

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 193**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2018** **PCT/EP2018/062473**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2018** **WO18210793**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2018** **E 18729328 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024** **EP 3625259**

54 Título: **Anticuerpos antisirpalha**

30 Prioridad:

16.05.2017 EP 17171285

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.10.2024

73 Titular/es:

BYONDIS B.V. (100.0%)
Microweg 22
6545 CM Nijmegen, NL

72 Inventor/es:

VERHEIJDEN, GIJSBERTUS FRANCISCUS MARIA;
ROUWENDAL, GERARD;
ARENDS, ROLAND JAN;
VAN DEN BERG, TIMO KARS;
MATLUNG, HANKE LOTTIE y
FRANKE, KATARINA

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 2 981 193 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

Anticuerpos antisirpalpa

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a anticuerpos contra SIRP α y al uso de estos anticuerpos en el tratamiento del cáncer, opcionalmente en combinación con otras terapias anticancerígenas.

10 FONDO DE LA PRESENTE INVENCIÓN

[0002] Desde finales de los años 90, se dispone de anticuerpos terapéuticos para el tratamiento del cáncer. Estos anticuerpos terapéuticos pueden actuar sobre las células malignas a través de diferentes vías. Las vías de señalización desencadenadas por la unión del anticuerpo a su diana en las células malignas dan lugar a la inhibición de la proliferación celular o a la apoptosis. La región Fc del anticuerpo terapéutico puede desencadenar citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). Sin embargo, los anticuerpos terapéuticos no suelen ser suficientemente eficaces como monoterapia. Una opción para mejorar la eficacia de los anticuerpos terapéuticos consiste en mejorar la ADCC y/o la ADCP. Esto se ha conseguido mejorando la afinidad de la región Fc por los receptores Fey, por ejemplo, mediante sustituciones de aminoácidos (Richards et al. Mol. Cancer Ther. 2008, 7(8), 2517-2527) o influyendo en la glicosilación de la región Fc (Hayes et al. J. Inflamm. Res. 2016, 9, 209-219).

[0003] Otra forma de mejorar la ADCC y/o ADCP de un anticuerpo terapéutico es combinando el anticuerpo terapéutico con un anticuerpo antagonista contra la proteína reguladora de señal α (anti-SIRP α) o un anticuerpo anti-CD47 (WO2009/131453). Cuando CD47 se une al inmunorreceptor inhibidor SIRP α expresado en monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, SIRP α transmite una señal inhibitoria que impide la destrucción de las células cancerosas por fagocitosis u otros mecanismos de destrucción celular dependientes del receptor Fc de las células efectoras inmunitarias.

[0004] Las células tumorales utilizan la regulación al alza de CD47 como mecanismo para evadir la respuesta inmunitaria antitumoral inducida por un anticuerpo terapéutico. Los anticuerpos anti-CD47 o anti-SIRP α bloquean la señalización inhibitoria generada a través del eje CD47-SIRP α , dando lugar a un aumento de la ADCC y/o ADCP.

[0005] La mayor parte de la investigación clínica relacionada con la interacción CD47-SIRP α se ha centrado en los anticuerpos anti-CD47, como monoterapia y como terapia en combinación con un anticuerpo terapéutico (Weiskopf. Eur. J. Cancer 2017, 76, 100-109). La investigación sobre los anticuerpos anti-CD47 como terapéutica anticancerígena va en aumento, a pesar de que CD47 también se expresa en la superficie de las células de la mayoría de los tejidos normales.

[0006] Se ha investigado poco la monoterapia anticancerígena o la terapia combinada con anticuerpos anti-SIRP α . La mayoría de los trabajos sobre anticuerpos anti-SIRP α son investigaciones mecanísticas sobre la interacción CD47-SIRP α y se han realizado utilizando anticuerpos murinos anti-SIRP α ; por ejemplo, los anticuerpos murinos 12C4 y 1.23A aumentaron la ADCC mediada por neutrófilos de células SKBR3 opsonizadas con trastuzumab (Zhao et al. PNAS 2011, 108(45), 18342-18347). El documento WO2015/138600 divulga el anticuerpo murino anti-SIRP α humano KWAR23 y su fragmento Fab quimérico, que aumentaron la fagocitosis *in vitro* de cetuximab i.a. En el documento WO2018/026600 se divulga KWAR23 humanizado con una parte Fc de IgG1 humana que comprende una mutación N297A. El documento WO2013/056352 divulga anticuerpos IgG4 29AM4-5 y otros anticuerpos IgG4 humanos anti-SIRP α . La IgG4 29AM4-5, dosificada tres veces por semana durante cuatro semanas a 8 mg/kg, redujo el injerto leucémico de células AML humanas primarias inyectadas en el fémur derecho de ratones NOD scid gamma (NSG).

[0007] SIRP α es un miembro de la familia de proteínas reguladoras de señales (SIRP), glicoproteínas transmembrana con dominios extracelulares similares a Ig presentes en células efectoras inmunitarias. El dominio NH2-terminal de unión al ligando de la SIRP α es altamente polimórfico (Takenaka et al. Nature Immun. 2007, 8(12), 1313-1323). Sin embargo, este polimorfismo no influye significativamente en la unión a CD47. SIRP $\alpha_{\text{BIT}}(v1)$ y SIRP $\alpha_1(v2)$ son los dos polimorfos más comunes y más divergentes (13 residuos diferentes) (Hatherley et al. J. Biol. Chem. 2014, 289(14), 10024-10028). Otros miembros humanos de la familia SIRP caracterizados bioquímicamente son SIRP β_1 y SIRP γ .

[0008] SIRP β_1 no se une a CD47 (van Beek et al. J. Immunol. 2005, 175 (12), 7781-7787, 7788-7789) y se conocen al menos dos variantes polimórficas de SIRP β_1 , SIRP β_{1v1} (ENSP00000371018) y SIRP β_{1v2} (ENSP00000279477). Aunque aún se desconoce el ligando natural de SIRP β_1 , los estudios *in vitro* con anticuerpos específicos anti-SIRP β_1 muestran que la participación de SIRP β_1 promueve la fagocitosis en macrófagos induciendo la fosforilación en tirosina de DAP12, Syk y SLP-76, y la subsiguiente activación de una cascada MEK-MAPK-miosina quinasa de cadena ligera (Matozaki et al. J. Biol. Chem. 2004, 279(28), 29450-29460).

[0009] SIRP γ se expresa en células T y células NK activadas y se une a CD47 con una afinidad 10 veces menor en comparación con SIRP α . La interacción CD47-SIRP γ está implicada en el contacto entre las células presentadoras de antígeno y las células T, coestimulando la activación de las células T y promoviendo su proliferación (Piccio et al. Blood

2005, 105, 2421-2427). Además, las interacciones CD47-SIRP γ desempeñan un papel en la migración transendotelial de las células T (Stefanisakis et al. Blood 2008, 112, 1280-1289).

[0010] Los anticuerpos anti-SIRP α conocidos en la técnica son menos adecuados para su uso en monoterapia o terapia combinada dirigida a SIRP α , porque o bien no son específicos para SIRP α humano, o bien son demasiado específicos. Los anticuerpos de la técnica anterior KWAR23, SESAS, 29AM4-5 y 12C4 no son específicos, ya que también se unen a la SIRP γ humana. La unión a SIRP γ , que se expresa en las células T, podría influir negativamente en la proliferación y el reclutamiento de células T. Otros anticuerpos anti-SIRP α tienen una especificidad demasiado limitada, por ejemplo, el mAb 1.23A sólo reconoce la variante polimórfica humana SIRP α SIRP α_1 y no la variante SIRP α_{BIT} , que es predominante al menos en la población caucásica (X.W. Zhao et al. PNAS 2011, 108(45), 18342-18347).

[0011] Además de usar anticuerpos anti-SIRP α para aumentar la ADCC de un anticuerpo terapéutico, estos anticuerpos también pueden usarse para dirigirse directamente a tipos de cáncer que expresan SIRP α . Los anticuerpos anti-SIRP α que comprenden -Fc humano de tipo salvaje pueden ser adecuados para tratar cánceres que expresan SIRP α , como el carcinoma de células renales y el melanoma maligno, ya que los anticuerpos murinos anti-SIRP α que tienen una región Fc funcional ralentizaron la formación de tumores en ratones inyectados con células Renca y células de melanoma B16BL6, ambas expresando SIRP α (Yanagita et al. JCI Insight 2017, 2(1), e89140).

[0012] En conclusión, sigue existiendo la necesidad de anticuerpos anti-SIRP α que tengan baja unión a SIRP γ , que se unan específicamente tanto a variantes polimórficas de SIRP α_1 como de SIRP α_{BIT} y que sean adecuados para su uso en terapia anticancerígena, ya sea solos o en combinación con anticuerpos terapéuticos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA PRESENTE INVENCION

[0013] La presente invención se refiere a anticuerpos contra SIRP α que son adecuados para su uso en terapia anticancerígena. La invención se refiere además al uso de los anticuerpos en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014]

Figura 1. Comparación de la ADCC medida en % de citotoxicidad de trastuzumab (Tmab) solo, trastuzumab en combinación con el anticuerpo 12C4 murino anti-SIRP α (mu12C4), trastuzumab en combinación con un anticuerpo en el que las regiones variables 12C4 murinas se injertan en la región constante IgG1 humana (12C4hulgGi), y trastuzumab en combinación con un anticuerpo en el que las regiones variables 12C4 murinas se injertan en la región constante IgG1 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A (12C4hulgGiLALA), medido en células de cáncer de mama HER2-positivas SKBR3 utilizando neutrófilos humanos como células efectoras.

Figura 2. Comparación del % de ADCC en relación con trastuzumab (ajustado al 100%) de trastuzumab en combinación con los anticuerpos anti-SIRP α 1-9 que tienen una región constante IgG1 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A, el anticuerpo anti-SIRP α 12C4hulgGiLALA (12C4LALA) y el anticuerpo anti-CD47 B6H12hulgGiLALA (B6H12LALA) en células SKBR3. Los cuadrados rellenos, (■), son los valores medidos con neutrófilos de donantes que presentan la variante SIRP α_{BIT} , los círculos abiertos, (○), son los valores medidos con neutrófilos de donantes que presentan la variante SIRP α_1 . Las columnas son la media de todos los donantes; las barras de error representan la desviación estándar.

Figura 3. Comparación del % de ADCC en relación con trastuzumab solo y trastuzumab en combinación con los anticuerpos anti-SIRP α 4, 7, 10, 14 en varias concentraciones (curvas dosis-respuesta) que tienen una región constante IgG1 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A, y el anticuerpo anti-SIRP α 12C4hulgGiLALA (12C4LALA) en células SKBR3. Neutrófilos de dos donantes (△, ○) que presentan la variante SIRP α_{BIT} . Las columnas son la media de los dos donantes.

Figura 4. Comparación del % de ADCC en relación con trastuzumab solo y trastuzumab en combinación con los anticuerpos anti-SIRP α 4, 7, 10, 13, 14, 15 y 16 que tienen una región constante IgG1 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A, y el anticuerpo anti-SIRP α 12C4hulgG1LALA (12C4LALA) en células

SKBR3. Se utilizaron neutrófilos de donantes con la variante SIRP α_{BIT} (△, ▽, ◇), con la variante SIRP α_1 (○, ●) y neutrófilos de un donante cuya variante no se determinó (□). Las columnas son la media de los donantes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

[0015] No se dispone de terapias aprobadas dirigidas contra la SIRP α , aunque se ha demostrado que esta diana desempeña un papel importante en los mecanismos de evasión inmunitaria de los tumores. Además, la SIRP α se expresa en varias células malignas, lo que la convierte en un posible antígeno asociado a tumores.

[0016] La presente invención se refiere a anticuerpos antagonistas anti-SIRP α que presentan una unión específica a las dos variantes polimórficas predominantes de SIRP α SIRP α_{BIT} y SIRP α_1 , que no se unen a SIRP γ y que aumentan la ADCC y/o ADCP de los anticuerpos terapéuticos.

[0017] El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente especificación, se refiere a un anticuerpo monoclonal (mAb) que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo, como los anticuerpos IgA, IgE, IgG, o IgM. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG, más preferiblemente un anticuerpo IgG1 o IgG2. Los anticuerpos pueden ser quiméricos, humanizados o humanos. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención son humanizados. Aún más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG humanizado o humano, más preferiblemente un mAb IgG1 humanizado o humano. El anticuerpo puede tener cadenas ligeras κ (kappa) o λ (lambda), preferiblemente cadenas ligeras κ (kappa), es decir, un anticuerpo IgG1- κ humanizado o humano. Los anticuerpos pueden incluir una región constante modificada, es decir, se pueden introducir una o más mutaciones para, por ejemplo, aumentar la semivida y/o aumentar o disminuir la función efectora.

[0018] Los términos "anticuerpo monoclonal" y "mAb" utilizados en el presente documento se refieren a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos pueden generarse inmunizando animales con una mezcla de péptidos que representen el antígeno deseado. Se aíslan linfocitos B y se fusionan con células de mieloma o se cultivan linfocitos B individuales durante varios días en presencia de medio condicionado y células alimentadoras. Los sobrenadantes de mieloma o de linfocitos B que contienen los anticuerpos producidos se analizan para seleccionar linfocitos B o hibridomas adecuados. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse a partir de hibridomas adecuados mediante la metodología del hibridoma descrita por primera vez por Köhler et al. Nature 1975, 256, 495-497. Alternativamente, se puede lisar el RNA de células B o linfoma adecuados, aislar el RNA, transcribirlo inversamente y secuenciarlo. Los anticuerpos pueden fabricarse mediante métodos de DNA recombinante en células bacterianas, eucariotas animales o vegetales (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N.º 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos fago utilizando las técnicas descritas en la técnica, por ejemplo en Clackson et al. Nature 1991, 352, 624-628 y Marks et al. J. Mol. Biol. 1991, 222, 581-597.

[0019] El término "fragmento de unión a antígeno", tal como se utiliza en la presente especificación, incluye un fragmento Fab, Fab' o F(ab')₂, un anticuerpo de cadena simple (sc), un scFv, un anticuerpo de dominio simple (sd), un diacuerpo, o un minicuerpo.

[0020] En los anticuerpos humanizados, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de unión a antígeno en las regiones variables (VR) de la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) se derivan de anticuerpos de una especie no humana, comúnmente ratón, rata o conejo. Estas CDR no humanas se combinan con regiones marco humanas (FR1, FR2, FR3 y FR4) de las regiones variables del HC y el LC, de forma que se conservan las propiedades funcionales de los anticuerpos, como la afinidad de unión y la especificidad. Los aminoácidos seleccionados en los FR humanos pueden intercambiarse por los correspondientes aminoácidos originales de especies no humanas para mejorar la afinidad de unión, manteniendo al mismo tiempo una baja inmunogenicidad. Alternativamente, se intercambian aminoácidos seleccionados de los FR originales de especies no humanas por sus correspondientes aminoácidos humanos para reducir la inmunogenicidad, conservando al mismo tiempo la afinidad de unión del anticuerpo. Las regiones variables así humanizadas se combinan con regiones constantes humanas.

[0021] Las CDR pueden determinarse utilizando el enfoque de Kabat (en Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., NIH publication no. 91-3242, pp. 662, 680, 689 (1991)), Chothia (Chothia et al., Nature 1989, 342, 877-883) o IMGT (Lefranc, The). En el contexto de la presente invención, la numeración Eu se utiliza para indicar las posiciones en las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo. La expresión "numeración Eu" se refiere al índice Eu como en Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., NIH publication no. 91-3242, pp. 662, 680, 689 (1991).

[0022] Los anticuerpos antagonistas tienen afinidad por un antígeno específico, y la unión del anticuerpo a su antígeno inhibe la función de un agonista o agonista inverso en los receptores. En el presente caso, la unión de un anticuerpo antagonista anti-SIRP α a SIRP α impedirá la unión de CD47 a SIRP α o interrumpirá la señal inhibitoria desencadenada por la unión CD47-SIRP α .

[0023] Los anticuerpos antagonistas anti-SIRP α pueden unirse al mismo sitio donde se une CD47, impidiendo la ligadura de SIRP α por CD47 y, en consecuencia, inhibiendo la señalización que regula negativamente la acción dependiente del receptor Fc de las células efectoras inmunitarias. Los anticuerpos antagonistas anti-SIRP α también pueden unirse a un sitio de SIRP α diferente del sitio de unión de CD47, es decir, un sitio alostérico, e inhibir la señalización inhibitoria de SIRP α sin interferencia directa con la interacción física CD47-SIRP α , por ejemplo, un cambio en la forma tridimensional de SIRP α . Este cambio en la forma tridimensional impide la señalización (descendente) al unirse a CD47. Cuando SIRP α se une a un sitio alostérico, CD47 puede seguir unida a SIRP α , lo que puede hacer que CD47 esté menos disponible para unirse a trombospondina-1 (TSP-1). La ligación de TSP-1 a CD47 desempeña un papel, por ejemplo, en la regulación negativa de la activación de las células T (Soto-Pantoja et al. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2015, 50(3), 212-230).

[0024] El término "afinidad de unión", tal como se utiliza en la presente especificación, se refiere a la constante de disociación (K_D) de una interacción antígeno-anticuerpo particular. La K_D es la relación entre la velocidad de disociación (k_{off}) y la velocidad de asociación (k_{on}). Por consiguiente, K_D es igual a k_{off}/k_{on} y se expresa como concentración molar (M).

De ello se deduce que cuanto menor sea la K_D , mayor será la afinidad de unión. Típicamente, los valores de K_D se determinan utilizando resonancia de plasmón superficial (SPR), típicamente utilizando un sistema biosensor (por ejemplo, Biacore®) utilizando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, E.S. Day et al. Anal. Biochem. El término "afinidad de unión" también puede referirse a la concentración de anticuerpo que proporciona una unión semimáxima (EC_{50}) determinada con, por ejemplo, un ensayo ELISA o mediante citometría de flujo.

[0025] El término "unión específica", tal como se utiliza a lo largo de la presente especificación, se refiere a la unión entre un anticuerpo y su antígeno con una K_D típicamente inferior a 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o incluso inferior, tal como se determina mediante SPR a 25°C.

[0026] El término "baja afinidad", tal como se utiliza a lo largo de la presente especificación, es intercambiable con las frases "se une/no se une" o "se une/no se une a", y se refiere a una afinidad de unión entre un anticuerpo y su antígeno con una EC_{50} superior a 1500 ng/ml determinada mediante un ensayo ELISA, o cuando no se observa unión específica entre el antígeno inmovilizado y el anticuerpo determinada mediante SPR.

[0027] El término "alta afinidad" se utiliza a lo largo de la presente especificación y se refiere a una afinidad de unión entre un anticuerpo y su antígeno con una K_D típicamente inferior a 10^{-10} M, 10^{-11} M o incluso inferior según se determina mediante SPR a 25°C.

[0028] La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende regiones variables (VR) de cadena pesada (HC) y ligera (LC) CDR1, CDR2 y CDR3, en las que:

- a. HC VR CDR1 consiste en la secuencia de aminoácidos HGIS,
- b. HC VR CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos TIGTGVITYFASWAKG,
- c. HC VR CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos GSAWNDPFD,
- d. LC VR CDR1 consiste en la secuencia de aminoácidos QASQSVYGNNDLA,
- e. LC VR CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos LASTLAT, y
- f. LC VR CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos LGGGDDEADNV,

en la que las CDR se determinan según la numeración de Kabat.

[0029] La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las regiones variables (VR) de cadena pesada (HC) y ligera (LC) de regiones determinantes de complementariedad (CDR) CDR1, CDR2 y CDR3 secuencias de aminoácidos de SEQ ID N.º: 13 y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 14.

[0030] Se divulga, pero no forma parte de la invención reivindicada, un anticuerpo anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) de región variable (VR) de cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) seleccionadas del grupo que consiste en:

- a. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 1 y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º:2;
- b. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:3 y secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:4;
- c. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:5 y secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:6;
- d. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:7 y secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:8;
- e. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º:9 y secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 10;
- f. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 11 y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 12;
- g. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 15 y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 16; y
- h. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 17 y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 18, en el que las CDR se determinan según la numeración de Kabat.

[0031] En una realización preferida, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPα según la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se define anteriormente, en el que el anticuerpo muestra unión específica tanto a SIRPα_{BIT} como a SIRPα₁ y no se une a SIRPγ.

[0032] En una realización más preferida, el anticuerpo anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a SIRPα_{BIT} con una K_D inferior a 10^{-9} M y se une a SIRPα₁ con una K_D inferior a 10^{-7} M, donde la K_D se mide con SPR a 25°C. Preferiblemente, el anticuerpo anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une a SIRPα₁ con una K_D inferior a 10^{-8} M.

[0033] En otra realización más preferida, el anticuerpo anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a SIRPα_{BIT} y SIRPα₁ con una K_D inferior a 10⁻⁹ M, donde la K_D se mide con SPR a 25°C.

[0034] En una realización aún más preferida, el anticuerpo anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a SIRPα_{BIT} y SIRPα₁ con una K_D inferior a 10⁻¹⁰ M. Preferiblemente, el anticuerpo anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a SIRPα_{BIT} con una K_D inferior a 10⁻¹⁰ M y a SIRPα₁ con una K_D inferior a 10⁻¹¹ M. Típicamente, el anticuerpo anti-SIRPα según la invención como se define anteriormente es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. Preferiblemente, el anticuerpo anti-SIRPα es un anticuerpo humanizado o humano. Más preferiblemente, el anticuerpo anti-SIRPα es un anticuerpo humanizado. En una realización particular, el anticuerpo humanizado anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención comprende una HCVR y una LCVR seleccionadas del grupo que consiste en:

- a. Secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º:35 y secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:36;
- b. Secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º:35 y secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:37;
- c. Secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º: 13 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:38;
- y
- d. Secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º: 13 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:37.

[0035] En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º:35 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:36.

[0036] En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º:35 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:37.

[0037] En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º: 13 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:38.

[0038] En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º: 13 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:37.

[0039] Se divulga, pero no forma parte de la invención reivindicada, el anticuerpo humanizado anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende la secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º:30 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:31.

[0040] Se divulga, pero no forma parte de la invención reivindicada, el anticuerpo humanizado anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende la secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º:32 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:33.

[0041] Se divulga, pero no forma parte de la invención reivindicada, el anticuerpo humanizado anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende la secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º:34 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:8.

[0042] Además de unirse a (hu)SIRPα_{BIT} y (hu)SIRPα₁ humanas, los anticuerpos según la invención también pueden unirse a (cy)SIRPα de mono cynomolgus, permitiendo estudios *in vivo* en un modelo animal relevante.

[0043] Los anticuerpos según la invención pueden unirse a un sitio de SIRPα que es diferente del sitio de unión de CD47, es decir, un sitio alostérico e inhibir la señalización inhibitoria de SIRPα sin interferencia directa con la interacción física CD47-SIRPα. Alternativamente, los anticuerpos pueden unirse al mismo sitio donde se une CD47, impidiendo la ligadura de SIRPα por CD47 y, en consecuencia, inhibiendo la señalización que regula negativamente la acción dependiente del receptor Fc de las células efectoras inmunitarias.

[0044] Los anticuerpos anti-SIRPα según la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se describe anteriormente son más específicos que los anticuerpos anti-SIRPα conocidos, y muestran una afinidad excelente tanto para SIRPα_{BIT} como para SIRPα₁. Asimismo, los anticuerpos anti-SIRPα según la invención no se unen a SIRPγ.

[0045] En una realización particular, el anticuerpo anti-SIRPα según la invención comprende una región Fc que se une a receptores Fc activadores presentes en células efectoras inmunitarias humanas. Dicho anticuerpo anti-SIRPα es adecuado para la monoterapia de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas SIRPα-positivos, ya que puede inducir ADCC y/o ADCP. Las células efectoras inmunitarias humanas poseen una variedad de receptores Fc activadores, que al ligarse desencadenan la fagocitosis, la liberación de citocinas, la ADCC y/o la ADCP, etc. Ejemplos de estos receptores son los receptores Fcγ, por ejemplo FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIIA (CD16a), FcγRIIIB (CD16b), FcγRIIC y el receptor Fcα FcαRI (CD89). Los distintos isotipos de anticuerpos naturales se unen a estos receptores. Por ejemplo, IgG₁ se une a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcγRIIIB; IgG₂ se une a FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA; IgG₃ se une a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcγRIIIB; IgG₄ se une a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA; e IgA se une a

FcαRI.

[0046] En una realización preferida, el anticuerpo anti-SIRPα según la invención comprende una región Fc del isotipo IgA o IgG. Más preferido es un anticuerpo anti-SIRPα que comprende una región Fc del isotipo IgGi, IgG₂, IgG₃ o IgG₄; el isotipo IgGi, IgG₂ o IgG₄ es aún más preferido. Lo más preferido es un anticuerpo anti-SIRPα que comprenda una región Fc del isotipo IgGi.

[0047] Aunque los anticuerpos anti-SIRPα que comprenden una región Fc que se une a receptores Fc activadores presentes en células efectoras inmunitarias humanas pueden ser adecuados para tratar cánceres que expresan SIRPα, los anticuerpos quiméricos anti-SIRPα IgGi no mostraron los resultados esperados cuando se probaron *in vitro* en combinación con otros anticuerpos que comprenden una región Fc humana que se une a receptores Fc activadores presentes en células efectoras inmunitarias humanas (es decir, anticuerpos capaces de inducir ADCC y/o ADCP). Los resultados de los ensayos de ADCC *in vitro* mostraron que un anticuerpo quimérico IgGi anti-SIRPα no aumenta la ADCC de ese otro anticuerpo tanto como se esperaba sobre la base de resultados anteriores utilizando anticuerpos murinos.

[0048] Por lo tanto, la invención se refiere a anticuerpos anti-SIRPα que muestran una unión reducida o una baja afinidad por los receptores Fc activadores presentes en las células efectoras inmunitarias humanas. Dichos anticuerpos anti-SIRPα comprenden una región Fc modificada en la que uno o más aminoácidos han sido sustituidos por otro(s) aminoácido(s) en comparación con una región Fc similar no modificada. Unión reducida significa que la afinidad del anticuerpo anti-SIRPα que comprende una región Fc modificada por los receptores Fc activadores es menor que la afinidad de un anticuerpo anti-SIRPα con las mismas regiones variables que comprende una región Fc similar no modificada. La afinidad de unión de los anticuerpos para activar los receptores Fc se mide normalmente mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) o citometría de flujo utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, el método de Harrison et al. en J. Pharm. Biomed. Anal. 2012, 63, 23-28. Los anticuerpos que presentan una unión reducida o una baja afinidad por el receptor Fcα o Fcγ humano en combinación con un anticuerpo terapéutico son especialmente eficaces en la destrucción celular de las células cancerosas al aumentar la ADCC y/o la ADCP de las células efectoras inmunitarias. Típicamente, la región Fc del anticuerpo anti-SIRPα según la invención se modifica para reducir la unión a receptores Fc activadores presentes en células efectoras inmunitarias humanas.

[0049] Por lo tanto, el anticuerpo anti-SIRPα según la invención comprende una región Fc modificada que exhibe una unión reducida o una baja afinidad por un receptor Fcα o Fcγ humano. Por ejemplo, la unión de IgGi a un receptor de Fcγ puede reducirse sustituyendo uno o más aminoácidos de IgGi seleccionados del grupo que consiste en L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328 y P329 (numeración Eu); la unión de IgG₂ puede reducirse introduciendo, por ejemplo una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S y P331S; o H268Q, V309L, A330S y P331S (numeración análoga a la numeración Eu de IgGi) (Vafa et al. Methods 2014, 65, 114-126); la unión de IgG₃ puede reducirse introduciendo, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A, o las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P331S (Leoh et al. Mol. Immunol. 2015, 67, 407-415); y la unión IgG₄ puede reducirse introduciendo, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos S228P, F234A y L235A ((numeración análoga a la numeración IgGi Eu) (Parekh et al. mAbs 2012, 4(3), 310-318). La unión de la IgA al receptor Fcα puede reducirse introduciendo, por ejemplo, una o más de las sustituciones de aminoácidos L257R, P440A, A442R, F443R, y P440R (numeración secuencial, Pleass et al. J. Biol. Chem. 1999, 271(33), 23508-23514).

[0050] Preferiblemente, el anticuerpo anti-SIRPα según la invención comprende una región Fc modificada que exhibe una unión reducida a o una baja afinidad por un receptor Fcγ humano. Más preferiblemente, la región Fc modificada es una región Fc del isotipo IgG. Aún más preferiblemente, la región Fc modificada es una región Fc del isotipo IgGi, IgG₂ o IgG₄.

[0051] En una realización preferida, el anticuerpo anti-SIRPα según la invención comprende una región Fc IgGi humana modificada que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328, y P329 (numeración Eu).

[0052] Preferiblemente, el anticuerpo anti-SIRPα comprende una región Fc IgGi modificada, que no comprende ninguna sustitución de aminoácidos N297A o N297G. Más preferiblemente, el anticuerpo anti-SIRPα comprende una región Fc IgGi modificada, que no comprende una sustitución de aminoácidos en la posición N297.

[0053] En una realización, la región Fc de IgGi humana modificada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, D270A, D270E, D270N, N297A, N297G, A327Q, P328A, P329A y P329G. Preferiblemente, las sustituciones de uno o más aminoácidos se seleccionan del grupo formado por L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, N297A, P328A, P329A y P329G.

[0054] En otra realización, la región Fc de IgGi humana modificada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, D270A, D270E, D270N, A327Q, P328A, P329A y P329G. Preferiblemente, las sustituciones de uno o más aminoácidos se seleccionan del grupo formado por L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, P328A, P329A y P329G. Más preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende ni la sustitución aminoacídica N297A ni la N297G. Aún más preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende una sustitución de aminoácidos en la posición N297.

[0055] En una realización preferida, la región Fc de IgGi humana modificada comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A, L234E y L235A, L234A, L235A y P329A o L234A, L235A y P329G. Preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende la sustitución aminoacídica N297A o N297G. Más preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende una sustitución de aminoácidos en la posición N297.

[0056] En otra realización preferida, el anticuerpo anti-SIRPα según la invención comprende una región Fc IgGi humana modificada que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A o L234E y L235A, preferiblemente las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A. Más preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende ni la sustitución aminoacídica N297A ni la N297G. Aún más preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende una sustitución de aminoácidos en la posición N297.

[0057] La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-SIRPα según la invención como se describe anteriormente y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones farmacéuticas típicas de proteínas terapéuticas como los anticuerpos adoptan la forma de tortas liofilizadas (polvos liofilizados), que requieren disolución (acuosa) (es decir, reconstitución) antes de la infusión intravenosa, o soluciones (acuosas) congeladas, que requieren descongelación antes de su uso.

[0058] Típicamente, la composición farmacéutica se proporciona en forma de torta liofilizada. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para su inclusión en la composición farmacéutica (antes de la liofilización) de acuerdo con la presente invención incluyen soluciones tampón (por ejemplo, citrato, histidina o succinato que contengan sales en agua), lyoprotectants (por ejemplo, sacarosa, trehalosa), modificadores de la tonicidad (por ejemplo, cloruro sódico), tensioactivos (por ejemplo, polisorbato), y agentes de carga (por ejemplo, manitol, glicina). Los excipientes utilizados para las formulaciones de proteínas liofilizadas se seleccionan por su capacidad para evitar la desnaturalización de las proteínas durante el proceso de liofilización, así como durante el almacenamiento.

[0059] La presente invención se refiere además a un anticuerpo anti-SIRPα según la invención o composición farmacéutica como se describe anteriormente para su uso como medicamento.

[0060] En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPα según la invención o composición farmacéutica como se describe anteriormente para su uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas. Los anticuerpos anti-SIRPα de la invención pueden utilizarse en el tratamiento de tumores sólidos, como el cáncer de mama, el cáncer renal o el melanoma, o de neoplasias hematológicas, como la leucemia mieloide aguda (AML).

[0061] En una segunda realización, la invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPα que comprende una región Fc que se une a receptores Fc activadores presentes en células efectoras inmunitarias humanas para su uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias malignas hematológicas SIRPα-positivos. Preferiblemente, la región Fc que se une a los receptores Fc activadores presentes en las células efectoras inmunitarias humanas es del isotipo IgA o IgG. Más preferido es un anticuerpo anti-SIRPα que comprende una región Fc del isotipo IgGi, IgG₂, IgG₃ o IgG₄; el isotipo IgGi, IgG₂ o IgG₄ es aún más preferido. El más preferido es un anticuerpo anti-SIRPα que comprende una región Fc del isotipo IgGi para su uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos positivos para SIRPα y neoplasias hematológicas.

[0062] En una tercera realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPα según la invención o composición farmacéutica como se describe anteriormente para su uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas en combinación con el uso de una o más terapias anticancerígenas. Las terapias anticancerígenas adecuadas son la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia, la terapia hormonal, la terapia dirigida y la inmunoterapia. El anticuerpo anti-SIRPα según la invención o la composición farmacéutica como se describe anteriormente puede ser para uso concomitante o secuencial en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas en combinación con el uso de una o más terapias anticancerígenas. En particular, el anticuerpo anti-SIRPα según la invención o la composición farmacéutica como se describe anteriormente puede usarse en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas tras el uso de una o más terapias anticancerígenas.

[0063] Preferiblemente, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPα según la invención o composición farmacéutica como se describe anteriormente para su uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas en combinación con el uso de uno o más de otros tratamientos contra el cáncer. En particular, el anticuerpo anti-SIRPα según la invención o la composición farmacéutica como se describe anteriormente puede usarse en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas tras el uso de una o más terapias anticancerígenas.

[0064] Las terapias anticancerígenas adecuadas incluyen quimioterapias, radioterapias, terapias hormonales, terapias dirigidas y agentes inmunoterapéuticos. Los quimioterápicos adecuados incluyen agentes alquilantes, como mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, tetrazinas y aziridinas; antimetabolitos, como antifolatos, fluoropirimidinas, análogos de desoxinucleósidos y tiopurinas; agentes antimicrotúbulos, como alcaloides de vinca y taxanos; inhibidores de la topoisomerasa I y II; y antibióticos citotóxicos, como antraciclinas y bleomicinas.

[0065] Las radioterapias adecuadas incluyen radioisótopos, como ¹³¹I-metayodobencilguanidina (MIBG), ³²P como fosfato de sodio, cloruro de ²²³Ra, cloruro de ⁸⁹Sr y tetrametilenofosfonato de diamina de ¹⁵³Sm (EDTMP).

[0066] Los agentes adecuados para ser utilizados como terapéuticos hormonales incluyen inhibidores de la síntesis hormonal, como los inhibidores de la aromatasa y los análogos de la GnRH; y antagonistas de los receptores hormonales, como los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos y los antiandrógenos.

5 **[0067]** Las terapias dirigidas son terapias que interfieren con proteínas específicas implicadas en la tumorigénesis y la proliferación y pueden ser fármacos de moléculas pequeñas; proteínas, como anticuerpos terapéuticos; péptidos y derivados peptídicos; o híbridos proteína-molécula pequeña, como conjugados anticuerpo-fármaco. Algunos ejemplos de fármacos terapéuticos contra el cáncer son los inhibidores de mTor, como everolimus, temsirolimus y rapamicina; los inhibidores de quinasas, como imatinib, dasatinib y nilotinib; los inhibidores de VEGF, como sorafenib y regorafenib; y los
10 inhibidores de EGFR/HER2, como gefitinib, lapatinib y erlotinib. Entre los ejemplos de terapias dirigidas a péptidos o derivados peptídicos se incluyen los inhibidores del proteasoma, como el bortezomib y el carfilzomib.

[0068] Los agentes inmunoterapéuticos incluyen agentes que inducen, potencian o suprimen una respuesta inmunitaria, como citoquinas (IL-2 e IFN- α); fármacos inmunomoduladores de imida, como talidomida, lenalidomida y pomalidomida; vacunas terapéuticas contra el cáncer, como talimogene laherparepvec; agentes inmunoterapéuticos basados en células, como vacunas de células dendríticas, células T adoptivas y células T modificadas por receptores de antígenos quiméricos); y anticuerpos terapéuticos que pueden desencadenar ADCC/ADCP o CDC a través de su región Fc cuando se unen a ligandos unidos a la membrana de una célula cancerosa.

20 **[0069]** Preferiblemente, la invención se relaciona con un anticuerpo anti-SIRP α según la invención o composición farmacéutica como se describe anteriormente para su uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas en combinación con uno o más otros terapéuticos anticancerígenos, en los que el terapéutico anticancerígeno es un terapéutico dirigido o un agente inmunoterapéutico. Una terapéutica dirigida preferida de acuerdo con la invención es un anticuerpo terapéutico o un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). La terapéutica dirigida más
25 preferida es un anticuerpo terapéutico.

[0070] El término "anticuerpo terapéutico", tal como se utiliza en la presente especificación, se refiere a un anticuerpo según la invención o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se define anteriormente, que es adecuado para la terapia humana. Los anticuerpos adecuados para la terapia humana son de calidad suficiente, seguros y eficaces para el tratamiento de enfermedades humanas específicas. La calidad puede evaluarse utilizando las directrices establecidas para las Buenas Prácticas de Fabricación; la seguridad y la eficacia suelen evaluarse utilizando las directrices establecidas de las autoridades reguladoras de medicamentos, por ejemplo, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) o la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA). Estas directrices son bien conocidas en la técnica.

35 **[0071]** Preferiblemente, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo aprobado por una autoridad reguladora de medicamentos, como la EMA o la FDA. Se pueden consultar las bases de datos en línea de la mayoría de las Autoridades Reguladoras para saber si un anticuerpo está aprobado.

[0072] El término "ADC", tal como se utiliza en la presente especificación, se refiere a un fármaco citotóxico conjugado con un anticuerpo según la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se define anteriormente, a través de un enlazador. Normalmente, los fármacos citotóxicos son muy potentes, por ejemplo, una duocamicina, una calicheamicina, un dímero de pirrolobenzodiazepina (PBD), un maytansinoide o un derivado de la auristatina. El enlazador puede ser escindible, por ejemplo, el dipéptido escindible valina-citrulina (vc) o valina-alanina (va), o no escindible, por ejemplo, succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC).
45

[0073] Típicamente, el anticuerpo terapéutico para uso en combinación con un anticuerpo anti-SIRP α según la invención es un anticuerpo monoespecífico o biespecífico o fragmento de anticuerpo que comprende al menos una HCVR y LCVR de unión a una diana seleccionada del grupo que consiste en anexina A1, B7H3, B7H4, CA6, CA9, CA15-3, CA19-9, CA27-29, CA125, CA242, CCR2, CCR5, CD2, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD56, CD70, CD74, CD79, CD115, CD123, CD138, CD203c, CD303, CD333, CEA, CEACAM, CLCA-1, CLL-1, c-MET, Cripto, CTLA-4, DLL3, EGFL, EGFR, EPCAM, Eph (p.ej. EphA2 o EphB3), receptor de endotelina B (ETBR), FAP, FcRL5 (CD307), FGF, FGFR (p.ej. FGFR3), FOLR1, GCC, GPNMB, HER2, HMW-MAA, integrina α (p. ej. α v β 3 y α v β 5), IGF1R, TM4SF1 (o antígeno L6), carbohidrato tipo Lewis A, Lewis X, Lewis Y, LIV1, mesotelina, MUC1, MUC16, NaPi2b, Nectina-4, PD-1, PD-L1, PSMA, PTK7, SLC44A4, STEAP-1, antígeno ST4 (o TPBG, glicoproteína del trofoblasto), TF (factor tisular), antígeno de Thomsen-Friedenreich (TF-Ag), Tag72, TNF, TNFR, TROP2, VEGF, VEGFR, y VLA.
50
55

[0074] Se prefiere un anticuerpo terapéutico monoespecífico. Se prefiere un anticuerpo contra una diana unida a la membrana en la superficie de las células tumorales.

60 **[0075]** Los anticuerpos terapéuticos adecuados para su uso en combinación con un anticuerpo anti-SIRP α según la invención incluyen alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, panitumumab, rituximab, y trastuzumab.

[0076] Los ADC adecuados para su uso en combinación con un anticuerpo anti-SIRP α según la invención incluyen trastuzumab emtansina y brentuximab vedotin.

65 **[0077]** En una realización preferida, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRP α según la invención como

se describe anteriormente para el uso mencionado anteriormente en combinación con un anticuerpo terapéutico contra una diana unida a membrana en la superficie de células tumorales que comprende una región Fc humana que se une a receptores Fc activadores presentes en células efectoras inmunitarias humanas.

- 5 **[0078]** Mediante la unión a estos receptores Fc activadores, descritos anteriormente, un anticuerpo terapéutico que comprende una región Fc humana que se une a receptores Fc activadores presentes en células efectoras inmunitarias humanas puede inducir ADCC y/o ADCP. Los anticuerpos terapéuticos de isotipo IgG, IgE o IgA humano comprenden una región Fc humana que se une a receptores Fc activadores presentes en células efectoras inmunitarias humanas.
- 10 **[0079]** Un anticuerpo terapéutico preferido para su uso según la invención es un anticuerpo terapéutico del isotipo IgG o IgA. Es más preferible un anticuerpo terapéutico del isotipo IgG, como los anticuerpos IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄. Aún más preferido es un anticuerpo terapéutico del isotipo IgG₁ o IgG₂. Lo más preferido es un anticuerpo terapéutico del isotipo IgG₁.
- 15 **[0080]** Preferiblemente, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-SIRPα humanizado que comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 13 y CDR1,
- [0081]** Secuencias de aminoácidos CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 14 para su uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas malignas en combinación con el uso de un anticuerpo terapéutico contra una diana unida a la membrana en la superficie de células tumorales, que comprende una región Fc humana que se une a receptores Fc activadores presentes en células efectoras inmunitarias humanas, en el que el anticuerpo anti-SIRPα comprende una región Fc modificada que muestra una unión reducida a un receptor Fcα o Fcγ humano, en comparación con el mismo anticuerpo anti-SIRPα que comprende una región Fc de tipo salvaje.
- 20 **[0082]** Se divulga, pero no forma parte de la invención reivindicada, un anticuerpo anti-SIRPα humanizado que comprende CDRs HCVR y LCVR seleccionadas del grupo que consiste en:
- 25 a. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 1 y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º:2;
- 30 b. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:3 y secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:4;
- c. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:5 y secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:6;
- 35 d. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:7 y secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:8;
- e. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º:9 y secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 10;
- f. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 11 y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 12;
- 40 g. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 15 y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 16; y h. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 17 y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 18,
- para su uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas malignas en combinación con el uso de un anticuerpo terapéutico contra una diana unida a la membrana en la superficie de células tumorales, que comprende una región Fc humana que se une a receptores Fc activadores presentes en células efectoras inmunitarias humanas, en el que el anticuerpo anti-SIRPα comprende una región Fc modificada que muestra una unión reducida a un receptor Fcα o Fcγ humano, en comparación con el mismo anticuerpo anti-SIRPα que comprende una región Fc de tipo salvaje.
- 50 **[0083]** En una realización preferida, el anticuerpo anti-SIRPα humanizado para uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas en combinación con el anticuerpo terapéutico, comprende una región Fc IgG₁ humana modificada que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328, y P329 (numeración Eu).
- 55 **[0084]** Preferiblemente, el anticuerpo humanizado anti-SIRPα para su uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas en combinación con el anticuerpo terapéutico comprende una región Fc IgG₁ modificada, que no comprende ninguna sustitución de aminoácidos N297A o N297G. Más preferiblemente, el anticuerpo anti-SIRPα comprende una región Fc IgG₁ modificada, que no comprende una sustitución de aminoácidos en la posición N297.
- 60 **[0085]** En una realización, la región Fc de IgG₁ humana modificada comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, D270A, D270E, D270N, N297A, N297G, A327Q, P328A, P329A, y P329G.
- 65 **[0086]** En otra realización, el anticuerpo anti-SIRPα humanizado para uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas en combinación con el anticuerpo terapéutico comprende una región Fc IgG₁ modificada que

comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, D270A, D270E, D270N, A327Q, P328A, P329A y P329G. Preferiblemente, las sustituciones de uno o más aminoácidos se seleccionan del grupo formado por L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, P328A, P329A y P329G. Más preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende ni la sustitución aminoacídica N297A ni la N297G. Aún más preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende una sustitución de aminoácidos en la posición N297.

[0087] En una realización preferida, la región Fc de IgGi humana modificada comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A, L234E y L235A, L234A, L235A y P329A o L234A, L235A y P329G. Preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende la sustitución aminoacídica N297A o N297G. Más preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende una sustitución de aminoácidos en la posición N297.

[0088] En otra realización preferida, el anticuerpo anti-SIRPα humanizado para su uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas en combinación con el anticuerpo terapéutico comprende una región Fc IgGi humana modificada que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A o L234E y L235A, preferiblemente las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A. Más preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende ni la sustitución aminoacídica N297A ni la N297G. Aún más preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende una sustitución de aminoácidos en la posición N297.

[0089] En una realización preferida, el anticuerpo humanizado anti-SIRPα para uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas en combinación con el uso de un anticuerpo terapéutico contra una diana unida a membrana en la superficie de células tumorales que comprende una región Fc humana que se une a receptores Fc activadores presentes en células efectoras inmunitarias humanas, comprende una región Fc que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A, y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de HCVR y LCVR de SEQ ID N.º: 13 y las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 14.

[0090] Se divulga, pero no forma parte de la invención reivindicada, el anticuerpo humanizado anti-SIRPα para su uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos y neoplasias hematológicas en combinación con el uso de un anticuerpo terapéutico contra una diana unida a membrana en la superficie de células tumorales que comprende una región Fc humana que se une a receptores Fc activadores presentes en células efectoras inmunitarias humanas, comprende una región Fc que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A, y CDRs HCVR y LCVR seleccionadas del grupo que consiste en:

- a. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:3 y secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:4;
- b. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:5 y secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:6;
- c. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:7 y secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID N.º:8;
- d. Secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º:9 y secuencias de aminoácidos CDR1, y CDR2 y CDR3 de SEQ ID N.º: 10.

[0091] En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º:35 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:36;

- a. Secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º:35 y secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:37;
- b. Secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º: 13 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:38;
- c. Secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º: 13 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:37.

[0092] Se divulga, pero no forma parte de la invención reivindicada, el anticuerpo humanizado anti-SIRPα para uso como se define anteriormente que comprende una región Fc que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A,

- y
- d. Secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º:30 y secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:31;
- e. secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º:32 y secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:33; o
- f. Secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º:34 y secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:8;

[0093] Más preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende ninguna sustitución de aminoácidos N297A o N297G. Aún más preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende una sustitución de aminoácidos en la posición N297.

[0094] En otra realización preferida, el anticuerpo anti-SIRPα humanizado para su uso según se define anteriormente comprende una región Fc que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A, y la secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º:35 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:36.

[0095] En otra realización preferida, el anticuerpo anti-SIRPα humanizado para su uso según se define anteriormente

comprende una región Fc que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A, y la secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º:35 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:37.

[0096] En otra realización preferida, el anticuerpo anti-SIRPα humanizado para uso como se define anteriormente comprende una región Fc que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A, y la secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º: 13 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:38.

[0097] En otra realización preferida, el anticuerpo anti-SIRPα humanizado para uso como se define anteriormente comprende una región Fc que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A, y la secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º: 13 y la secuencia de aminoácidos LCVR de SEQ ID N.º:37.

[0098] Más preferiblemente, los anticuerpos anti-SIRPα humanizados según la invención tal como se define en el presente documento para su uso tal como se define en el presente documento que comprenden una región Fc que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A, la región Fc IgGi modificada no comprenden ninguna sustitución de aminoácidos N297A o N297G. Aún más preferiblemente, la región Fc IgGi modificada no comprende una sustitución de aminoácidos en la posición N297.

[0099] Los anticuerpos anti-SIRPα que comprenden una región Fc modificada que muestra una unión reducida a un receptor Fcα o Fcγ humano, en comparación con el mismo anticuerpo anti-SIRPα que comprende una región Fc de tipo salvaje como se describe anteriormente, mejoran la ADCC *in vitro* de un anticuerpo terapéutico utilizando neutrófilos como células efectoras de diferentes donantes homocigotos para SIRPα_{BIT} o SIRPα₁. Todos estos anticuerpos aumentan la ADCC *in vitro* utilizando neutrófilos de la mayoría de los donantes, los anticuerpos preferidos incluso aumentan la ADCC *in vitro* utilizando neutrófilos de todos los donantes.

[0100] Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

EJEMPLOS

Protocolo de inmunización y selección

[0101] Se inmunizó repetidamente a conejos con una mezcla de péptidos que representaban la región del dominio extracelular de la (hu)SIRPα_{BIT} humana, la (hu)SIRPα₁ humana y la (cy)SIRPα de cynomolgus. Se extrajo sangre en diferentes momentos y se enriqueció con linfocitos. Se depositaron células B individuales en pocillos individuales de placas de microtitulación. Estas células B se cultivaron durante varios días en presencia de medio condicionado y células alimentadoras. Durante este tiempo produjeron y liberaron anticuerpos monoclonales en el medio de cultivo (sobrenadantes de células B). Se analizaron los sobrenadantes de estas células B individuales para determinar la producción de IgG; posteriormente se determinó la unión específica huSIRPα_{BIT} y huSIRPα₁, a cySIRPα y a un anticuerpo anti-Fc. Los sobrenadantes adecuados fueron los que se unían tanto a huSIRPα_{BIT} y huSIRPα₁ como a cySIRPα. Tras una etapa de selección de blancos, se midió la unión a SIRPα de ratón (mu) y a huSIRPβ_{1v1}, huSIRPβ_{1v2} y huSIRPy (como anti-objetivos). Además, se determinó la unión a células CHO que expresan SIRPα_{BIT} y SIRPα₁-over. La unión a células CHO parentales se aplicó como ensayo de control.

[0102] Se seleccionaron lisados de células B adecuados para el aislamiento del RNA, la transcripción inversa y la secuenciación. Las regiones variables únicas de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo se sintetizaron genéticamente y se clonaron delante de la secuencia de la región constante del anticuerpo (kappa LC SEQ ID N.º:26 y formato de IgGi HC-LALA humana SEQ ID N.º:27), respectivamente.

[0103] Las células HEK 293 se transfectaron transitoriamente con los plásmidos que contenían la secuencia de anticuerpos mediante un procedimiento automatizado en una plataforma Tecan Freedom Evo. Las inmunoglobulinas se purificaron a partir del sobrenadante celular mediante purificación por afinidad (proteína A) en un sistema HPLC Dionex Ultimate 3000 con un automuestreador de placas. Los anticuerpos producidos se probaron en ensayos de tipo ELISA (ELISA: huSIRPα₁, huSIRPα_{BIT}, cySIRPα, muSIRPα, huSIRPβ_{1v1}/β_{1v2}/γ; ensayos de unión celular: huSIRPα₁, huSIRPα_{BIT}).

Expresión transitoria de anticuerpos

a) Preparación de construcciones de cDNA y vectores de expresión

[0104] Las secuencias de aminoácidos HCVR de los anticuerpos se unieron cada una en el N-terminal a una secuencia líder (SEQ ID N.º:28 para los anticuerpos 1-9, 15, 16; SEQ ID N.º:39 para los anticuerpos 10-14), y en el C-terminal al dominio constante de una IgGi HC LALA humana según SEQ ID N.º:27. Las secuencias de aminoácidos HCVR de los anticuerpos 12C4hulgGiLALA, 12C4hulgGi o 29AM4-5hulgGiLALA se unieron cada una en el N-terminal a una secuencia líder HAVT20 (SEQ ID N.º:29) y en el C-terminal al dominio constante de una HC LALA IgGi humana según SEQ ID N.º:27 o una HC IgGi humana de tipo salvaje (SEQ ID N.º:25). Las secuencias de aminoácidos quiméricos resultantes se retrotradujeron a una secuencia de cDNA con codones optimizados para su expresión en células humanas (*Homo*

sapiens). Del mismo modo, la secuencia de cDNA quimérico para la LC de la construcción se obtuvo uniendo las secuencias de una secuencia líder (SEQ ID N.º:28 para los anticuerpos 1-9, 12; SEQ ID N.º:40 para los anticuerpos 10, 11, 13-16, SEQ ID N.º:29 para 12C4hulG_iLALA, 12C4hulG_i y 29AM4-5hulG_iLALA) a la LCVR de los anticuerpos 1-16, 12C4hulG_iLALA y 12C4hulG_i y 29AM4-5hulG_iLALA en el N-terminal y en el C-terminal a una región constante de cadena ligera IgG₁ k humana (SEQ ID N.º:26). Se utilizaron las secuencias HCVR y LCVR según la Tabla 1.

Tabla 1 Secuencias HCVR y LCVR de los anticuerpos y anticuerpos de referencia

Anticuerpo	HCVR	LCVR
1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
3	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
4	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
5	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
6	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
7	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14
8	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
9	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
29AM4-5hulG _i LALA	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20
12C4hulG _i LALA	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22
12C4hulG _i	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22
KWAR23	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
10 humanizado	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31
11 humanizado	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33
12 humanizado	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 8
13 humanizado	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36
14 humanizado	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 37
15 humanizado	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 38
16 humanizado	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 37

b) Construcción de vectores y estrategia de clonación

[0105] Para la expresión de las cadenas de anticuerpos se utilizó un vector de expresión de mamíferos, que contiene un casete de expresión CMV:BGHpA. Los vectores finales que contenían el casete de expresión HC o LC (CMV:HC:BGHpA y CMV:LC-BGHpA, respectivamente) se transfirieron y expandieron en células *E. coli* NEB 5-alpha. La producción a gran escala de los vectores de expresión finales para la transfección se realizó utilizando los kits Maxi- o Megaprep (Qiagen).

c) Expresión transitoria en células de mamífero

[0106] Las células Expi293F disponibles comercialmente (Thermo Fisher) se transfectaron con los vectores de expresión utilizando el agente de transfección ExpiFectamine de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la siguiente manera: Se sembraron 75×10^7 células en 300 mL de medio FortiCHO, se combinaron 300 µg del vector de expresión con 800 µl del agente de transfección ExpiFectamine y se añadieron a las células. Un día después de la transfección, se añadieron al cultivo 1,5 ml de potenciador 1 y 15 ml de potenciador 2. Seis días después de la transfección, se recogió el sobrenadante del cultivo celular centrifugándolo a 4.000 g durante 15 minutos y filtrando la cosecha clarificada sobre filtros de botella PES/filtros MF 75 (Nalgene).

Unión y especificidad de los anticuerpos

Experimental

[0107] **Ensayo ELISA:** Se añadieron soluciones de huSIRP_{α1}, huSIRP_{αBIT}, huSIRP_{β1v1}, huSIRP_{β1v2}, huSIRPy y cySIRPα en tampón fosfato salino (PBS) a una placa de poliestireno negro de múltiples pocillos para ELISA y se dejaron adherir durante 1 h a temperatura ambiente. La proteína no unida se eliminó con tres pasos de lavado utilizando un tampón de lavado estándar. A continuación, se añadió tampón de bloqueo a los pocillos. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado estándar. Los anticuerpos en tampón a varias concentraciones se añadieron a los pocillos y se incubaron a RT durante 1 h. Los anticuerpos no unidos se eliminaron con tres pasos de lavado utilizando un tampón de lavado estándar. Se añadió a los pocillos IgG antihumana de cabra (Fab)₂:peroxidasa de rábano (HRP) en tampón y se incubó a RT durante 1 h. Se añadió 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB) y, tras un desarrollo suficiente del color, se añadió HCl. La absorbancia se leyó a 450 nm/620 nm.

[0108] Ensayo de Resonancia Plasmónica Superficial (SPR): El análisis de afinidad se realizó mediante un análisis cinético de ciclo único en un aparato de Resonancia de Plasmón Superficial (sistema Biacore T200, GE Life Sciences) a 25°C. Los antígenos SIRP biotinilados se capturaron en la superficie de un chip adecuado para moléculas biotiniladas (Sensor Chip CAP, GE Life Sciences) inyectando 5 µg/ml del antígeno SIRP en tampón de funcionamiento (tampón HEPES 10 mM a pH 7,4 con 150 mM NaCl, 3 mM EDTA y 0,005% v/v de monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán (Tensioactivo P20) durante 60 s a 10 µl/min tras la inyección de un conjugado de estreptavidina (reactivo CAPture de biotina diluido 20x, GE Life Sciences) durante 60 s a 10 µl/min. La estabilización de la línea de base se fijó en 1 minuto, tras lo cual se inyectaron cinco concentraciones crecientes de un anticuerpo anti-SIRP en tampón de funcionamiento (tampón HEPES 10 mM a pH 7,4 con 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA y monolaurato de sorbitán polioxietileno (20) al 0,005% v/v). Para cada paso se utilizó un tiempo de asociación de 150 seg, seguido de un tiempo de disociación de 1200 seg sólo a la concentración más alta, todo ello a un caudal de 30 µL/min. La regeneración se realizó con una solución de guanidina-HCl 6 M, NaOH 0,25 M (60 seg con un caudal de 30 µL/min). Se realizó una doble sustracción del blanco en los sensorgramas observados utilizando un canal de flujo de referencia no anti-SIRP (blanco) inmovilizado y una inyección de tampón de funcionamiento. Los sensorgramas se ajustaron con un modelo de Langmuir 1:1 para todos los anticuerpos anti-SIRP probados. Los parámetros cinéticos (K_a , K_d y K_D) se calcularon utilizando el software de evaluación Biacore T200 (v3.1).

[0109] Citometría de flujo: Las células U937 que expresan endógenamente el antígeno SIRP α_{BIT} humano y las células derivadas de un subclon no manipulado que se ha examinado y aislado a partir de células CHO-S de ovario de hámster chino (ExpCHO-S) que expresan el antígeno SIRP α_1 , SIRP α_{BIT} o cySIRP α humano (100.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos) se lavaron tres veces con tampón FACS enfriado con hielo (1× PBS (LONZA) que contiene 0,2 % v/p de BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 0,02 % v/p de Na₂S₂O₃ (Sigma-Aldrich), seguido de la adición de un intervalo de concentración de cada mAb primario (50 µL/pocillo) diluido en tampón FACS helado. Tras un tiempo de incubación de 30 minutos a 4 °C, las células se lavaron tres veces con tampón FACS frío y se añadieron 50 µl/pocillo de mAb secundario (AffmPure F(ab')₂ fragment Goat-anti-human IgG-APC, dilución 1:6.000, Jackson Immuno Research). Tras 30 min a 4 °C, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 150 µl de tampón FACS. Las intensidades de fluorescencia se determinaron mediante citometría de flujo (BD FACSVerser, Franklin Lakes, NJ) y se indicaron como la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI-Mediana) para las células U937 y las células ExpCHO-S. Las curvas se ajustaron mediante regresión no lineal utilizando la ecuación sigmoidal dosis-respuesta con pendiente variable (cuatro parámetros) en GraphPad Prism (versión 7.02 para Windows, GraphPad, San Diego, CA). Los valores EC₅₀ se calcularon como la concentración en µg/mL que da una respuesta a medio camino entre la parte inferior y superior de la curva, cuando se utiliza un ajuste logístico de 4 parámetros.

Resultados

[0110] Ensayo ELISA: Los valores EC₅₀ de unión a huSIRP α_1 , huSIRP α_{BIT} , huSIRP β_1 , huSIRP β_{1v2} , huSIRPy, cySIRP α obtenidos con ELISA para los anticuerpos 1-9 y los anticuerpos de referencia se resumen en la Tabla 2. Todos los anticuerpos se unen a huSIRP α_1 y a huSIRP α_{BIT} . Los anticuerpos 29AM4-5hulgGiLALA y 12C4hulgGiLALA, se unen a huSIRP β_{1v1} , huSIRP β_{1v2} , y huSIRPy. Los anticuerpos 2-6, 8 y 9 muestran una baja afinidad por huSIRP β_{1v1} y por huSIRPy. El anticuerpo 7 se une a huSIRP β_{1v1} , pero tiene baja afinidad por huSIRP β_{1v2} y huSIRPy. El anticuerpo 1 se une a huSIRP β_{1v2} y huSIRPy.

Tabla 2 Especificidad de los anticuerpos anti-SIRP α y de los anticuerpos de referencia.

Anticuerpo	huSIRP α_1 EC ₅₀ (ng/ml)	huSIRP α_{BIT} EC ₅₀ (ng/ml)	huSIRP β_{1v1} EC ₅₀ (ng/ml)	huSIRP β_{1v2} EC ₅₀ (ng/ml)	huSIRPy EC ₅₀ (ng/ml)	cySIRP α EC ₅₀ (ng/ml)
1	39	21	100000	58	43	305
2	33	27	100000	28	100000	39
3	15	24	100000	89	5216	36
4	53	25	100000	92	100000	99
5	31	21	3518	119	100000	123
6	21	20	100000	24	100000	33
7	23	20	14	100000	100000	339
8	19	20	100000	19	100000	26
9	23	26	100000	47	100000	30
29AM4-S*	8	9	13	17	34	11
12C4*	7	5	8	6	6	5

*hulgGiLALA

Los valores de EC₅₀ > 100000, se han ajustado a 100000.

[0111] Ensayo SPR: Los valores K_D de unión a huSIRP α_1 , huSIRP α_{BIT} y huSIRPy de los anticuerpos 4, 7, 10-14 en comparación con los anticuerpos de referencia KWAR23, hulgGi12C4LALA y SE5A5 (adquiridos a un proveedor comercial) se resumen en la Tabla 3. Los anticuerpos 4, 7, 10-14 se unen tanto a huSIRP α_1 como a huSIRP α_{BIT} , y no se unen a huSIRPy. Todos los anticuerpos de referencia se unen a huSIRPy.

Tabla 3 Datos SPR (K_D en M)

Anticuerpo	K_D (huSIRP α_{BIT})	K_D (huSIRP α_1)	K_D (huSIRP γ)
KWAR23, IgG2a de ratón	<1.0E-11 ¹	<1.0E-11	<1.0E-11
KWAR23, huIgG ₁ LALA	<1.0E-11 ¹	<1.1E-11	<1.0E-11
12C4huIgG ₁ LALA	1.5E-11	8.7E-11	1.6E-11
SESA5	2.6E-9	2.2E-9	4.9E-8
4	<1.0E-11	2.6E-11	N ²
7	<1.0E-11	<1.0E-11	N
10 humanizado	<1.0E-11	3.2E-9	N
11 humanizado	1.4E-10	4.1E-8	N
12 humanizado	<1.0E-11	5.9E-11	N
13 humanizado	1.2E-11	<1.0E-11	N
14 humanizado	8.9E-11	<1.0E-11	N

¹ <1.0E-11: La K_D está fuera del rango, lo que significa alta afinidad.

² N: No se encontró unión específica.

[0112] Ensayo de citometría de flujo: La unión de varios anticuerpos a huSIRP α_1 , huSIRP α_{BIT} , y/o cySIRP α expresados en células se determinó mediante citometría de flujo. La unión se indica en valores EC₅₀, que se muestran en la Tabla 4. Los anticuerpos 2, 4, 5, 7, 8, 10-14 se unen a huSIRP α_1 , huSIRP α_{BIT} y cySIRP α . Los anticuerpos 2, 4, 5, 7, 8, 10-14 se unen a cySIRP α en el rango bajo de μ g/mL.

Tabla 4 Datos de citometría de flujo

Anticuerpo	Células U937 (SIRP α_{BIT}) EC ₅₀ (μ g/mL)	ExpiCHO-S (huSIRP α_1) EC ₅₀ (μ g/mL)	ExpiCHO-S (huSIRP α_{BIT}) EC ₅₀ (μ g/mL)	ExpiCHO-S (cySIRP α) EC ₅₀ (μ g/mL)
1	-	-	-	-
2	0.14	0.19	0.27	0.16
3	0.22	-	-	-
4	0.12	0.41	0.23	0.18
5	0.16	0.27	0.22	0.26
6	-	-	-	-
7	0.17	0.23	0.21	0.07
8	0.12	0.22	0.18	0.15
9	0.11	-	-	-
29AM4- ShuIgG ₁ LALA	0.25	-	-	-
12C4huIgG ₁ LALA	0.19	-	-	-
KWAR23huIgG ₁ LALA	0.09	-	-	-
10	0.17	0.38	0.2	0.27
11	0.13	1.05	0.3	0.32
12	0.2	0.1	0.46	0.17
13	0.14	0.36	0.23	0.44
14	0.22	0.37	0.29	0.38
15	0.16	-	-	-
16	0.23	-	-	-

-: Valor no determinado.

Bloqueo de la unión CD47-SIRP α por anticuerpos

Experimental

[0113] Las células CHO transfectadas con SIRP α_1 o SIRP α_{BIT} o células CHO parentales como control se sembraron en 20 μ l de medio celular en una placa de pocillos con fondo transparente y se incubaron durante la noche. Los anticuerpos

1-9, los anticuerpos de referencia 29AM4-5hulgGiLALA o 12C4hulgGiLALA junto con una mezcla de His tag® CD47 y anticuerpo de detección fluorescente anti-His tag® se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 2 h. Tras la incubación, las células se lavaron con tampón de lavado celular. La fluorescencia se determinó utilizando un sistema de cribado (CellInsight®, Thermo Scientific®) y se determinó la fluorescencia total por célula.

Resultados

[0114] Los anticuerpos 29AM4-5hulgGiLALA, 12C4hulgGiLALA, 3 y 7 bloquean completamente la unión de CD47 tanto a células CHO que expresan huSIRPα₁ como a células CHO que expresan huSIRPα_{BIT}, los anticuerpos 1, 2, 4-6, 8 y 9 no bloquean ni la unión de CD47 a células CHO que expresan huSIRPα₁ ni a células CHO que expresan huSIRPα_{BIT}.

Ensayo ADCC

[0115] Los neutrófilos de donantes homocigotos para SIRPα₁ o SIRPα_{BIT} se aislaron y cultivaron según el método de Chao et al. PNAS 2011, 108(45), 18342-18347. La ADCC se determinó utilizando el ensayo de liberación de ⁵¹Cr o el ensayo de citotoxicidad no radiactivo Europium TDA (EuTDA) (DELFA, PerkinElmer). Las células SKBR3 se utilizaron como células diana y se marcaron con 100 μCi ⁵¹Cr (Perkin-Elmer) durante 90 min a 37°C, o con bis (acetoximetil) 2,2':6',2"-terpiridina-6,6"-dicarboxilato (reactivo BATDA Delfia), durante 5 min a 37°C. Tras 2 lavados con PBS, se incubaron 5×10³ células diana por pocillo en medio de cultivo IMDM suplementado con 10% (v/v) de suero de ternera fetal (FCS) durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂ en una placa de 96 pocillos con fondo en U junto con neutrófilos en una proporción de células efectoras a células diana de 50:1 en presencia de los anticuerpos apropiados. Tras la incubación, se recogió el sobrenadante y se analizó la radiactividad en un contador gamma (Wallac) o se añadió a una solución de europio (DELFA, PerkinElmer) y se determinó la fluorescencia del ácido 2,2':6',2"-terpiridina-6,6"-dicarboxílico de europio (EuTDA) utilizando un espectrofluorómetro (Envision, PerkinElmer). El porcentaje de citotoxicidad se calculó como [(liberación experimental - liberación espontánea) / (liberación total - liberación espontánea)] × 100%. Todas las condiciones se midieron por duplicado y/o triplicado.

Datos ADCC 12C4hulgGiLALA frente a 12C4IgGi

[0116] La Figura 1 muestra los resultados del ensayo ADCC como citotoxicidad en %. El % de citotoxicidad medido en células SKBR3 utilizando neutrófilos como células efectoras y trastuzumab solo es inferior al % de citotoxicidad del trastuzumab en combinación con el anticuerpo murino 12C4 (mu12C4). El trastuzumab en combinación con un anticuerpo en el que las regiones variables 12C4 se injertan en una región constante IgGi humana (12C4hulgGi) muestra un % de citotoxicidad similar en comparación con el trastuzumab solo a bajas concentraciones de 12C4hulgGi. A mayores concentraciones 12C4hulgGi, se observa una disminución del % de citotoxicidad. El trastuzumab en combinación con un anticuerpo en el que las regiones variables 12C4 se injertan en una región constante IgGi humana que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A (12C4hulgGiLALA) muestra un % de citotoxicidad aumentado en comparación con el % de citotoxicidad del trastuzumab solo, y un % de citotoxicidad aumentado en comparación con la combinación de 12C4hulgGi y trastuzumab.

Datos ADCC

[0117] La Figura 2 compara el % de ADCC por neutrófilos humanos en relación con trastuzumab (fijado en 100%) en presencia del anticuerpo 1-9 que tiene una región constante IgGi humana que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A (LALA) en combinación con trastuzumab en comparación con 12C4hulgGiLALA. B6H12IgGiLALA, que tiene la VR de un anticuerpo murino anti-CD47 y una región constante IgGi humana que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A, y el vehículo (sin trastuzumab) se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. Los cuadrados rellenos (■), son los valores medidos con neutrófilos de donantes que presentan la variante SIRPα_{BIT} (homocigotos para SIRPα_{BIT}), los círculos abiertos (○) son los valores medidos con neutrófilos de donantes que presentan la variante SIRPα₁ (homocigotos para SIRPα₁). Para todos los anticuerpos, la ADCC media aumentó en comparación con el trastuzumab solo. En el caso de los anticuerpos 1, 2, 4, 5, 7 y 8, el aumento medio de ADCC fue incluso mayor que el aumento de ADCC inducido por 12C4hulgGiLALA. Cuando se compara el aumento de ADCC por donante y por anticuerpo, los anticuerpos 1, 3-6, 8 y 9 muestran menos variación en el % de aumento de ADCC que 12C4hulgGiLALA.

[0118] La Figura 3 compara el % de ADCC por neutrófilos humanos en presencia de varias concentraciones de anticuerpos quiméricos 4 y 7 y anticuerpos humanizados 10 y 14 que tienen una región constante IgGi humana que comprende sustituciones de aminoácidos L234A y L235A (LALA) en combinación con trastuzumab en comparación con trastuzumab solo y trastuzumab en combinación con varias concentraciones de 12C4hulgGiLALA. Se utilizaron neutrófilos de dos donantes homocigotos para SIRPα_{BIT}. Incluso a bajas concentraciones, los anticuerpos 4, 7, 10 y 14 aumentan la ADCC. El aumento de ADCC depende de la concentración.

[0119] La Figura 4 compara el % ADCC por neutrófilos humanos en presencia de los anticuerpos 4, 7, 10, 13, 14, 15 y 16 en combinación con trastuzumab (Tmab) en comparación con el % ADCC trastuzumab solo y 12C4hulgGiLALA. Todos los anticuerpos aumentan la ADCC en comparación con el trastuzumab solo. El aumento de ADCC por los neutrófilos de la mayoría de los donantes en presencia de los anticuerpos 4, 7, 10, 13, 14, 15 y 16 en combinación con trastuzumab es

similar o mayor en comparación con 12C4hulgILALA en combinación con trastuzumab.

Listados de secuencias con las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas en las secuencias de aminoácidos de la región variable (VR) de la cadena pesada (HC) y de la cadena ligera (LC) (determinadas mediante el método de Kabat).

5

[0120]

SEQ ID N.º:1 (HC VR 1)

10

1 QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGIDLSS YAMSWVRQAP GKGLEWIGII51 SSGGITYYAS WAKGRFTISK TSTTVDLKIP SPTTEDTATY FCARSLWAAS

15

101 NYMALWGPG TLVTVSS

SEQ ID N.º:2 (LC VR 1)

20

1 AIKMTQTPAS VSAAVGGTVS INCQASEDIE SYLAWYQQKP GQPPKLLIYR51 ASTLASGVSS RFKSGSGTQ FTLTISDLES ADAATYYCLG DYYSSSGDTG

25

101 AFGGGTEVVV K

SEQ ID N.º:3 (HC VR 2)

30

1 QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFSLSN YAMHWVRQAP GKGLEWIGII51 YTGGATSYAT WAKGQFTISK TSTTVDLKIT SPTTEDTATY FCARGDRDGY

35

101 AYFNIWGPGT LVTVSL

SEQ ID N.º:4 (LC VR 2)

40

1 QIVMTQTPFS VSAVVGTVT IKCQASHNIG SWLAWYQQKP GQRPKLLIYD51 ASTLASGVSS RFKSGSGTE FTLTISGVES ADAATYYCQQ GYGISYVHNV

45

101 FGGGTEVVVK

SEQ ID N.º:5 (HC VR3)

50

1 QSVEESGGRL VTPGTPLTLA CTVSGFSLIS YYISWVRQAP EKGLEYIGII51 NIGGGASYAS WAKGRFTISK TSTTVDLKIT SPTPEDTATY FCAMSYGMDT

55

101 GAFNIWGPGT LVTVSL

SEQ ID N.º:6 (LC VR 3)

60

1 AQVLTQTPAS VSAAVGGTVT ISCQSSESVY KNNFLSWYQQ KPGKPPKLLI51 YGASTLASGV PSRFKSGSG TQFTLTISDL ESDDAATYFC QGGYRTDIYP

65

101 FGGGTEVVVK

SEQ ID N.º:7 (HC VR 4)

ES 2 981 193 T3

1 QSVEESGGRL GTPGTPLTLT CTVSGFSLSS YVMGWFRQAP GKGLEYIGII

5 51 SSSGSPYYAS WVNGRFTISK TSTTMDLKMN SPTTEDTATY FCARVGPLGV

101 DYFNIWGPGT LVTVSL

10 SEQ ID N.º:8 (LC VR 4)

1 DIVMTQTPSS VEAAGGTVT IKCQAGQSIN SYLAWYQQKP GQRPKLLIYY

15 51 ASTLESGVPS RFKSGSGTD YTLTISDLES ADAATYYCQS WHYISRSYAF

101 GGGTEVVVK

20 SEQ ID N.º:9 (HC VR 5)

1 QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFSLSS YVMGWFRQAA GKGLEYIGYI

25 51 NADGSPYYAT WVNGRFTISK TPTTMDLKIN SPTTEDTATY FCARVGPLGV

101 DYFNIWGPGT LVTVSL

30 SEQ ID N.º:10 (LC VR 5)

1 DIVMTQTPAS VEAAGGTVT IKCQASQSIN RYLTWYQQKP GQRPKLLIYY

35 51 ASTLESGVPS RFEGSGSGTD YTLTISDLES ADAATYYCQS YYYISRTYAF

101 GGGTEV VVK

40 SEQ ID N.º:11 (HC VR 6)

1 QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGIDLSS YTMTWVRQAP GKGLEWIGII

45 51 YAGGSTAYAS WAKGRFTISK TSTTVDLKIT SPTTEDTATY FCARSSSDGY

101 DYFNIWGPGT LVTVS L

50 SEQ ID N.º:12 (LC VR 6)

1 GVVMTQTPSS VSAAGGTVT INCQASQSIG SWLAWYQQKP GQPPKLLIYQ

55 51 ASKLASGVPS RFSGRGSGTH FTLTISDVQS DDAATYYCQO TVTAASNVDNA

101 FGGGTEVVVK

ES 2 981 193 T3

SEQ ID N.º:13 (HC VR 7)

1 RSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFSLSS HGISWVRQAP GKGLE^YIG^TI
5 51 GTGVITYFAS WAKGRFTGSK TSTTVDLKIT SPTTEDTATY FCARGSAWND
10 101 PFDPWGPGTL VTVSS

SEQ ID N.º:14 (LC VR 7)

1 ALVMTQTPAS VSAAVGGTVT TKCQASQSVY GNNDLAWYQH KPGQPPKLLI
15 51 YLASTLATGV PSRFSGSGSG TQFTLTITGV QSDDAATYYC LGGGDDEADN
20 101 VFGGGTEVVV K

SEQ ID N.º:15 (HC VR 8)

1 QSLEESGGRL VTPGTPLTLT CTASGVDLSN YAMGWVRQAP GKGLEWIG^II
25 51 YAGGSTSYAT WAKGRFTISK TSTTMDLKMT SPTTEDTATY FCARHRSDGY
30 101 DYFHLWGPGT LVTVSL

SEQ ID N.º:16 (LC VR 8)

1 AIDMTQTPAS VSEPVGGTVT IKCQASQSIS SWLAWYQQKP GQRPKLLIYD
35 51 ASKLASGVPS RFSGSGSGTE FTLTISGVQS DDAAAYYCQQ GYAVSYVENI
40 101 FGGGTEVVVK

SEQ ID N.º:17 (HC VR 9)

1 QSMEESSGGRL VTPGTPLTLT CTASGFSLSN YGVSWVRQAP GKGLEWIG^II
45 51 YGGSDITAYA SWAKGRFTIS KTSTTVDLTI TSPTTEDTAT YFCAKS^YTNG
50 101 MDYYNIWGPG TLVTVSL

SEQ ID N.º:18 (LC VR 9)

1 AFDLTQTPSS VEAPVGGTVI IKCQASQSIS SYLAWYQQKP GQPPKLLIYS
55 51 ASTLASGVSS RFKSGSGSETQ FPLTISDLES ADAATYYCQS YYGSRSNVFG
101 GGTEVVVK

ES 2 981 193 T3

SEQ ID N.º:19 (HC VR 29AM4-5)

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIS YYFIHWVRQA PGKGLEWVAS
 51 VYSSEFGYTY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCAREFT
 101 FPGLFDGFFG AYLGSLDYWG QGTLVTVSS

SEQ ID N.º:20 (LC VR 29AM4-5)

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSVS SAVAWYQQKP GKAPKLLIYS
 51 ASSLYSGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ AVNWVGALVT
 101 FGQGTKVEIK

SEQ ID N.º:21 (HC VR 12C4)

1 EVKLEESGGG LMQPGGSMKL SCVASGFTFS NYWMNWVRQS PEKGLEWVAE
 51 IRLKSNNYAT HYAESVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNNLRA EDTGIYYCIR
 101 DYDYDAYFDY WGQGTTLTVS S

SEQ ID N.º:22 (LC VR 12C4)

1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYNYMYWY QQKPGQPPKL
 51 LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSGELPY
 101 TFGGGTKLEI K

SEQ ID N.º:23 (HC VR KWAR23)

1 EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DYYIHWVQQR TEQGLEWIGR
 51 IDPEDGETKY APKFQDKATI TADTSSNTAY LHLSSLTSED TAVYYCCARWG
 101 AYWGQTLVT VSS

SEQ ID N.º:24 (LC VR KWAR23)

1 QIVLTQSPAI MSASPGEKVT LTCSASSSVS SSYLYWYQQK PGSSPKLWIY
 51 STSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSME AEDAASYFCH QWSSYPRTFG
 101 AGTKLELK

ES 2 981 193 T3

SEQ ID N.º:25 (anticuerpo IgGi humano HC región constante)

```

1   ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
5   51   HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP
    101  KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
10  151  HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
    201  EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
15  251  LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
    301  QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
20

```

SEQ ID N.º:26 (anticuerpo IgGi humano LC κ región constante)

```

1   RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
25  51   NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
    101  SFNRGEC
30

```

SEQ ID N.º:27 (anticuerpo IgGi humano HC región constante LALA mutante (mutaciones subrayadas))

```

1   ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
35  51   HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP
    101  KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
40  151  HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
    201  EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
45  251  LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
    301  QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
50

```

SEQ ID N.º:28 (secuencia líder HC 1-9, 15 + 16, LC 1-9 + 12)

1 MGWSCILFL VATATGVHS

SEQ ID N.º:29 (secuencia líder HAVT20)

1 MACPGFLWAL VISTCLEFSMA

ES 2 981 193 T3

SEQ ID N.º:30 (HC VR 10)

1 KVEESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFSLSSY VMGWVRQAPG KGLEWVSIIS
 51 SSGSPYYASW VNGRFTISKD NSEGMVYLQM NSLRAEDTAV YYCARVGPLG
 101 VDYFNIWGQG TTVTVSS

SEQ ID N.º:31 (LC VR 10)

1 DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCQAGQSIN SYLAWYQQKP GQPPKLLIYY
 51 ASTLESGVPD RFSGSGSGTD FTLTISSLQA EDVAVYYCQS WHYISRSYAF
 101 GGGTKLEIK

SEQ ID N.º:32 (HC VR 11)

1 EVKVEESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFSLS SYVMGWVRQA PGKGLEWVSI
 51 ISSSGSPYYA SWVNGRFTIS KTSTTMDLQM NSLRAEDTAV YYCARVGPLG
 101 VDYFNIWGQG TTVTVSS

SEQ ID N.º:33 (LC VR 11)

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQAGQSIN SYLAWYQQKP GKVPKLLIYY
 51 ASTLESGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCQS WHYISRSYAF
 101 GQGTKVEIK

SEQ ID N.º:34 (HC VR 12)

1 VQLVESGGRL VQPGTPLTSL CTVSGFSLSS YVMGWFRQAP GKGLEYIGII
 51 SSSGSPYYAS WVNGRFTISK TSTTMDLKMN SLRSEDATY FCARVGPLGV
 101 DYFNIWGPGT LVTVSS

SEQ ID N.º:35 (HC VR 13 + 14)

1 RQLVESGGGL VQPGGSLRLS CTASGFSLSS HGISWVRQAP GKGLEYIGTI
 51 GTGVITYFAS WAKGRFTGSK TSSTAYMELS SLRSEDNAVY FCARGSAWND
 101 PFDPWGQGTI VTVSS

ES 2 981 193 T3

SEQ ID N.º:36 (LC VR 13)

1 AIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQSVY GNNDLAWYQQ KPGKAPKLLI
51 YLASTLATGV PSRFSGSGSG TDFTLTISL QPEDFATYYC LGGGDDEADN
101 VFGGGTKVEI K

SEQ ID N.º:37 (LC VR 14 + 16)

1 DIEMTQSPSS VSASVGDRVT LTCQASQSVY GNNDLAWYQQ KPGQAPKLLI
51 YLASTLATGV PSRFSGSGSG TDFTLTISL QPEDFATYYC LGGGDDEADN
101 VFGGGTKVEI K

SEQ ID N.º:38 (LC VR 15)

1 ELVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQSVY GNNDLAWYQQ KPGEAPKLLI
51 YLASTLATGV PSRFSGSGSG TDFTLTISGL QSEDFATYYC LGGGDDEADN
101 VFGQGTKVEI K

SEQ ID N.º:39 (secuencia líder cadenas pesadas 10-14)

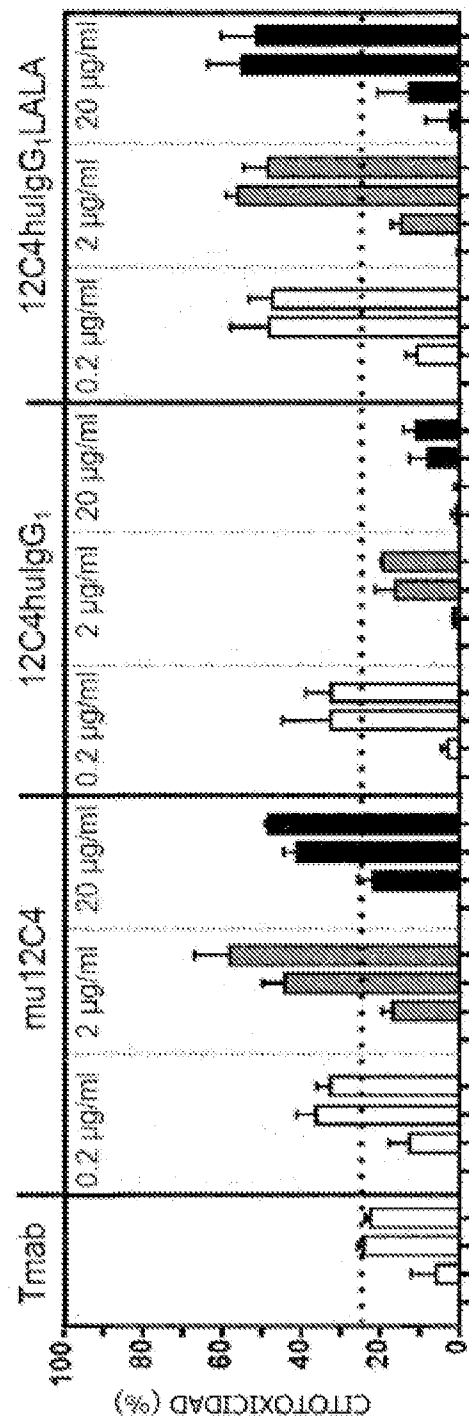
1 MGWTLVFLFL LSVTAGVHS

SEQ ID N.º:40 (secuencia líder cadenas ligeras 10, 11, 13-16)

1 MVSSAQFLGL LLLCFQGTRC

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-SIRPα o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende regiones variables (VR) de cadena pesada (HC) y ligera (LC) CDR1, CDR2 y CDR3 de regiones determinantes de complementariedad (CDR), en el que:
 - a. HC VR CDR1 consiste en la secuencia de aminoácidos HGIS,
 - b. HC VR CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos TIGTGVITYFASWAKG,
 - c. HC VR CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos GSAWNDPFDP,
 - d. LC VR CDR1 consiste en la secuencia de aminoácidos QASQSVYGNNDLA,
 - e. LC VR CDR2 consiste en la secuencia de aminoácidos LASTLAT, y
 - f. LC VR CDR3 consiste en la secuencia de aminoácidos LGGGDDEADNV,
- en la que las CDR se determinan según la numeración de Kabat.
2. El anticuerpo anti-SIRPα o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, que es quimérico, humanizado o humano.
3. El anticuerpo anti-SIRPα o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 2, que está humanizado.
4. El anticuerpo humanizado anti-SIRPα o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 3, que comprende
 - a. Secuencia de aminoácidos HC VR de SEQ ID N.º:35 y secuencia de aminoácidos LC VR de SEQ ID N.º:36;
 - b. Secuencia de aminoácidos HC VR de SEQ ID N.º:35 y secuencia de aminoácidos LC VR de SEQ ID N.º:37;
 - c. Secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º: 13 y la secuencia de aminoácidos LC VR de SEQ ID N.º:38;
 - o
 - d. Secuencia de aminoácidos HCVR de SEQ ID N.º: 13 y la secuencia de aminoácidos LC VR de SEQ ID N.º:37.
5. El anticuerpo anti-SIRPα según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una región Fc modificada que muestra una unión reducida a un receptor Fcα o Fcγ humano en comparación con el mismo anticuerpo anti-SIRPα que comprende una región Fc de tipo salvaje.
6. El anticuerpo anti-SIRPα según la reivindicación 5, que comprende una región Fc de IgG1 humana modificada que comprende sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328 y P329 según la numeración Eu.
7. El anticuerpo anti-SIRPα según la reivindicación 6, que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A; L234E y L235A; L234A, L235A y P329A; o L234A, L235A y P329G.
8. El anticuerpo anti-SIRPα según la reivindicación 7, que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A; o L234E y L235A.
9. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-SIRPα según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
10. El anticuerpo anti-SIRPα según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica según la reivindicación 9 para su uso como medicamento.
11. El anticuerpo anti-SIRPα según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica según la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos o neoplasias hematológicas.
12. Una combinación del anticuerpo anti-SIRPα según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición farmacéutica según la reivindicación 9 con una o más de otras terapias anticancerígenas para su uso en el tratamiento de tumores sólidos humanos o neoplasias hematológicas.
13. La combinación para uso según la reivindicación 12, en la que el otro u otros agentes terapéuticos anticancerosos son agentes terapéuticos dirigidos o inmunoterapéuticos.
14. La combinación para uso según la reivindicación 13, en la que el terapéutico dirigido es un anticuerpo terapéutico o un conjugado anticuerpo-fármaco.
15. La combinación para uso según la reivindicación 14, en la que el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo terapéutico contra una diana unida a membrana en la superficie de células tumorales que comprende una región Fc humana que se une a receptores Fc activadores presentes en células efectoras inmunitarias humanas.



INCREMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TRASTUZUMAB DE IZQUIERDA A DERECHA (0, 0.05, 0.5 Y 5 µg/ml)

FIG. 1

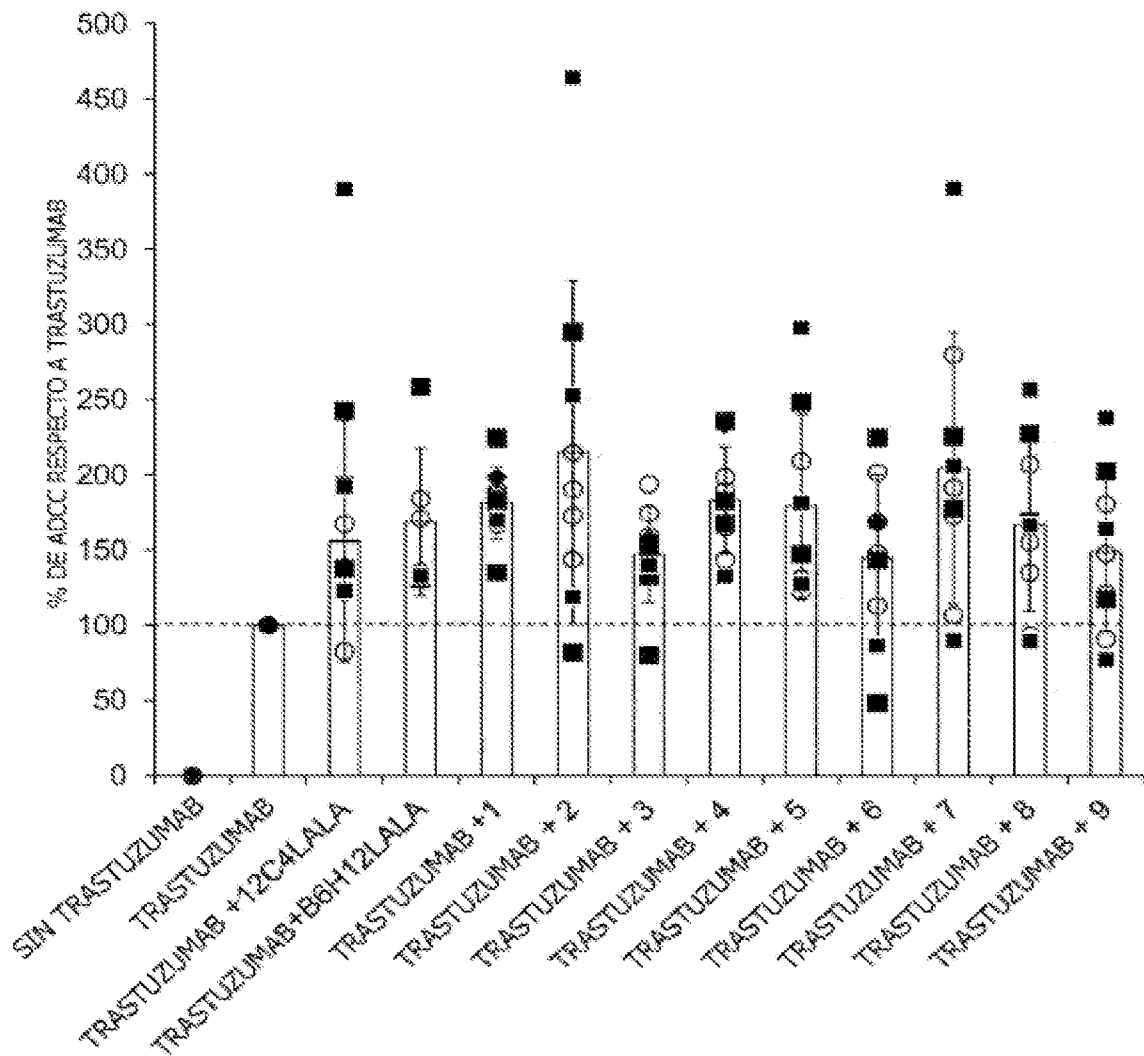


FIG. 2

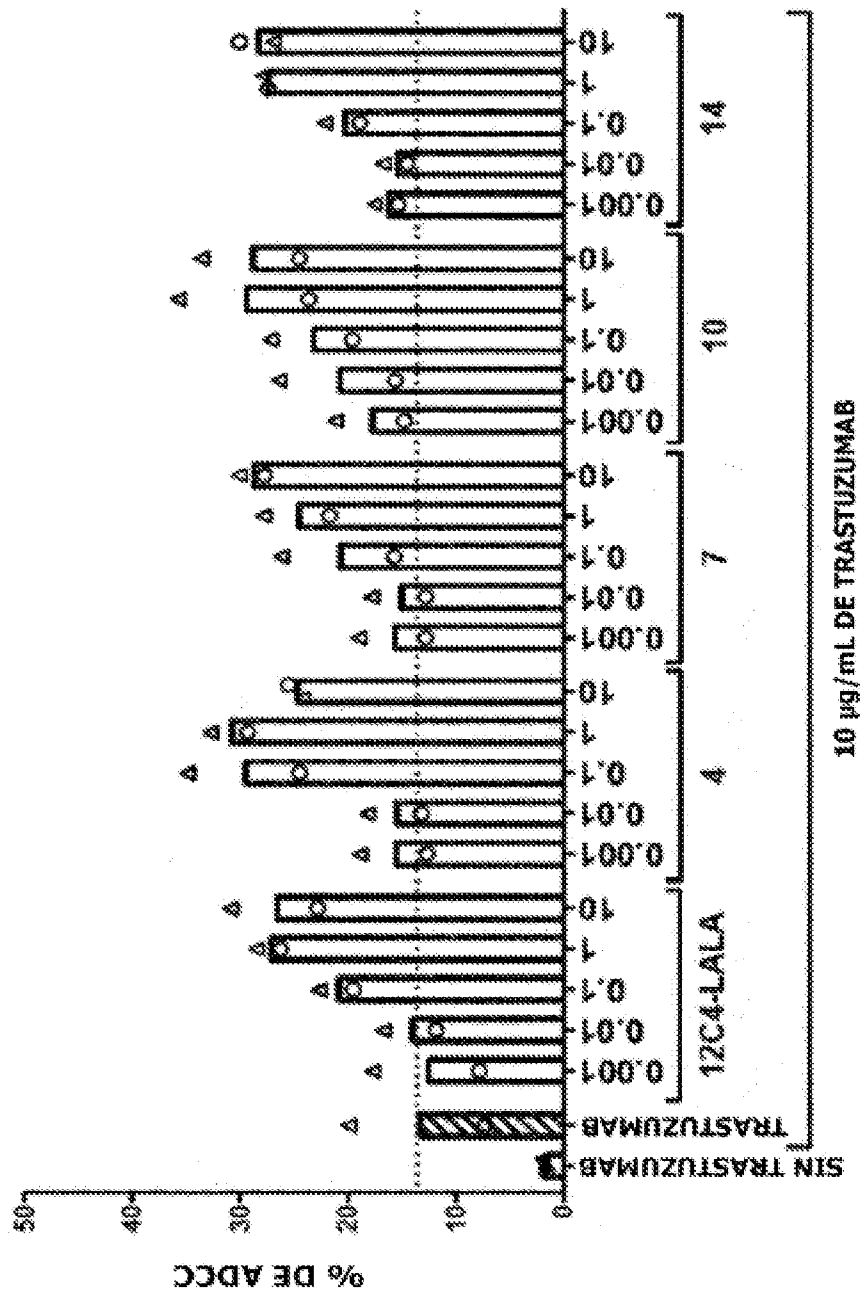


FIG. 3

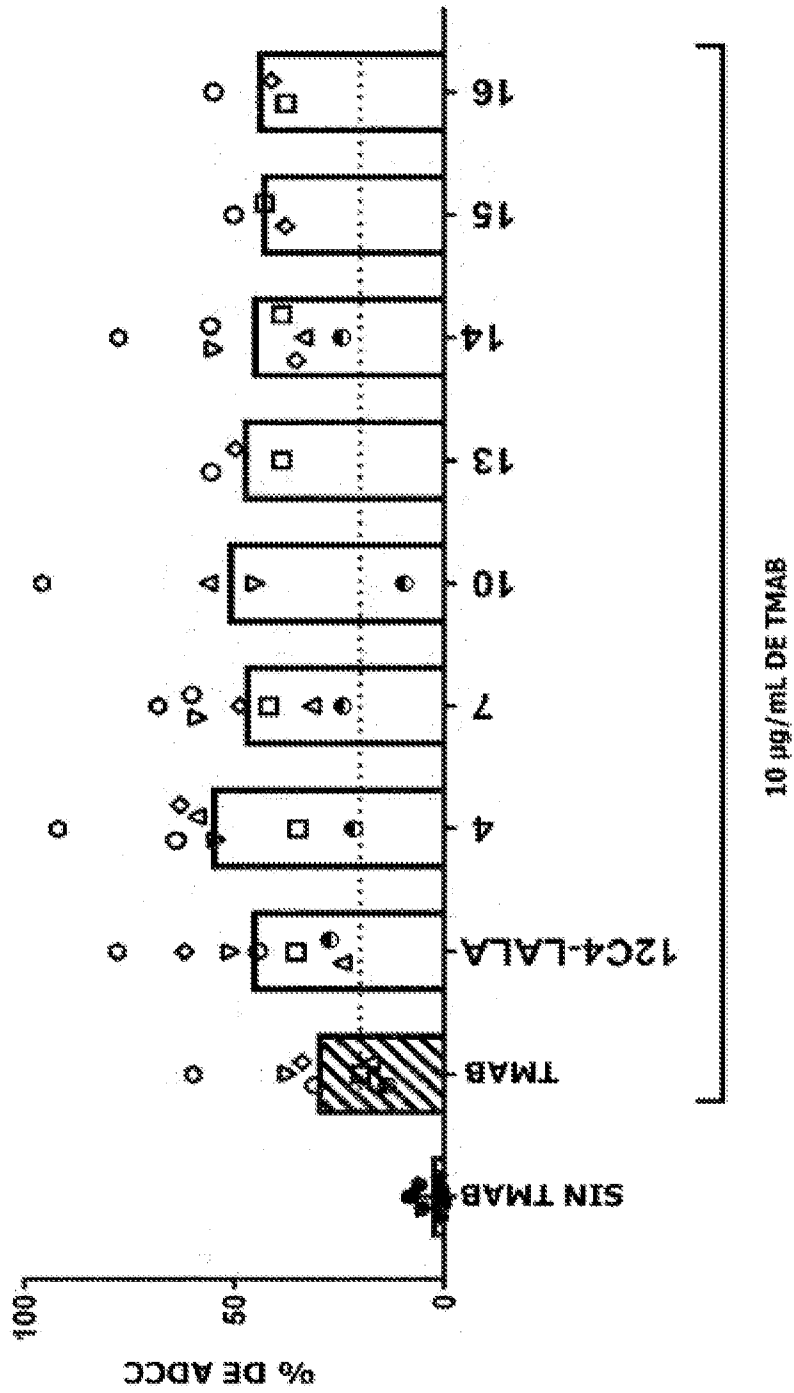


FIG. 4