. Los datos son representativos de por lo menos cuatro muestras de HCASMC independientes con ensayos de qPCR realizados por triplicado. Los datos se presentan como el porcentaje de ADN de entrada y como las veces de enriquecimiento de la cromatina precipitada con el Ab E2F4 con respecto a la IgG de control.

Ensayos de indicador del promotor de luciferasa. Se obtuvieron Goclones del informador de promotor LightSwitch de calreticulina (RenSP, S721464), vectores vacíos (S790005) y las construcciones de control de Cypridina TK (pTK-Cluc, SN0322S) de SwitchGear Genomics (Menlo Park, CA) y se transfectaron en células HEK usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Para los ensayos de atenuación, se cotransfectaron 5 pmol de anti-*CDKN2B* o ARNip de control. Para la sobreexpresión, se obtuvieron *CDKN2B* (sc319536) y el plásmido de expresión Rb (sc119971) y el vector vacío (pCMV6) de Origene y se cotransfectaron 100 ng de plásmido. La actividad de la luciferasa dual se midió con el sistema de ensayo dual LightSwitch después de 48 horas usando un luminómetro SpectraMax L (Molecular Devices), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos experimentos, el medio se cambió a medio libre de suero después de 24 horas de transfección. Los estudios se realizaron al inicio del estudio y después de que las células se hubieran expuesto a dosis crecientes de TGFβ-1 humano recombinante (de Sigma, 0,5-10 ng/ml) durante las últimas 16 horas antes del análisis. La actividad de luciferasa relativa (proporción de luciferasa de Renilla/Cypridina) se expresa como el cambio porcentual con respecto a los valores de referencia obtenidos de células transfectadas de control no expuestas al tratamiento con TGF-β.

Ensayos de capacidad y resistencia a la eferocitosis. Se marcaron células de músculo liso aórtico primarias generadas a partir de ratones *Cdkn2b*^{-/-} y *Cdkn2b*^{+/-} con sondas fluorescentes CMTMR CellTracker naranja de 20 µM (Life Technologies, C2927) durante una hora, luego se cultivaron durante la noche en medio libre de suero. Simultáneamente, se marcaron macrófagos de *Cdkn2b*^{+/-} intraperitoneales primarios con 20 µM de verde CFDA CellTracker sonda (Life Technologies, C7025) durante una hora, luego se cultivaron durante la noche en medio estándar con suplementación de suero. Por la mañana, se indujo a las SMC a sufrir apoptosis durante 4 horas, luego se recogieron y se contaron manualmente. Luego se añadieron 1×10^5 células apoptóticas a los macrófagos cultivados y se dejaron cocultivar durante 1,5 horas adicionales. En ese punto, todas las células adherentes fueron tripsinizadas y clasificadas por FACS (BD FACSCaliber, 530 nm [FL1] y >575 nm [FL4]), como en los protocolos publicados anteriormente. Se supuso que las células que eran doblemente positivas para verde (fagocito) y naranja (SMC) representaban células fagocitadas.

La tasa de eferocitosis se definió luego como el porcentaje de células positivas duales (AB fagocitado) frente a células positivas para naranja/negativas para verde (AB sin comer). La comparación se hizo entre las tasas de depuración de AB *Cdkn2b*^{-/-} y *Cdkn2b*^{+/+}. Este experimento se realizó como anteriormente con las siguientes permutaciones: SMC aórtico murino primario frente a macrófagos estimulados con tioglicolato intraperitoneales murinos primarios; SMC aórtico murino primario frente a macrófagos RAW no estimulados murinos; HCASMC transfectadas frente a células THP-1 estimuladas con PMA humana.

Finalmente, se evaluó el efecto de *CDKN2B* sobre la 'capacidad eferocítica' (frente a la 'resistencia eferocítica') realizando estos experimentos con fagocitos transfectados de control y deficientes en *CDKN2B* expuestos a AB no transfectado. En estos experimentos, la capacidad fagocítica se definió como el porcentaje de células positivas duales (fagocitos que habían comido un AB) frente a células negativas para naranja/positivas para verde (fagocitos que no habían comido un AB). Todos los ensayos se repitieron en tres ocasiones con por lo menos tres repeticiones por experimento. El análisis se realizó con FloJo 7.6.3.

Ensayos de competición de eferocitosis. La confirmación de los estudios anteriores se realizó colocando en placas cantidades iguales de siCDKN2B HCASMC apoptótico marcado con CellTracker verde y siCont HCASMC apoptótico marcado con CellTracker naranja sobre HCASMC no apoptótico no transfectado sin marcar en placas de cultivo celular de 12 pocillos. Los tres tipos de células se cocultivaron durante 2 horas adicionales y luego se lavaron las células no adherentes y no fagocitadas. Las células restantes se fijaron y tiñeron con DAPI y se analizaron bajo un microscopio fluorescente invertido. Un investigador ciego contó manualmente 8 hpf aleatorios/pocillo para las células eferocitadas y se registró la proporción de AB deficiente para en *CDKN2B* fagocitado con AB transfectado con el control.

Ensayos de cocultivo de fagocitos-cuerpo apoptótico Ensayos de cultivo de eflujo de colesterol Los ensayos de eflujo de colesterol se realizaron como se ha descrito anteriormente, con modificaciones. Se colocaron en placas macrófagos RAW en placas de 12 pocillos en DMEM que contenía FBS al 10% y se marcaron con [3H]colesterol (0,5 µCi/pocillo) durante 48 horas. Después de lavar con PBS, las células se cocultivaron con células de músculo liso aórtico *Cdkn2b*^{-/-} y *Cdkn2b*^{+/+} durante 1,5 horas, luego se incubaron en DMEM libre de suero durante la noche. Las células se lavaron e incubaron en 350 µl de medio libre de suero que contenía 10 µg/ml de apolipoproteína A-1 (Sigma) como aceptor durante 4 horas. El medio se recogió y se centrifugó, y la cantidad de radiactividad se determinó mediante un contador de centelleo. El eflujo de colesterol se expresó como el porcentaje de recuentos en el medio frente a los recuentos totales de colesterol [3H] (medio más célula). Se restó el eflujo de referencia (sin apoA-1).

Ensayos de formación de células de espuma. Se colocaron en placas macrófagos RAW en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante la noche. En algunos experimentos, los macrófagos se trataron con 100 ng/ml de lipopolisacárido de Escherichia coli 0111: B4 (LPS, Sigma). Los macrófagos se cocultivaron con células de músculo liso aórtico *Cdkn2b*^{-/-} y *Cdkn2b*^{+/+} apoptóticas y 100 µg/ml de LDL oxidada (Biomedical Technologies Inc.) durante 24 horas. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 20 min, se lavaron con PBS y se tiñeron con rojo aceite O al 0,5% durante 5 min. Después de enjuagar en isopropanol al 60% y lavar, se tomaron 8 imágenes aleatorias/pocillo con un microscopio invertido a 20 aumentos. El área positiva de rojo aceite O se analizó con el software Adobe Photoshop CS5.

Ensayos de expresión de citoquinas específicos de macrófagos Se cocultivaron macrófagos RAW estimulados con LPS (1 µg/ml) con HCASMC apoptótica siCDKN2B o siCont en medio libre de suero. El HCASMC no unido se eliminó lavando con PBS después de 1,5 horas, luego las células se cultivaron en DMEM libre de suero. Después de 24 horas de incubación, se recogió el sobrenadante y se evaluó el nivel de IL-10 y TNF-α secretados con ELISA (R&D Systems) desarrollados específicamente para citoquinas de origen murino.

Análisis estadístico Los datos se presentan como media ± SEM. Los datos se sometieron a la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución. Los grupos se compararon usando la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos o la prueba t de Student para datos paramétricos. Al comparar múltiples grupos, los datos se analizaron mediante análisis de varianza con la prueba posterior de Bonferroni. Para pruebas múltiples de datos paramétricos, un valor de P<0,05 se consideró estadísticamente significativo. Los experimentos se replicaron por lo menos por cuadruplicado y todos los análisis se realizaron de forma ciega por dos investigadores separados, a menos que se especifique lo contrario. El análisis estadístico se realizó con contador GraphPad Prism 5. contador. El eflujo de colesterol se expresó como el porcentaje de recuentos en el medio frente a los recuentos de [3H]colesterol (medio más célula). Se restó el eflujo de referencia (sin apoA-1).

Ensayos de formación de células de espuma. Se colocaron en placas macrófagos RAW en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante la noche. En algunos experimentos, los macrófagos se trataron con 100 ng/ml de lipopolisacárido de Escherichia coli 0111:B4 (LPS, Sigma). Los macrófagos se cocultivaron con células de músculo liso aórtico *Cdkn2b*^{-/-} y *Cdkn2b*^{+/+} apoptóticas y 100 µg/ml de LDL oxidada (Biomedical Technologies Inc.) durante 24 horas. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 20 min, se lavaron con PBS y se tiñeron con rojo

aceite O al 0,5% durante 5 min. Después de enjuagar en isopropanol al 60% y lavar, se tomaron 8 imágenes aleatorias/pocillo con un microscopio invertido a 20 aumentos. El área positiva de aceite rojo O se analizó con el software Adobe Photoshop CS5.

5 *Ensayos de expresión de citoquinas específicos de macrófagos* Se cocultivaron macrófagos RAW estimulados con LPS (1 µg/ml) con HCASMC apoptótica siCDKN2B o siCont en medio libre de suero. El HCASMC no unido se eliminó lavando con PBS después de 1,5 horas, luego las células se cultivaron en DMEM libre de suero. Después de 24 horas de incubación, se recogió el sobrenadante y se evaluó el nivel de IL-10 y TNF-α secretados con ELISA (R&D Systems) desarrollados específicamente para citoquinas de origen murino.

10 *Análisis estadístico* Los datos se presentan como media ± SEM. Los datos se sometieron a la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución. Los grupos se compararon usando la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos o la prueba t de Student para datos paramétricos. Al comparar múltiples grupos, los datos se analizaron mediante análisis de varianza con la prueba posterior de Bonferroni. Para pruebas múltiples de datos paramétricos, un valor de $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los experimentos se replicaron por lo menos por cuadruplicado y todos los análisis se realizaron de forma ciega por dos investigadores separados, a menos que se especifique lo contrario. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 5.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un agente anti-CD47 para su uso en un método para tratar a un sujeto para aterosclerosis, el método comprendiendo:

administrar al sujeto una dosis eficaz de un agente anti-CD47 y un agente anti-TNF α , en donde el agente anti-CD47 es un anticuerpo anti-CD47 o un anticuerpo anti-SIRP α , en donde el anticuerpo reduce la unión de CD47 en una célula apoptótica para SIRP α en una célula fagocítica, y en donde el agente anti-TNF α es un anticuerpo anti-TNF α .

2. El agente anti-CD47 para el uso de la Reivindicación 1, en donde el sujeto es un mamífero.

3. El agente anti-CD47 para el uso de la Reivindicación 2, en donde el sujeto es un humano.

4. El agente anti-CD47 para el uso de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en donde el agente anti-CD47 es un anticuerpo anti-CD47.

5. El agente anti-CD47 para el uso de la Reivindicación 4, en donde el anticuerpo es 5F9-hlgG4 humano.

6. El agente anti-CD47 para el uso de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en donde el agente anti-CD47 es un anticuerpo anti-SIRP α .

7. El agente anti-CD47 para el uso de cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, en donde la combinación de agentes proporciona un efecto sinérgico con respecto al uso de cualquier agente como una monoterapia.

8. El agente anti-CD47 para el uso de cualquiera de las Reivindicaciones 1-7, en donde la dosificación de uno o ambos agentes en la combinación se reduce con respecto a la dosis eficaz del agente como una monoterapia.

9. El agente anti-CD47 para el uso de cualquiera de las Reivindicaciones 1-8, en donde al sujeto se le ha diagnosticado que tiene por lo menos un polimorfismo de nucleótido único (SNP) asociado con el alelo de riesgo 9p21 para la aterosclerosis, en donde el SNP se selecciona de: rs10757278; rs3217992; rs4977574; rs1333049; rs10757274; rs2383206; rs2383207; rs3217989; rs1333040; rs10116277; rs7044859; rs1292136; rs7865618; rs1333045; rs9632884; rs10757272; rs2891168; rs6475606; y rs1333048.

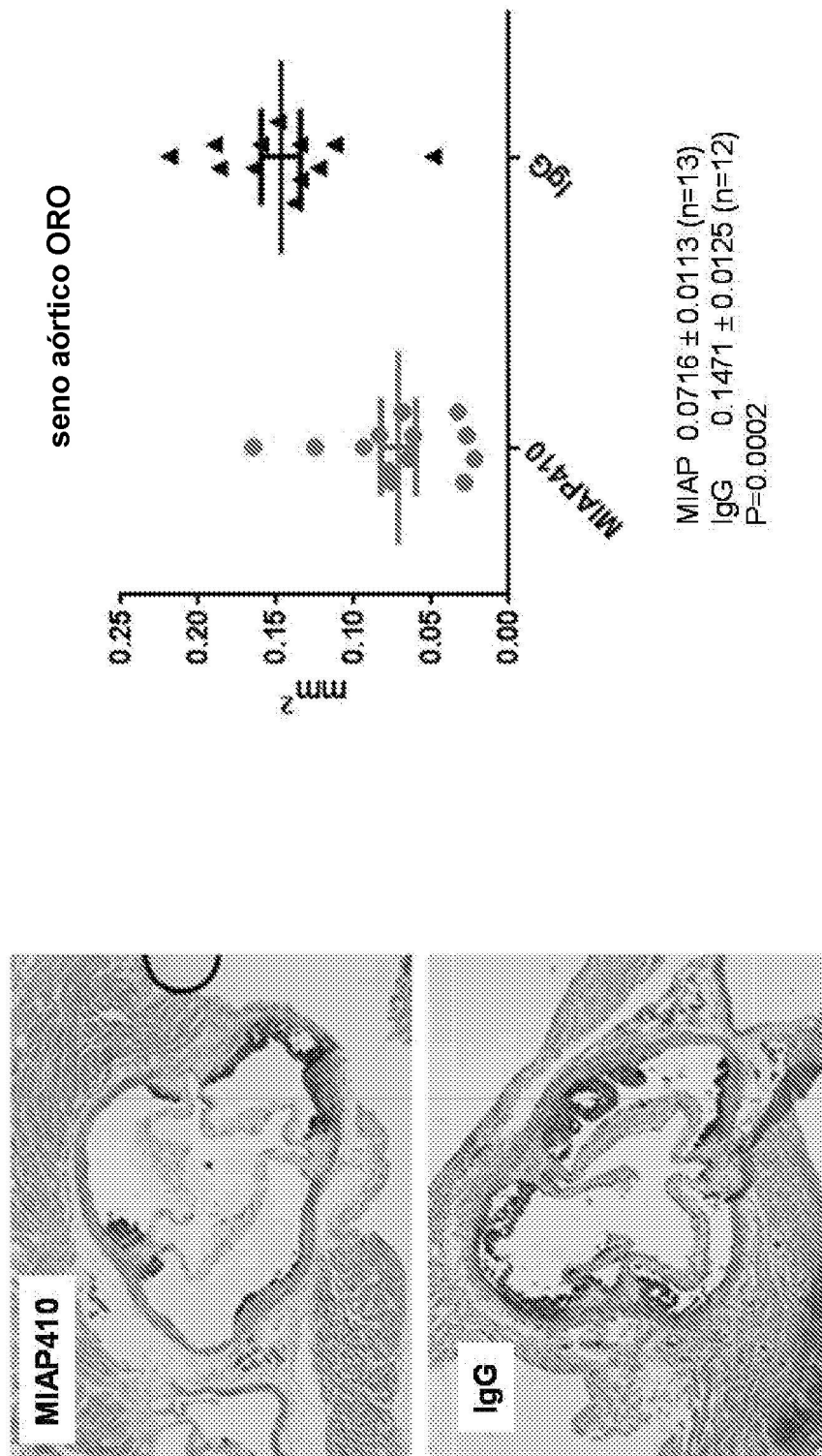


FIGURA 1

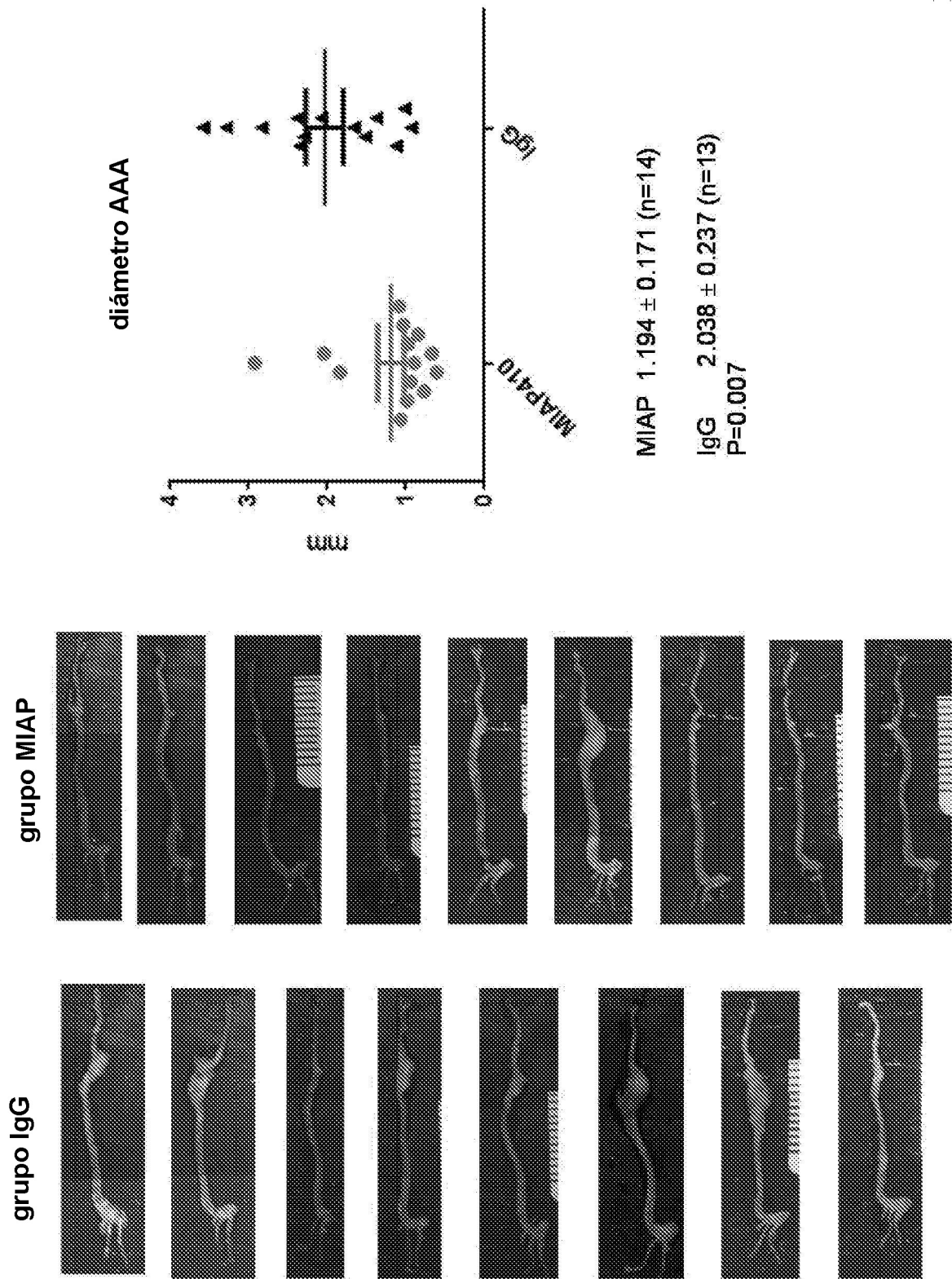


FIGURA 2

Células apoptóticas, in vivo

- El tratamiento con Ab Anti-CD47 está asociado con menos células apoptóticas, in vivo

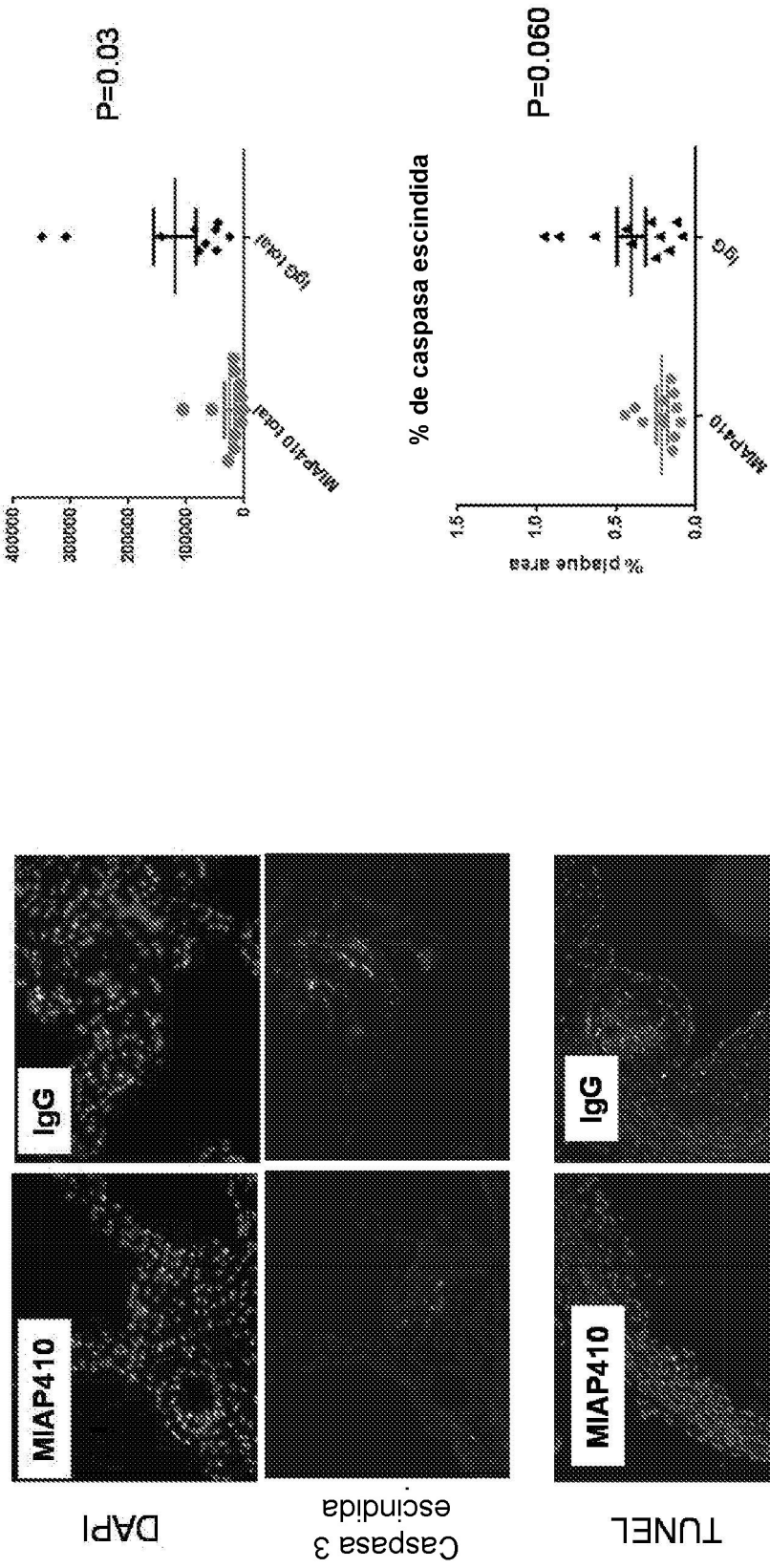


FIGURA 3

Indice fagocítico, in vivo

- El tratamiento con AB anti-CD47 está asociado con menos cuerpos apoptóticos “no asociados”

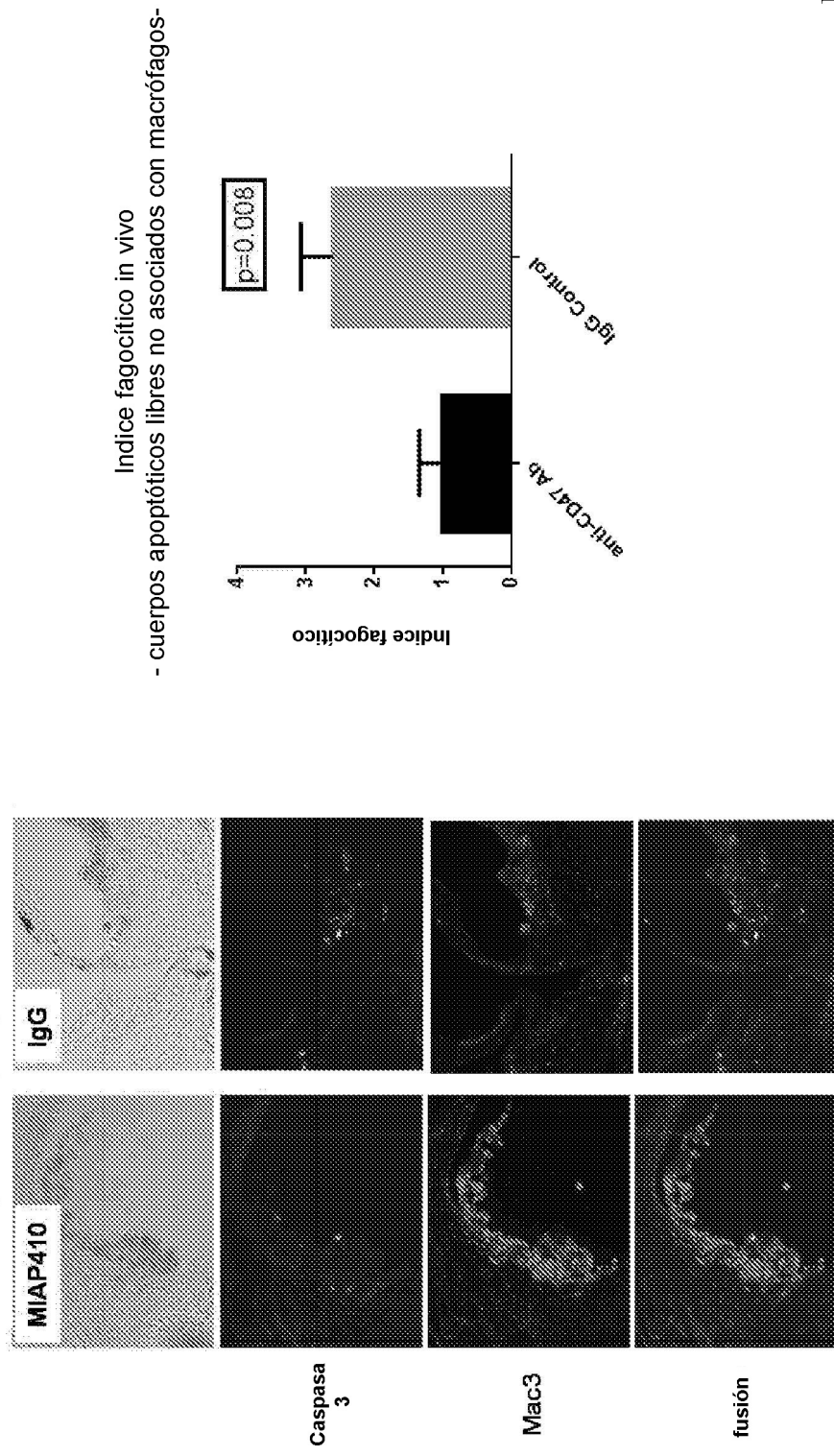


FIGURA 4

La expresión de CD47 es aumentada por TNF-alfa

■ Tomados juntos:

- La apoptosis reduce CD47 en SMC (como se ha mostrado anteriormente)
- Pero TNF mitiga esta disminución (nuevos datos)

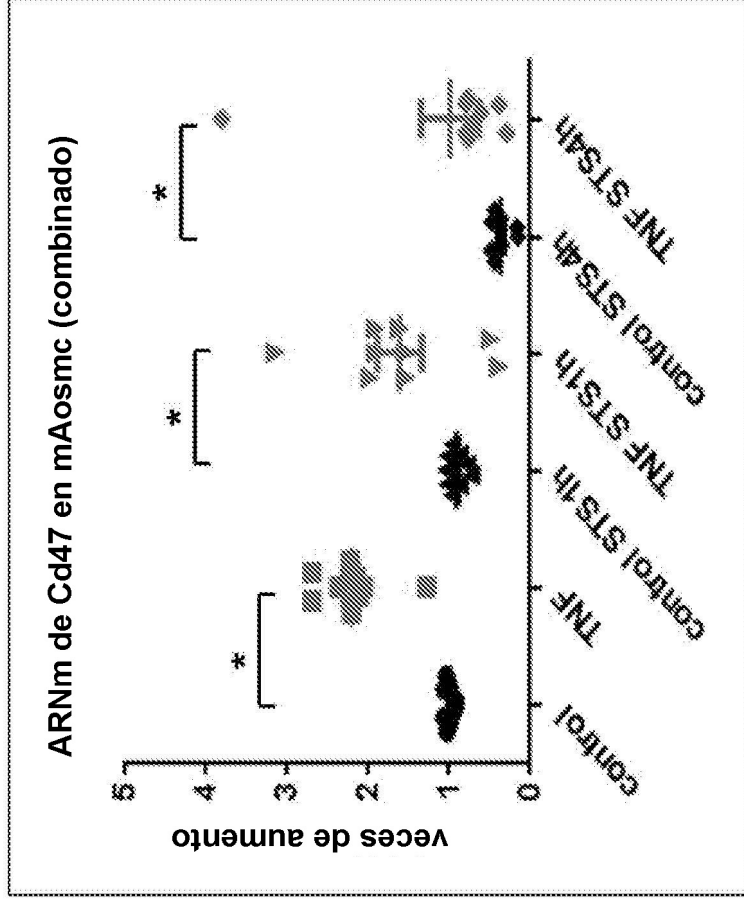


FIGURA 5

Expresión de CD47 durante apoptosis en SMC
expresados para ‘estímulos no -aterogénicos’

**TNF-alfa parece mitigar la disminución esperada
en la superficie celular de la expresión de CD47 durante
la apoptosis**

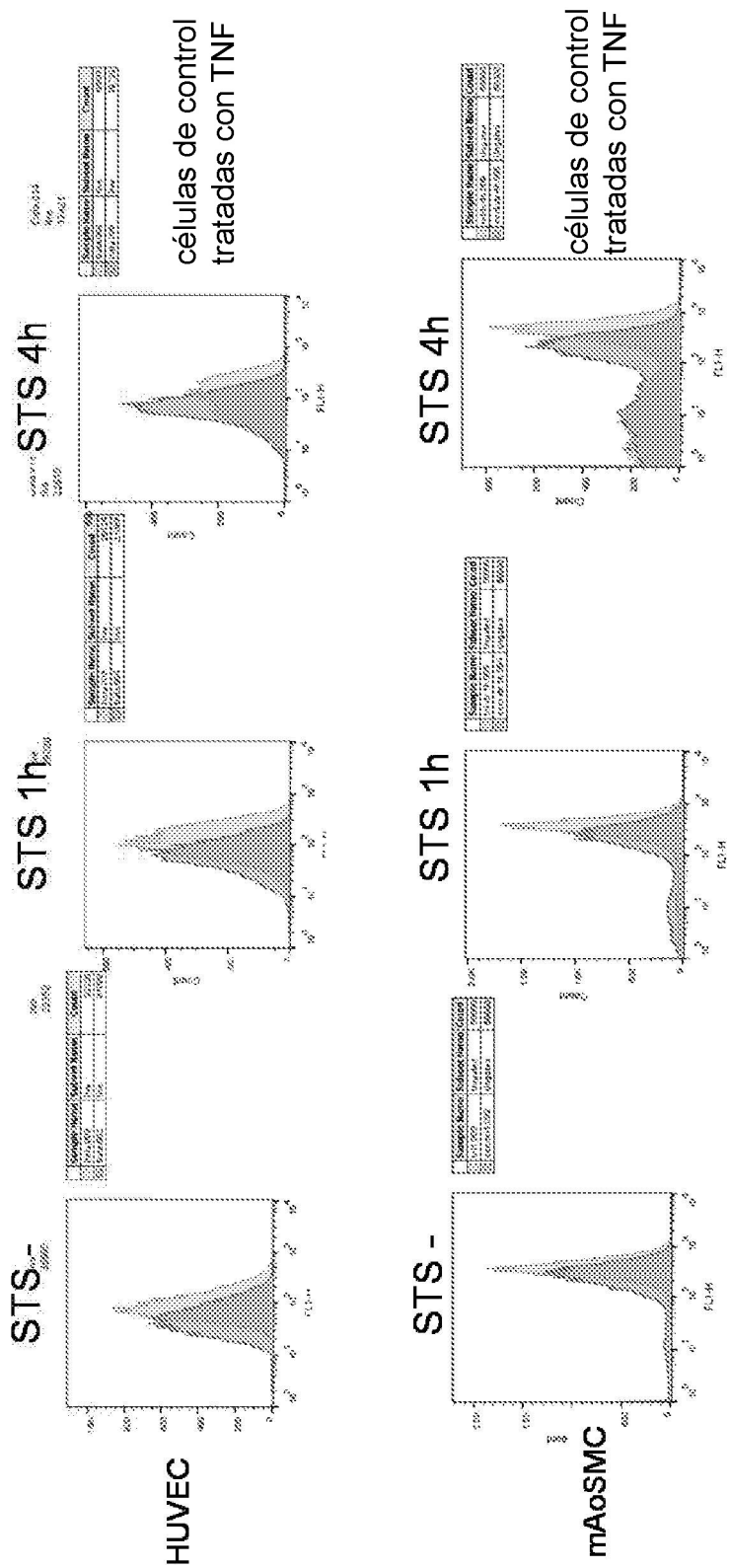


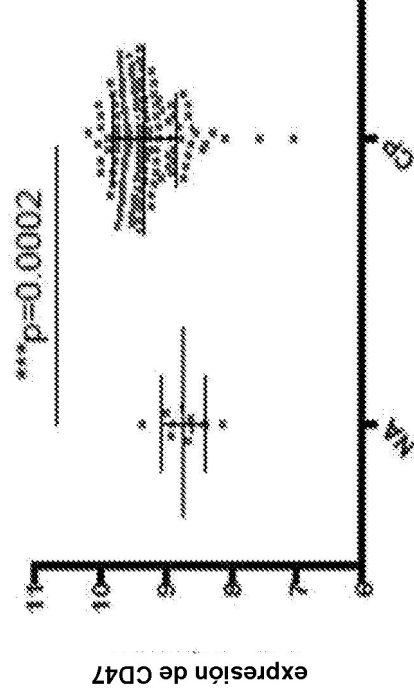
FIGURA 6

Expresión de CD47 en enfermedad vascular

- CD47 se regula por incremento en la placa aterosclerótica humana en comparación con tejido vascular normal

Experimentos de micromatrices humanas realizados en especímenes de placa humanos ;
CP = placa carótida. NA = tejido no aterosclerótico

CP vs NA
(BiKE nuevo)



CP vs NA
(BiKE viejo)

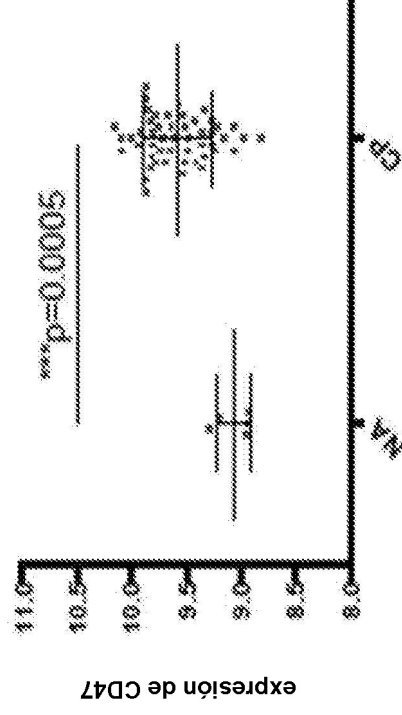


FIGURA 7

Análisis de promotor de CD47

- Ensayos de informador de luciferasa la sobreexpresión de NFKB1 activa la expresión de CD47

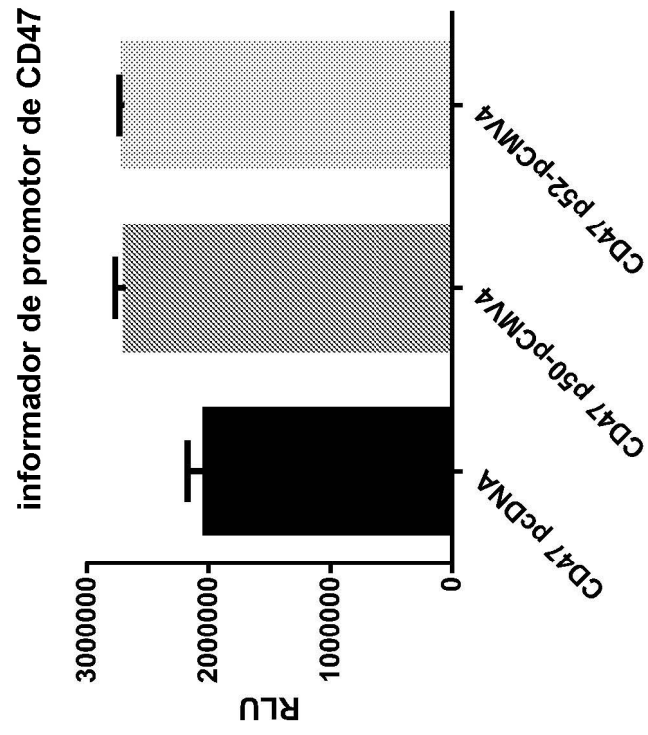


FIGURA 8

Correlación entre CD47 y la vía de TNF- α

Conjuntos de datos de micromatrices de muestras de arterias coronarias humanas - revisando miembros de la superfamilia TNF

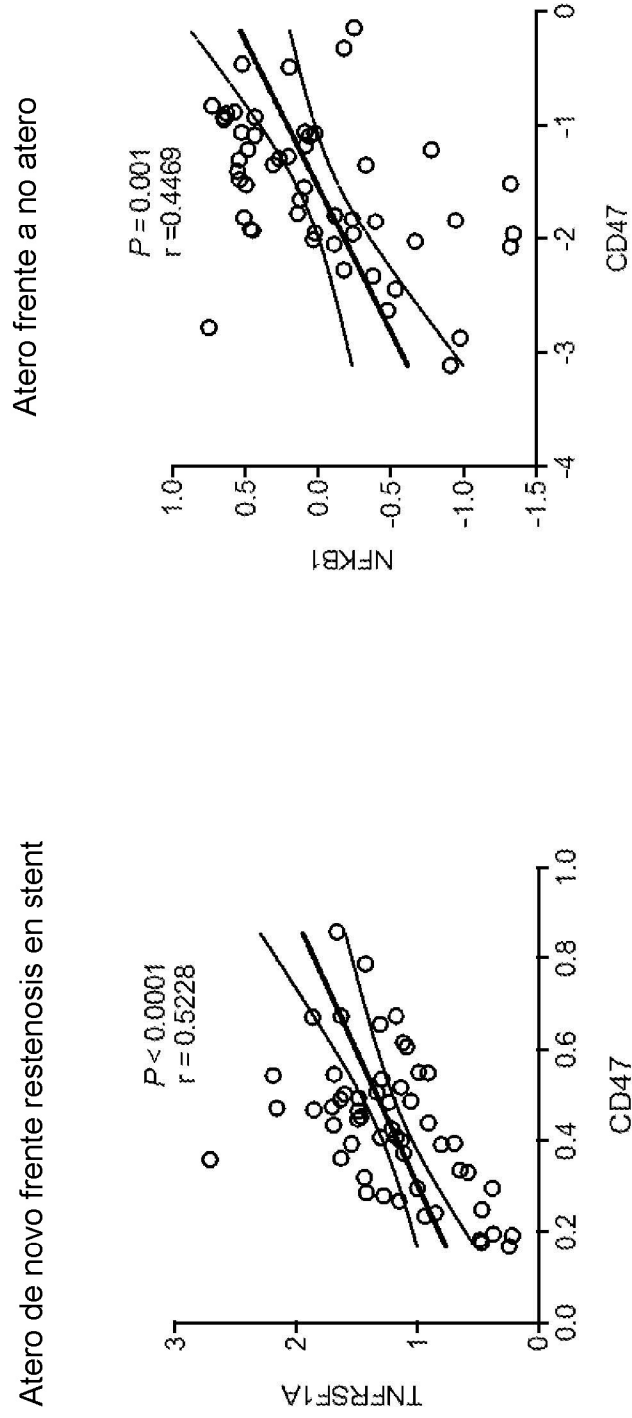


FIGURA 9

Expresión de CD47 en enfermedad vascular

- CD47 se correlaciona con TNF-a en tejido vascular humano

Análisis de coexpresión de micromatrices

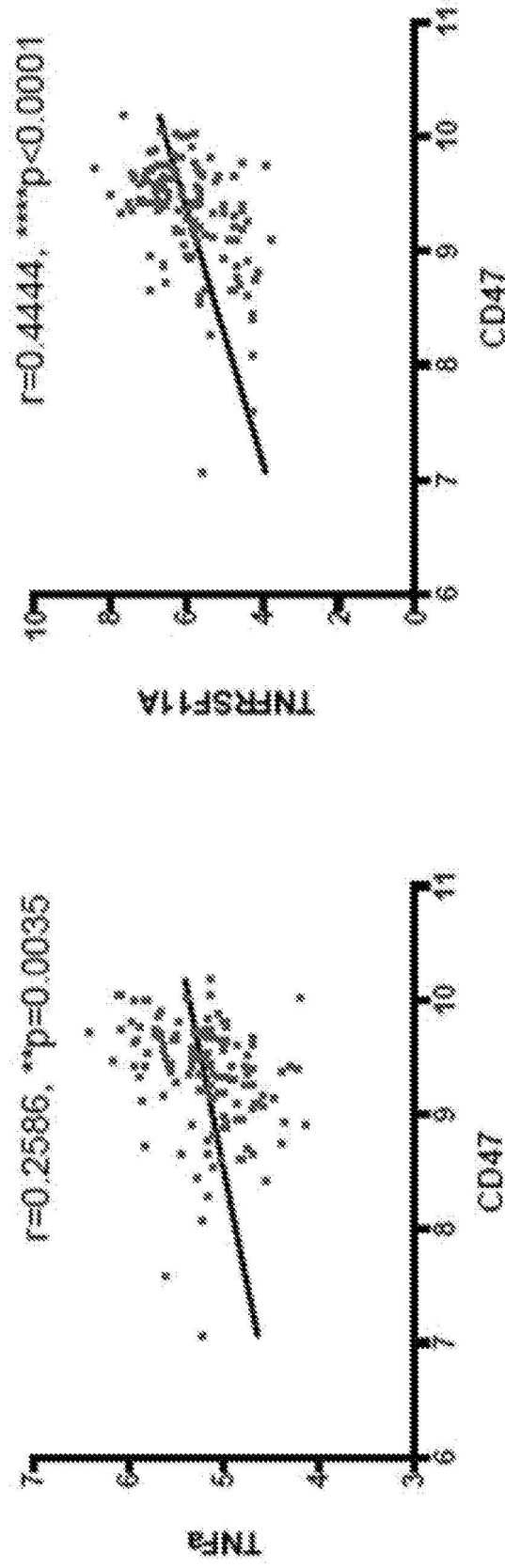
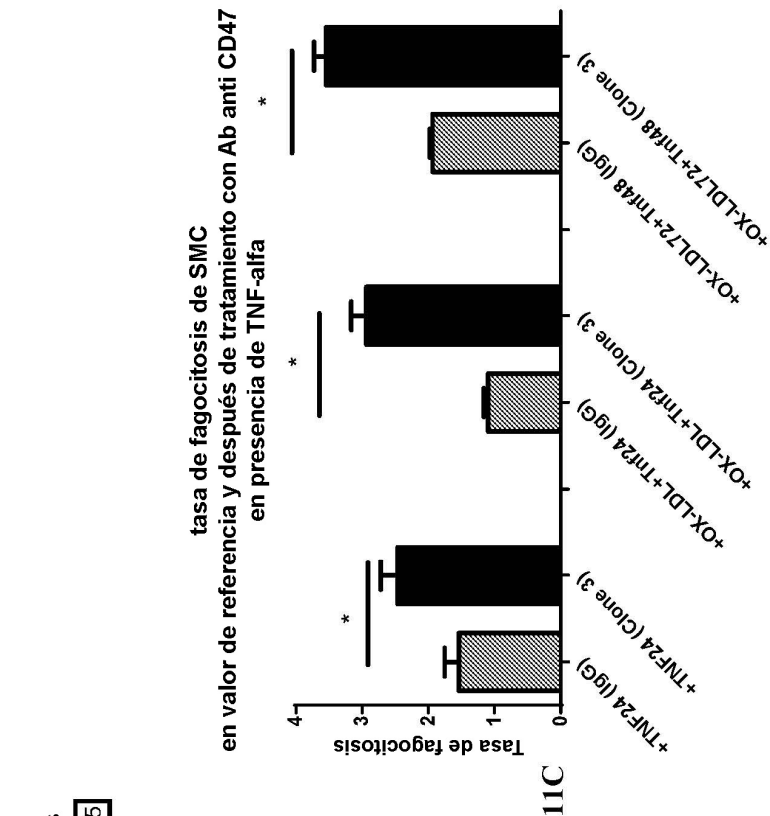


FIGURA 10

FIGURA 11A



11B

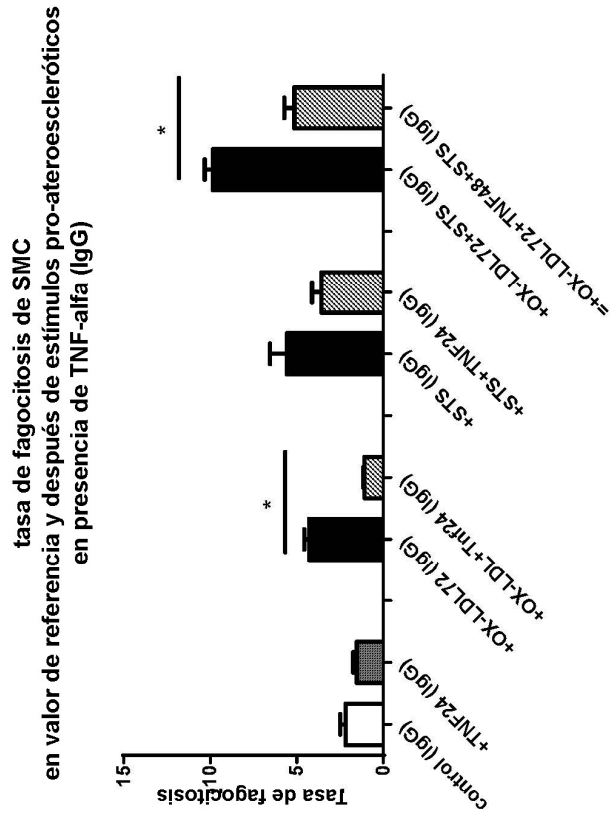


FIGURA 12

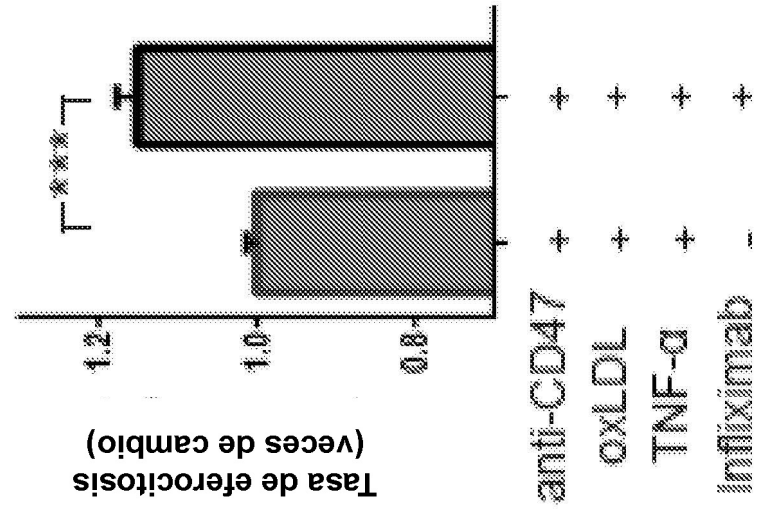
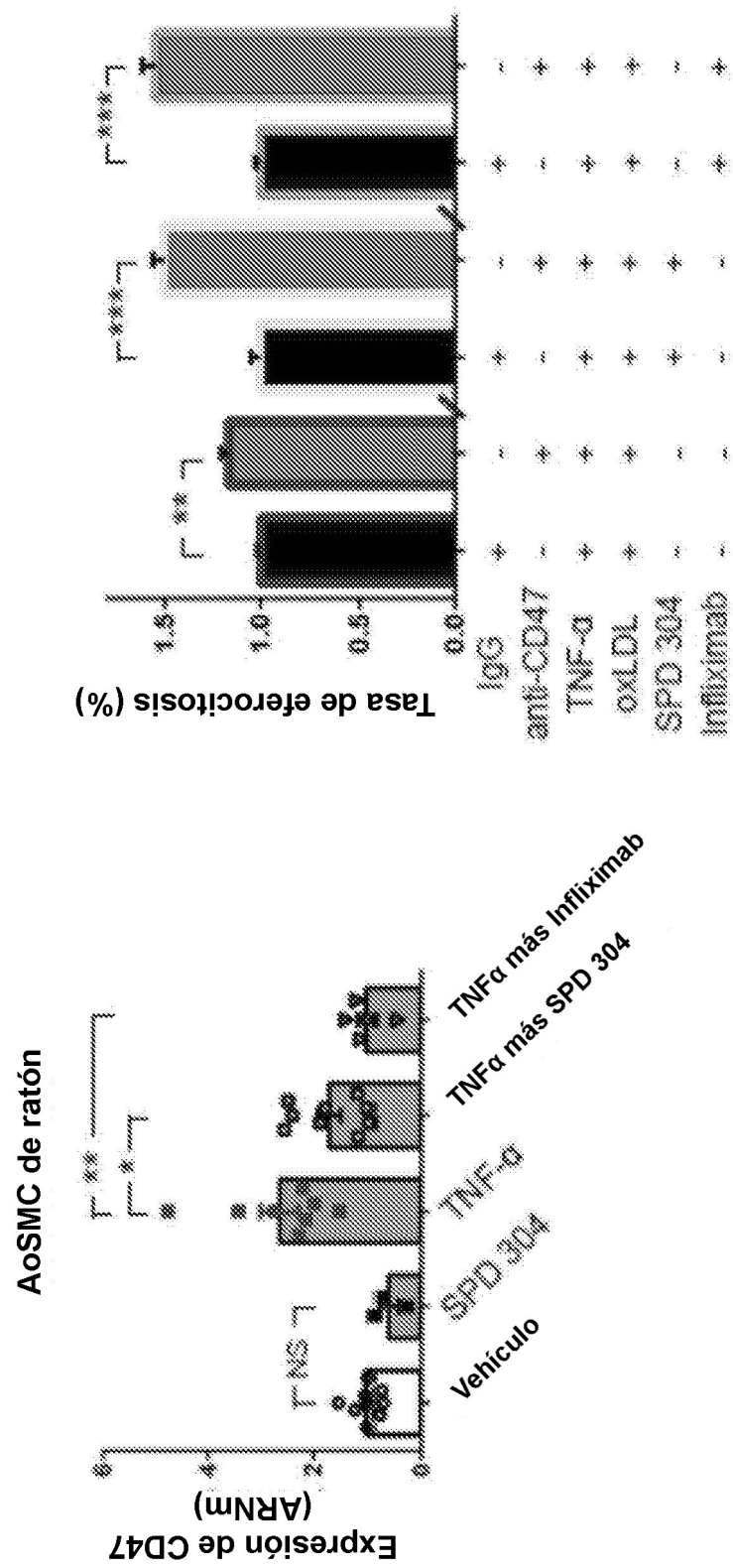


FIGURA 13



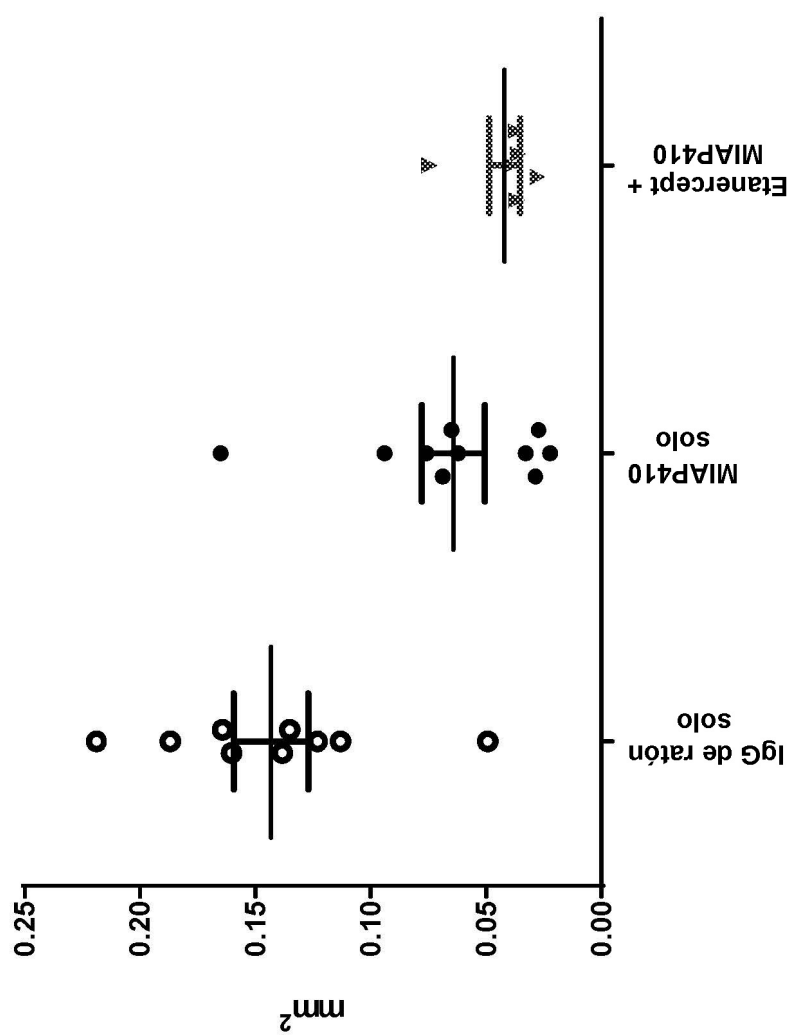


FIGURA 14