

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 881 771**

⑮ Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2016 PCT/US2016/045914**

⑰ Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2017 WO17027422**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2016 E 16835723 (4)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.04.2021 EP 3331902**

⑭ Título: **Constructos que tienen un dominio de SIRP- $\alpha$  o variante del mismo**

⑩ Prioridad:

**07.08.2015 US 201562202772 P**  
**07.08.2015 US 201562202775 P**  
**07.08.2015 US 201562202779 P**  
**10.12.2015 US 201562265887 P**  
**08.01.2016 US 201662276801 P**  
**08.01.2016 US 201662276796 P**  
**06.06.2016 US 201662346414 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.11.2021**

⑬ Titular/es:

**ALX ONCOLOGY INC. (100.0%)**  
866 Malcolm Road, Suite 100  
Burlingame, CA 94010, US

⑭ Inventor/es:

**PONS, JAUME;**  
**DEMING, LAURA;**  
**GOODMAN, COREY;**  
**SIM, BANG JANET;**  
**KAUDER, STEVEN ELLIOT;**  
**WAN, HONG y**  
**KUO, TRACY CHIA-CHIEN**

⑭ Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 881 771 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

Constructos que tienen un dominio de SIRP- $\alpha$  o variante del mismo

## Antecedentes de la invención

El documento WO 2013/109752 describe reactivos SIRP- $\alpha$  de alta afinidad. El documento WO 2010/070047 describe polipéptidos de CD47 unión a solubles para uso en el tratamiento de trastornos autoinmunes e inflamatorios.

## Sumario de la invención

La presente invención proporciona un polipéptido, que comprende una variante de D1 de la proteína reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) y una variante de Fc, en donde el polipéptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NOS: 98-104, 107-113, 116-122 y 135-136. También se proporcionan (i) un dímero que consiste

10 en dos copias de dicho polipéptido, (ii) un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido, (iii) un vector que comprende dicho ácido nucleico y (iv) una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico o dicho vector. La presente invención proporciona además un método para producir el polipéptido de la invención que comprende cultivar la célula huésped de la invención bajo condiciones apropiadas para provocar la expresión del polipéptido y recuperar el polipéptido. También se proporciona (i) una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la invención, 15 o el dímero de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (ii) dicha composición farmacéutica para uso en un método para tratar el cáncer.

En el presente documento se describen polipéptidos que comprenden: una variante de D1 de la proteína reguladora de señal  $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92. En algunos aspectos, el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NO: 1-10. En algunos aspectos, el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  comprende entre una y nueve mutaciones de aminoácidos adicionales con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste

20 en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92. En algunos aspectos, la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  tiene al menos tres sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene una secuencia según SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  tiene al menos cuatro sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene una secuencia según SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  tiene al 25 menos cinco sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene una secuencia según SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  tiene al menos seis sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene una secuencia según SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  tiene al menos siete sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene una secuencia según SEQ ID NO: 1. En algunos aspectos, la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  tiene una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NOS: 81-85. En algunos aspectos, el polipéptido se une al humano CD47 con una  $K_D$  menor de aproximadamente  $5 \times 10^{-9}$  M. En algunos aspectos, el polipéptido comprende además un dominio Fc monómero unido al extremo N-terminal o al extremo C-terminal del polipéptido, en donde el monómero del dominio Fc es una región Fc de IgG1, IgG2 o IgG4 humana. En algunos aspectos, el monómero del dominio Fc comprende al menos una mutación con respecto a una región Fc de 30 IgG1, IgG2 o IgG4 humana de tipo salvaje. En algunos aspectos, el polipéptido presenta una reducción de la fagocitosis en un ensayo de fagocitosis en comparación con un polipéptido con una región Fc de IgG humana de tipo salvaje. En algunos aspectos, el monómero del dominio Fc se une a un segundo polipéptido que comprende un segundo monómero del dominio Fc para formar un dímero del dominio Fc. En algunos aspectos, el segundo monómero del dominio Fc se une a un polipéptido adicional. En algunos aspectos, el polipéptido adicional comprende un dominio

35 variable de anticuerpo. En algunos aspectos, el dominio variable de anticuerpo se dirige a un antígeno expresado en una célula. En algunos aspectos, la célula es una célula cancerosa. En algunos aspectos, el dominio variable de anticuerpo se dirige a una proteína de la superficie celular involucrada en la regulación de las células inmunes. En algunos aspectos, el polipéptido adicional comprende una proteína terapéutica. En algunos aspectos, la proteína terapéutica es una citocina, una interleucina, un antígeno, un esteroide, un agente antiinflamatorio o un agente 40 inmunomodulador. En algunos aspectos, el polipéptido adicional comprende una variante de D1 de SIRP- $\alpha$ . En algunos aspectos, el polipéptido comprende además una albúmina de suero humano (HSA) (SEQ ID NO: 12). En algunos aspectos, la HSA comprende una sustitución de aminoácidos de C34S o K573P respecto a SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, el polipéptido comprende además un péptido de unión a albúmina. En algunos aspectos, el péptido de unión a albúmina comprende la secuencia de aminoácidos D1CLPRWGCLW (SEQ ID NO: 160). En algunos aspectos, el polipéptido comprende además un polímero de polietilenglicol (PEG). En algunos aspectos, el polímero 45 de PEG se une a una sustitución de cisteína en el polipéptido.

En algunos aspectos, uno de los monómeros del dominio Fc en el dímero del dominio Fc comprende una región Fc de IgG1 humana que comprende mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A. En algunos aspectos, la variante de Fc de IgG1 o IgG2 presenta una unión ablacionada o reducida a un receptor Fc $\gamma$  en comparación con una versión de tipo salvaje de una región Fc de IgG humana. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una unión ablacionada o

50

55

60

reducida a CD16a, CD32a, CD32b, CD32c y CD64 receptores Fc en comparación con una versión de tipo salvaje de una región Fc de IgG1 o IgG2 humana. En algunos aspectos, la variante de Fc de IgG4 presenta una unión ablacionada o reducida a receptores Fc CD16a y CD32b en comparación con una versión de tipo salvaje de una región Fc de IgG4 humana. En algunos aspectos, la variante de Fc de IgG1 o IgG2 presenta unión ablacionada o reducida a C1q en comparación con una versión de tipo salvaje de una fusión de Fc de IgG1 o IgG2 humana. En algunos aspectos, la variante de Fc se une a un receptor Fc con una  $K_D$  mayor que aproximadamente  $5 \times 10^{-6}$ M.

En el presente documento se describen polipéptidos que comprenden una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A. En algunos aspectos, al menos uno de los monómeros del dominio Fc es una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A. En algunos aspectos, al menos uno de los monómeros del dominio Fc es una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una unión ablacionada o reducida a un receptor Fc en comparación con una versión de tipo salvaje de una región Fc de IgG humana. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una unión ablacionada o reducida a receptores Fc de CD16a, CD32a, CD32b, CD32c y CD64 en comparación con una versión de tipo salvaje de una región Fc de IgG humana. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una unión ablacionada o reducida a C1q en comparación con una versión de tipo salvaje de una fusión de Fc de IgG humana. En algunos aspectos, al menos uno de los monómeros del dominio Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una unión ablacionada o reducida a un receptor Fc en comparación con una versión de tipo salvaje de una región Fc de IgG4 humana. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una unión a CD16 y CD32b ablacionada o reducida a un receptor Fc en comparación con una versión de tipo salvaje de una región Fc de IgG4 humana. En algunos aspectos, la variante de Fc se une a un receptor Fc con una  $K_D$  mayor que aproximadamente  $5 \times 10^{-6}$ M. En algunos aspectos, el polipéptido comprende además un polipéptido de unión CD47. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una unión ablacionada o reducida a un receptor Fc en comparación con una versión de tipo salvaje de una región Fc de IgG humana. En algunos aspectos, el CD47 polipéptido de unión no causa anemia aguda en roedores y primates no humanos. En algunos aspectos, el CD47 polipéptido de unión no causa anemia aguda en humanos. En algunos aspectos, el CD47 polipéptido de unión es un polipéptido de proteína reguladora de señal  $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) o un fragmento del mismo.

En el presente documento, en ciertos aspectos, se describen polipéptidos que comprenden: una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ), en donde la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  es un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad no natural, en donde la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  se une al CD47 humano con una afinidad que es al menos 10 veces mayor que la afinidad de un dominio D1 de origen natural; y un monómero del dominio Fc, en donde el monómero del dominio Fc está unido a un segundo polipéptido que comprende un segundo monómero del dominio Fc para formar un dominio Fc, en donde el dominio Fc tiene una función efectora ablacionada o reducida. En algunos aspectos, el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad no natural comprende una mutación de aminoácido en el residuo 80.

En el presente documento se describen polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ), en donde la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  se une a CD47 de una primera especie con una  $K_D$  menor que 250 nM; y en donde la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  se une a CD47 de una segunda especie con una  $K_D$  menor que 250 nM; y la  $K_D$  para CD47 de la primera especie y la  $K_D$  para CD47 de la segunda especie están dentro de 100 veces entre sí; en donde la primera especie y la segunda especie se seleccionan del grupo que consiste en: primate humano, roedor y no humano. En algunos aspectos, la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  se une a CD47 de al menos 3 especies diferentes. En algunos aspectos, el primate no humano es el mono cynomolgus.

En el presente documento se describen polipéptidos que comprenden: (a) un dominio D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señales (SIRP- $\alpha$ ) que se une a CD47 humano con una  $K_D$  menor que 250 nM; y (b) un monómero de dominio Fc unido al extremo N-terminal o al extremo C-terminal del dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , en donde el polipéptido no causa anemia aguda en roedores y primates no humanos. En algunos aspectos, el polipéptido es una variante no natural de un SIRP- $\alpha$  humano. En algunos aspectos, la administración del polipéptido *in vivo* da como resultado una reducción de la hemoglobina en menos de 50% durante la primera semana después de la administración. En algunos aspectos, la administración del polipéptido en humanos da como resultado una reducción de la hemoglobina en menos de 50% durante la primera semana después de la administración. En algunos aspectos, el polipéptido comprende además al menos una variante de Fc, en donde la variante de Fc se selecciona de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A. En algunos aspectos, la variante de Fc es una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A. En algunos aspectos, la variante de Fc es una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A. En algunos aspectos, la variante de Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A.

En el presente documento se describen métodos para tratar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno, comprendiendo el método administrar al sujeto un polipéptido descrito en el presente documento. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66, y residuo 92. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana consistente en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ), en donde la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  es un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad no natural, en donde la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  se une al CD47 humano con una afinidad que es al menos 10 veces mayor que la afinidad de un dominio D1 de origen natural; y un monómero del dominio Fc, en donde el monómero del dominio Fc está unido a un segundo polipéptido que comprende un segundo monómero del dominio Fc para formar un dominio Fc, en donde el dominio Fc tiene una función efectora ablacionada o reducida. En algunos aspectos, el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad no natural comprende una mutación de aminoácido en el residuo 80. En algunos aspectos, el polipéptido comprende una variante D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ), en donde la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  se une a CD47 de una primera especie con una  $K_D$  menor que 250 nM; y en donde la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  se une a CD47 de una segunda especie con una  $K_D$  menor que 250 nM; y la  $K_D$  para CD47 de la primera especie y la  $K_D$  para CD47 de la segunda especie están dentro de 100 veces entre sí; en donde la primera especie y la segunda especie se seleccionan del grupo que consiste en: primate humano, roedor y primate no humano. En algunos aspectos, el polipéptido comprende: (a) un dominio D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señales (SIRP- $\alpha$ ) que se une a CD47 humano con una  $K_D$  menor que 250 nM; y (b) un monómero de dominio Fc unido al extremo N-terminal o al extremo C-terminal del dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , en donde el polipéptido no causa anemia aguda en roedores y primates no humanos. En algunos aspectos, la enfermedad o trastorno es un cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria. En algunos aspectos, la enfermedad o trastorno es un cáncer, y el cáncer se selecciona entre cáncer de tumor sólido, cáncer hematológico, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, mieloma, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de pulmón, cáncer de bronquios, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y recto, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de vesícula biliar, cáncer de tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cáncer de cuello, cáncer de orofaringe, cáncer de esófago, melanoma, cáncer de piel no melanoma, carcinoma de células de Merkel, cáncer inducido por virus, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal, leucemia, linfoma, sarcoma, glioma, tumor cerebral y carcinoma. En algunos aspectos, la enfermedad o trastorno es una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria, y la enfermedad autoinmune o la enfermedad inflamatoria se selecciona entre escleroses múltiple, artritis reumatoide, una espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, una enfermedad inflamatoria o autoinmune mediada por anticuerpos, enfermedad de injerto contra huésped, sepsis, diabetes, psoriasis, aterosclerosis, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica progresiva, esclerodermia, síndrome coronario agudo, reperfusión isquémica, enfermedad de Crohn, endometriosis, glomerulonefritis, miastenia gravis, fibrosis pulmonar idiopática, asma, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), vasculitis y miositis inflamatoria autoinmune. En algunos aspectos, el método comprende además administrar al menos un agente adicional. En algunos aspectos, el al menos un agente adicional es un anticuerpo, un antígeno asociado a un tumor o un agente terapéutico que no es un anticuerpo. En algunos aspectos, se administran al menos dos agentes adicionales. En algunos aspectos, los al menos dos agentes adicionales comprenden dos anticuerpos. En algunos aspectos, los al menos dos agentes adicionales comprenden un anticuerpo y un antígeno asociado al tumor. En algunos aspectos, el al menos un agente adicional es un anticuerpo. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo de isótipo IgG1 humano. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo de isótipo IgG2 humano. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo de isótipo IgG4 humano. En algunos aspectos, el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CS1, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-PD1, anticuerpo anti-OX40, anticuerpo anti-PD-1, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-CD274, anticuerpo anti-CTLA-4, anticuerpo anti-CD137, anticuerpo anti-4-1BB, anticuerpo anti-B7-H3, anticuerpo anti-FZD7, anticuerpo anti-CD27, anticuerpo anti-CCR4, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-CSF1R, anticuerpo anti-CSF, anticuerpo anti-CD30, anticuerpo anti-BAFF, anticuerpo anti-VEGF o anticuerpo anti-VEGFR2. En algunos aspectos, el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CS1, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-PD-1, anticuerpo anti-RANKL o anticuerpo anti-PD-L1. En algunos aspectos, el al menos un agente adicional es al menos un anticuerpo y el anticuerpo se selecciona de cetuximab, necitumumab, pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, MEDI0680, MED16469, atezolizumab, avelumab, durvalumab, MEDI6383, RG7888, ipilimumab, tremelimumab, urelumab, PF-05082566, enoblituzumab, vancictumab, varlilumab, mogamalizumab, SAR650984, daratumumab, trastuzumab, trastuzumab emtansina, pertuzumab, elotuzumab, rituximab, ofatumumab, obinutuzumab, RG7155, FPA008, panitumumab, brentuximab vedotin, MSB0010718C, belimumab, bevacizumab, denosumab, panitumumab, ramucirumab, necitumumab, nivolumab, pembrolizumab, avelumab, atezolizumab, durvalumab, MEDI0680, pidilizumab o BMS-93659. En algunos aspectos, el anticuerpo es trastuzumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es rituximab. En algunos aspectos, el anticuerpo es

5 cetuximab. En algunos aspectos, el anticuerpo es daratumumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es belimumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es bevacizumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es denosumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es pantumumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es ramucirumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es necitumumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es nivolumab. En algunas modalidades, el anticuerpo es pembrolizumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es avelumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es atezolizumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es durvalumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es MEDI0680. En algunas modalidades, el anticuerpo es pidilizumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es BMS-93659. En algunos aspectos, el al menos un agente adicional es un antígeno asociado al tumor y el antígeno asociado al tumor provoca una respuesta inmune. En algunos aspectos, el al menos un agente adicional es un anticuerpo y el anticuerpo se dirige a un complejo HLA/péptido o MHC/péptido. En algunos aspectos, el anticuerpo se dirige a un complejo HLA/péptido o MHC/péptido que comprende NY-ESO-1/LAGE1, SSX-2, familia MAGE (MAGE-A3), gp100/ pMel17, Melan-A/MART-1, gp75/TRP1, tirosinasa, TRP2, CEA, PSA, TAG-72, Receptor de laminina inmaduro, MOK/RAGE-1, WT-1, Her2/neu, EphA3, SAP-1, BING-4, Ep-CAM, MUC1, PRAME, survivina, mesotelina, BRCA1/2 (mutado), CDK4, CML66, MART-2, p53(mutado), Ras (mutado),  $\beta$ -catenina (mutado), TGF- $\beta$ RII (mutado), HPV E6 o E7. En algunos aspectos, el anticuerpo es ESK1, RL1B, Pr20 o 3,2G1.

#### Breve descripción de los dibujos

20 En las reivindicaciones adjuntas se establecen las características novedosas de la invención. Un mejor entendimiento de las características y ventajas de la presente invención se obtendrá por referencia a la siguiente descripción detallada que establece modalidades ilustrativas y en las que se usan los principios de la invención, y conforme a las figuras adjuntas en las que:

25 **FIG. 1** es una ilustración de un constructo de SIRP- $\alpha$  que incluye un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo unido a un primer monómero de dominio Fc, que forma un dominio Fc con un segundo monómero de dominio Fc;

30 **FIG. 2** es una ilustración de un constructo de SIRP- $\alpha$  que incluye un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo unido a un primer monómero de dominio Fc y un dominio variable de anticuerpo unido a un segundo monómero de dominio Fc, en donde el primer monómero de dominio Fc y el segundo monómero Fc el monómero de dominio se combina para formar un dominio Fc;

35 **FIG. 3** es una ilustración de un constructo de SIRP- $\alpha$  que incluye un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo unido a un primer monómero de dominio Fc y un dominio variable de anticuerpo unido a un segundo monómero de dominio Fc, en donde el primer monómero de dominio Fc y el segundo monómero Fc el monómero de dominio se combina para formar un dominio Fc;

40 **FIG. 4A** es una ilustración de un constructo de SIRP- $\alpha$  que incluye un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo unido a un primer monómero de dominio Fc que tiene una mutación de botón, que forma un dominio Fc con un segundo monómero de dominio Fc que tiene un mutation de hueco.; **FIG. 4B** es una ilustración de un constructo de SIRP- $\alpha$  que incluye un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo unido a un primer monómero de dominio Fc que tiene una mutación de hueco, que forma un dominio Fc con un segundo monómero de dominio Fc que tiene una mutación knob;

45 **FIG. 5A** es una ilustración de un constructo de SIRP- $\alpha$  que incluye un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo unido a un dominio de monómero Fc; **FIG. 5B** es una ilustración de un constructo de SIRP- $\alpha$  que es un homodímero del constructo ilustrado en la FIG. 5A;

50 **FIG. 6** ejemplifica datos de unión de SPR para constructos de SIRP- $\alpha$  monofuncionales y bifuncionales que incluyen un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ ;

**FIG. 7** ejemplifica la fagocitosis de células tumorales DLD-1-GFP-Luciferasa por macrófagos humanos derivados de monocitos en presencia de concentraciones variables de constructos de polipéptido SIRP- $\alpha$ ;

55 **FIG. 8** ejemplifica la fagocitosis de células tumorales DLD-1-GFP-Luciferasa por macrófagos humanos derivados de monocitos en presencia de concentraciones variables de constructos de polipéptido SIRP- $\alpha$ ;

**FIG. 9** ejemplifica la fagocitosis de células tumorales DLD-1-GFP-Luciferasa por macrófagos humanos derivados de monocitos en presencia de concentraciones variables de constructos de polipéptido SIRP- $\alpha$ ;

60 **FIG. 10** ejemplifica la estabilidad de la vida media de los polipéptidos SIRP- $\alpha$  durante un período de tiempo definido;

**FIG. 11** ejemplifica los datos del ensayo de hemaglutinación para constructos de polipéptido SIRP- $\alpha$ ;

**FIG. 12** ejemplifica las curvas de supervivencia de modelos de tumores singénicos de ratones tratados con constructos de polipéptido SIRP- $\alpha$  y anti-mPD-L1;

**FIG. 13** ejemplifica un análisis de volumen tumoral de modelos de tumores singénicos de ratones tratados con constructos de polipéptido SIRP- $\alpha$  en combinación con anti-mPD-L1;

**FIG. 14** ejemplifica la unión de varias concentraciones complementarias C1q a fusiones SIRP- $\alpha$ -Fc;

**FIG. 15** ejemplifica la fagocitosis de células MM1R por macrófagos humanos derivados de monocitos en presencia de concentraciones variables de constructos de polipéptido SIRP- $\alpha$ ;

**FIG. 16** ejemplifica la fagocitosis de células MM1R por macrófagos humanos derivados de monocitos en presencia de concentraciones variables de constructos de polipéptido SIRP- $\alpha$ ;

**FIG. 17** ejemplifica la fagocitosis de células N87 por macrófagos humanos derivados de monocitos en presencia de concentraciones variables de constructos de polipéptido SIRP- $\alpha$ ;

**FIG. 18** ejemplifica el análisis del peso molecular de una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una mutación P83V;

**FIG. 19A** ejemplifica el crecimiento tumoral de células de linfoma humano GFP-Luc-Raji en un modelo de ratón de cáncer NOD scid gamma (NSG) tratado con varios constructos de SIRP- $\alpha$  con o sin rituximab; **FIG. 19B** ejemplifica un gráfico de dispersión del volumen tumoral de los tumores descritos en la FIG.19A; **FIG. 19C** ejemplifica los valores de hemoglobina de los ratones tratados descritos en la FIG.19A; y

**FIG. 20** ejemplifica los recuentos de glóbulos rojos tomados de ratones tratados con un constructo Fc de IgG1 de tipo salvaje SIRP- $\alpha$  o un constructo variante de Fc de IgG1 de SIRP- $\alpha$ .

#### Descripción detallada de la invención

##### Definiciones

Las expresiones "aproximadamente" o "aproximadamente" significan que el valor se encuentra comprendido en un intervalo de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la técnica, lo que dependerá parcialmente de cómo se mida o determine el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medida. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación estándar, según la práctica en la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta, 20% de hasta el, 10% de hasta, 5% o de hasta 1% de un valor dado. Como alternativa, en particular con respecto a los sistemas o procedimientos biológicos, los términos pueden significar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente comprendido en 5 veces y más preferiblemente, comprendido en 2 veces, de un valor. En donde se describen valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, el término "aproximadamente" significa que debe asumirse un intervalo de error aceptable para el valor particular.

La terminología usada en el presente documento es a efectos de describir ejemplos de casos particulares únicamente y no pretende ser limitante. Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, en la medida en que las expresiones "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con", o variantes de las mismas se usan en la descripción detallada y/o en las reivindicaciones, dichas expresiones pretenden ser inclusivas de una manera similar a la expresión "que comprende".

Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos intactos; fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (p. ej., unión de epítopos); anticuerpos monoclonales; anticuerpos policlonales; anticuerpos monoespecíficos; anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos); y proteínas de tipo anticuerpo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "dominio variable de anticuerpo" se refiere a las partes de la cadena ligera y pesada de las moléculas de anticuerpo que incluyen secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de la complementariedad (CDR; p. ej., CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2, y CDR H3) y regiones marco (FR).

Como se usa en el presente documento, el término "enlazador" se refiere a un enlace entre dos elementos, p. ej., dominios de proteínas. En algunos aspectos, un enlazador puede ser un enlace covalente o un espaciador. El término "espaciador" se refiere a un resto (p. ej., un polímero de polietilenglicol (PEG) o una secuencia de aminoácidos (p. ej., una secuencia de aminoácidos 1-200) que ocurre entre dos polipéptidos o dominios polipeptídicos para proporcionar espacio o flexibilidad (o ambos espacio y flexibilidad) entre los dos polipéptidos o dominios polipeptídicos. En algunos aspectos, un espaciador de aminoácidos es parte de la secuencia primaria de un polipéptido (p. ej., unido a los polipéptidos espaciados o dominios polipeptídicos a través de la estructura polipeptídica).

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un polipéptido o una composición farmacéutica que contiene un polipéptido descrito en el presente documento, p. ej., un polipéptido que tiene un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo, que es suficiente y eficaz para lograr un efecto terapéutico deseado en el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad, tal como un cáncer, p. ej., un

tumor sólido o un cáncer hematológico. En algunos aspectos, una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptido evitará efectos secundarios adversos.

Como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a una formulación medicinal o farmacéutica que incluye un principio activo, así como excipientes o diluyentes (o tanto excipientes como diluyentes)

5 y permite que el principio activo se administre mediante métodos de administración adecuados. En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas descritas en este documento incluyen componentes farmacéuticamente aceptables que son compatibles con el polipéptido. En algunos aspectos, la composición farmacéutica está en forma de tableta o cápsula para administración oral o en forma acuosa para administración intravenosa o subcutánea, por ejemplo mediante inyección.

10 Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto", "individuo", y "paciente", usados de manera intercambiable, se refieren a un vertebrado, por ejemplo, un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinos, simios, humanos, animales de granja, animales de deportes y mascotas.

15 También se abarcan tejidos, células y su progenie de una entidad biológica obtenida *in vivo* o cultivada *in vitro*. Ninguno de los términos implica la supervisión de un profesional médico. Como se usa en el presente documento, el término "afinidad" o "afinidad de unión" se refiere a la fuerza de la interacción de unión entre dos moléculas. Generalmente, la afinidad de unión se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre una molécula y su pareja de unión, como una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad y CD47. A menos que se indique lo contrario, la afinidad de unión se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión. La afinidad de unión entre dos moléculas se describe comúnmente mediante la constante de disociación ( $K_D$ ) o la constante de asociación ( $K_A$ ). Dos moléculas que tienen baja afinidad de unión entre sí generalmente se unen lentamente, tienden a disociarse fácilmente y presentan una  $K_D$  alta. Dos moléculas que tienen una alta afinidad entre sí generalmente se unen fácilmente, tienden a permanecer unidas por más tiempo y presentan una  $K_D$  baja. En algunos aspectos, la  $K_D$  de dos moléculas que interactúan se determina usando métodos y técnicas conocidos, p. ej., resonancia de plasmón de superficie (SPR).  $K_D$  se puede calcular como la relación de  $k_{off}/k_{on}$ .

20 25 Como se usa en el presente documento, el término " $K_D$  menor que" se refiere a un valor de  $K_D$  numéricamente más pequeño y una afinidad de unión creciente con respecto al valor de  $K_D$  mencionado. Como se usa en el presente documento, el término " $K_D$  mayor que" se refiere a un valor de  $K_D$  numéricamente mayor y una afinidad de unión decreciente con respecto al valor de  $K_D$  mencionado.

30 35 Como se usa en este documento, el término "anemia aguda" se refiere a una desminución de la masa de glóbulos rojos o hemoglobina 30% durante los primeros cinco días después de la administración de un compuesto o tratamiento.

#### I. Dominio D1 de la proteína $\alpha$ reguladora de señales (SIRP- $\alpha$ ) y sus variantes

40 En el presente documento se describen, polipéptidos de un espectro que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92.

45 50 En el presente documento también se describen polipéptidos que comprenden una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A.

55 60 La proteína  $\alpha$  reguladora de señales ("SIRP- $\alpha$ " o "SIRP-alfa") es una glicoproteína transmembrana que pertenece a la superfamilia Ig que se expresa ampliamente en la membrana de las células mieloides. SIRP- $\alpha$  interactúa con CD47, una proteína ampliamente expresada en muchos tipos de células del cuerpo. La interacción de SIRP- $\alpha$  con CD47 previene la absorción de las células "propias", que de otro modo pueden ser reconocidas por el sistema inmunológico. Se ha observado que una alta CD47 expresión en células tumorales puede actuar, en la leucemia mieloide aguda y varios cánceres tumorales sólidos, como un factor de pronóstico negativo para la supervivencia.

65 70 La SIRP- $\alpha$  nativa comprende 3 dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (Ig) altamente homólogos: D1, D2 y D3. El dominio D1 de SIRP- $\alpha$  ("dominio D1") se refiere al dominio extracelular distal de la membrana de SIRP- $\alpha$  y media la unión de SIRP- $\alpha$  a CD47. Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido SIRP- $\alpha$ " se refiere a cualquier polipéptido SIRP- $\alpha$  o fragmento del mismo que es capaz de unirse a CD47. Hay al menos diez variantes de SIRP- $\alpha$  humana de tipo salvaje. La Tabla 1 muestra las secuencias de aminoácidos de los dominios D1 de las diez variantes del dominio D1 de SIRP- $\alpha$  humano de tipo salvaje de origen natural (SEQ ID NOs: 1-10). En algunos aspectos, un polipéptido SIRP- $\alpha$  comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ . En algunos aspectos, un polipéptido SIRP- $\alpha$  comprende un dominio D1 de tipo salvaje, como los que se proporcionan en SEQ ID NOs: 1-10. En algunos aspectos,

un polipéptido SIRP- $\alpha$  incluye un dominio D2 o D3 (o ambos dominios D2 y D3) (Tabla 3) de un SIRP- $\alpha$  humano de tipo salvaje.

Tabla 1. Secuencias de tablas de dominios D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
1	Variante 1 del dominio D1 de tipo salvaje	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPI QWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRN NMDFSIIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFK SGAGTELSVRAKPS
2	Variante 2 del dominio D1 de tipo salvaje	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSЛИVGPIQ WFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKREN MDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSGA GTELSVRAKPS
3	Variante 3 del dominio D1 de tipo salvaje	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILLCTVTSЛИVGPIQ WFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKREN MDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSGA GTELSVRAKPS
4	Variante 4 del dominio D1 de tipo salvaje	EEGLQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTATSLIPVGPI QWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRN NMDFSIIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFK SGAGTELSVRAKPS
5	Variante 5 del dominio D1 de tipo salvaje	EEELQVIQPDKFVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPI QWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRN NMDFSIIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFK SGAGTELSVRAKPS
6	Variante 6 del dominio D1 de tipo salvaje	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPI QWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRN NMDFPIRIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFK SGAGTELSVRAKPS
7	Variante 7 del dominio D1 de tipo salvaje	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSЛИVGPIQ WFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKREN MDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSGA GTELSVRGKPS
8	Variante 8 del dominio D1 de tipo salvaje	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPI QWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKREN MDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSGA GTELSVRAKPS
9	Variante 9 del dominio D1 de tipo salvaje	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPI QWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRN NMDFSIIRISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKS GAGTELSVRAKPS

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
10	Variante 10 del dominio D1 de tipo salvaje	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQ WFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKREN MDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSGA GTELSVRAKPS
11	Dominio pan-D 1 de tipo salvaje	EEX <sub>1</sub> LQVIQPDKX <sub>2</sub> VX <sub>3</sub> VAAGEX <sub>4</sub> AX <sub>5</sub> LX <sub>6</sub> CTX <sub>7</sub> TSLI PVGPIQWFRGAGPX <sub>8</sub> RELIYNQKEGHFPRVTTVSX <sub>9</sub> X <sub>10</sub> TKRX <sub>11</sub> NMDFX <sub>12</sub> IX <sub>13</sub> IX <sub>14</sub> NITPADAGTYYCVKFR KGSX <sub>15</sub> X <sub>16</sub> DX <sub>17</sub> EFKSGAGTELSVRX <sub>18</sub> KPS
	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 11	X <sub>1</sub> es E o G; X <sub>2</sub> es S o F; X <sub>3</sub> es L o S; X <sub>4</sub> es T o S; X <sub>5</sub> es T o I; X <sub>6</sub> es R, H o L; X <sub>7</sub> es A o V; X <sub>8</sub> es G o A; X <sub>9</sub> es D o E; X <sub>10</sub> es L o S; X <sub>11</sub> es N o E o D; X <sub>12</sub> es S o P; X <sub>13</sub> es R o S; X <sub>14</sub> es G o S; X <sub>15</sub> es P o está ausente; X <sub>16</sub> es D o P; X <sub>17</sub> es V o T; y X <sub>18</sub> es A o G

Como se usa en el presente documento, los términos "variante de D1 de SIRP- $\alpha$  alta afinidad", "variante de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad" o "variante de D1 de SIRP- $\alpha$ " se refieren a un polipéptido que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una parte de unión de un polipéptido SIRP- $\alpha$  a CD47 que tiene una mayor afinidad por CD47 que SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje. Una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad comprende al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácidos (o una combinación de las mismas) con respecto a un SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje.

En algunos aspectos, las variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad descritas en el presente documento comprenden un dominio de D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad comprende una o más sustituciones, inserciones, adiciones o delecciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de tipo salvaje que se muestra en la SEQ ID NOs: 1-10. La Tabla 2 enumera sustituciones de aminoácidos ejemplares en cada variante de dominio D1 de SIRP- $\alpha$  (SEQ ID NOs: 13-22). En algunos aspectos, el polipéptido del dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad comprende un fragmento del dominio D1. En algunos aspectos, el fragmento de polipéptido SIRP- $\alpha$  o el fragmento variante de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad comprende una secuencia de aminoácidos de menos de 10 aminoácidos de longitud, aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, o más de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud. En algunos aspectos, los fragmentos del dominio D1 de SIRP- $\alpha$  conservan la capacidad de unirse a CD47.

En algunos aspectos, un polipéptido de la descripción que comprende una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se une a CD47 con mayor afinidad de unión que un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  humano de tipo salvaje. En algunos aspectos, la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se une al ser humano CD47 con al menos 1 vez (p. ej., Al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 5 veces o más de 5 veces) afinidad que la afinidad de un dominio D1 de origen natural. En algunos aspectos, la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se une a CD47 humano con al menos 1 vez (p. ej., al menos 10 veces, 100 veces, 1000 veces o más de 1000 veces) afinidad que la afinidad de un dominio D1 de origen natural. Como se usa en el presente documento, el término "afinidad optimizada" o "afinidad de unión optimizada" se refiere a una fuerza optimizada de la interacción de unión entre un polipéptido descrito en el presente documento, que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad, y CD47.

Por ejemplo, en algunos aspectos, el polipéptido se une principalmente o con mayor afinidad a CD47 las células cancerosas y no se une sustancialmente ni se une con menor afinidad a CD47 las células no cancerosas. En algunos aspectos, la afinidad de unión entre el polipéptido y CD47 se optimiza tal que la interacción no causa toxicidad clínicamente relevante o disminuye la toxicidad en comparación con una variante que se une con máxima afinidad. En algunos aspectos, para lograr una afinidad de unión optimizada entre un polipéptido proporcionado en el presente documento y CD47, el polipéptido que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se desarrolla para que tenga una afinidad de unión más baja CD47 de la que se puede alcanzar al máximo. En algunos aspectos, las variantes de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad descritas en el presente documento reaccionan de forma cruzada con roedores, primates no humanos (NHP) y CD47 humano.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunogenicidad" se refiere a la propiedad de una proteína (p. ej., una proteína terapéutica) que provoca una respuesta inmune en el huésped como si fuera un antígeno extraño.

La inmunogenicidad de una proteína se puede ensayar *in vitro* de diversas formas, tal como mediante ensayos de proliferación de células T *in vitro*.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunogenicidad mínima" se refiere a una inmunogenicidad de una proteína (p. ej., una proteína terapéutica) que se ha modificado, por ejemplo, mediante sustituciones de aminoácidos, para que sea menor (p. ej., al menos, 10%, 25%, 50% o 100% menor) que la inmunogenicidad antes de que se introduzcan las sustituciones de aminoácidos (p. ej., una proteína no modificada). En algunos aspectos, una proteína (p. ej., una proteína terapéutica) se modifica para que tenga una inmunogenicidad mínima y provoca muy poca o ninguna respuesta inmune del huésped, aunque sea un antígeno extraño.

En algunos aspectos, la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad tiene una inmunogenicidad mínima. En algunos aspectos, un polipéptido SIRP- $\alpha$  de la descripción administra do a un sujeto tiene la misma secuencia de aminoácidos que la del polipéptido SIRP- $\alpha$  en una muestra biológica del sujeto, excepto por los cambios de aminoácidos que aumentan la afinidad de la variante de D1 de SIRP- $\alpha$ . En algunos aspectos, las variantes de polipéptido descritas en este documento reducen el riesgo de efectos secundarios en comparación con los anticuerpos anti-CD47 o SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje. En algunos aspectos, las variantes de polipéptido descritas en este documento reducen el riesgo de anemia en comparación con los anticuerpos anti-CD47 o SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje. En algunos aspectos, las variantes polipeptídicas descritas en este documento no causan anemia aguda en estudios de roedores o primates no humanos (NHP).

La Tabla 2 enumera las sustituciones de aminoácidos específicas en una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad con respecto a cada secuencia de dominio D1. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad incluye una o más (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más) de las sustituciones enumeradas en la Tabla 2. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad incluye como máximo catorce sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de tipo salvaje. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad incluye como máximo diez sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de tipo salvaje. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad incluye como máximo diez sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de tipo salvaje. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad de la descripción tiene al menos 90% (p. ej., al menos 92%, 95%, 97% o mayor que 97%) identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de un dominio D1 de tipo salvaje.

En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad es una variante quimérica de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que incluye una parte de dos o más dominios D1 de tipo salvaje o variantes de los mismos (p. ej., una parte de un dominio de tipo salvaje Dominio D1 o variante del mismo y una parte de otro dominio D1 de tipo salvaje o variante del mismo). En algunos aspectos, una variante quimérica de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad incluye al menos dos partes (p. ej., tres, cuatro, cinco o más partes) de dominios D1 de tipo salvaje o variantes de los mismos, en donde cada una de las partes es de un dominio D1 de tipo salvaje diferente. En algunos aspectos, una variante quimérica de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad incluye además una o más sustituciones de aminoácidos enumeradas en la Tabla 2.

Tabla 2. Sustituciones de aminoácidos en una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
13	v1 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVLVAAGETX <sub>3</sub> TLRCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PV GPIQWFRGAGPGRX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSDX <sub>10</sub> TX <sub>11</sub> RNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCX <sub>12</sub> KX <sub>13</sub> RKGS PDDVEX <sub>14</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos relacionados con SEQ ID NO: 13	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =A, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =L, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =V, I; X <sub>13</sub> =F, L, V; X <sub>14</sub> =F, V
14	v2 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVSVAAGESX <sub>3</sub> ILHCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PVG PIQWFRGAGPARX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSEX <sub>10</sub> T X <sub>11</sub> RENMDFSISISNITPADAGTYYCX <sub>12</sub> KX <sub>13</sub> RKGSPD TEX <sub>14</sub> KSGAGTELSVRAKPS

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
-	Sustituciones de aminoácidos relacionadas con SEQ ID NO:14	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =V, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =S, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =V, I; X <sub>13</sub> =F, L, V; X <sub>14</sub> =F, V
15	v3 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVSVAAGESX <sub>3</sub> ILLCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PVG PIQWFRGAGPARX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSEX <sub>10</sub> T X <sub>11</sub> RENMDFSISISNITPADAGTYYCX <sub>12</sub> KX <sub>13</sub> RKGSPD TEX <sub>14</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustitución de aminoácidos relacionadas con SEQ ID NO:15	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =V, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =S, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =V, I; X <sub>13</sub> =F, L, V; X <sub>14</sub> =F, V
16	v4 del Dominio D1	EEGX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVSVAAGESX <sub>3</sub> ILHCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PVG PIQWFRGAGPGRX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSDX <sub>10</sub> TX <sub>11</sub> RNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCX <sub>12</sub> KX <sub>13</sub> RKGSP DDVEX <sub>14</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos relacionadas con SEQ ID NO:16	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =A, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =L, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =V, I; X <sub>13</sub> =F, L, V; X <sub>14</sub> =F, V
17	v5 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKFVLVAAGETX <sub>3</sub> TLRCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PV GPIQWFRGAGPGRX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSDX <sub>10</sub> TX <sub>11</sub> RNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCX <sub>12</sub> KX <sub>13</sub> RKGS PDDVEX <sub>14</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos relacionadas con SEQ ID NO:17	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =A, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =L, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =V, I; X <sub>13</sub> =F, L, V; X <sub>14</sub> =F, V
18	v6 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVLVAAGETX <sub>3</sub> TLRCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PV GPIQWFRGAGPGRX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSDX <sub>10</sub> TX <sub>11</sub> RNNMDFPIRIGNITPADAGTYYCX <sub>12</sub> KX <sub>13</sub> RKGS PDDVEX <sub>14</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos relacionadas	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =A, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =L, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =V, I; X <sub>13</sub> =F, L, V; X <sub>14</sub> =F, V

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia de aminoácidos</b>
	con SEQ ID NO:18	
19	v7 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVSVAAGESX <sub>3</sub> ILHCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PVG PIQWFRGAGPARX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSEX <sub>10</sub> T X <sub>11</sub> RENMDFSISISNITPADAGTYYCX <sub>12</sub> KX <sub>13</sub> RKGSPD TEX <sub>14</sub> KSGAGTELSVRGKPS
-	Sustituciones de aminoácidos relacionadas con SEQ ID NO:19	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =V, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =S, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =V, I; X <sub>13</sub> =F, L, V; X <sub>14</sub> =F, V
20	v8 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVLVAAGETX <sub>3</sub> TLRCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PV GPIQWFRGAGPARX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSEX <sub>1</sub> <sub>0</sub> TX <sub>11</sub> RENMDFSISISNITPADAGTYYCX <sub>12</sub> KX <sub>13</sub> RKGSP DTEX <sub>14</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos relacionadas con SEQ ID NO:20	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =A, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =S, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =V, I; X <sub>13</sub> =F, L, V; X <sub>14</sub> =F, V
21	v9 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVLVAAGETX <sub>3</sub> TLRCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PV GPIQWFRGAGPGRX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSDX <sub>1</sub> <sub>0</sub> TX <sub>11</sub> RNMDFSIRISNITPADAGTYYCX <sub>12</sub> KX <sub>13</sub> RKGSP DDVEX <sub>14</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos relacionadas con SEQ ID NO:21	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =A, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =L, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =V, I; X <sub>13</sub> =F, L, V; X <sub>14</sub> =F, V
22	v10 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVSVAAGESX <sub>3</sub> ILHCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PVG PIQWFRGAGPARX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSEX <sub>10</sub> T X <sub>11</sub> RENMDFSISISNITPADAGTYYCX <sub>12</sub> KX <sub>13</sub> RKGSPD TEX <sub>14</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos relacionadas con SEQ ID NO:22	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =V, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =S, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =V, I; X <sub>13</sub> =F, L, V; X <sub>14</sub> =F, V

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
23	Dominio D1 Pan	EEX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> QX <sub>3</sub> IQPDKX <sub>4</sub> VX <sub>5</sub> VAAGEX <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> LX <sub>9</sub> CTX <sub>10</sub> TS LX <sub>11</sub> PVGPPIQWFRGAGPGRX <sub>12</sub> RX <sub>13</sub> LIYNQX <sub>14</sub> X <sub>15</sub> GX <sub>16</sub> FP RVTTVSX <sub>17</sub> X <sub>18</sub> TX <sub>19</sub> RX <sub>20</sub> NMDFX <sub>21</sub> IX <sub>22</sub> IX <sub>23</sub> NITPADAG TYYCX <sub>24</sub> KX <sub>25</sub> RKGSPDX <sub>26</sub> X <sub>27</sub> EX <sub>28</sub> KSGAGTEL SVRX <sub>29</sub> KPS
-	Sustituciones de aminoácidos relacionadas con SEQ ID NO:23	X <sub>1</sub> =E, G; X <sub>2</sub> =L, I, V; X <sub>3</sub> =V, L, I; X <sub>4</sub> =S, F; X <sub>5</sub> =L, S; X <sub>6</sub> =S, T; X <sub>7</sub> =A, V; X <sub>8</sub> =I, T; X <sub>9</sub> =H, R; X <sub>10</sub> =A, V, I, L; X <sub>11</sub> =I, T, S, F; X <sub>12</sub> =A, G; X <sub>13</sub> =E, V, L; X <sub>14</sub> =K, R; X <sub>15</sub> =E, Q; X <sub>16</sub> =H, P, R; X <sub>17</sub> =D, E; X <sub>18</sub> =S, L, T, G; X <sub>19</sub> =K, R; X <sub>20</sub> =E, D; X <sub>21</sub> =S, P; X <sub>22</sub> =S, R; X <sub>23</sub> =S, G; X <sub>24</sub> =V, I; X <sub>25</sub> =F, L, V; X <sub>26</sub> =D o está ausente; X <sub>27</sub> =T, V; X <sub>28</sub> =F, V; and X <sub>29</sub> =A, G

- En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVLVAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSX<sub>5</sub>PVGPPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RN NMDFSIRIGNITPADAGTYYCX<sub>12</sub>KX<sub>13</sub>RKGSPDDVEX<sub>14</sub>KSGAGTEL SVRAKPS (SEQ ID NO: 13), en donde X<sub>1</sub> es L, I o V; X<sub>2</sub> es V, L o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I o L; X<sub>5</sub> es I, T, S o F; X<sub>6</sub> es E, V o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P o R; X<sub>10</sub> es L, T o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es V o I; X<sub>13</sub> es F, L o V; y X<sub>14</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:1.
- 5 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEGX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVVAAGESX<sub>3</sub>ILHCTX<sub>4</sub> TSLX<sub>5</sub>PVGPPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RN NMDFSIRIGNITPADAGTYYCX<sub>12</sub>KX<sub>13</sub>RKGSPDDVEX<sub>14</sub>KSGAGTEL SVRAKPS(SEQ ID NO: 16), en donde X<sub>1</sub> es L, I o V; X<sub>2</sub> es V, L o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I o L; X<sub>5</sub> es I, T, S o F; X<sub>6</sub> es E, V o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P o R; X<sub>10</sub> es L, T o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es V o I; X<sub>13</sub> es F, L o V; y X<sub>14</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:4.
- 10 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKFVLVAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSX<sub>5</sub>PVGPPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RN NMDFSIRIGNITPADAGTYYCX<sub>12</sub>KX<sub>13</sub>RKGSPDDVEX<sub>14</sub>KSGAGTEL SVRAKPS (SEQ ID NO: 17), en donde X<sub>1</sub> es L, I o V; X<sub>2</sub> es V, L o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I o L; X<sub>5</sub> es I, T, S o F; X<sub>6</sub> es E, V o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P o R; X<sub>10</sub> es L, T o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es V o I; X<sub>13</sub> es F, L o V; y X<sub>14</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:5.
- 15 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVL VAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSX<sub>5</sub>PVGPPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RN NMDFSIRIGNITPADAGTYYCX<sub>12</sub>KX<sub>13</sub>RKGSPDDVEX<sub>14</sub>KSGAGTEL SVRAKPS (SEQ ID NO: 18), en donde X<sub>1</sub> es L, I o V; X<sub>2</sub> es V, L o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I o L; X<sub>5</sub> es I, T, S o F; X<sub>6</sub> es E, V o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P o R; X<sub>10</sub> es L, T o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es V o I; X<sub>13</sub> es F, L o V; y X<sub>14</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:6.
- 20 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKFVLVAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSX<sub>5</sub>PVGPPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RN NMDFSIRISNITPADAGTYYCX<sub>12</sub>KX<sub>13</sub>RKGSPDDVEX<sub>14</sub>KSGAGTEL SVRAKPS (SEQ ID NO: 21), en donde X<sub>1</sub> es L, I o V; X<sub>2</sub> es V, L o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I o L; X<sub>5</sub> es I, T, S o F; X<sub>6</sub> es E, V o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P o R; X<sub>10</sub> es L, T o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es V o I; X<sub>13</sub> es F, L o V; y X<sub>14</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:9.
- 25 En cualquier de los aspectos mencionados anteriormente, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene una secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 13,16-18 y 21, y en donde X<sub>1</sub> es L, I o V. En cualquier de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>2</sub> es V, L o I. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es A o V. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es A, I o L. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es I, T, S o F. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>6</sub> es E, V o L. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es K o R. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es
- 30 En cualquier de los aspectos mencionados anteriormente, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene una secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 13,16-18 y 21, y en donde X<sub>1</sub> es L, I o V. En cualquier de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>2</sub> es V, L o I. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es A o V. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es A, I o L. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es I, T, S o F. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>6</sub> es E, V o L. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es K o R. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es
- 35 En cualquier de los aspectos mencionados anteriormente, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene una secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 13,16-18 y 21, y en donde X<sub>1</sub> es L, I o V. En cualquier de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>2</sub> es V, L o I. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es A o V. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es A, I o L. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es I, T, S o F. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>6</sub> es E, V o L. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es K o R. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es
- 40 En cualquier de los aspectos mencionados anteriormente, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene una secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 13,16-18 y 21, y en donde X<sub>1</sub> es L, I o V. En cualquier de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>2</sub> es V, L o I. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es A o V. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es A, I o L. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es I, T, S o F. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>6</sub> es E, V o L. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es K o R. En cualquier de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es

- 5 E o Q. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_9$  es H, P o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_{10}$  es L, T o G. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_{11}$  es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_{12}$  es V o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_{13}$  es F, L, V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_{14}$  es F o V. En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de seis sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 4-6 y 9.
- 10 En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con una afinidad de unión al menos 10 veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 4-6 y 9. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con una afinidad de unión al menos 100 veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 4-6 y 9. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos una afinidad de unión 1000-veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de uno cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 4-6 y 9. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  menor que  $1 \times 10^{-8} M$ , menor que  $5 \times 10^{-9} M$ , menor que  $1 \times 10^{-9} M$ , menor que  $5 \times 10^{-10} M$ , menor que  $1 \times 10^{-10} M$  o menor que  $1 \times 10^{-11} M$ . En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una KD entre aproximadamente 500 nM y 100 nM, entre aproximadamente 100 nM y 50 nM, entre aproximadamente 50 nM y 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y 5 nM, entre aproximadamente 5 nM y 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y 500 pM, entre aproximadamente 500 pM y 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y 50 pM, o entre aproximadamente 50 pM y 10 pM.
- 15 20 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVVAAGESX<sub>3</sub>ILHCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPARX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSEX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RE NMDFSISISNITPADAGTYYCX<sub>12</sub>KX<sub>13</sub>RKGSPDTEX<sub>14</sub>KSGAGTELX RAKPS (SEQ ID NO: 14), en donde  $X_1$  es L, I o V;  $X_2$  es V, L o, I;  $X_3$  es A o V;  $X_4$  es A, I o L;  $X_5$  es I, T, S o F;  $X_6$  es E, V o L;  $X_7$  es K o R;  $X_8$  es E o Q;  $X_9$  es H, P o R;  $X_{10}$  es S, T o G;  $X_{11}$  es K o R;  $X_{12}$  es V o I;  $X_{13}$  es F, L o V; y  $X_{14}$  es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:2.
- 25 30 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVVAAGESX<sub>3</sub>ILLCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPARX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSEX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RE NMDFSISISNITPADAGTYYCX<sub>12</sub>KX<sub>13</sub>RKGSPDTEX<sub>14</sub>KSGAGTELX RAKPS (SEQ ID NO: 15), en donde  $X_1$  es L, I o V;  $X_2$  es V, L o, I;  $X_3$  es A o V;  $X_4$  es A, I o L;  $X_5$  es I, T, S o F;  $X_6$  es E, V o L;  $X_7$  es K o R;  $X_8$  es E o Q;  $X_9$  es H, P o R;  $X_{10}$  es S, T o G;  $X_{11}$  es K o R;  $X_{12}$  es V o I;  $X_{13}$  es F, L o V; y  $X_{14}$  es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:3.
- 35 40 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVVAAGESX<sub>3</sub>ILHCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPARX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSEX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RE NMDFSISISNITPADAGTYYCX<sub>12</sub>KX<sub>13</sub>RKGSPDTEX<sub>14</sub>KSGAGTELX RGKPS (SEQ ID NO: 19), en donde  $X_1$  es L, I o V;  $X_2$  es V, L o, I;  $X_3$  es A o V;  $X_4$  es A, I o L;  $X_5$  es I, T, S o F;  $X_6$  es E, V o L;  $X_7$  es K o R;  $X_8$  es E o Q;  $X_9$  es H, P o R;  $X_{10}$  es S, T o G;  $X_{11}$  es K o R;  $X_{12}$  es V o I;  $X_{13}$  es F, L o V; y  $X_{14}$  es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:7.
- 45 50 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVVAAGESX<sub>3</sub>ILHCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPARX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSEX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RE NMDFSISISNITPADAGTYYCX<sub>12</sub>KX<sub>13</sub>RKGSPDTEX<sub>14</sub>KSGAGTELX RAKPS (SEQ ID NO: 22), en donde  $X_1$  es L, I o V;  $X_2$  es V, L o, I;  $X_3$  es A o V;  $X_4$  es A, I o L;  $X_5$  es I, T, S o F;  $X_6$  es E, V o L;  $X_7$  es K o R;  $X_8$  es E o Q;  $X_9$  es H, P o R;  $X_{10}$  es S, T o G;  $X_{11}$  es K o R;  $X_{12}$  es V o I;  $X_{13}$  es F, L o V; y  $X_{14}$  es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:10.
- 55 60 En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene una secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 14, 15, 19 y 22, y en donde  $X_1$  es L, I o V. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente,  $X_2$  es V, L o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_3$  es A o V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_4$  es A, I o L. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_5$  es I, T, S o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_6$  es E, V o L. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_7$  es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_8$  es E o Q. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_9$  es H, P o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_{10}$  es S, T o G. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_{11}$  es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_{12}$  es V o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_{13}$  es F, L, V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados,  $X_{14}$  es F o V. En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de seis sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 3, 7 y 10.
- 65 En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con una afinidad de unión al menos 10 veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 3, 7 y 10. En algunos aspectos,

el polipéptido se une a CD47 con una afinidad de unión al menos 100 veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 3, 7 y 10. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos una afinidad de unión 1000-veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de uno cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 3, 7 y 10. En algunos aspectos, un polipéptido variante de

- 5 D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  menor que  $1 \times 10^{-8}M$ , menor que  $5 \times 10^{-9}M$ , menor que  $1 \times 10^{-9}M$ , menor que  $5 \times 10^{-10}M$ , menor que  $1 \times 10^{-10}M$  o menor que  $1 \times 10^{-11}M$ . En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  entre aproximadamente 500 nM y 100 nM, entre aproximadamente 100 nM y 50 nM, entre aproximadamente 50 nM y 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y 5 nM, entre aproximadamente 5 nM y 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y 500 pM, entre aproximadamente 500 pM y 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y 50 pM, o entre aproximadamente 50 pM y 10 pM.
- 10

En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: , EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVLVAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPARX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSEX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RE NMDFSISISNITPADAGTYYCX<sub>12</sub>KX<sub>13</sub>RKGSPDTEX<sub>14</sub>KSGAGTELSV RAKPS (SEQ ID NO: 20) en donde X<sub>1</sub> es L, I o V; X<sub>2</sub> es V, L o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I o L; X<sub>5</sub> es I, T, S o F; X<sub>6</sub> es E, V o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P o R; X<sub>10</sub> es L, T o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es V o I; X<sub>13</sub> es F, L o V; y X<sub>14</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:8.

- 20 En algunos aspectos mencionados anteriormente, el polipéptido tiene una secuencia de SEQ ID NO:20, y en donde X<sub>1</sub> es L, I o V. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>2</sub> es V, L o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es A o V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es A, I o L. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es I, T, S o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>6</sub> es E, V o L. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es E o Q. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>9</sub> es H, P o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>10</sub> es S, T o G. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>11</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>12</sub> es V o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>13</sub> es F, L, V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>14</sub> es F o V. En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de seis sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de y SEQ ID NO:8.
- 25

En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con una afinidad de unión al menos 10 veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:8. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con una afinidad de unión al menos 100 veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:8. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos una afinidad de unión 1000veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de uno cualquiera de SEQ ID NO:8. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  menor que  $1 \times 10^{-8}M$ , menor que  $5 \times 10^{-9}M$ , menor que  $1 \times 10^{-9}M$ , menor que  $5 \times 10^{-10}M$ , menor que  $1 \times 10^{-10}M$  o menor que  $1 \times 10^{-11}M$ . En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  entre aproximadamente 500 nM y 100 nM, entre aproximadamente 100 nM y 50 nM, entre aproximadamente 50 nM y 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y 5 nM, entre aproximadamente 5 nM y 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y 500 pM, entre aproximadamente 500 pM y 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y 50 pM, o entre aproximadamente 50 pM y 10 pM.

30

En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>QX<sub>3</sub>IQPDKX<sub>4</sub>VX<sub>5</sub>VAAGEX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>LX<sub>9</sub>CTX<sub>10</sub>TSLX<sub>11</sub>PVGPIQWFRGAGPX<sub>12</sub>RX<sub>13</sub>LIYNQX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub>FPRVTTVSX<sub>17</sub>X<sub>18</sub>TX<sub>19</sub>RX<sub>20</sub> NMDFX<sub>21</sub>IX<sub>2</sub>2IX<sub>3</sub>NITPADAGTYYCX<sub>4</sub>2KX<sub>5</sub>2RKGSPDX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>2EX<sub>8</sub>2KSGAGTELSVRX<sub>9</sub>KPS (SEQ ID NO: 23), en donde X<sub>1</sub> es E o G; X<sub>2</sub> es L, I o V; X<sub>3</sub> es V, L o, I; X<sub>4</sub> es S o F; X<sub>5</sub> es L o S; X<sub>6</sub> es S o T; X<sub>7</sub> es A o V; X<sub>8</sub> es I o T, X<sub>9</sub> es H o R; X<sub>10</sub> es A, V, I o L; X<sub>11</sub> es I, T, S o F; X<sub>12</sub> es A o G; X<sub>13</sub> es E, V o L; X<sub>14</sub> es K o R; X<sub>15</sub> es E o Q; X<sub>16</sub> es H, P o R; X<sub>17</sub> es D o E; X<sub>18</sub> es S, L, T o G; X<sub>19</sub> es K o R; X<sub>20</sub> es E o D; X<sub>21</sub> es S o P; X<sub>22</sub> es S o R; X<sub>23</sub> es S o G; X<sub>24</sub> es V o I; X<sub>25</sub> es F, L, V; X<sub>26</sub> es D o está ausente; X<sub>27</sub> es T o V; X<sub>28</sub> es F o V; y X<sub>29</sub> es A o G; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10.

45

En cualquiera de los aspectos antes mencionados en este aspecto de la descripción, X<sub>2</sub> es L, I o V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es V, L o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es S o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es L o S. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>6</sub> es S o T. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A o V. los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es I o T. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>9</sub> es H o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>10</sub> es A, V, I o L. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>11</sub> es I, T, S o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>12</sub> es A o G. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>13</sub> es E, V o L. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>14</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>15</sub> es E o Q. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>16</sub> es H, P o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>17</sub> es D o E. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>18</sub> es S, L, T o G. En cualquiera de los aspectos

50

55

60

antes mencionados, X<sub>19</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>20</sub> es E o D. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>21</sub> es S o P. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>22</sub> es S o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>23</sub> es S o G. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>24</sub> es V o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>25</sub> es F, L, V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>26</sub> es D o está ausente. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>27</sub> es T o V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>28</sub> es F o V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>29</sub> es A o G.

5 En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de seis sustituciones de aminoácidos con respecto a el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10.

10 En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con una afinidad de unión al menos 10 veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con una afinidad de unión al menos 100 veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos una afinidad de unión 1000 veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de uno cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o

15 un fragmento del mismo se une a CD47 con una K<sub>D</sub> menor que  $1 \times 10^{-8}$ M, menor que  $5 \times 10^{-9}$ M, menor que  $1 \times 10^{-9}$ M, menor que  $5 \times 10^{-10}$ M, menor que  $1 \times 10^{-10}$ M o menor que  $1 \times 10^{-11}$ M. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una K<sub>D</sub> entre aproximadamente 500 nM y 100 nM, entre 20 aproximadamente 100 nM y 50 nM, entre aproximadamente 50 nM y 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y 5 nM, entre aproximadamente 5 nM y 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y 500 pM, entre aproximadamente 500 pM y 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y 50 pM, o entre aproximadamente 50 pM y 10 pM.

20 En algunos aspectos, un polipéptido de la descripción que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad comprende además un dominio D2 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 24, un dominio D3 que tiene la secuencia de o un dominio D2 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 24 y un dominio D3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO:

25 25 de un SIRP- $\alpha$  humano de tipo salvaje como se muestra en la Tabla. En algunos aspectos, la variante D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad comprende además un fragmento o variante de un dominio D2 o un fragmento o variante de un dominio D3. En algunos aspectos, la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad comprende además un fragmento o variante de un dominio D2 y un fragmento o variante de un dominio D3. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se une a un dominio D2 y D3 por medio de un enlazador. En algunos aspectos, una variante 30 de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se une a un dominio D2 y D3 por medio de un enlazador.

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de los dominios D2 y D3 de SIRP- $\alpha$

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
24	Dominio D2 de SIRP- $\alpha$	APVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDITLKWFKNNGNE LSDFQTNVDPVGESVSYIHSATAKVVLTREDVHSQVICEVA HVTLQGDPLRGTAANLSETIR
25	Dominio D3 de SIRP- $\alpha$	VPPTLEVTQQPVRAENQVNVTQVRKFYPQRLQLTWLEN GNVSRTEASTVTENKDGTYNWMSLLVNVSAHRDDVK LTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVS

35 En algunos aspectos, un polipéptido de la descripción que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se une a un monómero de dominio Fc, una albúmina de suero humano (HSA) o una variante de la misma, una proteína o péptido de unión al suero, o una molécula orgánica, p. ej., un polímero (p. ej., un polímero de PEG), con el fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas del polipéptido, p. ej., aumentar la vida media en suero. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se une a un monómero de dominio Fc que no es capaz de dimerizar. En algunos aspectos, los monómeros del dominio Fc, las proteínas HSA, las proteínas o péptidos de unión 40 al suero y las moléculas orgánicas tales como un PEG sirven para aumentar la vida media en suero de los polipéptidos descritos en el presente documento. En algunos aspectos, un polipéptido de la descripción que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad no incluye la secuencia de cualquiera de los SEQ ID NOs: 26-36 mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4.

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
26	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSЛИPVGPIQWFRGAGPARELIYNQ REGHFPRTTVSETTRRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEV KSGAGTELSVRAKPS
27	EEEVQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTLTSLIPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ RQGHFPRTTVSEGTRRENMDFSISISNITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
28	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESVILHCTITSЛPVGPIQWFRGAGPARLLIYNQ REGPFPRVTVSETTRRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKLRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
29	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSЛPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ RQGPFPRTTVSEGTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCIKLRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
30	EEEIQVIQPDKSVSVAAGESVIIHCTVTSЛPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ RQGRFPRTTVSEGTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKVRKGSPDTEV KSGAGTELSVRAKPS
31	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESIILHCTVTSЛPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ REGRFPRVTVSEGTRRENMDFSISISNITPADAGTYYCIKLRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
32	EEEVQLIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSЛPVGPIQWFRGAGPARVLIYN QREGPFPRVTVSEGTRRENMDFSISISNITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEV KSGAGTELSVRAKPS
33	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSЛPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS
34	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSЛPVGPIQWFRGAGPARLLIYNQR QGPFPRTVSETTRRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKS GAGTELSVRAKPS
35	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSЛPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ KQGPFPRTTISETTRRENMDFSISISNITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEFKS GAGTELSVRAKPS
36	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSЛPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQ RQGPFPRTVSEGTRRENMDFSISISNITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEVK SGAGTELSVRAKPS

5 En algunos aspectos, los polipéptidos y los constructos polipeptídicos descritas en el presente documento se usan *in vitro* para ensayos de unión, tales como ensayos inmunes. Por ejemplo, en algunos aspectos, los polipéptidos y los constructos polipeptídicos descritas en el presente documento se usan en fase líquida o se unen a un vehículo en fase sólida. En algunos aspectos, los polipéptidos usados para inmunoensayos se marcan de forma detectable de diversas formas.

En algunos aspectos, los polipéptidos y los constructos polipeptídicos descritos en este documento se unen a varios vehículos y se usan para detectar la presencia de células que expresan antígenos específicos. Los ejemplos de

vehículos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosa y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser tanto soluble como insoluble.

Se conocen varias marcadores y métodos de marcado diferentes. Los ejemplos de los tipos de marcadores que se pueden usar en la presente invención incluye enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminescentes y compuestos bioluminescentes. Están disponibles varias técnicas para unir marcadores a polipéptidos descritos en el presente documento.

En algunos aspectos, los polipéptidos se acoplan a haptenos de bajo peso molecular. A continuación, estos haptenos se detectan específicamente mediante una segunda reacción. Por ejemplo, en algunos aspectos, el hapteno biotina se usa con avidina o los haptenos dinitrofenol, piridoxal o fluoresceína se detectan con anticuerpos anti-hapteno específicos (p. ej., anticuerpos anti-dinitrofenol, anticuerpos anti-piridoxal y anticuerpos anti-fluoresceína, respectivamente).

## II. Dominios D1 de SIRP- $\alpha$ de alta afinidad con glicosilación alterada

En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92.

En el presente documento también se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A.

En algunos aspectos, un polipéptido en una composición descrita en el presente documento comprende una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene una glicosilación reducida o mínima. El dominio D1 de cada una de las diez proteínas SIRP- $\alpha$  humanas de tipo salvaje (SEQ ID NOs: 1-10 en la Tabla 1) contiene un único sitio de glicosilación potencial unido a N en el aminoácido N80 de la secuencia N80ITP. La expresión de un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  en células de ovario de hámster chino (CHO) da como resultado una banda principal de 16 KDa (no glicosilada) y una banda menor de mayor peso molecular que fue eliminada por Endo Hf. Endo Hf es una fusión de proteína recombinante de endoglicosidasa H y proteína de unión a maltosa. Endo Hf se escinde dentro del núcleo de quitobiosa de manosa alta y algunos oligosacáridos híbridos de glicoproteínas enlazadas a N. Esto implica que una prolina en la posición del aminoácido 83 puede reducir la eficacia de la glicosilación, lo que da lugar a una proteína con diferentes grados de glicosilación y, por tanto, heterogeneidad. Para el desarrollo de fármacos, la heterogeneidad puede dar lugar a desafíos en el desarrollo de procesos. Por lo tanto, para investigar la posibilidad de generar formas homogéneas, no glicosiladas de variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad, en algunos aspectos, el aminoácido N80 de una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  está mutado a Ala. En algunos aspectos, para hacer una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad no glicosilada, el aminoácido N80 en una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se reemplaza por cualquier aminoácido, incluyendo cualquier aminoácido natural y no natural, p. ej., N80A y N80Q. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad comprende una mutación N80A y al menos 1 mutación adicional (p. ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones adicionales o más). En algunos aspectos, la mutación adicional está en el sitio de unión CD47. En algunos aspectos, la mutación adicional está en el núcleo hidrófobo del dominio D1.

En algunos aspectos, un polipéptido en una composición descrita en el presente documento incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene una glicosilación aumentada con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje. Otra opción para aumentar la homogeneidad del producto final es mejorar la eficacia de la glicosilación en el aminoácido N80 y generar variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad con un aumento de la glicosilación con respecto a un tipo salvaje. En algunos aspectos, el aminoácido P83 en la secuencia NITP83 afecta el grado de glicosilación en el aminoácido N80. En algunos aspectos, cambiar P83 a cualquier aminoácido aumenta la eficacia de la glicosilación en N80. En algunos aspectos, el aminoácido P83 en una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se reemplaza por cualquier aminoácido, incluyendo los aminoácidos naturales y no naturales, p. ej., P83V, P83A, P83I y P83L. En algunos aspectos, un polipéptido de la descripción se expresa en una célula que está optimizada para no glicosilar proteínas que son expresadas por dicha célula, por ejemplo, mediante ingeniería genética de la línea celular (p. ej., levadura modificada genéticamente o huésped mamífero) o modificaciones de condiciones de cultivo celular tales como la adición de kifunensina o mediante el uso de un huésped naturalmente no glicosilante tal como un procariota (E. coli, etc.).

La Tabla 5 enumera las sustituciones de aminoácidos específicas en una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad con respecto a cada secuencia de variante de dominio D1. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad incluye una o más (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más) de las sustituciones enumeradas en la Tabla 5. En algunos aspectos, las variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  no están

glicosiladas o están mínimamente glicosiladas. En algunos aspectos, las variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  están completamente glicosiladas o casi completamente glicosiladas. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad incluye como máximo catorce sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de tipo salvaje. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad incluye como máximo diez sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de tipo salvaje. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad incluye como máximo siete sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de tipo salvaje. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad de la descripción tiene al menos 90% (p. ej., al menos 92%, 95%, 97% o mayor que 97%) identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de un dominio D1 de tipo salvaje.

- 5 En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad es una variante químérica de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que incluye una parte de dos o más dominios D1 de tipo salvaje o variantes de los mismos (p. ej., una parte de un dominio D1 de tipo salvaje o variante del mismo y una parte de otro dominio D1 de tipo salvaje o variante del mismo). En algunos aspectos, una variante químérica de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad incluye al menos dos partes (p. ej., tres, cuatro, cinco o más partes) de dominios D1 de tipo salvaje o variantes de los mismos, en donde cada una de las partes es de un dominio D1 de tipo salvaje diferente. En algunos aspectos, una variante químérica de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad incluye además una o más sustituciones de aminoácidos enumeradas en la Tabla 5.
- 10 En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad es una variante químérica de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que incluye una parte de dos o más dominios D1 de tipo salvaje o variantes de los mismos (p. ej., una parte de un dominio D1 de tipo salvaje o variante del mismo y una parte de otro dominio D1 de tipo salvaje o variante del mismo). En algunos aspectos, una variante químérica de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad incluye al menos dos partes (p. ej., tres, cuatro, cinco o más partes) de dominios D1 de tipo salvaje o variantes de los mismos, en donde cada una de las partes es de un dominio D1 de tipo salvaje diferente. En algunos aspectos, una variante químérica de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad incluye además una o más sustituciones de aminoácidos enumeradas en la Tabla 5.
- 15

Tabla 5. sustituciones de aminoácidos en una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
37	v1 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVLVAAGETX <sub>3</sub> TLRCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PV PIQWFRGAGPGRX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSDX <sub>1</sub> <sub>0</sub> TX <sub>11</sub> RNNMDFSIRIGX <sub>12</sub> ITX <sub>13</sub> ADAGTYYCX <sub>14</sub> KX <sub>15</sub> RK GSPDDVEX <sub>16</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:37	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =A, I, I; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =L, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>13</sub> =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>14</sub> =V, I; X <sub>15</sub> =F, L, V; X <sub>16</sub> =F, V
38	v2 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVSVAAGESX <sub>3</sub> ILHCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PVG PIQWFRGAGPARX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSEX <sub>10</sub> T X <sub>11</sub> RENMDFSISISX <sub>12</sub> ITX <sub>13</sub> ADAGTYYCX <sub>14</sub> KX <sub>15</sub> RKGS PDTEX <sub>16</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:38	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =V, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =S, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>13</sub> =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>14</sub> =V, I; X <sub>15</sub> =F, L, V; X <sub>16</sub> =F, V
39	v3 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVSVAAGESX <sub>3</sub> ILLCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PVG PIQWFRGAGPARX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSEX <sub>10</sub> T X <sub>11</sub> RENMDFSISISX <sub>12</sub> ITX <sub>13</sub> ADAGTYYCX <sub>14</sub> KX <sub>15</sub> RKGS PDTEX <sub>16</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustitución de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:39	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =V, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =S, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>13</sub> =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>14</sub> =V, I; X <sub>15</sub> =F, L, V; X <sub>16</sub> =F, V

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
40	v4 del Dominio D1	EEGX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVSVAAGESX <sub>3</sub> ILHCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PVG PIQWFRGAGPGRX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSDX <sub>10</sub> TX <sub>11</sub> RNNMDFSIRIGX <sub>12</sub> ITX <sub>13</sub> ADAGTYYCX <sub>14</sub> KX <sub>15</sub> RK GSPDDVEX <sub>16</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:40	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =A, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =L, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>13</sub> =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>14</sub> =V, I; X <sub>15</sub> =F, L, V; X <sub>16</sub> =F, V
41	v5 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKFVLVAAGETX <sub>3</sub> TLRCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PV GPIQWFRGAGPGRX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSDX <sub>10</sub> TX <sub>11</sub> RNNMDFSIRIGX <sub>12</sub> ITX <sub>13</sub> ADAGTYYCX <sub>14</sub> KX <sub>15</sub> RK GSPDDVEX <sub>16</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:41	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =A, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =L, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>13</sub> =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>14</sub> =V, I; X <sub>15</sub> =F, L, V; X <sub>16</sub> =F, V
42	v6 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVLVAAGETX <sub>3</sub> TLRCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PV GPIQWFRGAGPGRX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSDX <sub>10</sub> TX <sub>11</sub> RNNMDFPIRIGX <sub>12</sub> ITX <sub>13</sub> ADAGTYYCX <sub>14</sub> KX <sub>15</sub> RK GSPDDVEX <sub>16</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:42	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =A, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =L, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>13</sub> =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>14</sub> =V, I; X <sub>15</sub> =F, L, V; X <sub>16</sub> =F, V
43	v7 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVSVAAGESX <sub>3</sub> ILHCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PVG PIQWFRGAGPARX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSEX <sub>10</sub> T X <sub>11</sub> RENMDFSISISX <sub>12</sub> ITX <sub>13</sub> ADAGTYYCX <sub>14</sub> KX <sub>15</sub> RKGS PDTEX <sub>16</sub> KSGAGTELSVRGKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:43	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =V, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =S, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>13</sub> =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>14</sub> =V, I; X <sub>15</sub> =F, L, V; X <sub>16</sub> =F, V
44	v8 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVLVAAGETX <sub>3</sub> TLRCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PV GPIQWFRGAGPARX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSEX <sub>10</sub> T TX <sub>11</sub> RENMDFSISISX <sub>12</sub> ITX <sub>13</sub> ADAGTYYCX <sub>14</sub> KX <sub>15</sub> RK GSPDTEX <sub>16</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:44	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =A, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =S, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>13</sub> =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>14</sub> =V, I; X <sub>15</sub> =F, L, V; X <sub>16</sub> =F, V

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
45	v9 del Dominio D1	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVLVAAGETX <sub>3</sub> TLRCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PV GPIQWFRGAGPGRX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSDX <sub>10</sub> TX <sub>11</sub> RNNMDFSIRISX <sub>12</sub> ITX <sub>13</sub> ADAGTYYCX <sub>14</sub> KX <sub>15</sub> RK GSPDDVEX <sub>16</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:45	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =A, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =L, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>13</sub> =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>14</sub> =V, I; X <sub>15</sub> =F, L, V; X <sub>16</sub> =F, V
46	Dominio D1 v10	EEEX <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> IQPDKSVSVAAGESX <sub>3</sub> ILHCTX <sub>4</sub> TSLX <sub>5</sub> PVG PIQWFRGAGPARX <sub>6</sub> LIYNQX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> GX <sub>9</sub> FPRVTTVSEX <sub>10</sub> T X <sub>11</sub> RENMDFSISISX <sub>12</sub> ITX <sub>13</sub> ADAGTYYCX <sub>14</sub> KX <sub>15</sub> RKGS PDTEX <sub>16</sub> KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:46	X <sub>1</sub> =L, I, V; X <sub>2</sub> =V, L, I; X <sub>3</sub> =A, V; X <sub>4</sub> =V, I, L; X <sub>5</sub> =I, T, S, F; X <sub>6</sub> =E, V, L; X <sub>7</sub> =K, R; X <sub>8</sub> =E, Q; X <sub>9</sub> =H, P, R; X <sub>10</sub> =S, T, G; X <sub>11</sub> =K, R; X <sub>12</sub> =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>13</sub> =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X <sub>14</sub> =V, I; X <sub>15</sub> =F, L, V; X <sub>16</sub> =F, V
47	Dominio D1 Pan	EEX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> QX <sub>3</sub> IQPDKX <sub>4</sub> VX <sub>5</sub> VAAGEX <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> LX <sub>9</sub> CTX <sub>10</sub> TS LX <sub>11</sub> PVGPIQWFRGAGPX <sub>12</sub> RX <sub>13</sub> LIYNQX <sub>14</sub> X <sub>15</sub> GX <sub>16</sub> FP RVTTVSX <sub>17</sub> X <sub>18</sub> TX <sub>19</sub> RX <sub>20</sub> NMDFX <sub>21</sub> IX <sub>22</sub> IX <sub>23</sub> X <sub>24</sub> ITX <sub>25</sub> AD AGTYYCX <sub>26</sub> KX <sub>27</sub> RKGSPDX <sub>28</sub> X <sub>29</sub> EX <sub>30</sub> KSGAGTELSVR X <sub>31</sub> KPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:47	X <sub>1</sub> =E, G; X <sub>2</sub> =L, I, V; X <sub>3</sub> =V, L, I; X <sub>4</sub> =S, F; X <sub>5</sub> =L, S; X <sub>6</sub> =S, T; X <sub>7</sub> =A, V; X <sub>8</sub> =I, T; X <sub>9</sub> =H, R, L; X <sub>10</sub> =A, V, yo, L; X <sub>11</sub> =I, T, S, F; X <sub>12</sub> =A, G; X <sub>13</sub> =E, V, L; X <sub>14</sub> =K, R; X <sub>15</sub> =E, Q; X <sub>16</sub> =H, P, R; X <sub>17</sub> =D, E; X <sub>18</sub> =S, L, T, G; X <sub>19</sub> =K, R; X <sub>20</sub> =E, N; X <sub>21</sub> =S, P; X <sub>22</sub> =S, R; X <sub>23</sub> =S, G; X <sub>24</sub> = cualquier aminoácido; X <sub>25</sub> = cualquier aminoácido; X <sub>26</sub> =V, I; X <sub>27</sub> =F, L, V; X <sub>28</sub> =D o ausente; X <sub>29</sub> =T, V; X <sub>30</sub> =F, V; y X <sub>31</sub> =A, G
48	Dominio D1 Pan	EEELQX <sub>1</sub> IQPDKSVX <sub>2</sub> VAAGEX <sub>3</sub> AX <sub>4</sub> LX <sub>5</sub> CTX <sub>6</sub> TSLX <sub>7</sub> P VGPIQWFRGAGPX <sub>8</sub> RX <sub>9</sub> LIYNQX <sub>10</sub> X <sub>11</sub> GX <sub>12</sub> FPRVTTV SX <sub>13</sub> X <sub>14</sub> TKRX <sub>15</sub> NMDFSIX <sub>16</sub> IX <sub>17</sub> X <sub>18</sub> ITPADAGTYYCX <sub>19</sub> KFRKGX <sub>20</sub> X <sub>21</sub> X <sub>22</sub> DX <sub>23</sub> EFKSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:48	X <sub>1</sub> =V, I; X <sub>2</sub> = L, S; X <sub>3</sub> = T, S; X <sub>4</sub> = T, I; X <sub>5</sub> = R, H; X <sub>6</sub> = A, V, I; X <sub>7</sub> =I, R, Y, K, F; X <sub>8</sub> =G, A; X <sub>9</sub> =E, V; X <sub>10</sub> =K, R; X <sub>11</sub> = E, D, Q; X <sub>12</sub> =H, P; X <sub>13</sub> =D, E; X <sub>14</sub> = S, L, T; X <sub>15</sub> = N, E; X <sub>16</sub> = R, S; X <sub>17</sub> = G, S; X <sub>18</sub> = N, A; X <sub>19</sub> = V, I; X <sub>20</sub> = S, I, M; X <sub>21</sub> = P o ausente; X <sub>22</sub> = D, P; y X <sub>23</sub> = V, T
49	Dominio D1 Pan	EEELQX <sub>1</sub> IQPDKSVLVAAGETATLRCTX <sub>2</sub> TSLX <sub>3</sub> PVGP IQWFRGAGPGRX <sub>4</sub> LIYNQX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> GX <sub>7</sub> FPRVTTVSDX <sub>8</sub> TK RNNMDFSIRIGX <sub>9</sub> ITPADAGTYYCX <sub>10</sub> KFRKGSPDDV EFKSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:49	X <sub>1</sub> =V, I, L; X <sub>2</sub> =A, I, V, L, v, L; X <sub>3</sub> =I, F, S, T; X <sub>4</sub> =E, V, L; X <sub>5</sub> =K, R; X <sub>6</sub> =E, Q; X <sub>7</sub> =H, P, R; X <sub>8</sub> =L, T, S, G; X <sub>9</sub> = A; y X <sub>10</sub> =V, I

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
50	Dominio D1 Pan	EEELQX <sub>1</sub> IQPDKSVSVAAGESAILHCTX <sub>2</sub> TSLX <sub>3</sub> PVGPI QWFRGAGPARX <sub>4</sub> LIYNQX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> GX <sub>7</sub> FPRVTTVSEX <sub>8</sub> TK RENMDFSISISX <sub>9</sub> ITPADAGTYYCX <sub>10</sub> KFRKGSPDTEF KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:50	X <sub>1</sub> =V, I; X <sub>2</sub> =V, I; X <sub>3</sub> =I, F; X <sub>4</sub> =E, V; X <sub>5</sub> =K, R; X <sub>6</sub> =E, Q; X <sub>7</sub> =H, P; X <sub>8</sub> =S, T; X <sub>9</sub> =N, A; y X <sub>10</sub> =V, I
51	Dominio D1 Pan	EEELQX <sub>1</sub> IQPDKSVLVAAGETATLRCTX <sub>2</sub> TSLX <sub>3</sub> PVGP IQWFRGAGPGRX <sub>4</sub> LIYNQX <sub>5</sub> EGX <sub>6</sub> FPRVTTVSDX <sub>7</sub> TK RNNMDFSIRIGX <sub>8</sub> ITPADAGTYYCX <sub>9</sub> KFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:51	X <sub>1</sub> =V, I; X <sub>2</sub> =A, I; X <sub>3</sub> =I, F; X <sub>4</sub> =E, V; X <sub>5</sub> =K, R; X <sub>6</sub> =H, P; X <sub>7</sub> =L, T; X <sub>8</sub> = cualquier aminoácido que no sea N; y X <sub>9</sub> =V, I
52	Dominio D1 Pan	EEELQX <sub>1</sub> IQPDKSVLVAAGETATLRCTX <sub>2</sub> TSLX <sub>3</sub> PVGP IQWFRGAGPGRELIYNQX <sub>4</sub> EGX <sub>5</sub> FPRVTTVSDX <sub>6</sub> TKR NNMDFSIRIGX <sub>7</sub> ITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEF KSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:52	X <sub>1</sub> =V, L, I; X <sub>2</sub> =A, I, L; X <sub>3</sub> =I, T, S, F; X <sub>4</sub> =K, R; X <sub>5</sub> =H, P, R; X <sub>6</sub> =L, T, G; y X <sub>7</sub> =N, A
212	Dominio D1 Pan	EEELQX <sub>1</sub> IQPDKSVSVAAGESAILHCTX <sub>2</sub> TSLX <sub>3</sub> PVGPI QWFRGAGPARELIYNQX <sub>4</sub> EGX <sub>5</sub> FPRVTTVSEX <sub>6</sub> TKRE NMDFSISISX <sub>7</sub> ITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSG AGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:212	X <sub>1</sub> =V, L, I; X <sub>2</sub> =V, I, L; X <sub>3</sub> =I, T, S, F; X <sub>4</sub> =K, R; X <sub>5</sub> =H, P, R; X <sub>6</sub> =L, T, G; y X <sub>7</sub> =A
217	Dominio D1 Pan	EEELQX <sub>1</sub> IQPDKSVLVAAGETATLRCTX <sub>2</sub> TSLX <sub>3</sub> PVGP IQWFRGAGPGRX <sub>4</sub> LIYNQX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> GX <sub>7</sub> FPRVTTVSDX <sub>8</sub> TK RNNMDFSIRIGX <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> ADAGTYYCX <sub>13</sub> KFRKGSP DDVEFKSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:217	X <sub>1</sub> =V, L, o I; X <sub>2</sub> =A, V, L o I; X <sub>3</sub> =I, S, T o F; X <sub>4</sub> =E, L, o V; X <sub>5</sub> =K o R; X <sub>6</sub> =E o Q; X <sub>7</sub> =H, R o P; X <sub>8</sub> =S, G, L o T, X <sub>9</sub> = cualquier aminoácido; X <sub>10</sub> = cualquier aminoácido; X <sub>11</sub> = cualquier aminoácido; X <sub>12</sub> = cualquier aminoácido; y X <sub>13</sub> =V o I

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
218	Dominio D1 Pan	EEELQX <sub>1</sub> IQPDKSVLVAAGETATLRCTX <sub>2</sub> TSLX <sub>3</sub> PVGP IQWFRGAGPGRX <sub>4</sub> LIYNQX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> GX <sub>7</sub> FPRVTTVSDX <sub>8</sub> TK RNNMDFSIRIGX <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> ADAGTYYCX <sub>13</sub> KFRKGSP DDVEFKSGAGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:218	X <sub>1</sub> =V, L, o I; X <sub>2</sub> =A, V, L o I; X <sub>3</sub> =I, S, T o F; X <sub>4</sub> =E, L, o V; X <sub>5</sub> =K o R; X <sub>6</sub> =E o Q; X <sub>7</sub> =H, R o P; X <sub>8</sub> =S, G, L o T, X <sub>9</sub> = cualquier aminoácido; X <sub>10</sub> = cualquier aminoácido; X <sub>11</sub> = cualquier aminoácido; X <sub>12</sub> = cualquier aminoácido; y X <sub>13</sub> =V o I
221	Dominio D1 Pan	EEELQX <sub>1</sub> IQPDKSVSVAAGESAILHCTX <sub>2</sub> TSLX <sub>3</sub> PVGPI QWFRGAGPARELIYNQX <sub>4</sub> EGX <sub>5</sub> FPRVTTVSEX <sub>6</sub> TKRE NMDFSISSISX <sub>7</sub> ITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSG AGTELSVRAKPS
-	Sustituciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:212	X <sub>1</sub> =V, L, I; X <sub>2</sub> =V, I, L; X <sub>3</sub> =I, T, S, F; X <sub>4</sub> =K, R; X <sub>5</sub> =H, P, R; X <sub>6</sub> =S, T, G; y X <sub>7</sub> = N o A

En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVLVAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub> FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RN NMDFSIRIGX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYYCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDDVEX<sub>16</sub>KSGAGTELSVRAKPS, (SEQ ID NO: 37) en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V; X<sub>2</sub> es V, L, o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I, o L; X<sub>5</sub> es I, T, S, o F; X<sub>6</sub> es E, V, o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P, o R; X<sub>10</sub> es L, T, o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>14</sub> es V o I; X<sub>15</sub> es F, L, o V; y X<sub>16</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:1.

- 5 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVSVAAGESX<sub>3</sub>ILHCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub> FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RN NMDFSIRIGX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYYCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDDVEX<sub>16</sub>KSGAG TELSVRAKPS, (SEQ ID NO: 40) en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V; X<sub>2</sub> es V, L, o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I, o L; X<sub>5</sub> es I, T, S, o F; X<sub>6</sub> es E, V, o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P, o R; X<sub>10</sub> es L, T, o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>14</sub> es V o I; X<sub>15</sub> es F, L, o V; y X<sub>16</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:4.
- 10 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEGX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVLVAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub> FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RN NMDFSIRIGX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYYCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDDVEX<sub>16</sub>KSGAG TELSVRAKPS, (SEQ ID NO: 40) en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V; X<sub>2</sub> es V, L, o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I, o L; X<sub>5</sub> es I, T, S, o F; X<sub>6</sub> es E, V, o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P, o R; X<sub>10</sub> es L, T, o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>14</sub> es V o I; X<sub>15</sub> es F, L, o V; y X<sub>16</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:4.

- 15 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKFVLVAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub> FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RN NMDFSIRIGX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYYCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDDVEX<sub>16</sub>KSGAG, TELSVRAKPS (SEQ ID NO: 41) en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V; X<sub>2</sub> es V, L, o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I, o L; X<sub>5</sub> es I, T, S, o F; X<sub>6</sub> es E, V, o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P, o R; X<sub>10</sub> es L, T, o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>14</sub> es V o I; X<sub>15</sub> es F, L, o V; y X<sub>16</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:5.

- 20 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVLVAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub> FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RN NMDFPIRIGX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYYCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDDVEX<sub>16</sub>KSGAGTELSVRAKPS, (SEQ ID NO: 42) y en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V; X<sub>2</sub> es V, L, o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I, o L; X<sub>5</sub> es I, T, S, o F; X<sub>6</sub> es E, V, o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P, o R; X<sub>10</sub> es L, T, o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>14</sub> es V o I; X<sub>15</sub> es F, L, o V; y X<sub>16</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:6.
- 25 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVLVAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub> FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RN NMDFPIRIGX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYYCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDDVEX<sub>16</sub>KSGAGTELSVRAKPS, (SEQ ID NO: 42) y en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V; X<sub>2</sub> es V, L, o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I, o L; X<sub>5</sub> es I, T, S, o F; X<sub>6</sub> es E, V, o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P, o R; X<sub>10</sub> es L, T, o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>14</sub> es V o I; X<sub>15</sub> es F, L, o V; y X<sub>16</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:6.

- 30 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVLVAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub> FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RN NMDFPIRIGX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYYCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDDVEX<sub>16</sub>KSGAGTELSVRAKPS, (SEQ ID NO: 42) y en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V; X<sub>2</sub> es V, L, o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I, o L; X<sub>5</sub> es I, T, S, o F; X<sub>6</sub> es E, V, o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P, o R; X<sub>10</sub> es L, T, o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>14</sub> es V o I; X<sub>15</sub> es F, L, o V; y X<sub>16</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:6.

- 35 En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVLVAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub> FPRVTTVSDX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RN

NMDFSIRISX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYYCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDDVEX<sub>16</sub>KSGAGTELSVRAKPS, (SEQ ID NO: 45) y en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V; X<sub>2</sub> es V, L, o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I, o L; X<sub>5</sub> es I, T, S, o F; X<sub>6</sub> es E, V, o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P, o R; X<sub>10</sub> es L, T, o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>14</sub> es V o I; X<sub>15</sub> es F, L, o V; y X<sub>16</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP-α de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:9.

En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, un polipéptido incluye una variante de D1 SIRP-α que tiene una secuencia de una cualquiera de SEQ ID NOs: 37, 40-42 y 45, y en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V. En cualquiera de los anteriores aspectos, X<sub>2</sub> es V, L o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es A o V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es A, I o L. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es I, T, S o F. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>6</sub> es E, V o L. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>7</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>8</sub> es E o Q. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>9</sub> es H, P o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>10</sub> es L, T o G. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>11</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, es X<sub>12</sub> N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>14</sub> es V o r I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>15</sub> es F, L, V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>16</sub> es F o V.

En algunos aspectos, un polipéptido proporcionado en este documento incluye no más de diez sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP-α de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 4-6 y 9. En algunos aspectos, el polipéptido proporcionado en este documento incluye no más de siete aminoácidos sustituciones relativas al dominio D1 SIRP-α de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 4-6 y 9.

En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 10 veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 de SIRP-α de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 4-6 y 9. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 100 veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 de SIRP-α de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 4-6 y 9. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 1000 veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 SIRP-α de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 4-6 y 9. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP-α o un fragmento del mismo se une a CD47 con una K<sub>D</sub> menor que 1 x 10<sup>-8</sup>M, menor que 5 x 10<sup>-9</sup>M, menor que 1 x 10<sup>-9</sup>M, menor que 5 x 10<sup>-10</sup>M, menor que 1 x 10<sup>-10</sup>M o menor que 1 x 10<sup>-11</sup>M. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP-α o un fragmento del mismo se une a CD47 con una K<sub>D</sub> entre aproximadamente 500 nM y 100 nM, entre aproximadamente 100 nM y 50 nM, entre aproximadamente 50 nM y 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y 5 nM, entre aproximadamente 5 nM y 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y 500 pM, entre aproximadamente 500 pM y 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y 50 pM, o entre aproximadamente 50 pM y 10 pM.

En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP-α que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVSVAAGESX<sub>3</sub>ILHCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPARX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSEX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RE NMDFSISISX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYYCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDTEX<sub>16</sub>KSGAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO: 38) X<sub>10</sub> X<sub>11</sub>, en donde X<sub>1</sub> es L, I o V; X<sub>2</sub> es V, L o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I o L; X<sub>5</sub> es I, T, S o F; X<sub>6</sub> es E, V o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P o R; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>14</sub> es V o I; X<sub>15</sub> es F, L o V; y X<sub>16</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP-α de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:2.

En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP-α que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVSVAAGESX<sub>3</sub>ILLCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPARX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSEX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RE NMDFSISISX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYYCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDTEX<sub>16</sub>KSGAGTEL,SVRAKPS (SEQ ID NO: 39) en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V; X<sub>2</sub> es V, L, o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es V, I, o L; X<sub>5</sub> es I, T, S, o F; X<sub>6</sub> es E, V, o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P, o R; X<sub>10</sub> es S, T, o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>14</sub> es V o I; X<sub>15</sub> es F, L, o V; y X<sub>16</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP-α de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:3.

En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP-α que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVSVAAGESX<sub>3</sub>ILHCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPARX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSEX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RE NMDFSISISX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYYCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDTEX<sub>16</sub>KSGAGTEL,SVRGKPS (SEQ ID NO: 43) en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V; X<sub>2</sub> es V, L, o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es V, I, o L; X<sub>5</sub> es I, T, S, o F; X<sub>6</sub> es E, V, o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P, o R; X<sub>10</sub> es S, T, o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>14</sub> es V o I; X<sub>15</sub> es F, L, o V; y X<sub>16</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP-α de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:7.

En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVVAAGESX<sub>3</sub>ILHCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPARX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub>FPRVTTVSEX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RE NMDFSISIX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYYCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDTEX<sub>16</sub>KSGAGTELSVRACKPS, (SEQ ID NO: 46) en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V; X<sub>2</sub> es V, L, o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es V, I, o L; X<sub>5</sub> es I, T, S, o F; X<sub>6</sub> es E, V, o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P, o R; X<sub>10</sub> es S, T, o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>14</sub> es V o I; X<sub>15</sub> es F, L, o V; y X<sub>16</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:10.

En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, un polipéptido incluye una variante de D1 SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de una cualquiera de SEQ ID NOs: 38, 39, 43 y 46 y en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V. En cualquiera de los anteriores aspectos, X<sub>2</sub> es V, L o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es A o V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es V, I o L. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es I, T, S o F. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>6</sub> es E, V o L. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>7</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>8</sub> es E o Q. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>9</sub> es H, P o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>10</sub> es S, T o G. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>11</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>14</sub> es V o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>15</sub> es F, L, V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>16</sub> es F o V.

En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que no tiene más de diez sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 3, 7 y 10. En algunos aspectos, el polipéptido proporcionado en este documento incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene no más de siete aminoácidos sustituciones relativas al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 3, 7 y 10.

En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 10 veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 3, 7 y 10. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 100 veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 3, 7 y 10. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 1000 veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 3, 7 y 10. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una K<sub>D</sub> menor que  $1 \times 10^{-8}$ M, menor que  $5 \times 10^{-9}$ M, menor que  $1 \times 10^{-9}$ M, menor que  $5 \times 10^{-10}$ M, menor que  $1 \times 10^{-10}$ M M o menor que  $1 \times 10^{-11}$ M. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una K<sub>D</sub> entre aproximadamente 500 nM y 100 nM, entre aproximadamente 100 nM y 50 nM, entre aproximadamente 50 nM y 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y 5 nM, entre aproximadamente 5 nM y 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y 500 pM, entre aproximadamente 500 pM y 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y 50 pM, o entre aproximadamente 50 pM y 10 pM.

En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEEX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>IQPDKSVLVAAGETX<sub>3</sub>TLRCTX<sub>4</sub>TSLX<sub>5</sub>PVGPIQWFRGAGPARX<sub>6</sub>LIYNQX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>GX<sub>9</sub> FPRVTTVSEX<sub>10</sub>TX<sub>11</sub>RE NMDFSISIX<sub>12</sub>ITX<sub>13</sub>ADAGTYYCX<sub>14</sub>KX<sub>15</sub>RKGSPDTEX<sub>16</sub>KSGAGTE LSVRAKPS, (SEQ ID NO: 44) en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V; X<sub>2</sub> es V, L, o, I; X<sub>3</sub> es A o V; X<sub>4</sub> es A, I, o L; X<sub>5</sub> es I, T, S, o F; X<sub>6</sub> es E, V, o L; X<sub>7</sub> es K o R; X<sub>8</sub> es E o Q; X<sub>9</sub> es H, P, o R; X<sub>10</sub> es S, T, o G; X<sub>11</sub> es K o R; X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y; X<sub>14</sub> es V o I; X<sub>15</sub> es F, L, o V; y X<sub>16</sub> es F o V; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:8.

En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, un polipéptido incluye una variante que tiene una secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO:44 y en donde X<sub>1</sub> es L, I, o V. En cualquiera de los anteriores aspectos, X<sub>2</sub> es V, L o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es A o V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es A, I o L. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es I, T, S o F. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>6</sub> es E, V o L. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>7</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>8</sub> es E o Q. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>9</sub> es H, P o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>10</sub> es S, T o G. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>11</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>12</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>13</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>14</sub> es V o r I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>15</sub> es F, L, V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>16</sub> es F o V.

En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene no más de diez sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:8. En algunos aspectos, el polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene no más de siete

aminoácidos sustituciones relativas al dominio D1 SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:8.

En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 10 veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:8. En algunos aspectos, el

5 polipéptido se une a CD47 con al menos 100-veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de y SEQ ID NO:8. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 1000-veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de y SEQ ID NO:8. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  menor que  $1 \times 10^{-8}$ , menor que  $5 \times 10^{-9}$ M, menor que  $1 \times 10^{-9}$ M, menor que  $5 \times 10^{-10}$ M, menor que  $1 \times 10^{-10}$ M o menor que  $1 \times 10^{-11}$ M. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  entre aproximadamente 500 nM y 100 nM, entre aproximadamente 100 nM y 50 nM, entre aproximadamente 50 nM y 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y 5 nM, entre aproximadamente 5 nM y 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y 500 pM, entre aproximadamente 500 pM y 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y 50 pM, o entre aproximadamente 50 pM y 10 pM.

10 15 En otro aspecto, la descripción caracteriza un polipéptido que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de:  
 EEX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>QX<sub>3</sub>IQPDKX<sub>4</sub>VX<sub>5</sub>VAAGEX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>LX<sub>9</sub>CTX<sub>10</sub>TSLX<sub>11</sub>PVGPIQWFRGAGPX<sub>12</sub>RX<sub>13</sub>L<sub>14</sub>YNQX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub>FPRVTTVSX<sub>17</sub>X<sub>18</sub>TX<sub>19</sub>RX<sub>20</sub> NMDFX<sub>21</sub>I<sub>22</sub>IX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>ITX<sub>25</sub>ADAGTYYCX<sub>26</sub>KX<sub>27</sub>RKGSPDX<sub>28</sub>X<sub>29</sub>EX<sub>30</sub>KSGAGTELSVRX<sub>31</sub>KPS, (SEQ ID NO: 47) en donde X<sub>1</sub> es E o G; X<sub>2</sub> es L, I, o V; X<sub>3</sub> es V, L, o, I; X<sub>4</sub> es S o F; X<sub>5</sub> es L o S; X<sub>6</sub> es S o T; X<sub>7</sub> es A o V; X<sub>8</sub> es I o T; X<sub>9</sub> es H, R, o L; X<sub>10</sub> es A, V, I, o L; X<sub>11</sub> es I, T, S, o F; X<sub>12</sub> es A o G; X<sub>13</sub> es E, V, o L; X<sub>14</sub> es K o R; X<sub>15</sub> es E o Q; X<sub>16</sub> es H, P, o R; X<sub>17</sub> es D o E; X<sub>18</sub> es S, L, T, o G; X<sub>19</sub> es K o R; X<sub>20</sub> es E o N; X<sub>21</sub> es S o P; X<sub>22</sub> es S o R; X<sub>23</sub> es S o G; X<sub>24</sub> es cualquier aminoácido; X<sub>25</sub> es cualquier aminoácido; X<sub>26</sub> es V o I; X<sub>27</sub> es F, L, V; X<sub>28</sub> es D o está ausente; X<sub>29</sub> es T o V; X<sub>30</sub> es F o V; y X<sub>31</sub> es A o G; y en donde la variante que tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10.

20 25 En algunos aspectos, el polipéptido tiene una secuencia de SEQ ID NO:47, en donde X<sub>1</sub> es E o G. En cualquiera de los aspectos antes mencionados en este aspecto de la descripción, X<sub>2</sub> es L, I o V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es V, L o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es S o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es L o S. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>6</sub> es S o T. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A o V. los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es I o T. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>9</sub> es H, R o L. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>10</sub> es A, V, I o L. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>11</sub> es I, T, S o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>12</sub> es A o G. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>13</sub> es E, V o L. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>14</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>15</sub> es E o Q. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>16</sub> es H, P o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>17</sub> es D o E. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>18</sub> es S, L, T o G. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>19</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>20</sub> es E o N. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>21</sub> es S o P. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>22</sub> es S o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>23</sub> es S o G. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>24</sub> es N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>25</sub> es P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>26</sub> es V o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>27</sub> es F, L, V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>28</sub> es D o está ausente. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>29</sub> es F o V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>30</sub> es A o G.

30 35 40 En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de diez sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10. En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de siete sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10.

45 50 55 60 En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con una afinidad de unión al menos 10 veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con una afinidad de unión al menos 100 veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos una afinidad de unión 1000-veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de uno cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  menor que  $1 \times 10^{-8}$ M, menor que  $5 \times 10^{-9}$ M, menor que  $1 \times 10^{-9}$ M, menor que  $5 \times 10^{-10}$ M, menor que  $1 \times 10^{-10}$ M o menor que  $1 \times 10^{-11}$ M. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  entre aproximadamente 500 nM y 100 nM, entre aproximadamente 100 nM y 50 nM, entre aproximadamente 50 nM y 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y 5 nM, entre aproximadamente 5 nM y 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y 500 pM, entre aproximadamente 500 pM y 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y 50 pM, o entre aproximadamente 50 pM y 10 pM.

En algunos aspectos, un polipéptido incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de:

EEELQX<sub>1</sub>IQPDKSVX<sub>2</sub>VAAGEX<sub>3</sub>AX<sub>4</sub>LX<sub>5</sub>CTX<sub>6</sub>TSXL<sub>7</sub>PVGPIQWFRGAGPX<sub>8</sub>RX<sub>9</sub>LIYNQX<sub>10</sub>X<sub>11</sub>GX<sub>12</sub>FPRVTTVSX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>T  
KRX<sub>15</sub> NMDFSIX<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>ITPADAGTYYCX<sub>19</sub>KFRKG X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>DX<sub>23</sub>EFKSGAGTELSVRACKPS, (SEQ ID NO: 48) en  
donde X<sub>1</sub> es V o I; X<sub>2</sub> es L o S; X<sub>3</sub> es T o S; X<sub>4</sub> es T o I; X<sub>5</sub> es R o H; X<sub>6</sub> es A, V, o I; X<sub>7</sub> es I, R, Y, K o F; X<sub>8</sub> es G o A;  
X<sub>9</sub> es E o V; X<sub>10</sub> es K o R; X<sub>11</sub> es E, D o Q; X<sub>12</sub> es H o P; X<sub>13</sub> es D o E; X<sub>14</sub> es S, L o T; X<sub>15</sub> es N o E; X<sub>16</sub> es R o S; X<sub>17</sub>  
5 es G o S; X<sub>18</sub> es N o A; X<sub>19</sub> es V o I; X<sub>20</sub> es S, I o M; X<sub>21</sub> es P o ausente; X<sub>22</sub> es D o P; y X<sub>23</sub> es V o T, o un fragmento  
del mismo.

En otro aspecto, la descripción caracteriza un polipéptido que incluye una variante D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una  
secuencia de: EEELQX<sub>1</sub>IQPDKSVLVAAGETATLRLCTX<sub>2</sub>TSXL<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>4</sub>LIYNQX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>GX<sub>7</sub>FPRVTTVSDX<sub>8</sub>TKRN

10 NMDFSIRIGX<sub>9</sub>ITPADAGTYYCX<sub>10</sub>KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRACKPS (SEQ ID NO: 49), en donde X<sub>1</sub> es V, L o  
I; X<sub>2</sub> es A, I, V o L; X<sub>3</sub> es I, F, S o T; X<sub>4</sub> es E, V o L; X<sub>5</sub> es K o R; X<sub>6</sub> es E o Q; X<sub>7</sub> es H, P o R; X<sub>8</sub> es L, T, S o G; X<sub>9</sub> es  
A; y X<sub>10</sub> es V o I; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1  
de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1.

15 En algunos aspectos, el polipéptido tiene la secuencia de en donde X<sub>1</sub> es V, L o I. En cualquiera de los aspectos  
mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>2</sub> es A, I, V o L. En cualquiera de los aspectos antes  
mencionados, X<sub>3</sub> es I, F, S o T. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es E, V o L. En cualquiera de  
los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es K o R. los aspectos antes mencionados, X<sub>6</sub> es E o Q. En cualquiera de los  
aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es H, P o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es L, T, S o G.  
aspectos antes mencionados, X<sub>9</sub> es A. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>10</sub> es V o I.

20 En algunos aspectos, el polipéptido tiene un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene al menos identidad de  
secuencia (p. ej., al menos 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de  
identidad de secuencia) a SEQ ID NO:49, en donde cada uno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub> y X<sub>10</sub> no son un  
aminoácido de tipo salvaje.

25 En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de diez sustituciones de  
aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID  
NO:1. En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de siete sustituciones de  
aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID  
NO:1.

30 En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con una afinidad de unión al menos 10 veces mayor que el dominio  
D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, el  
polipéptido se une a CD47 con una afinidad de unión al menos 100 veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo  
salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con  
al menos una afinidad de unión 1000 -veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia  
35 de uno cualquiera de SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento  
del mismo se une a CD47 con una K<sub>D</sub> menor que  $1 \times 10^{-8}$  M, menor que  $5 \times 10^{-9}$  M, menor que  $1 \times 10^{-9}$  M, menor que  
 $5 \times 10^{-10}$  M, menor que  $1 \times 10^{-10}$  M o menor que  $1 \times 10^{-11}$  M. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de  
SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una K<sub>D</sub> entre aproximadamente 500 nM y 100 nM, entre  
aproximadamente 100 nM y 50 nM, entre aproximadamente 50 nM y 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y 5 nM,  
40 entre aproximadamente 5 nM y 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y 500 pM, entre aproximadamente 500 pM y 100  
pM, entre aproximadamente 100 pM y 50 pM, o entre aproximadamente 50 pM y 10 pM.

45 En otro aspecto, la descripción caracteriza un polipéptido que incluye una variante D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una  
secuencia de: EEELQX<sub>1</sub>IQPDKSVSVAAGESAILHCTX<sub>2</sub>TSXL<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPARX<sub>4</sub>LIYNQX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>GX<sub>7</sub>FPRVTTVSEX<sub>8</sub>TKRE  
NMDFSISIX<sub>9</sub>ITPADAGTYYCX<sub>10</sub>KFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRACKPS, (SEQ ID NO: 50), en donde X<sub>1</sub> es V o I; X<sub>2</sub>  
es V o L; X<sub>3</sub> es I o F; X<sub>4</sub> es E o V; X<sub>5</sub> es K o R; X<sub>6</sub> es E o Q; X<sub>7</sub> es H o P; X<sub>8</sub> es S o T; X<sub>9</sub> es N o A; y X<sub>10</sub> es V o I; y en  
donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo  
salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:2.

50 En algunos aspectos, el polipéptido tiene la secuencia de SEQ ID NO:50, en donde X<sub>1</sub> es V o I. En cualquiera de los  
aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>2</sub> es V o L. En cualquiera de los aspectos  
antes mencionados, X<sub>3</sub> es I o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es E o V. En cualquiera de los  
aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es K o R. los aspectos antes mencionados, X<sub>6</sub> es E o Q. En cualquiera de los  
aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es H o P. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es S o T. aspectos  
antes mencionados, X<sub>9</sub> N o A. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>10</sub> es V o I.

55 En algunos aspectos, el polipéptido tiene un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene al menos identidad de  
secuencia (p. ej., al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o  
100% de identidad de secuencia) a SEQ ID NO:50, en donde cada uno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub> y X<sub>10</sub> no  
son un aminoácido de tipo salvaje.

En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de diez sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:2. En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de siete sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:2.

5 En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con una afinidad de unión al menos 10 veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:2. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con una afinidad de unión al menos 100 veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:2. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con 10 al menos una afinidad de unión 1000-veces mayor que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de uno cualquiera de SEQ ID NO:2. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  menor que  $1 \times 10^{-8}M$ , menor que  $5 \times 10^{-9}M$ , menor que  $1 \times 10^{-9}M$ , menor que  $5 \times 10^{-10}M$ , menor que  $1 \times 10^{-10}M$  o menor que  $1 \times 10^{-11}M$ . En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  entre aproximadamente 500 nM y 100 nM, entre 15 aproximadamente 100 nM y 50 nM, entre aproximadamente 50 nM y 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y 5 nM, entre aproximadamente 5 nM y 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y 500pM, entre aproximadamente 500 pM y 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y 50 pM, o entre aproximadamente 50 pM y 10 pM.

20 En otro aspecto, la descripción caracteriza un polipéptido que incluye una variante D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de: EEEELQX<sub>1</sub>IQPDKSVLVAAGETATLRCX<sub>2</sub>TSLX<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>4</sub>LIYNQX<sub>5</sub>EGX<sub>6</sub>FPRVTTVSDX<sub>7</sub>TKRN NMDFSIRIGX<sub>8</sub>ITPADAGTYYCX<sub>9</sub>KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAK PS (SEQ ID NO: 51), en donde X<sub>1</sub> es V o I; X<sub>2</sub> es A o I; X<sub>3</sub> es I o F; X<sub>4</sub> es E o V; X<sub>5</sub> es K o R; X<sub>6</sub> es H o P; X<sub>7</sub> es L o T; X<sub>8</sub> es cualquier aminoácido diferente de N; y X<sub>9</sub> es V o I; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1.

25 En algunos aspectos, el polipéptido tiene la secuencia de SEQ ID NO:51, en donde X<sub>1</sub> es V o I. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>2</sub> es A o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es I o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es E o V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es K o R. los aspectos antes mencionados, X<sub>6</sub> es H o P. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es L o T. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es N o A. aspectos antes mencionados, X<sub>9</sub> es V o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, es V o I. En algunos aspectos, X<sub>4</sub> no es V.

30 En algunos aspectos, el polipéptido tiene la secuencia de SEQ ID NO:51, en donde X<sub>8</sub> es A. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>8</sub> es A y X<sub>1</sub> es V o I. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>8</sub> es A y X<sub>2</sub> es A o I. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>8</sub> es A y X<sub>3</sub> es I o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es A y X<sub>4</sub> es E o V. En algunos aspectos, X<sub>4</sub> no es V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es A y X<sub>5</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es A y X<sub>6</sub> es H o P. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es A y X<sub>7</sub> es A o V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es A y X<sub>9</sub> es V o I.

35 40 En algunos aspectos, el polipéptido tiene la secuencia de SEQ ID NO:51, en donde X<sub>8</sub> es A. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>8</sub> es A y X<sub>1</sub> es I. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>8</sub> es A y X<sub>2</sub> es I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es A y X<sub>3</sub> es F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es A y X<sub>4</sub> es V. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es A y X<sub>5</sub> es R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es A y X<sub>6</sub> es P. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es A y X<sub>7</sub> es T. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>8</sub> es A y X<sub>9</sub> es I.

45 50 En algunos aspectos, el polipéptido tiene un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene al menos identidad de secuencia (p. ej., al menos, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia) a SEQ ID NO:51, en donde cada uno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub> y no son un aminoácido de tipo salvaje.

55 En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de diez sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de siete sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1.

En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 10 veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 100-veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 1. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47

con al menos 1000-veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  menor que  $1 \times 10^{-8}$ M, menor que  $5 \times 10^{-9}$ M, menor que  $1 \times 10^{-9}$ M, menor que  $5 \times 10^{-10}$ M, menor que  $1 \times 10^{-10}$ M o menor que  $1 \times 10^{-11}$ M. En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  entre aproximadamente 500 nM y 100 nM, entre aproximadamente 100 nM y 50 nM, entre aproximadamente 50 nM y 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y 5 nM, entre aproximadamente 5 nM y 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y 500 pM, entre aproximadamente 500 pM y 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y 50 pM, o entre aproximadamente 50 pM y 10 pM.

En otro aspecto, la descripción presenta un polipéptido que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de:

EEELQX<sub>1</sub>IQPDKSVLVAAGETATLRLCTX<sub>2</sub>TSLX<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPGRELIYNQX<sub>4</sub>EGX<sub>5</sub>FPRVTTVSDX<sub>6</sub>TKRN  
NMDFSRIGX<sub>7</sub>ITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO: 52), en donde X<sub>1</sub> es V, L o I; X<sub>2</sub> es A, I o L; X<sub>3</sub> es I, T, S o F; X<sub>4</sub> es K o R; X<sub>5</sub> es H, P o R; X<sub>6</sub> es L, T, S o G; X<sub>7</sub> es N o A; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1.

En algunos aspectos, el polipéptido tiene la secuencia de SEQ ID NO:52, en donde X<sub>1</sub> es V, L o I. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>2</sub> es A, I o L. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es I, T, S o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es H o P. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>6</sub> es L, T o G. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>7</sub> es N o A.

En algunos aspectos, el polipéptido tiene la secuencia de SEQ ID NO:52, en donde X<sub>1</sub> es V o I. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>2</sub> es A o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es I o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es H o P. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>6</sub> es L o T. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, X<sub>7</sub> es N o A.

En algunos aspectos, el polipéptido tiene la secuencia de SEQ ID NO:52, en donde X<sub>7</sub> es A. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>7</sub> es A y X<sub>1</sub> es V o I. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>7</sub> es A y X<sub>2</sub> es A o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>3</sub> es I o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>4</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>5</sub> es H o P. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>6</sub> es L o T.

En algunos aspectos, el polipéptido tiene la secuencia de SEQ ID NO:52, en donde X<sub>7</sub> es A. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>7</sub> es A y X<sub>1</sub> es I. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>7</sub> es A y X<sub>2</sub> es I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>3</sub> es F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>4</sub> es R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>5</sub> es P. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>6</sub> es T.

En algunos aspectos, el polipéptido tiene un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene al menos 85% de identidad de secuencia (p. ej., al menos, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia) a SEQ ID NO:52, en donde cada uno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, y X<sub>7</sub> no es un aminoácido de tipo salvaje.

En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de diez sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de siete sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1.

En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 10 veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 100-veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 1000-veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, los fragmentos incluyen polipéptidos de menos de 10 aminoácidos de longitud, aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, o más de 100 aminoácidos de longitud. Los fragmentos conservan la capacidad de unirse a CD47. Preferiblemente, los polipéptidos variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  y fragmentos del mismo se unen a CD47 con una mayor afinidad que un polipéptido de SIRP- $\alpha$  se une a CD47. Por

ejemplo, en algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  menor que  $1 \times 10^{-8}M$ , menor que  $5 \times 10^{-9}M$ , menor que  $1 \times 10^{-9}M$ , menor que  $5 \times 10^{-10}M$ , menor que  $1 \times 10^{-10}M$  o menor que  $1 \times 10^{-11}M$ . En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  entre aproximadamente 500 nM y 100 nM, entre aproximadamente 100 nM y 50 nM, entre

5 aproximadamente 50 nM y 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y 5 nM, entre aproximadamente 5 nM y 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y 500 pM, entre aproximadamente 500 pM y 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y 50 pM, o entre aproximadamente 50 pM y 10 pM.

En otro aspecto, la descripción caracteriza un polipéptido que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia de:EEELQX<sub>1</sub>IQPDKSVSVAAGESAILHCTX<sub>2</sub>TSLX<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPARELIYNQX<sub>4</sub>EGX<sub>5</sub>FPR

10 VTVSEX<sub>6</sub>TKRE NMDFSISISX<sub>7</sub>ITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS, (SEQ ID NO: 212) en donde X<sub>1</sub> es V, L, o I; X<sub>2</sub> es V, I, o L; X<sub>3</sub> es I, T, S, o F; X<sub>4</sub> es K o R; X<sub>5</sub> es H, P, o R; X<sub>6</sub> es S, T, o G; X<sub>7</sub> es A; y en donde la variante tiene al menos una sustitución de aminoácido con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de SEQ ID NO:2.

15 En algunos aspectos, el polipéptido tiene una secuencia de SEQ ID NO:212, en donde X<sub>1</sub> es V, L, o I. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>2</sub> es V, I, o L. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es I, T, S, o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es H o P. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>6</sub> es S, T, o G. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A.

20 En algunos aspectos, el polipéptido tiene una secuencia de SEQ ID NO:212, en donde X<sub>1</sub> es V o I. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>2</sub> es V o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>3</sub> es I o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>4</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>5</sub> es H o P. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>6</sub> es S o T. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A.

25 En algunos aspectos, el polipéptido tiene una secuencia de SEQ ID NO:212, en donde X<sub>7</sub> es A. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>7</sub> es A y X<sub>1</sub> es V o I. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>7</sub> es A y X<sub>2</sub> es V o I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>3</sub> es I o F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>4</sub> es K o R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>5</sub> es H o P. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>6</sub> es S o T.

30 En algunos aspectos, el polipéptido tiene una secuencia de SEQ ID NO:212, en donde X<sub>7</sub> es A. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>7</sub> es A y X<sub>1</sub> es I. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>7</sub> es A y X<sub>2</sub> es I. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>3</sub> es F. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>4</sub> es R. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>5</sub> es P. En cualquiera de los aspectos antes mencionados, X<sub>7</sub> es A y X<sub>6</sub> es T.

35 En algunos aspectos, el polipéptido tiene un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene al menos 85% de identidad de secuencia (p. ej., al menos, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% identidad de secuencia) a SEQ ID NO:212, en donde cada uno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, y X<sub>7</sub> no es un aminoácido de tipo salvaje.

40 En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de diez sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:2. En algunos aspectos, el polipéptido de este aspecto de la descripción incluye no más de siete sustituciones de aminoácidos con respecto al dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:2.

45 En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 10 veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:2. En algunos aspectos, el polipéptido se une a CD47 con al menos 100-veces mayor afinidad de unión que el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:2. En algunos aspectos, los fragmentos incluyen polipéptidos de menos de 10 aminoácidos de longitud, aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, o más de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud. Los fragmentos conservan la capacidad de unirse a CD47. Preferiblemente, los polipéptidos variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  y fragmentos del mismo se unen a CD47 con una mayor afinidad que un polipéptido de SIRP- $\alpha$  se une a CD47. Por ejemplo, en algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  menor que  $1 \times 10^{-8}M$ , menor que  $5 \times 10^{-9}M$ , menor que  $1 \times 10^{-9}M$ , menor que  $5 \times 10^{-10}M$ , menor que  $1 \times 10^{-10}M$

o menor que  $1 \times 10^{-11} M$ . En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una  $K_D$  entre aproximadamente 500 nM y 100 nM, entre aproximadamente 100 nM y 50 nM, entre aproximadamente 50 nM y 10 nM, entre aproximadamente 10 nM y 5 nM, entre aproximadamente 5 nM y 1 nM, entre aproximadamente 1 nM y 500 pM, entre aproximadamente 500 pM y 100 pM, entre aproximadamente 100 pM y 50 pM, o entre aproximadamente 50 pM y 10 pM.

En el presente documento se describe, en algunos aspectos, un polipéptido que comprende una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia según:

EEELQX<sub>1</sub>IQPDKSVLVAAGETATLRCX<sub>2</sub>TSLX<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>4</sub>LIYNQX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>GX<sub>7</sub>FPRVTTVSDX<sub>8</sub>TKRN

NMDFSIRIGX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>ADAGTYYCX<sub>13</sub>KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS (SEQ ID NO: 218), en donde X<sub>1</sub> es V, L, o I; X<sub>2</sub> es A, V, L o I; X<sub>3</sub> es I, S, T o F; X<sub>4</sub> es E, L o V; X<sub>5</sub> es K o R; X<sub>6</sub> es E o Q; X<sub>7</sub> es H, R o P; X<sub>8</sub> es S, G, L o T; X<sub>9</sub> es cualquier aminoácido; X<sub>10</sub> es cualquier aminoácido; X<sub>11</sub> es cualquier aminoácido; X<sub>12</sub> es cualquier aminoácido; y X<sub>13</sub> es V o I; y en donde la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  tiene al menos dos sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene una secuencia según SEQ ID NO:1.

En algunos aspectos, el polipéptido tiene la secuencia de SEQ ID NO:212, X<sub>9</sub> es A. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>9</sub> es N. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción X<sub>10</sub> es I. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>9</sub> es N y X<sub>10</sub> es P. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>9</sub> es N y X<sub>11</sub> es cualquier aminoácido distinto de S, T, o C. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción X<sub>11</sub> es T. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción X<sub>11</sub> es un aminoácido distinto de T. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción X<sub>12</sub> es P. En cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente en este aspecto de la descripción, X<sub>9</sub> es N y X<sub>12</sub> es cualquier aminoácido distinto de P.

En el presente documento se describe, en algunos aspectos, un polipéptido que comprende una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una secuencia según:

EEELQX<sub>1</sub>IQPDKSVLVAAGETATLRCX<sub>2</sub>TSLX<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>4</sub>LIYNQX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>GX<sub>7</sub>FPRVTTVSDX<sub>8</sub>TKRN

NMDFSIRIGX<sub>9</sub>ITX<sub>10</sub>ADAGTYYCX<sub>11</sub>KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVR (SEQ ID NO: 219), en donde X<sub>1</sub> es V, L, o I; X<sub>2</sub> es A, V, L o I; X<sub>3</sub> es I, S, T o F; X<sub>4</sub> es E, L o V; X<sub>5</sub> es K o R; X<sub>6</sub> es E o Q; X<sub>7</sub> es H, R o P; X<sub>8</sub> es S, G, L o T; X<sub>9</sub> es N; X<sub>10</sub> es cualquier aminoácido diferente de P; y X<sub>11</sub> es V o I; y en donde la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  tiene al menos dos sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene una secuencia según SEQ ID NO:1.

En otro aspecto de la descripción, se describen en el presente documento composiciones que incluyen un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48, o un fragmento de la misma. En algunos aspectos, el polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo se une a CD47 con una mayor afinidad en comparación con la afinidad que un polipéptido SIRP- $\alpha$  se une a CD47. En algunos aspectos, el polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  se une a CD47 con una  $K_D$  menor que  $1 \times 10^{-8} M$  o menor que  $1 \times 10^{-9} M$  menor que  $1 \times 10^{-10} M$  o menor que  $1 \times 10^{-11} M$ . En algunos aspectos, los polipéptidos variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  mencionados anteriormente están unidos o fusionados a un segundo polipéptido. En algunos aspectos, el segundo polipéptido incluye, sin limitación, un polipéptido de Fc, una variante de Fc, un polipéptido de HSA, un péptido de albúmina, un polímero de PEG o un fragmento de los anteriores.

Sin limitar lo anterior, en algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  se selecciona de cualquiera de SEQ ID NOs: 53-87 y 213 se muestra en la Tabla 6

Tabla 6. Polipéptidos variantes de SIRP- $\alpha$

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
53	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGPFPRTTVSETTKRENMDFSIISNITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
54	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVSLFPVGPIQWFRGAGPARELIYNQRQGPFPRTTVSESTKRENMDFSIISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
55	EEELQVIQPDKSVAAGESAILHCTITSFPGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGPFPRTTVSETTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
56	EEELQIIQPDKSVAAGESAILHCTVTSFPGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGPFPRTTVSETTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
57	EEELQIIQPDKSVAAGESAILHCTSLIPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGPFPRTTVSETTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
58	EEELQIIQPDKSVAAGESAILHCTITSFPGPIQWFRGAGPARELIYNQRQGPFPRTTVSETTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
59	EEELQIIQPDKSVAAGESAILHCTITSFPGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGPFPRTTVSETTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
60	EEELQIIQPDKSVAAGESAILHCTITSFPGPIQWFRGAGPARVLIYNQREGPFPRRTVSETTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
61	EEELQIIQPDKSVAAGESAILHCTITSFPGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGHFPRTTVSETTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
62	EEELQIIQPDKSVAAGESAILHCTSLIPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGPFPRTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
63	EEELQIIQPDKSVAAGESAILHCTITSFPGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGPFPRTTVSETTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
64	EEELQVIQPDKSVAAGESAILHCTVTSFPGPIQWFRGAGPARELIYNQREGPFPRRTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
65	EEELQVIQPDKSVAAGESAILHCTVTSFPGPIQWFRGAGPARELIYNQRQGPFPRTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
66	EEELQVIQPDKSVAAGESAILHCTITSFPGPIQWFRGAGPARELIYNQREGPFPRRTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
67	EEELQVIQPDKSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARELIYNQ REGPFPRVTTVSESTKRENMDFSIISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
68	EEELQIIQPDKSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARELIYNQ REGPFPRVTTVSESTKRENMDFSIISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
69	EEELQVIQPDKSVAAGESAILHCTITSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQ REGPFPRVTTVSESTKRENMDFSIISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
70	EEELQIIQPDKSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARELIYNQ REGPFPRVTTVSESTKRENMDFSIISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEFK SGAGTELSVRAKPS
71	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYN QRQGPFPRTVSDLTKRNNMDFSIIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPS
72	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS
73	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYN QREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPS
74	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS
75	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYN QREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPS
76	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYN QREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPS
77	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRTVSDTTKRNNMDFSIIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS
78	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRTVSDTTKRNNMDFSIIGAITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
79	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRQGPFPRTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
80	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
81	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
82	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
83	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
84	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
85	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
86	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
87	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
213	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRQGPFPRTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITVADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS

En algunos aspectos, el polipéptido incluye un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia (p. ej., al menos 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia) a cualquier variante proporcionada en la Tabla 6.

- 5 En algunos aspectos, el polipéptido incluye un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene al menos identidad de secuencia (p. ej., al menos, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia) a en la SEQ ID NOs: 80, 81 o 85 en la Tabla 6.

### III. Variantes de dominio Fc y constructos de fusión

En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92.

En el presente documento también se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A.

Los anticuerpos que se dirigen a los antígenos de la superficie celular pueden desencadenar funciones inmunoestimuladoras y efectoras asociadas con la participación del receptor Fc (FcR) en las células inmunitarias. Existen varios receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión de la región Fc a receptores Fc sobre las superficies celulares desencadena una cantidad de respuestas biológicas que incluyen la fagocitosis de partículas recubiertas por anticuerpos (fagocitosis celular mediada dependientes de anticuerpos, o ADCP), aclaramiento de complejos inmunes, lisis de células recubiertas por anticuerpos mediante células asesinas (citotoxicidad celular mediada dependientes de anticuerpo, o ADCC), y, liberación de mediadores inflamatorios, transferencia de placenta y control de la producción de inmunoglobulina. Por ejemplo, la unión del componente C1 de complemento a anticuerpos puede activar el sistema de complemento. La activación del complemento puede ser importante para la lisis de patógenos celulares. Sin embargo, la activación del complemento también puede estimular la respuesta inflamatoria y también puede estar involucrada en hipersensibilidad autoinmune u otros trastornos inmunológicos. Las regiones Fc variantes con capacidad reducida o ablacionada para unirse a ciertos receptores Fc son útiles para desarrollar anticuerpos terapéuticos y constructos polipeptídicas de fusión Fc que actúan dirigiendo, activando o neutralizando funciones de ligando sin dañar o destruir células o tejidos locales.

En algunos aspectos, un constructo polipeptídico de D1 de SIRP- $\alpha$  comprende una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad no natural unida a un monómero de dominio Fc que forma un dominio Fc que tiene una función efectora ablacionada o reducida.

En algunos aspectos, un monómero de dominio Fc se refiere a una cadena polipeptídica que incluye dominios constantes de anticuerpo segundo y tercero (p. ej., CH2 y CH3). En algunos aspectos, un monómero de dominio Fc también incluye un dominio de bisagra. En algunos aspectos, el monómero del dominio Fc es de cualquier isotipo de anticuerpo de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgE, IgM, IgA e IgD. Además, en algunos aspectos, un monómero de dominio Fc es de cualquier subtipo de IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3 e IgG4). En algunos aspectos, los monómeros del dominio Fc incluyen hasta diez cambios de una secuencia de monómero del dominio Fc de tipo salvaje (p. ej., Sustituciones adiciones o inserciones, delecciones o combinaciones de los mismos de aminoácidos 1-10, 1-8, 1-6, 1-4,) que alteran la interacción entre un dominio Fc y un receptor de Fc.

Como se usa en el presente documento, el término "dominio Fc" se refiere a un dímero de dos monómeros del dominio Fc. En un dominio Fc de tipo salvaje, dos monómeros del dominio Fc se dimerizan mediante la interacción entre los dos CH3 dominios constantes del anticuerpo, así como uno o más enlaces desulfuro que se forman entre los dominios bisagra de los dos monómeros del dominio Fc dimerizados. En algunos aspectos, un dominio Fc se muta para carecer de funciones efectoras, por ejemplo, un "dominio Fc muerto". En algunos aspectos, cada uno de los monómeros del dominio Fc en un dominio Fc incluye sustituciones de aminoácidos en el CH2 dominio constante del anticuerpo para reducir la interacción o unión entre el dominio Fc y un receptor Fc, como un receptor Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R), un receptor Fc $\alpha$  (Fc $\alpha$ R) o un Fc $\epsilon$  (Fc $\epsilon$ R).

En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad (p. ej., cualquiera de las variantes descritas en las Tablas 2, 5 y 6) se fusiona con un monómero de dominio Fc de una inmunoglobulina o un fragmento de un monómero de dominio Fc. En algunos aspectos, un monómero de dominio Fc de una inmunoglobulina o un fragmento de un monómero de dominio Fc es capaz de formar un dominio Fc con otro monómero de dominio Fc. En algunos aspectos, un monómero de dominio Fc o un fragmento de un dominio Fc se fusiona con un polipéptido de la descripción para aumentar la vida media en suero del polipéptido. En algunos aspectos, un monómero de dominio Fc o un fragmento de un monómero de dominio Fc fusionado a un polipéptido de la descripción se dimeriza con un segundo monómero de dominio Fc para formar un dominio Fc que se une a un receptor Fc, o alternativamente, un monómero de dominio Fc se une a un receptor Fc. En algunos aspectos, un dominio Fc o un fragmento del dominio Fc fusionado a un polipéptido para aumentar la vida media en suero del polipéptido no induce ninguna respuesta relacionada con el sistema inmunológico.

En algunos aspectos, un polipéptido o constructo de SIRP- $\alpha$  proporcionado en este documento incluye un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo unido a un primer monómero de dominio Fc y un dominio variable de anticuerpo

unido a un segundo monómero de dominio Fc, en el que el primer y los monómeros del segundo dominio Fc se combinan para formar un dominio Fc (p. ej., un dominio Fc heterodimérico). Un dominio Fc es la estructura de la proteína que se encuentra en el extremo C-terminal de una inmunoglobulina. Un dominio Fc incluye dos monómeros del dominio Fc que están dimerizados por la interacción entre los dominios constantes del anticuerpo CH3. Un dominio

5 Fc de tipo salvaje forma la estructura mínima que se une a un receptor Fc, p. ej., FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγIV.

Los dominios Fc no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan varias funciones efectoras, tal como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo. En algunos aspectos, el dominio Fc en un polipéptido SIRP- $\alpha$  o constructo de la descripción comprende sustituciones, adiciones o inserciones, delecciones de aminoácidos o cualquier combinación de los mismos que conduzca a una función efectora disminuida, como una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos disminuida (ADCC), disminución de la citólisis dependiente del complemento (CDC), desminución de la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP) o cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, los polipéptidos o los constructos de SIRP- $\alpha$  de la descripción se caracterizan por una unión disminuida (p. ej., unión

10 mínima o ausencia de unión) a un receptor Fc humano y unión disminuida (p. ej., Unión mínima o ausencia de unión) a la proteína C1q del complemento. En algunos aspectos, los constructos de SIRP- $\alpha$  de la descripción se caracterizan por una unión disminuida (p. ej., unión mínima o ausencia de unión) a FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIb humano, o cualquier combinación de los mismos, y C1q. Para alterar o reducir una función efectora dependiente de

15 anticuerpos, tal como ADCC, CDC, ADCP o cualquier combinación de los mismos, en algunos aspectos, los dominios Fc en los constructos de SIRP- $\alpha$  de la descripción son de la clase IgG y comprenden uno o más aminoácidos. sustituciones de ácido en E233, L234, L235, G236, G237, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331, o P329 (numeración según el índice de la EU deKabat (Secuencias de proteínas de interés inmunológico, 5<sup>a</sup> edición del Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991))).

20 En algunos aspectos, los constructos polipeptídicos que comprenden una región Fc no nativa descritas en el presente documento presentan unión reducida o ablacionada a al menos uno de los receptores Fc de CD16a, CD32a, CD32b, CD32c, y CD64 en comparación con un constructo polipeptídica que comprende una región Fc nativa. En algunos casos, los constructos polipeptídicos descritas en el presente documento presentan una unión reducida o ablacionada a los receptores Fc de CD16a, CD32a, CD32b, CD32c y CD64.

25 En algunos aspectos, los constructos polipeptídicos que comprenden una región Fc no nativa descritas en el presente documento presentan unión reducida o ablacionada a al menos uno de los receptores Fc de CD16a, CD32a, CD32b, CD32c, y CD64 en comparación con un constructo polipeptídica que comprende una región Fc nativa. En algunos casos, los constructos polipeptídicos descritas en el presente documento presentan una unión reducida o ablacionada a los receptores Fc de CD16a, CD32a, CD32b, CD32c y CD64.

30 CDC se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la cascada del complemento es activada por la unión del componente C1q del complemento al anticuerpo Fc. En algunos aspectos, los constructos polipeptídicos que comprenden una región Fc no nativa descritas en este documento presentan al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o mayor reducción en la unión a C1q en comparación con un constructo polipeptídica que comprende una región Fc de tipo salvaje. En algunos casos, los constructos polipeptídicos que comprenden una

35 región Fc no nativa como se describe en el presente documento presentan CDC reducida en comparación con un constructo polipeptídica que comprende una región Fc de tipo salvaje. En algunos aspectos, los constructos polipeptídicos que comprenden una región Fc no nativa descritas en este documento presentan al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o mayor reducción en la unión en comparación con un constructo polipeptídico que comprende una región Fc de tipo salvaje. En algunos casos, los constructos polipeptídicos que comprenden una región Fc no nativa como se describe en el presente documento presentan CDC reducida en

40 comparación con un constructo polipeptídico que comprende una región Fc de tipo salvaje.

45 En algunos aspectos, las variantes de Fc en este documento están mínimamente glicosiladas o tienen una glicosilación reducida con respecto a una secuencia de tipo salvaje. En algunos aspectos, la desglicosilación se logra con una mutación de N297A, o mutando N297 a cualquier aminoácido que no sea N. En algunos aspectos, la desglicosilación se logra rompiendo el motivo N-Xaa1-Xaa2-Xaa3, donde N = asparagina; Xaa1 = cualquier aminoácido excepto P (prolina); Xaa2 = T (treonina), S (serina) o C (cisteína); y Xaa3 = cualquier aminoácido excepto P (prolina). En un aspecto, el motivo N-Xaa1-Xaa2-Xaa3 se refiere a 297-300 residuos designados según Kabat et al., 1991. En algunos aspectos, una mutación en uno cualquiera o más de N, Xaa1, Xaa2 o Xaa3 da como resultado la desglicosilación de la variante de Fc.

50 En algunos aspectos, las variantes de regiones constantes de anticuerpo IgG (p. ej., variantes de Fc) poseen una capacidad reducida para unirse específicamente a receptores Fc o tienen una capacidad reducida para inducir fagocitosis. En algunos aspectos, las variantes de regiones constantes de anticuerpo IgG de (p. ej., variantes de Fc) poseen una capacidad reducida para unirse específicamente a receptores Fc o tienen una capacidad reducida para inducir fagocitosis. Por ejemplo, en algunos aspectos, un dominio Fc mutar para carecer de funciones efectoras, típicas de un dominio Fc "muerto". Por ejemplo, en algunos aspectos, un dominio Fc incluye sustituciones de aminoácidos

55 específicas que se sabe que minimizan la interacción entre el dominio Fc y un receptor Fc. En algunos aspectos, un monómero de dominio Fc es de un anticuerpo IgG1 e incluye una o más sustituciones de aminoácidos L234A, L235A, G237A y N297A (como se designa según el sistema de numeración EU según Kabat et al., 1991). En algunos aspectos, se incluyen una o más mutaciones adicionales en dicha variante de Fc de IgG1. Los ejemplos no limitantes de tales mutaciones adicionales para variantes de Fc de IgG1 humana incluyen E318A y K322A. En algunos casos,

60 una variante de Fc de IgG1 humana tiene hasta 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o 4 o menos mutaciones en total en comparación con la secuencia de IgG1 humana de tipo salvaje. En algunos aspectos, se incluyen una o más mutaciones adicionales en dicha variante de Fc de IgG1. Por ejemplo, en algunos aspectos, la lisina C-terminal de la región constante de la

cadena pesada de Fc de IgG1 proporcionada en SEQ ID NO:88 en la Tabla 7 se elimina, por ejemplo, para aumentar la homogeneidad del polipéptido cuando el polipéptido se produce en células bacterianas o de mamíferos. En algunos casos, una variante de Fc de IgG1 humana tiene hasta 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o 4 o menos mutaciones en total en comparación con la secuencia de IgG1 humana de tipo salvaje. En algunos aspectos, una variante de Fc de IgG1 tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NO:135, SEQ ID NO:136, o SEQ ID NO:137.

En algunos aspectos, un monómero de dominio Fc es de un anticuerpo IgG2 o IgG4 e incluye sustituciones de aminoácidos A330S, P331S o ambos A330S y P331S. Las posiciones de aminoácidos mencionadas anteriormente se definen según Kabat, et al. (1991). La numeración de residuos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo determinado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia de anticuerpos con una secuencia de numeración de Kabat "estándar". En algunos aspectos, la variante de Fc comprende una secuencia Fc de IgG2 humana que comprende una o más sustituciones de aminoácidos A330S, P331S y N297A (como se designa según el sistema de numeración EU según Kabat, et al (1991)). En algunos aspectos, se incluyen una o más mutaciones adicionales en dicha variante de Fc de IgG2. Los ejemplos no limitantes de tales mutaciones adicionales para la variante de Fc de IgG2 humana incluyen V234A, G237A, P238S, V309L y H268A (como se designa según el sistema

10 de numeración de la UE según Kabat et al. (1991)). En algunos casos, una variante de Fc de IgG2 humana tiene hasta 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o menos mutaciones en total en comparación con la secuencia de IgG2 humana de tipo salvaje. En algunos aspectos, se incluyen una o más mutaciones adicionales en dicha variante de Fc de IgG2. Por ejemplo, en algunos aspectos, la lisina C-terminal de la región constante de la cadena pesada de Fc de IgG2 proporcionada en SEQ ID NO:89 en la Tabla 7 se elimina, por ejemplo, para aumentar la homogeneidad del polipéptido

15 cuando el polipéptido se produce en células bacterianas o de mamíferos. En algunos casos, una variante de Fc de IgG2 humana tiene hasta 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o 4 o menos mutaciones en total en comparación con la secuencia de IgG2 humana de tipo salvaje.

20 Cuando la variante de Fc es una variante de Fc de IgG4, en algunos aspectos, dicha variante de Fc comprende una mutación S228P (como se designa según Kabat, et al. (1991)). En algunos casos, una variante de Fc de IgG4 humana tiene hasta 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mutación(es) en total en comparación con la secuencia de IgG4 humana de tipo salvaje.

25 En algunos aspectos, la variante de Fc incluye al menos una de las mutaciones L234A, L235A, G237A o N297A de una región Fc de IgG1 o al menos una de las mutaciones A330S, P331S o N297A de una región Fc de IgG2. En algunos aspectos, la variante de Fc incluye al menos una de las mutaciones L234A, L235A, G237A o N297A de una

30 región Fc de IgG1 o al menos una de las mutaciones L234A, L235A, G237A o N297A de una región Fc de IgG2. En algunos aspectos, la variante de Fc incluye al menos una de las mutaciones A330S, P331S o N297A de una región Fc de IgG1 o al menos una de las mutaciones L234A, L235A, G237A o N297A de una región Fc de IgG2. En algunos aspectos, la variante de Fc consiste en las mutaciones A330S, P331S y N297A

35 En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una unión reducida a un receptor Fc del sujeto en comparación con la región Fc de IgG humana de tipo salvaje. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una unión reducida a un receptor Fc del sujeto en comparación con la región Fc de IgG humana de tipo salvaje. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una reducción de la fagocitosis en comparación con la región Fc de IgG humana de tipo salvaje. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una reducción de la fagocitosis en comparación con la región

36 Fc de IgG humana de tipo salvaje.

40 SEQ ID NO:88 y SEQ ID NO: 89 proporcionan secuencias de aminoácidos de regiones constantes de cadena pesada de Fc IgG1 e IgG2. En algunos aspectos, una variante de Fc es cualquier variante de SEQ ID NOs: 90-95 como se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Secuencias de aminoácidos de variantes de Fc

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
88	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

SEQ NO:	ID	Secuencia de aminoácidos
89		STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTQTYTCNDHKPSNTKVDKTVERK CCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVHQLDWLNGKEYK CKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMMLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
90		DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
91		DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
92		VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISIKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMMLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
93		VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISIKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMMLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
94		ERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISIKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMMLDSDGSSFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
95		ERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISIKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMMLDSDGSSFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5 La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, que también se denomina en el presente documento ADCC, se refiere a una forma de citotoxicidad en donde la Ig secretada se une a los receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (p. ej., células asesinas naturales (NK) y neutrófilos) permitiendo que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente maten a la célula diana. La fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos, que también se refieren en el presente documento ADCP, se refiere a una forma de citotoxicidad en donde la Ig secretada se une a los receptores Fc (FcR)

presentes en ciertas células fagocíticas (p. ej., macrófagos) que permiten que estas células efectoras fagocíticas se unen específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente engullen y digieren la célula diana. Los anticuerpos IgG de alta afinidad específicos de ligando dirigidos a la superficie de las células diana pueden estimular las células citotóxicas o fagocíticas y pueden usarse para tal destrucción. En algunos aspectos, los constructos polipeptídicos que comprenden una variante de Fc como se describe en el presente documento presentan ADCC o ADCP reducida en comparación con un constructo polipeptídico que comprende una región Fc de tipo salvaje. En algunos aspectos, los constructos polipeptídicos que comprenden una variante de Fc descritas en el presente documento presentan al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% o mayor reducción en ADCC o ADCP en comparación con un constructo polipeptídico que comprende una región Fc de tipo salvaje. En algunos aspectos, los constructos polipeptídicos que comprenden una variante de Fc como se describe en el presente documento presentan ADCC o ADCP reducida en comparación con un constructo polipeptídica que comprende una región Fc de tipo salvaje.

La citotoxicidad dirigida por complemento, que también se denomina en el presente documento CDC, se refiere a una forma de citotoxicidad en donde la cascada del complemento se activa mediante la unión del componente C1q del complemento al anticuerpo Fc. En algunos aspectos, los constructos polipeptídicos que comprenden una región Fc no nativa descritas en este documento presentan al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% o mayor reducción en la unión de C1q en comparación con un constructo polipeptídico que comprende una región Fc de tipo salvaje. En algunos casos, los constructos polipeptídicos que comprenden una variante de Fc como se describe en el presente documento presentan CDC reducida en comparación con un constructo polipeptídico que comprende una región Fc de tipo salvaje. En algunos aspectos, los constructos polipeptídicos que comprenden una región Fc descritas en este documento presentan al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o mayor reducción en la unión en comparación con un constructo polipeptídico que comprende una región Fc de tipo salvaje. En algunos casos, los constructos polipeptídicos que comprenden una región Fc como se describe en el presente documento presentan CDC reducida en comparación con un constructo polipeptídico que comprende una región Fc de tipo salvaje.

Las variantes de Fc en el presente documento incluyen aquellas que presentan una unión reducida a un receptor Fcγ en comparación con la región Fc de IgG humana de tipo salvaje. Por ejemplo, en algunos aspectos, una variante de Fc presenta unión a un receptor Fcγ que es menor que la unión exhibida por una región Fc de IgG humana de tipo salvaje a un receptor Fcγ, como se describe en los Ejemplos. En algunos casos, una variante de Fc ha reducido la unión a un receptor Fcγ en un factor de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% (función efectora completamente reducida). En algunos aspectos, la unión reducida es para uno o más receptores Fcγ, p. ej., CD16a, CD32a, CD32b, CD32c o CD64.

En algunos casos, las variantes de Fc descritas en el presente documento presentan una reducción de la fagocitosis en comparación con su región Fc de IgG humana de tipo salvaje. Dichas variantes de Fc presentan una reducción de la fagocitosis en comparación con su región Fc de IgG humana de tipo salvaje, en donde la reducción de la actividad de fagocitosis es, p. ej., por un factor de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o 100%. En algunos casos, una variante de Fc presenta fagocitosis ablacionada en comparación con su región Fc de IgG humana de tipo salvaje.

En algunos aspectos, las variantes de Fc descritas en este documento están acopladas a uno o más socios de fusión. En algunos casos, el socio de fusión es un resto terapéutico. En algunos casos, el socio de fusión se selecciona para permitir el direccionamiento de una proteína expresada, purificación, selección, presentación y similares. En algunos aspectos, el socio de fusión también afecta el grado de unión a los receptores Fc o el grado de reducción de la fagocitosis. Como se describe en el presente documento, en algunos aspectos, cuando una variante de Fc se acopla a un socio de fusión, forma un constructo polipeptídico como se describe a continuación.

En algunos aspectos, los socios de fusión están vinculados a la secuencia variante de Fc a través de una secuencia enlazadora. En algunos aspectos, la secuencia del enlazador generalmente comprende un pequeño número de aminoácidos, como menos de diez aminoácidos, aunque también se usan enlazadores más largos. En algunos casos, el enlazador tiene una longitud menor que 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos o menos. En algunos casos, el enlazador tiene una longitud de al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30 o 35 aminoácidos o más. Opcionalmente, en algunos aspectos, se emplea un enlazador escindible.

En algunos aspectos, un socio de fusión es una secuencia de señalización o de direccionamiento que dirige una proteína variante de Fc y cualquier socio de fusión asociado a una ubicación celular deseada o al medio extracelular. En algunos aspectos, ciertas secuencias de señalización se dirigen a una proteína para que sea secretada en el medio de crecimiento o en el espacio periplásmico, ubicado entre la membrana interna y externa de la célula. En algunos aspectos, un socio de fusión es una secuencia que codifica un péptido o proteína que permite la purificación o el cribado. Dichos socios de fusión incluyen, entre otros, etiquetas de polihistidina (etiquetas His) (por ejemplo, His6 y His10) u otras etiquetas para su uso con sistemas de cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) (p. ej., Columnas de afinidad Ni 2+), fusiones GST, Fusiones de MBP, Strep-tag, la secuencia diana de biotinilación de BSP de la enzima bacteriana BirA y etiquetas de epítopo que están dirigidas por anticuerpos (por ejemplo, etiquetas c-myc, etiquetas de bandera y similares).

En algunos aspectos, tales etiquetas son útiles para purificación, cribado o ambos. Por ejemplo, en algunos aspectos, una variante de Fc se purifica usando una etiqueta de His inmovilizándola en una columna de afinidad de Ni<sup>+2</sup>, y luego, después de la purificación, se usa la misma etiqueta de His para inmovilizar el anticuerpo en una placa recubierta de Ni<sup>+2</sup> para realizar un ELISA u otro ensayo de unión como se describe en otra parte de este documento.

5 En algunos aspectos, un socio de fusión permite el uso de un método de selección para cribar variantes de Fc como se describe en el presente documento.

Se encuentran disponibles varios socios de fusión que permiten una variedad de métodos de selección. Por ejemplo, fusionando los miembros de una biblioteca de variantes de Fc con la proteína del gen III, se puede emplear la presentación de fagos. En algunos aspectos, los socios de fusión permiten etiquetar variantes de Fc. Alternativamente, 10 en algunos aspectos, un socio de fusión se une a una secuencia específica en el vector de expresión, lo que permite que el socio de fusión y la variante de Fc asociada se unan covalente o no covalentemente con el ácido nucleico que los codifica.

En algunos aspectos, cuando un socio de fusión es un resto terapéutico, el resto terapéutico es, p. ej., un péptido, una 15 proteína, un anticuerpo, un ARNip o una molécula pequeña. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos terapéuticos que se acoplan a las variantes de Fc de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que reconocen CD47. Los ejemplos no limitantes de polipéptidos terapéuticos que se acoplan a las variantes de Fc de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, CD47 polipéptidos de unión a, incluyendo polipéptidos SIRP- $\alpha$ . En tales casos, el CD47 polipéptido de unión se une o fusiona a una variante de Fc de la descripción. Los ejemplos de 20 CD47 polipéptidos de unión incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-CD47 o fragmentos de los mismos, y ligandos CD47 tales como SIRP- $\alpha$  o un fragmento del mismo. Los ejemplos adicionales de CD47 polipéptidos de unión incluyen, pero no se limitan a, formas naturales de SIRP- $\alpha$  así como mutantes del mismo.

En algunos aspectos, en el presente documento también se describen, un polipéptido que comprende una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que 25 consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A. En algunos aspectos, los monómeros del dominio Fc son idénticos (es decir, homodímero). En algunos aspectos, los monómeros del dominio Fc son diferentes (es decir, heterodímero). En algunos aspectos, al menos uno de los monómeros del dominio Fc es una región Fc de IgG1 humana que 30 consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A. En algunos aspectos, al menos uno de los monómeros del dominio Fc es una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una unión ablacionada o reducida a un receptor Fc $\gamma$  en comparación con una versión de tipo salvaje de una región Fc de IgG humana. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta unión ablacionada o reducida a 35 receptores Fc $\gamma$  de CD16a, CD32a, CD32b, CD32c y CD64 en comparación con una versión de tipo salvaje de una región Fc de IgG humana. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una unión ablacionada o reducida a un receptor C1q en comparación con una versión de tipo salvaje de una fusión Fc de IgG humana. En algunos aspectos, al menos uno de los monómeros del dominio Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una unión 40 ablacionada o reducida a un receptor Fc $\gamma$  en comparación con una versión de tipo salvaje de una región Fc de IgG4 humana. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una unión ablacionada o reducida a los receptores Fc $\gamma$  de CD16a y CD32b en comparación con una versión de tipo salvaje de una región Fc de IgG4 humana. En algunos aspectos, la variante de Fc se une a un receptor Fc $\gamma$  con una KD mayor que aproximadamente 5 x 10<sup>-6</sup>M.

En algunos aspectos, la variante de Fc comprende además un polipéptido de unión CD47. En algunos aspectos, la variante de Fc presenta una unión ablacionada o reducida a un receptor Fc $\gamma$  en comparación con una versión de tipo salvaje de una región Fc de IgG humana. En algunos aspectos, el polipéptido de unión a CD47 no causa anemia 45 aguda en roedores y primates no humanos. En algunos aspectos, el polipéptido de unión a CD47 no causa anemia aguda en humanos.

En algunos aspectos, el polipéptido de unión a CD47 es un polipéptido de proteína reguladora de señal  $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) o un fragmento del mismo. En algunos aspectos, el polipéptido SIRP- $\alpha$  comprende una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que 50 comprende la secuencia de aminoácidos, EEEELQX<sub>1</sub>IQPDKSVLVAAGETATLRCX<sub>2</sub>TSX<sub>3</sub>PVGPIQWFRGAGPGRX<sub>4</sub>LIYNQX<sub>5</sub>EGX<sub>6</sub>FP RVTIVSDX<sub>7</sub>TKRN NMDFSIRIGX<sub>8</sub>ITPADAGTYYCX<sub>9</sub>KFRKGSPDDVEFKSGAGTELVRK PS (SEQ ID NO: 51), en donde X<sub>1</sub> es V o I; X<sub>2</sub> es A o I; X<sub>3</sub> es I o F; X<sub>4</sub> es E o V; X<sub>5</sub> es K o R; X<sub>6</sub> es H o P; X<sub>7</sub> es L o T; X<sub>8</sub> es cualquier aminoácido que no sea N; y X<sub>9</sub> es V o I. En algunos aspectos, el polipéptido SIRP- $\alpha$  comprende una variante D1 de SIRP- $\alpha$  en 55 donde X<sub>1</sub> es V o I; X<sub>2</sub> es A o I; X<sub>3</sub> es I o F; X<sub>4</sub> es E; X<sub>5</sub> es K o R; X<sub>6</sub> es H o P; X<sub>7</sub> es L o T; X<sub>8</sub> no es N; y X<sub>9</sub> es V.

En ciertos aspectos, en el presente documento, se describen un polipéptido que comprende: una variante de D1 de la proteína reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ), en donde la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  es un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad no natural, en donde la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  se une al CD47 humano con una afinidad que es al menos 10 veces mayor que la afinidad de un dominio D1 de origen natural; y un monómero del dominio Fc, en donde el monómero del dominio Fc está unido a un segundo polipéptido que comprende un segundo monómero del dominio Fc para formar un dominio Fc, en donde el dominio Fc tiene una función efectora ablacionada o reducida. En algunos 60

aspectos, el dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad no natural comprende una mutación de aminoácido en el residuo 80.

En el presente documento se describen polipéptidos que comprenden una variante de D1 de SIRP- $\alpha$ , en donde la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  se une a CD47 de una primera especie con una KD menor que 250 nM; y en donde la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  se une a CD47 de una segunda especie con una KD menor que 250 nM; y la KD para CD47 de la primera especie y la KD para CD47 de la segunda especie están dentro de 100 veces entre sí; en donde la primera especie y la segunda especie se seleccionan del grupo que consiste en: primate humano, roedor y no humano. En algunos aspectos, la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  se une a CD47 de al menos 3 especies diferentes. En algunos aspectos, el primate no humano es el mono cynomolgus.

- 5 En algunos aspectos, en el presente documento, el polipéptido comprende: (a) un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  que se une a CD47 humano con una KD menor que 250 nM; y (b) un monómero de dominio Fc unido al extremo N-terminal o al extremo C-terminal del dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , en donde el polipéptido no causa anemia aguda en roedores y primates no humanos. En algunos aspectos, el polipéptido es una variante no natural de un SIRP- $\alpha$  humano. En algunos aspectos, la administración del polipéptido *in vivo* da como resultado una reducción de la hemoglobina en menos de 10
- 10 15 20 25 30 35 40 50% durante la primera semana después de la administración. En algunos aspectos, la administración del polipéptido en humanos da como resultado una reducción de la hemoglobina en menos de 50% durante la primera semana después de la administración. En algunos aspectos, el polipéptido comprende además al menos una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un monómero de dominio seleccionado de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A. En algunos aspectos, al menos uno de los monómeros del dominio Fc es una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A. En algunos aspectos, al menos uno de los monómeros del dominio Fc es una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A.
- 25 Los constructos SIRP- $\alpha$  de la descripción incluyen un dominio SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo que tiene su terminal C unido al terminal N de un monómero de dominio Fc por medio de un enlazador usando medios genéticos o químicos convencionales, p. ej., conjugación química. En algunos aspectos, se inserta un enlazador (p. ej., un espaciador) entre el polipéptido y el monómero del dominio Fc. En algunos aspectos, un polipéptido de la descripción que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se fusiona con un monómero de dominio Fc que es incapaz de formar un dímero. En algunos aspectos, un polipéptido de la descripción se fusiona con un monómero de dominio Fc que es capaz de formar un dímero, p. ej., un heterodímero, con otro monómero de dominio Fc. En algunos aspectos, un polipéptido de la descripción se fusiona con un monómero de dominio Fc y esta proteína de fusión forma un homodímero. En algunos aspectos, un polipéptido de la descripción se fusiona con un primer monómero de dominio Fc y una proteína o péptido diferente (p. ej., una región variable de anticuerpo) se fusiona con un segundo monómero de dominio Fc. En algunos aspectos, un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo se une a un primer monómero de dominio Fc y una proteína terapéutica (por ejemplo, una citocina, una interleucina, un antígeno, un esteroide, un agente antiinflamatorio o un agente inmunomodulador) se une a un segundo monómero de dominio Fc. En algunos aspectos, los monómeros del primer y segundo dominio Fc forman un heterodímero.
- 30 35 40 Sin limitar lo anterior, en algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  (p. ej., cualquiera de las variantes descritas en las Tablas 2, 5 y 6) se fusiona con un polipéptido Fc o un polipéptido variante de Fc, tal como un monómero de dominio Fc. Ejemplos de polipéptidos que comprenden un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  y un polipéptido variante de Fc fusionado incluyen, pero no se limitan a, SEQ ID NOS: 96-137, 214 y 216 se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Polipéptidos que comprenden variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  fusionadas con variantes de Fc

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
96	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKHTCPPCPAPEAAGAPSFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
97	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYN QRQGPFPRTTVDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
98	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVL IYNQ RQGPFPRTTVDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCIKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYASTY R VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPV YTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
99	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYN QRQGPFPRTTVDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
100	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYN QREGPFPRVTTVDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
101	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYN QREGPFPRVTTVDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
102	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
103	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYN QREGPFPRVTTVSDTTKRNNDLDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPP LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
104	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNNDLDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
105	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRVIYNQ RQGPFPRTTVSDTTKRNNDLDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
106	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYN QRQGPFPRTTVSDLTKRNNDLDFSIRIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTV VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
107	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVDLTKRNNMDFSIIRGAITPADAGTYYCIFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
108	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRQGPFPRTTVDLTKRNNMDFSIIRGAITPADAGTYYCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
109	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVDLTKRNNMDFSIIRGAITPADAGTYYCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
110	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVDLTKRNNMDFSIIRGAITPADAGTYYCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
111	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQREGPFPRVTTVDLTKRNNMDFSIIRGAITPADAGTYYCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
112	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
113	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
114	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVIYNNQRQGPFPRTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
115	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
116	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVIYNNQRQGPFPRTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
117	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTGQPREPQVYTLPPSREEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
118	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
119	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSFLPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
120	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSFLPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
121	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSFLPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
122	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSFLPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFASTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
123	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSFLPVGPIQWFRGAGPGRVLINYQRQGPFPRTTVDSTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
124	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRTTVDSTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK
125	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRTTVDSTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK
126	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRTTVDSTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSERKCCVECPCAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK
127	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRTTVDSTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSERKCCVECPCAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK
128	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRTTVDSTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSERKCCVECPCAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVV SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK
129	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRTTVDSTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSERKCCVECPCAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVV SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
130	EEELQVIQPDKSLSVAAGESAILHCTVTSIPLVGPIQWFRGAGPARELIYNQ KEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFRKGSPDTEF KSGAGTELSVRAKPSESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSGK
131	EEELQIIQPDKSLSVAAGETATLRCTITSIFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSGK
132	EEELQIIQPDKSLSVAAGETATLRCTITSIFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSGK
133	EEELQIIQPDKSLSVAAGETATLRCTITSIFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSGK
134	EEELQIIQPDKSLSVAAGETATLRCTITSIFPVGPIQWFRGAGPGRVLINYQ RQGPFPRTTVSDTTKRNMDFSIRIGNITPADAGTYYC1KFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSAAAPPCCPAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
135	EEELQVIQPDKSLSVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYN QREGPFPRVTTVSDLTKRNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPKPKDTLM SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
136	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
137	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
214	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYN QREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFASTFRV VS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPVYTLPP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
216	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQ RQGPFPRTTVDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVS VLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

En algunos aspectos, el polipéptido tiene un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene al menos 85% de identidad de secuencia (p. ej., al menos, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% identidad de secuencia) a cualquier variante en la Tabla 8.

- 5 En algunos aspectos, el polipéptido tiene un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia (p. ej., al menos, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% identidad de secuencia) a SEQ ID NOs: 98-104, 107-113, 116-122, 135-137 en la Tabla 8.
- 10 En algunos aspectos, el polipéptido comprende (a) una proteína reguladora de señal  $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) variante D1, en donde la variante D1 de SIRP- $\alpha$  comprende la secuencia de aminoácidos EEX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>QX<sub>3</sub>IQPDKX<sub>4</sub>VX<sub>5</sub>VAAGEX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>LX<sub>9</sub>CTX<sub>10</sub>TSLX<sub>11</sub>PVGPIQWFRGAGPX<sub>12</sub>RX<sub>13</sub>LIYNQX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>GX<sub>16</sub>FPRVTTVSX<sub>17</sub>X<sub>18</sub>TX<sub>19</sub>RX<sub>20</sub> NMDFX<sub>21</sub>IX<sub>22</sub>IX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>ITX<sub>25</sub>ADAGTYYCX<sub>26</sub>KX<sub>27</sub>RKGSPDX<sub>28</sub>X<sub>29</sub>EX<sub>30</sub>KSGAGTELSVRX<sub>31</sub>KPS (SEQ ID NO: 47), en donde X<sub>1</sub> es E, o G; X<sub>2</sub> es L, I o V; X<sub>3</sub> es V, L o I; X<sub>4</sub> es S, o F; X<sub>5</sub> es L, o S; X<sub>6</sub> es S, o T; X<sub>7</sub> es A, o V; X<sub>8</sub> soy yo, o T; X<sub>9</sub> es H, R o L; X<sub>10</sub> es A, V, I o L; X<sub>11</sub> es I, T, S o F; X<sub>12</sub> es A, o G; X<sub>13</sub> es E, V o L; X<sub>14</sub> es K, o R; X<sub>15</sub> es E, o Q; X<sub>16</sub> es H, P o R; X<sub>17</sub> es D, o E; X<sub>18</sub> es S, L, T o G; X<sub>19</sub> es K, o R; X<sub>20</sub> es E, o N; X<sub>21</sub> es S, o P; X<sub>22</sub> es S, o R; X<sub>23</sub> es S, o G; X<sub>24</sub> es cualquier aminoácido; X<sub>25</sub> es cualquier aminoácido; X<sub>26</sub> es V, o I; X<sub>27</sub> es F, L o V; X<sub>28</sub> es D o está ausente; X<sub>29</sub> es T, o V; X<sub>30</sub> es F, o V; y X<sub>31</sub> es A, o G; y donde la variante D1 de SIRP- $\alpha$  tiene al menos dos sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje que tiene una secuencia según cualquiera

de SEQ ID NOs: 1 a 10; y (b) una variante de Fc que comprende un dominio Fc dímero que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc es independientemente (i) una región Fc de IgG1 humana que comprende una mutación N297A; (ii) una región Fc de IgG1 humana que comprende mutaciones L234A, L235A, y G237A; (iii) una región Fc de IgG1 humana que comprende mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (iv) una

5 región Fc de IgG2 humana que comprende una mutación N297A; (v) una región Fc de IgG2 humana que comprende mutaciones A330S y P331S; (vi) una región Fc de IgG2 humana que comprende mutaciones A330S, P331S y N297A; (vii) una región Fc de IgG4 humana que comprende mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A y delG236; o (viii) una región Fc de IgG4 humana que comprende mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A.

10 En algunos aspectos, el polipéptido comprende una variante D1 de SIRP- $\alpha$  en donde la variante D1 de SIRP- $\alpha$  comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO:47; una variante de Fc que comprende un dímero del dominio Fc que tiene dos monómeros del dominio Fc, en donde uno de los monómeros del dominio Fc en el dominio Fc dímero comprende una región de Fc de IgG1 humana que comprende las mutaciones de L234A, L235A, G237A y N297A.

#### ***Dimerización de monómeros de dominio Fc***

15 En algunos aspectos, un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  (p. ej., cualquiera de las variantes descritas en las Tablas 2, 5 y 6) se fusiona con un primer monómero de dominio Fc en el extremo N-terminal o en el C-terminal. En algunos aspectos, el primer monómero del dominio Fc es incapaz de formar un dominio Fc o un dímero. En algunos aspectos, el primer monómero de dominio Fc se combina con un segundo monómero de dominio Fc para formar un dominio Fc o un dímero. En algunos aspectos, los monómeros del primer y segundo dominio Fc incluyen sustituciones 20 de aminoácidos que promueven la heterodimerización entre los monómeros del primer y segundo dominio.

25 En algunos aspectos, cada uno de los dos monómeros del dominio Fc en un dominio Fc incluye sustituciones de aminoácidos que promueven la heterodimerización de los dos monómeros. En algunos aspectos, un constructo SIRP- $\alpha$  se forma, por ejemplo, a partir de una primera subunidad que incluye un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  fusionado a un primer monómero de dominio Fc y una segunda subunidad que incluye un segundo monómero de dominio Fc (p. ej., sin un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  o cualquier otro polipéptido). En algunos aspectos, un constructo tiene un único polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  unido a un dominio Fc (p. ej., brazo único). En algunos aspectos, un constructo tiene dos polipéptidos variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  unido a un dominio Fc (p. ej., doble brazo). En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una  $K_D$  de aproximadamente 500 nM es particularmente útil en un constructo de doble brazo. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una  $K_D$  de 30 aproximadamente 50 nM es particularmente útil en un constructo de doble brazo. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una  $K_D$  de aproximadamente 5 nM es útil en un constructo de brazo doble y un constructo de brazo único. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una  $K_D$  de aproximadamente 500 pM es útil en un constructo de brazo doble y un constructo de brazo único. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una  $K_D$  de aproximadamente 100 pM es útil en un constructo de brazo doble y un constructo de 35 brazo único. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una  $K_D$  de aproximadamente 50 pM es útil en un constructo de brazo doble y un constructo de brazo único. En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una  $K_D$  de aproximadamente 10 pM es útil en un constructo de brazo doble y un constructo de brazo único.

40 En algunos aspectos, la heterodimerización de los monómeros del dominio Fc se promueve introduciendo sustituciones diferentes, pero compatibles, en los dos monómeros del dominio Fc, tales como pares de residuos de "botón en ojal" y pares de residuos de carga. La interacción botón y ojal favorece la formación de heterodímeros, mientras que la interacción botón-botón y ojal-oval dificultan la formación de homodímeros debido al choque estérico y la eliminación de interacciones favorables. Un ojal se refiere a un vacío que se crea cuando un aminoácido original en una proteína se reemplaza con un aminoácido diferente que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño. Un botón se refiere a una protuberancia que se crea cuando un aminoácido original en una proteína se reemplaza con un 45 aminoácido diferente que tiene un volumen de cadena lateral mayor. Por ejemplo, en algunos aspectos, un aminoácido que se reemplaza está en el CH3 dominio constante del anticuerpo de un monómero del dominio Fc y está involucrado en la dimerización de dos monómeros del dominio Fc. En algunos aspectos, CH3 se crea un ojal en un dominio constante de anticuerpo para acomodar un botón en otro CH3 dominio constante de anticuerpo, de manera que los aminoácidos del botón y del ojal actúan para promover o favorecer la heterodimerización de los dos monómeros del dominio Fc. En algunos aspectos, CH3 se crea un ojal en un dominio constante de anticuerpo para acomodar mejor 50 un aminoácido original en otro CH3 dominio constante de anticuerpo. En algunos aspectos, CH3 se crea un botón en un dominio constante de anticuerpo para formar interacciones adicionales con aminoácidos originales en otro CH3 dominio constante de anticuerpo.

55 En algunos aspectos, se construye un ojal reemplazando los aminoácidos que tienen cadenas laterales más grandes, como tirosina o triptófano, con aminoácidos que tienen cadenas laterales más pequeñas, tales como alanina, valina o treonina, por ejemplo, una mutación Y407V en el dominio constante del anticuerpo CH3. De manera similar, en algunos aspectos, se construye un botón reemplazando los aminoácidos que tienen cadenas laterales más pequeñas con aminoácidos que tienen cadenas laterales más grandes, por ejemplo, una mutación T366W en el CH3 dominio constante del anticuerpo. En algunos aspectos, un monómero de dominio Fc incluye la mutación de botón T366W y el otro monómero de dominio Fc incluye mutaciones de ojal T366S, L358A y Y407V. En algunos aspectos, un polipéptido de la descripción que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se fusiona con un monómero

de dominio Fc que incluye la mutación del botón T366W para limitar la formación de homodímero botón-botón no deseado. En la Tabla 9 se incluyen ejemplos de pares de aminoácidos de botón en ojal, y en la Tabla 10 se proporcionan ejemplos de variantes de Fc de botón en ojal y fusiones SIRP- $\alpha$  - Fc.

**Tabla 9.** Pares de aminoácidos botón en ojal

Monómero 1 del dominio Fc	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S L358A Y407V	T394W Y407T	T394S Y407A	T366W T394S
Monómero 2 del dominio Fc	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y F405A	T366W F405W	F405W Y407A

5

**Tabla 10.** Ejemplos de variantes de Fc y fusiones de SIRP- $\alpha$  - Fc

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
138	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPQIQWFRGAGPGRVLIYN QRQGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCIKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
139	DKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSSREEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
140	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPQIQWFRGAGPGRVLIYN QRQGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCIKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
141	DKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
142	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGIQWFRGAGPGRELIYN QREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSDKHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
143	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGIQWFRGAGPGRELIYN QREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSDKHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
145	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGIQWFRGAGPGRELIYN QREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSDKHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
146	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGIQWFRGAGPGRELIY NQRQGPFPRTTVDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPD DVEFKSGAGTELSVRAKPSDKHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK K
147	DKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
148	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGIQWFRGAGPGRELIY NQRQGPFPRTTVDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPD DVEFKSGAGTELSVRAKPSDKHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
149	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCSVMEALHNHYTQKSLSPGK

Además de la estrategia botón en ojal, en algunos aspectos, la dirección electrostática también se usa para controlar la dimerización de los monómeros del dominio Fc. La dirección electrostática se refiere a la usación de interacciones electrostáticas favorables entre aminoácidos con carga opuesta en péptidos, dominios proteicos y proteínas para controlar la formación de moléculas proteicas de orden superior. En particular, para controlar la dimerización de los monómeros del dominio Fc usando dirección electrostática, uno o más residuos de aminoácidos que forman la interfaz CH3-CH3 se reemplazan con residuos de aminoácidos cargados positiva o negativamente de modo que la interacción se vuelve electrostáticamente favorable o desfavorable dependiendo de los aminoácidos cargados específicos introducidos. En algunos aspectos, un aminoácido cargado positivamente en la interfaz, tal como lisina, arginina o histidina, se reemplaza con un aminoácido cargado negativamente tal como ácido aspártico o ácido glutámico. En algunos aspectos, un aminoácido cargado negativamente en la interfaz se reemplaza por un aminoácido cargado positivamente. En algunos aspectos, los aminoácidos cargados se introducen en uno de los dominios constantes del anticuerpo que interactúan, o en ambos. En algunos aspectos, la introducción de aminoácidos cargados en los dominios constantes del anticuerpo interactúan de los dos monómeros del dominio Fc promueve la formación selectiva de heterodímeros de monómeros del dominio Fc controlados por los efectos de dirección electrostática que resultan de la interacción entre los aminoácidos cargados. Ejemplos de pares de aminoácidos de dirección electrostática se incluyen, sin limitación, en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Pares de aminoácidos de dirección electrostática

Monómero 1 del dominio Fc	K409D	K409D	K409E	K409E	K392D	K392D	K392E	K392E	K409D K392D	K370E K439E	K409D
Monómero 2 del dominio Fc	D399K	D399R	D399K	D399R	D399K	D399R	D399K	D399R	D399K D356K	D356K D399K	E357K

- 20 Están disponibles otros métodos usados para controlar la heterodimerización de los monómeros del dominio Fc, especialmente en el contexto del constructo de un anticuerpo biespecífico.
- En algunos aspectos, un primer monómero de dominio Fc y un segundo monómero de dominio Fc incluyen cada uno una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: T366W, T366S, L368A, Y407V, T366Y, T394W, F405W, Y349T, Y349E, Y349V, L351T, L351H, L351N, L351K, P353S, S354D, D356K, D356R, D356S, E357K, E357R, E357Q, S364A, T366E, L368T, L368Y, L368E, K370E, K370D, K370Q, K392E, K392D, T394N, P395N, P396T, V397T, V397Q, L398T, D399K, D399R, D399N, F405T, F405H, F405R, Y407T, Y407H, Y407I, K409E, K409D, K409T y K409I con respecto a la secuencia de IgG1 humana.
- En algunos aspectos, un monómero de dominio Fc comprende: (a) una de las siguientes sustituciones de aminoácidos con respecto a la IgG1 humana de tipo salvaje: T366W, T366S, L368A, Y407V, T366Y, T394W, F405W, Y349T, Y349E, Y349V, L351T, L351H, L351N, L351K, P353S, S354D, D356K, D356R, D356S, E357K, E357R, E357Q, S364A, T366E, L368T, L368Y, L368E, K370E, K370D, K370Q, K392E, K392D, T394N, P395N, P396T, V397T, V397Q, L398T, D399K, D399R, D399N, F405T, F405H, F405R, Y407T, Y407H, Y407I, K409E, K409D, K409T o K409I; o (b) (i) una mutación N297A con respecto a una región Fc de IgG1 humana; (ii) una mutación L234A, L235A y G237A con respecto a una región Fc de IgG1 humana; (iii) una mutación L234A, L235A, G237A y N297A con respecto a una región Fc de IgG1 humana; (iv) una mutación N297A con respecto a una región Fc de IgG2 humana; (v) una mutación A330S y P331S con respecto a una región Fc IgG2 humana; (vi) una mutación A330S, P331S y N297A con respecto a una región Fc IgG2 humana; (vii) mutación S228P, E233P, F234V, L235A y delG236 con respecto a una región Fc de IgG4 humana; o (viii) una mutación S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A con respecto a una región Fc de IgG4 humana. En algunos aspectos, un monómero de dominio Fc comprende: (a) una de las siguientes sustituciones de aminoácidos con respecto a la IgG1 humana de tipo salvaje: T366W, T366S, L368A, Y407V, T366Y, T394W, F405W, Y349T, Y349E, Y349V, L351T, L351H, L351N, L351K, P353S, S354D, D356K, D356R, D356S, E357K, E357R, E357Q, S364A, T366E, L368T, L368Y, L368E, K370E, K370D, K370Q, K392E, K392D, T394N, P395N, P396T, V397T, V397Q, L398T, D399K, D399R, D399N, F405T, F405H, F405R, Y407T, Y407H, Y407I, K409E, K409D, K409T, K409I con respecto a la secuencia de IgG1 humana.

K409D, K409T o K409I; o (b) (i) una mutación N297A con respecto a una región Fc de IgG1 humana; (ii) una mutación L234A, L235A, y G237A con respecto a una región Fc de IgG1 humana; (iii) una mutación L234A, L235A, G237A y N297A con respecto a una región Fc de IgG1 humana; (iv) una mutación N297A con respecto a una región Fc de IgG2 humana; (v) una mutación A330S y P331S con respecto a una región Fc de IgG2 humana; (vi) una mutación A330S, P331S y N297A con respecto a una región Fc de IgG2 humana; (vii) una mutación S228P, E233P, F234V, L235A y delG236 con respecto a una región Fc de IgG4 humana; o (viii) una mutación S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A con respecto a una región Fc de IgG4 humana., En algunos aspectos, el primer y segundo monómeros del dominio Fc incluyen diferentes sustituciones de aminoácidos.

5 En algunos aspectos, el primer monómero de dominio Fc incluye T366W. En algunos aspectos, el segundo monómero del dominio Fc incluye T366S, L368A y Y407V. En algunos aspectos, el primer monómero de dominio Fc incluye D399K. En algunos aspectos, el primer monómero de dominio Fc incluye K409D.

#### IV. Albúmina sérica

10 En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92.

15 En el presente documento también se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A.

20 25 La fusión con albúminas séricas puede mejorar la farmacocinética de los productos farmacéuticos proteicos y, en algunos aspectos, los polipéptidos de la descripción, que incluyen una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad descrita en el presente documento, se unen con una albúmina sérica.

30 35 La albúmina sérica es una proteína globular que abunda en la sangre en mamíferos. La albúmina sérica se produce en el hígado y puede constituir aproximadamente la mitad de las proteínas del suero sanguíneo. Es monomérico y soluble en sangre. Algunas de las funciones más importantes de la albúmina sérica incluyen el transporte de hormonas, ácidos grasos y otras proteínas en el cuerpo, amortiguar el pH y mantener la presión osmótica necesaria para la distribución adecuada de los fluidos corporales entre los vasos sanguíneos y los tejidos corporales. En aspectos preferidos, la albúmina sérica es albúmina de suero humano (HSA). En algunos aspectos, una HSA se une al extremo C-terminal del polipéptido de la descripción para aumentar la vida media en suero del polipéptido. En algunos aspectos, el N-terminal de una HSA se une al C-terminal del polipéptido de la descripción. En algunos aspectos, una HSA se une, ya sea directamente o mediante un enlazador, al extremo C-terminal del polipéptido. En algunos aspectos, una HSA se une, ya sea directamente o mediante un enlazador, al extremo N-terminal del polipéptido.

40 En algunos aspectos, una albúmina de suero humano comprende la secuencia de aminoácidos (aa) 25-609 de UniProt ID NO: P02768 (SEQ ID NO: 12) como se muestra en la Tabla 12. En algunos aspectos, la HSA se unió a una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad (p. ej., cualquier variante de D1 de SIRP- $\alpha$  descrita en las Tablas 2, 5 y 6) incluye aminoácidos 25-609 (SEQ ID NO: 12) de la secuencia de UniProt ID NO: P02768. En algunos aspectos, la HSA incluye sustituciones C34S o K573P con respecto a SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, la HSA incluye sustituciones C34S y K573P con respecto a SEQ ID NO: 12.

Tabla 12. Secuencias de HSA

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
12	UniProt ID NO: P02768, AA 25-609	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQC PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHT LFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPPERNECF LQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK KYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAATTECCQA ADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASTLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSK LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADF VESKDVKNYAEAKDVFGLMFLYEYARRHPDYS VVLLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVFDE FKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRY TKKVPQVSTPTLVEVSRLNLGKVGSKCCKHPEAKR MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTE SLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICT LSEKERQIKKQTALVELVHKPKATKEQLKAVMD DFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GL

5 En algunos aspectos, una albúmina sérica se fusiona genéticamente con un polipéptido de la descripción o se une al polipéptido a través de medios químicos, p. ej., conjugación química. En algunos aspectos, se inserta un espaciador entre el polipéptido y la HSA. Algunos ejemplos de espaciadores se describen en detalle en otra parte de este documento. En algunos aspectos, un espaciador es A o AAAL. En algunos aspectos, la fusión de una HSA en un polipéptido de la descripción conduce a una retención prolongada del polipéptido así como a aumentos en la vida media.

Los polipéptidos que comprenden un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  y una HSA fusionada incluyen, pero no se limitan a, SEQ ID NOS: 150-159 proporcionada en la Tabla 13.

10

Tabla 13. Polipéptidos que comprenden variantes de SIRP- $\alpha$  fusionadas con HSA

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
150	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLINYQ RQGPFPRTVTVDTTKRNNDMSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQS PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETY GEMADCCAKQEPPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEET FLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAATTECCQAADKAACLLPKLD ELRDEGKASSAKQRLKCASTLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAFAEV KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKP LLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVFGLMFL YEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRL GKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTE SLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAAL GL

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
151	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRQGPFPRTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPEPERNECFLQHKDDNPNLPRVRPEVDVMCTAFHDNEETEETFLKKYLIEIARRHPFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAFAEVSEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVFDEFKPLKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
152	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVIYNQRQGPFPRTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVIAFAQYLQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPEPERNECFLQHKDDNPNLPRVRPEVDVMCTAFHDNEETEETFLKKYLIEIARRHPFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAFAEVSEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVFDEFKPLKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
153	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRQGPFPRTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPEPERNECFLQHKDDNPNLPRVRPEVDVMCTAFHDNEETEETFLKKYLIEIARRHPFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAFAEVSEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVFDEFKPLKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
154	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLINYQ REGPFPRVTTVSDTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCIFRKGSPPDVE FKSGAGTELSVRAKPSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVIAFAQYLQQS PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETY GEMADCCAKQEPEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEET FLKKYLYEIARRHPFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLD ELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAFAEV KLVTDLTKVHTECCHGDLLEADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKP LLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL YEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVFDEFKPL VEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRL GKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTE SLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALV ELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVA SQAALGL
155	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELYN QREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVIAFAQYLQ QSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDN EETFLKKYLYEIARRHPFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP KLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAFA EVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG MFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVFDEF KPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVS RNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKC CTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQT ALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKL VAASQAALGL
156	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELYN QREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVIAFAQYLQ QSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRE TYGEMADCCAKQEPEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDN EETFLKKYLYEIARRHPFYAPELFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP KLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAFA EVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLG MFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVFDEF KPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVS RNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKC CTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQT ALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKL VAASQAALGL
157	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELYNQ

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
	REGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPPERNECFLQHKDDNPNLPRVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPFYFAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKDLEARDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLKVHTECCHGDLLEADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEPPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRLNGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAA SQAALGL
158	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNMMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPPERNECFLQHKDDNPNLPRVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPFYFAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKDLEARDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLKVHTECCHGDLLEADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEPPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRLNGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAA VAASQAALGL
159	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNMMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPPERNECFLQHKDDNPNLPRVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPFYFAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKDLEARDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLKVHTECCHGDLLEADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEPPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRLNGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAA SQAALGL

En algunos aspectos, el polipéptido tiene un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene al menos 85% de identidad de secuencia (p. ej., al menos, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia) a cualquier variante proporcionada en la Tabla 13.

En algunos aspectos, el polipéptido tiene un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que tiene al menos 85% de identidad de secuencia (p. ej., al menos, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia) a SEQ ID NO:154, 155 y 159 en Tabla 13.

#### V. Péptido de unión a albúmina

5 En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 10 56, residuo 66 y residuo 92.

En el presente documento también se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones 15 A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A.

La unión a proteínas séricas puede mejorar la farmacocinética de los productos farmacéuticos proteicos y, en particular, en algunos aspectos, los polipéptidos descritos en este documento se fusionan con péptidos o proteínas que se unen a proteínas del suero.

20 Como se usa en el presente documento, el término "péptido de unión a albúmina" se refiere a una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 12 a 16 aminoácidos que tiene afinidad y funciona para unirse a una proteína de albúmina sérica. En algunos aspectos, un péptido que se une a la albúmina se origina en un ser humano, un ratón o una rata.

25 En algunos aspectos, un polipéptido de la descripción que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad (p. ej., cualquier variante proporcionada en las Tablas 2, 5 y 6) se fusiona con un péptido de unión a albúmina que muestra actividad de unión a la albúmina sérica para aumentar la vida media del polipéptido. Están disponibles varios péptidos de unión a albúmina que pueden usarse en los métodos y composiciones descritos aquí. En algunos aspectos, el péptido de unión a la albúmina incluye la secuencia DCLPRWGCLW (SEQ ID NO: 160). []En algunos aspectos, un péptido de unión a albúmina se fusiona genéticamente con un polipéptido de la descripción o se une al polipéptido a 30 través de medios químicos, p. ej., conjugación química.

35 En algunos aspectos, se inserta un enlazador (p. ej., un espaciador) entre el polipéptido y el péptido de unión a albúmina para permitir una flexibilidad espacial y estructural adicional de la proteína de fusión. Los enlazadores específicos (p. ej., un espaciador) y sus secuencias de aminoácidos se describen con más detalle en el presente documento. En algunos aspectos, un péptido que se une a la albúmina se fusiona con el extremo N- o C-terminal de 40 un polipéptido de la descripción. En un ejemplo, el extremo N-terminal del péptido que se une a la albúmina se fusiona directamente con el extremo C-terminal de un polipéptido de la descripción a través de un enlace peptídico. En un ejemplo, el extremo C-terminal del péptido de unión a albúmina se fusiona directamente con el extremo N-terminal de un polipéptido de la descripción a través de un enlace peptídico. En algunos aspectos, la fusión de un péptido de unión a albúmina con un polipéptido de la descripción conduce a la retención prolongada del polipéptido a través de su unión a la albúmina sérica.

#### VI. Polímero polietilenglicol (PEG)

En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al 45 menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92.

En el presente documento también se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A.

55 En algunos aspectos, un polipéptido que incluye un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad (p. ej., cualquier variante proporcionada en las Tablas 2, 5 y 6) se fusiona con un polímero (p. ej., polietilenglicol, PEG). En algunos aspectos, la unión de un polímero a una proteína farmacéutica "enmascara" la proteína farmacéutica del sistema inmunológico del huésped. Además, en algunos aspectos, ciertos polímeros, tales como los polímeros hidrófilos, proporcionan

solubilidad en agua a proteínas y fármacos hidrófobos. Por ejemplo, en algunos aspectos, tales polímeros incluyen moléculas de PEG, cadena de ácido polisálico y cadena PAS. En algunos aspectos, un polímero tal como PEG se une covalentemente a una sustitución o adición de cisteína en el polipéptido. En algunos aspectos, la sustitución de cisteína en el polipéptido es I7C, A16C, S20C, T20C, A45C, G45C, G79C, S79C, o A84C, con respecto a la secuencia de cualquiera de las secuencias proporcionadas en las Tablas 2, 5 y 6. En algunos aspectos, la adición de un residuo de cisteína en el polipéptido se introduce mediante síntesis de péptidos, modificación genética, clonación molecular, o cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el polímero, por ejemplo PEG, se une al residuo de cisteína usando conjugación de cisteína-maleimida. En algunos aspectos, un polímero tal como el PEG se une covalentemente al polipéptido que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad en el extremo N- o C-terminal o en una ubicación interna, usando métodos químicos convencionales tales como la conjugación química.

## VII. Constructo biespecífico

En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92.

En el presente documento también se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A.

En algunos aspectos, un polipéptido que tiene una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad (p. ej., cualquiera de las variantes proporcionadas en las Tablas 2, 5 y 6) comprende un constructo biespecífico. Un constructo biespecífico se refiere a un constructo que tiene dos dominios que interactúan con la diana. En algunos aspectos, un constructo biespecífico incluye un dominio Fc y dos dominios que interactúan con la diana: (1) un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo (p. ej., cualquiera de las variantes proporcionadas en las Tablas 2, 5 y 6) y (2) un dominio variable de anticuerpo. En algunos aspectos, un constructo biespecífico incluye un primer polipéptido y un segundo polipéptido. En algunos aspectos, el primer polipéptido tiene la fórmula A-L-B, en donde A incluye un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo, L es un enlazador y B incluye un primer monómero de dominio Fc. En algunos aspectos, el segundo polipéptido tiene la fórmula A'-L'-B', en donde A' incluye un dominio variable de anticuerpo, L' es un enlazador; y B' incluye un segundo monómero de dominio Fc. En algunos aspectos, la orientación del primer y segundo polipéptidos es B-L-A y B'-L'-A', respectivamente. En algunos aspectos, el primer y segundo monómeros del dominio Fc se combinan para formar el dominio Fc en el constructo biespecífico. En algunos aspectos, un constructo biespecífico es de cualquier isotipo de anticuerpo de immunoglobulina (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgA e IgD). Una variante de un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  incluye el dominio D1 de un SIRP- $\alpha$  humano de tipo salvaje y una o más sustituciones de aminoácidos con respecto a los dominios D1 de tipo salvaje (p. ej., cualquier variante de D1 de SIRP- $\alpha$  como se describe en las Tablas 2, 5 y 6). En algunos aspectos, una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  se une con mayor afinidad de unión a CD47 que un dominio de D1 de SIRP- $\alpha$  humano de tipo salvaje. En algunos aspectos, el dominio variable del anticuerpo en un constructo biespecífico se dirige a un antígeno celular (p. ej., un antígeno celular en una célula cancerosa).

Un dominio variable de anticuerpo se refiere a las partes de la cadena ligera y pesada de las moléculas de anticuerpo que incluyen secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de la complementariedad (CDR; p. ej., CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2, y CDR H3) y regiones marco (FR). El dominio variable del anticuerpo puede conferir al anticuerpo la capacidad de unirse a antígenos específicos. Se pueden construir muchas moléculas de dominio variable de anticuerpos diferentes. En algunos aspectos, las moléculas de dominio variable de anticuerpo usadas incluyen, pero no se limitan a, Fv monocatenario.

En algunos aspectos, el dominio variable del anticuerpo en un constructo biespecífico se dirige a un antígeno celular (p. ej., un antígeno celular en una célula cancerosa o una célula inmune). Algunas proteínas se expresan en niveles más altos en las células cancerosas que en las células no cancerosas. Por ejemplo, un antígeno canceroso es una proteína que se expresa preferiblemente por células cancerosas (p. ej., se expresa a niveles más altos en células cancerosas que en células no cancerosas) y, en algunos casos, se expresa únicamente por células cancerosas. En algunos aspectos, las proteínas, p. ej., proteínas expresadas por células cancerosas, que están dirigidas por un dominio variable de anticuerpo que forma un dominio Fc con un dominio de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad o una variante del mismo incluyen, pero no se limitan a: 5T4, AGS-16, ALK1, ANG-2, B7-H3, B7-H4, c-fms, c-Met, CA6, CD123, CD19, CD20, CD22, EpCAM, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CD74, CD79b, CD98, CEA, CEACAM5, CLDN18,2, CLDN6, CS1, CXCR4, DLL-4, EGFR, EGP-1, ENPP3, EphA3, ETBR, FGFR2, fibronectina, FR-alfa, GCC, GD2, glypican-3, GP NMB, HER-2, HER3, HLA-DR, ICAM-1, IGF-1R, IL-3R, LIV-1, mesotelina, MUC16, MUC1, NaPi2b, Nectin-4, Notch 2, Notch 1, PD-L1, PD-L2, PDGFR- $\alpha$ , PS, PSMA, SLTRK6, STEAP1, TEM1, VEGFR,

CD25, CD27L, DKK-1, o CSF-1R. En algunos aspectos, el dominio variable del anticuerpo en el constructo biespecífico no está diseñado para unirse a una proteína humana.

En algunos aspectos, cada uno de los monómeros del primer y segundo dominio Fc en el dominio Fc del constructo biespecífico incluye una o más sustituciones de aminoácidos que promueven la heterodimerización del primer y segundo monómeros del dominio Fc. Los métodos para promover la heterodimerización de los monómeros del dominio Fc se describen en detalle más adelante en este documento, véase, p. ej., estrategia de botón en ojal y estrategia de dirección electrostática.

En algunos aspectos, el dominio Fc del constructo biespecífico se muta para carecer de una o más funciones efectoras, típicas de un "dominio Fc muerto". En algunos aspectos, el dominio Fc del constructo biespecífico es de un anticuerpo IgG1 e incluye sustituciones de aminoácidos L14A, L15A y G17A, con respecto a la secuencia de SEQ ID NO:161 (Tabla 14) para reducir la interacción o unión entre el dominio Fc y un receptor Fc<sub>y</sub>. En algunos aspectos, un monómero de dominio Fc es de un anticuerpo IgG1 e incluye una o más sustituciones de aminoácidos L234A, L235A, G237A y N297A (como se designa según el sistema de numeración EU según Kabat et al., 1991). En algunos aspectos, las variantes de Fc descritas en este documento están mínimamente glicosiladas o tienen glicosilación reducida. En algunos aspectos, la desglicosilación se logra con una mutación de N297A, o mutando N297 a cualquier aminoácido que no sea N (como se designa según el sistema de numeración EU según Kabat, et al. (1991)). En algunos aspectos, el constructo biespecífico se diseña de manera que tenga una unión preferencial a proteínas (p. ej., receptores tales como receptores Fc) expresados por diferentes tipos de células. Los estudios han demostrado que las sustituciones de aminoácidos en la bisagra, los dominios constantes (p. ej., CH2 Y CH3 dominios constantes) o los dominios bisagra y constantes de un anticuerpo pueden alterar eficazmente las afinidades de unión del anticuerpo hacia receptores específicos (p. ej., receptores Fc) expresados en diferentes tipos de células (p. ej., células T reguladoras y células T efectoras). La IgG2 que tiene sustituciones de aminoácidos A111S y P112S (con respecto a la SEQ ID NO:162, Tabla 14) muestra una unión significativamente reducida a Fc<sub>y</sub>RIIIa 131H en comparación con la IgG2 de tipo salvaje. En algunos aspectos, las variantes de Fc de la presente están mínimamente glicosiladas o tienen una glicosilación reducida. En algunos aspectos, la desglicosilación se logra con una mutación de N297A, o mutando N297 a cualquier aminoácido que no sea N (como se designa según el sistema de numeración EU según Kabat, et al. (1991)). En algunos aspectos, un constructo biespecífico incluye un dominio Fc de la subclase de IgG2 o IgG4. En algunos aspectos, un constructo biespecífico que incluye un dominio Fc de una subclase de IgG2 incluye sustituciones de aminoácidos A111S y P112S, con respecto a SEQ ID NO:162 (Tabla 14). En algunos aspectos, la variante de Fc comprende una secuencia Fc de IgG2 humana que comprende una o más sustituciones de aminoácidos A330S, P331S y N297A (como se designa según el sistema de numeración EU según Kabat, et al (1991)).

**Tabla 14.** Secuencias de aminoácidos de IgG

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
161	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
162	ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPAPIEKTIASKAGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Un ejemplo de un constructo de SIRP- $\alpha$  que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo unido a un primer monómero de dominio Fc por medio de un enlazador y un segundo monómero de dominio Fc, en donde el primer y segundo monómero de dominio Fc se combinan para formar un dominio Fc se muestra en la FIG. 1. En algunos aspectos, no hay dominio variable de proteína o anticuerpo unido al segundo monómero Fc. En algunos aspectos, un constructo de SIRP- $\alpha$  incluye un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo unido a un primer monómero de dominio Fc por medio de un enlazador y un dominio variable de anticuerpo unido a un segundo monómero de dominio Fc por medio de un enlazador, en el que el primer y segundo monómeros del dominio Fc se combinan para formar un dominio Fc (como se muestra en la Figura 2). En algunos aspectos, un constructo SIRP- $\alpha$  incluye un dominio de D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo unido a un primer monómero de dominio Fc por medio

de un enlazador y una proteína terapéutica (p. ej., una citocina, una interleucina, un antígeno, un esteroide, un agente antiinflamatorio o un agente inmunomodulador) unido a un segundo monómero de dominio Fc por medio de un enlazador, en donde el primer y segundo monómeros del dominio Fc se combinan para formar un dominio Fc (como se muestra en la Figura 3). En algunos aspectos, cada uno de los dos monómeros del dominio Fc en el dominio Fc de los constructos de SIRP- $\alpha$  descritas anteriormente (p. ej., los constructos de SIRP- $\alpha$  como se muestra en las Figuras 1-3), incluyen sustituciones de aminoácidos que promueven la heterodimerización de los dos monómeros. En el presente documento se describen en detalle diferentes estrategias (p. ej., estrategia de botón en ojal, estrategia de dirección electrostática) y sustituciones de aminoácidos del dominio Fc que promueven la heterodimerización de dos monómeros del dominio Fc. Por ejemplo, la FIG. 4A ilustra un constructo de SIRP- $\alpha$  que tiene un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo unido a un monómero de dominio Fc que incluye una mutación de botón, p. ej., T366W, para limitar la formación de homodímero de botón-botón no deseado. La FIG. 4B ilustra un constructo de SIRP- $\alpha$  que tiene un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo unido a un monómero de dominio Fc que incluye mutaciones de ojal, p. ej., T366S, L358A y Y407V. En algunos aspectos, se aplican estrategias de heterodimerización de dominios Fc similares a los dominios Fc en los constructos descritos en las Figs. 2 y 3. En algunos aspectos, un constructo de SIRP- $\alpha$  incluye una proteína de fusión de un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  o una variante del mismo unido a un monómero de dominio Fc (como se muestra en la FIG. 5A). En algunos aspectos, esta proteína de fusión forma un homodímero (como se muestra en la FIG. 5B).

Las variantes de Fc de la descripción acopladas con un socio de fusión presentan preferiblemente unión reducida o ablacionada a al menos uno de los receptores Fc de CD16a, CD32a, CD32b, CD32c, y CD64 en comparación con un constructo polipeptídico similar que comprende la región Fc del anticuerpo (no mutado) nativo o de tipo salvaje (no mutado). En algunos casos, la variante de Fc o la pareja de fusión descrita en el presente documento presenta una unión reducida o ablacionada a los receptores Fc de CD16a, CD32a, CD32b, CD32c y CD64.

En algunos aspectos, las variantes de Fc de la descripción acopladas con un socio de fusión presentan una unión reducida al componente del complemento C1q y CDC en comparación con un constructo polipeptídico similar que comprende la región Fc nativa o de tipo salvaje (no mutado). En algunos casos, la variante de Fc presenta al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o una reducción mayor en la unión C1q en comparación con un constructo polipeptídico que comprende una región Fc de tipo salvaje. En algunos casos, la variante de Fc presenta CDC reducida en comparación con un constructo polipeptídico que comprende la región Fc nativa o de tipo salvaje (no mutado). En algunos casos, la variante de Fc presenta al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o una reducción mayor en la unión en comparación con un constructo polipeptídico que comprende una región Fc de tipo salvaje.

### VIII. Enlazadores

En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92.

En el presente documento también se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, del G236 y N297A.

En la presente descripción, se usa un enlazador para describir un enlace o conexión entre polipéptidos o dominios proteicos o restos no proteicos asociados. En algunos aspectos, un enlazador es un enlace o conexión entre un monómero de dominio Fc, un péptido de unión a albúmina o una HSA y una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad. En algunos aspectos, el enlazador conecta el C-terminal de la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  y el N-terminal del monómero del dominio Fc, el péptido de unión a la albúmina o la HSA, tal que los dos polipéptidos se unen entre sí en serie en tandem.

En algunos aspectos, un enlazador es un enlace covalente simple, p. ej., un enlace peptídico, un polímero sintético tal como un polímero de polietilenglicol (PEG) o cualquier tipo de enlace creado a partir de una reacción química, p. ej., conjugación química. Cuando un enlazador es un enlace peptídico, en algunos aspectos, el grupo ácido carboxílico en el extremo C-terminal de un dominio proteico reacciona con el grupo amino en el extremo N-terminal de otro dominio proteico en una reacción de condensación para formar un enlace peptídico. En algunos aspectos, el enlace peptídico se forma a partir de medios sintéticos a través de una reacción de química orgánica convencional, o por producción natural a partir de una célula huésped, en donde una molécula de ácido nucleico que codifica las secuencias de ADN de ambas proteínas (p. ej., variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad) en serie en tandem se puede transcribir y traducir directamente en un polipéptido contiguo que codifica ambas proteínas mediante las maquinarias moleculares necesarias (p. ej., ADN polimerasa y ribosoma) en la célula huésped.

Cuando un enlazador es un polímero sintético (p. ej., un polímero de PEG), en algunos aspectos, el polímero se funcionaliza con grupos funcionales químicos reactivos en cada extremo para reaccionar con los aminoácidos terminales en los extremos de conexión de dos proteínas.

- 5 Cuando un enlazador (excepto el enlace peptídico mencionado anteriormente) se hace a partir de una reacción química, en algunos aspectos, los grupos funcionales químicos (p. ej., amina, ácido carboxílico, éster, azida u otros grupos funcionales) se unen sintéticamente al C-terminal de una proteína y el N-terminal de otra proteína, respectivamente. En algunos aspectos, los dos grupos funcionales luego reaccionan a través de medios químicos sintéticos para formar un enlace químico, conectando así las dos proteínas.

#### **Espaciadores**

- 10 En la presente descripción, en algunos aspectos, un enlazador entre un monómero de dominio Fc, un péptido de unión a albúmina o una HSA, y un polipéptido de la descripción, es un espaciador de aminoácidos que incluye aproximadamente aminoácidos 1-200. Los espaciadores de péptidos adecuados incluyen enlazadores de péptidos que contienen residuos de aminoácidos flexibles tales como glicina y serina. En la Tabla se proporcionan ejemplos de secuencias enlazadoras. 15. En algunos aspectos, un espaciador contiene motivos, p. ej., motivos múltiples o repetidos, de GS, GG, GGS, GGG, GGGGS (SEQ ID NO: 163) GGSG (SEQ ID NO: 164) o SGGG (SEQ ID NO: 165). En algunos aspectos, un espaciador contiene de 2 a 12 aminoácidos que incluyen motivos de GS, p. ej., GS, GSGS (SEQ ID NO: 166) GSGSGS (SEQ ID NO: 167) GSGSGSGS (SEQ ID NO: 168) GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 169) o GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 170). En algunos aspectos, un espaciador contiene de 3 a 12 aminoácidos que incluyen motivos de GGS, p. ej., GGS, GGSGS (SEQ ID NO: 171) GGSGGGGS (SEQ ID NO: 172) y GGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 173). En algunos aspectos, un espaciador contiene de 4 a 12 aminoácidos que incluyen motivos de GGSG (SEQ ID NO: 164) p. ej., GGSG (SEQ ID NO: 164) GGSGGGSG (SEQ ID NO: 174) o GGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 175). En algunos aspectos, un espaciador contiene motivos de GGGGS (SEQ ID NO: 163) p. ej., GGGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 176). En algunos aspectos, un espaciador contiene aminoácidos distintos de glicina y serina, p. ej., (SEQ ID NO: 177)AAS,AAAL, (SEQ ID NO: 178)(SEQ ID NO: 179) 20 AAAK,AAAR, (SEQ ID NO: 180)(SEQ ID NO: 181)EGKSSSGSGSESKST,GSAGSAAGSGEF, (SEQ ID NO: 182)(SEQ ID NO: 183)KESGSVSSEQLAQFRSLD(SEQ ID NO: 184)AEAAAKEAAAKA,,GGGGAGGGG, (SEQ ID NO: 185)(SEQ ID NO: 186)GENLYFQSGG, (SEQ ID NO: 187)SACYCELS,RSIAT, (SEQ ID NO: 188)(SEQ ID NO: 189)RPACKIPNDLKQKVVMNH,GGSAGGSGSGSSGGSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG, (SEQ ID NO: 190)(SEQ ID NO: 191) AAANSSIDLISVPVDSR, o GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS. (SEQ ID NO: 192)
- 25 25. En algunos aspectos, un espaciador contiene motivos, p. ej., motivos múltiples o repetidos, de AAAK (SEQ ID NO: 193). En algunos aspectos, un espaciador contiene motivos, p. ej., motivos múltiples o repetidos, de secuencias ricas en prolina tales como (XP)<sub>n</sub>, en las que X es cualquier aminoácido (p. ej., A, K o E) y n es de 1-5 y PAPAP (SEQ ID NO: 194).
- 30 30. En algunos aspectos, un espaciador contiene motivos, p. ej., motivos múltiples o repetidos, de EAAAK (SEQ ID NO: 193). En algunos aspectos, un espaciador contiene motivos, p. ej., motivos múltiples o repetidos, de secuencias ricas en prolina tales como (XP)<sub>n</sub>, en las que X es cualquier aminoácido (p. ej., A, K o E) y n es de 1-5 y PAPAP (SEQ ID NO: 194).

**Tabla 15.** Secuencias de enlazadores

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Secuencia de aminoácidos</b>
163	GGGGS
164	GGSG
165	SGGG
166	GSGS
167	GSGSGS
168	GSGSGSGS
169	GSGSGSGSGS
170	GSGSGSGSGGS
171	GGSGGS
172	GGSGGGSGGS

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Secuencia de aminoácidos</b>
173	GGSGGSGGSGGS
174	GGSGGGSG
175	GGSGGGSGGGSG
176	GGGGSGGGGGSGGGGS
177	AAS
178	AAAL
179	AAAK
180	AAAR
181	EGKSSGSGSESKST
182	GSAGSAAGSGEF
183	AEAAAKEAAAKA
184	KESGSVSSEQLAQFRSLD
185	GGGGAGGGG
186	GENLYFQSGG
187	SACYCELS
188	RSIAT
189	RPACKIPNDLKQKVMNH
190	GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG
191	AAANSSIDLISVPVDSR
192	GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSS
193	EAAAK
194	PAPAP

En algunos aspectos, la longitud del péptido espaciador y los aminoácidos usados se ajusta dependiendo de las dos proteínas involucradas y el grado de flexibilidad deseado en el polipéptido de fusión de proteínas final. En algunos aspectos, la longitud del espaciador se ajusta para asegurar un plegamiento de proteínas adecuado y evitar la formación de agregados. En algunos aspectos, un espaciador, tal como un espaciador entre una HSA y un polipéptido descrito en el presente documento, es A o AAAL (SEQ ID NO: 178).

## IX. Vectores, células huésped y producción de proteínas

En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 54, residuo 53, residuo 56, residuo 66 y residuo 92.

En el presente documento también se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A.

En algunos aspectos, los polipéptidos de la descripción se producen a partir de una célula huésped. Una célula huésped se refiere a un vehículo que incluye los componentes celulares necesarios, p. ej., orgánulos, necesarios para expresar los polipéptidos y polipéptidos de fusión descritos en el presente documento a partir de sus correspondientes ácidos nucleicos. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos están incluidos en los vectores de ácidos nucleicos introducidos en la célula huésped por transformación, transfección, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, microinyección directa, infección, etc. En algunos aspectos, la elección de los vectores de ácidos nucleicos depende del huésped. Celda que se usará. En algunos aspectos, las células huésped son de origen procariótico (p. ej., bacteriano) o eucariótico (p. ej., de mamífero).

En algunos aspectos, se produce un polipéptido, por ejemplo, un constructo polipeptídico que comprende una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  (p. ej., cualquier variante proporcionada en las Tablas 2, 5 y 6) y un socio de fusión como una variante de Fc, HSA y un péptido de unión a albúmina, cultivando una célula huésped transformada con un ácido nucleico, preferiblemente un vector de expresión, que contiene un ácido nucleico que codifica el constructo polipeptídico (p. ej., variante de Fc, enlazador y socio de fusión) en las condiciones apropiadas para inducir o causar la expresión del constructo polipeptídico. En algunos aspectos, las condiciones apropiadas para la expresión varían con el vector de expresión y la célula huésped elegidos. En algunos aspectos, se usa una amplia variedad de células huésped apropiadas, que incluyen, pero no se limitan a, células de mamíferos, bacterias, células de insectos y levaduras. Por ejemplo, una variedad de líneas celulares que encuentran uso en la presente descripción se describen en el catálogo de líneas celulares ATCC®, disponible en American Type Culture Collection. En algunos aspectos, las variantes de Fc de esta descripción se expresan en una célula que está optimizada para no glicosilar proteínas que son expresadas por dicha célula, ya sea por ingeniería genética de la línea celular o modificaciones de las condiciones del cultivo celular como la adición de kifunensina o usando un huésped naturalmente no glicosilante tal como un procariota (E. coli, etc.), y en algunos casos, no es necesaria la modificación de la secuencia de glicosilación en el Fc.

### Construcción de vectores de ácido nucleico y células huésped

Se puede preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la descripción mediante una variedad de métodos. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio) y mutagénesis por PCR. En algunos aspectos, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la descripción se obtiene usando técnicas estándar, p. ej., síntesis de genes. Alternativamente, una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje se muta para incluir sustituciones de aminoácidos específicas usando técnicas estándar, p. ej., mutagénesis QuikChange™. En algunos casos, las moléculas de ácido nucleico se sintetizan usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR.

En algunos aspectos, los ácidos nucleicos que codifican un constructo polipeptídico, por ejemplo, un constructo polipeptídico que comprende una variante de D1 SIRP- $\alpha$  (p. ej., cualquier variante proporcionada en las Tablas 2, 5 y 6) y un socio de fusión como una variante de Fc, HSA y un péptido de unión a albúmina, se incorporan a un vector de expresión para expresar la proteína. Puede usarse una variedad de vectores de expresión para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión pueden comprender vectores extracromosómicos autorreplicantes o vectores que se integran en un genoma del huésped. Un vector también puede incluir varios componentes o elementos. Por ejemplo, en algunos aspectos, los componentes del vector incluyen, pero no se limitan a, secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales tales como una secuencia promotora, un sitio de unión ribosomal, una secuencia señal, secuencias de inicio y detención de la transcripción, secuencias de inicio y detención de traducción, regiones no traducidas (UTR) 3 'y 5' y secuencias potenciadoras o activadoras; un origen de replicación; un gen marcador de selección; y la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés, y una secuencia de terminación de la transcripción. En algunos aspectos, los vectores de expresión comprenden una proteína unida operativamente con secuencias reguladoras o de control, marcadores seleccionables, cualquier pareja de fusión, elementos adicionales o cualquier combinación de los mismos. Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Generalmente, estos vectores de expresión incluyen ácido nucleico regulador transcripcional y traduccionar unido operativamente al ácido nucleico que codifica la variante de Fc, y son típicamente apropiados para la célula huésped usada para expresar la proteína. Se puede usar un gen o marcador de selección, tal como, pero no se limita a, un gen de resistencia a antibióticos o un gen de proteína fluorescente, para

seleccionar células huésped que contienen el vector de expresión, por ejemplo mediante expresión de antibiótico o fluorescencia. Se encuentran disponibles varios genes de selección.

En algunos aspectos, los componentes o elementos de un vector se optimizan de manera que los vectores de expresión sean compatibles con el tipo de célula huésped. Los vectores de expresión que encuentran uso en la 5 presente descripción incluyen, pero no se limitan a, aquellos que permiten la expresión de proteínas en células de mamíferos, bacterias, células de insectos, levaduras y en sistemas *in vitro*.

En algunos aspectos, las células de mamífero se usan como células huésped para producir polipéptidos de la 10 descripción. Los ejemplos de tipos de células de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, riñón embrionario humano (HEK) (p. ej., HEK293, HEK 293F), ovario de hámster chino (CHO), HeLa, COS, PC3, Vero, MC3T3, NS0, Sp2 /0, VERY, BHK, MDCK, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce endógenamente ninguna cadena de inmunoglobulina) CRL7O3O y células Hs78Bst. En algunos aspectos, 15 las células *E. coli* se usan como células huésped para producir polipéptidos de la descripción. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen, pero no se limitan a, *E. coli* 294(ATCC® 31,446), *E. coli* λ 1776(ATCC® 31,537, *E. coli* BL21 (DE3)(ATCC® BAA-1025) y *E. coli* RV308 (ATCC® 31,608).

15 Las células huésped diferentes tienen características y mecanismos específicos para el proceso y modificación postraduccional de proteínas y productos genéticos (p. ej., glicosilación). Las líneas celulares o sistemas huésped apropiadas se eligen para asegurar la modificación correcta y procesamiento del polipéptido expresado. Una vez que 20 los vectores se introducen en las células huésped para la producción de proteínas, las células huésped se cultivan en un medio nutritivo convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

En algunos aspectos, un constructo polipeptídico, por ejemplo, un constructo polipeptídico que comprende una 25 variante de D1 de SIRP-α (p. ej., cualquier variante proporcionada en las Tablas 2, 5 y 6) y un socio de fusión como una variante de Fc, HSA y un péptido de unión a albúmina, se expresan en sistemas de expresión de mamíferos, incluyendo sistemas en los que los constructos de expresión se introducen en las células de mamíferos usando virus tales como retrovirus o adenovirus. En algunos aspectos, se usan células de humanos, ratones, ratas, hámsteres o 30 primates. Las células adecuadas también incluyen células de investigación conocidas, que incluyen pero no se limitan a células T Jurkat, células NIH3T3, CHO, COS y 293. Alternativamente, en algunos aspectos, las proteínas se expresan en células bacterianas. Los sistemas de expresión bacteriana son bien conocidos en la técnica e incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremores* y *Streptococcus lividans*. En algunos casos, los 35 constructos polipeptídicos que comprenden variantes de Fc se producen en células de insecto tales como, pero no se limitan a, células Sf9 y Sf21 o células de levadura tales como, pero no se limitan a, organismos de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* y *Yarrowia*. En algunos casos, los constructos polipeptídicos que 40 comprenden variantes de Fc se expresan *in vitro* usando sistemas de traducción libres de células. Los sistemas de traducción *in vitro* derivados de células procariotas (p. ej., *E. coli*) y eucariotas (p. ej., germen de trigo, reticulocitos de conejo) están disponibles y, en algunos aspectos, se eligen basándose en los niveles de expresión y propiedades funcionales de la proteína de interés. Por ejemplo, como apreciarán los expertos en la técnica, se requiere traducción *in vitro* para algunas tecnologías de presentación, por ejemplo, presentación de ribosomas. Además, en algunos aspectos, las variantes de Fc se producen mediante métodos de síntesis química tales como, pero no se limitan a, síntesis de péptidos en fase líquida y síntesis de péptidos en fase sólida. En el caso de la transcripción *in vitro* usando 45 un sistema no glicosilante, tales como extractos bacterianos, el Fc no se glicosilará incluso en presencia del sitio de glicosilación natural y, por lo tanto, se obtendrá de manera equivalente la inactivación del Fc.

En algunos aspectos, un constructo polipeptídico incluye aminoácidos no naturales, análogos de aminoácidos, 50 miméticos de aminoácidos o cualquier combinación de los mismos que funcionen de una manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos codificados de forma natural generalmente se refiere a los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, esoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, pralina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina) y pirrolesina y selenocisteína. Análogos de aminoácidos hace referencia a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, tal como homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, sulfonio metílico de metionina. 55 En algunos aspectos, tales análogos tienen grupos R modificados (tales como, norleucina) o estructuras principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural.

#### **Producción, recuperación y purificación de proteínas**

En algunos aspectos, las células huésped usadas para producir polipéptidos de la descripción se cultivan en medios 60 adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Ejemplos de medios adecuados para células huésped de mamíferos incluyen Medio Esencial Mínimo (MEM), Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), Medio de Expresión Expi293™, DMEM con suero bovino fetal suplementado (FBS) y R PMI-1640. Ejemplos de medios adecuados para bacterias las células huésped incluyen caldo Luria (LB) más los suplementos necesarios, como un agente de selección, p. ej., ampicilina. En algunos aspectos, las células huésped se cultivan a temperaturas adecuadas, tales como de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, por ejemplo, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C, preferiblemente 37 °C, y CO<sub>2</sub> niveles, tales como aproximadamente 5% a 10%. En

algunos aspectos, el pH del medio es de aproximadamente pH 6,8 a pH 7,4, p. ej., el pH 7,0, depende principalmente del organismo huésped. Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión, la expresión de la proteína puede inducirse en condiciones adecuadas para la activación del promotor.

5 En algunos aspectos, la recuperación de proteínas implica alterar la célula huésped, por ejemplo, mediante choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que las células se rompen, los restos celulares se eliminan mediante centrifugación o filtración. A continuación, las proteínas pueden purificarse más. En algunos aspectos, un polipéptido de la descripción se purifica mediante diversos métodos de purificación de proteínas, por ejemplo, mediante cromatografía (p. ej., cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de afinidad, cromatografía de líquidos de alta presión, y similares), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de péptidos o proteínas. Por ejemplo, en algunos aspectos, la proteína se aísla y se purifica seleccionando y combinando apropiadamente columnas de afinidad como la columna Proteína A (p. ej., Cromatografía de proteína A POROS) con columnas de cromatografía (p. ej., cromatografía de intercambio catiónico POROS HS-50), filtración, procedimientos de ultrafiltración, desalación y diálsis. En algunos aspectos, un polipéptido se conjuga con secuencias marcadoras, tales como un péptido, para facilitar la purificación. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina (etiqueta His6), que puede unirse a una columna de afinidad de agarosa funcionalizada con níquel con afinidad micromolar. Como alternativa, se puede usar una etiqueta de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina de la influenza.

10 20 En algunos aspectos, los polipéptidos de la descripción, por ejemplo, un constructo polipeptídica que comprende una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  (p. ej., cualquier variante proporcionada en las Tablas 2, 5 y 6) y un socio de fusión como una variante de Fc, HSA y un péptido de unión a albúmina, son producidas por las células de un sujeto (p. ej., un ser humano), p. ej., en el contexto de la terapia génica, mediante la administración de un vector como un vector viral (p. ej., un vector retroviral, vector adenoviral, vector poxviral (p. ej., vector viral vaccinia, tal como Vaccinia Ankara Modificada (MVA)), vector viral adenoasociado y vector alfaviral) que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la descripción. El vector, una vez dentro de una célula del sujeto (p. ej., por transformación, 25 transfección, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, microinyección directa, infección, etc.) puede usarse para la expresión de un polipéptido descrito en el presente documento. En algunos casos, el polipéptido se secreta desde la célula. En algunos aspectos, si el resultado deseado es el tratamiento de una enfermedad o trastorno, no se requiere ninguna acción adicional. En algunos aspectos, si se desea la recolección de la proteína, se recolecta sangre del sujeto y la proteína se purifica de la sangre mediante varios métodos.

### 30 X. Composiciones y preparaciones farmacéuticas

En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92.

35 En el presente documento también se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A.

40 45 50 55 La descripción presenta composiciones farmacéuticas que incluyen polipéptidos descritos en el presente documento, tales como polipéptidos que tienen una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad. En algunos aspectos, una composición farmacéutica de la descripción incluye un polipéptido de la descripción como proteína terapéutica. En algunos aspectos, una composición farmacéutica de la descripción que incluye un polipéptido descrito en este documento se usa en combinación con otros agentes o composiciones (p. ej., agentes terapéuticos, biológicos, moléculas pequeñas o cualquier combinación de los mismos) en una terapia. En algunos aspectos, uno o más agentes terapéuticamente activos adicionales, tales como por ejemplo una molécula pequeña, un compuesto químico o un compuesto biológico como polinucleótidos y polipéptidos que incluyen, pero no se limitan a, ARNip, polipéptidos cortos y anticuerpos con actividad terapéutica, son opcionalmente formulados en composiciones farmacéuticas de polipéptidos descritos en el presente documento. En algunos aspectos, las formulaciones de constructos polipeptídicos descritas en el presente documento se preparan para almacenamiento mezclando un constructo polipeptídico descrito en el presente documento que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. En algunos aspectos, una composición farmacéutica de la descripción incluye una molécula de ácido nucleico (ADN o ARN, p. ej., AR nM) que codifica un polipéptido de la descripción, o un vector que contiene dicha molécula de ácido nucleico.

60 Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables en una composición farmacéutica son preferiblemente no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones administradas. En algunos aspectos, los vehículos,

excipientes y estabilizadores aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, HEPES, TAE y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como ácido ascórbico y metionina; conservantes (p. ej., cloruro de hexametonio; cloruro de octadecidimetilbencil amonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (p. ej., menos de aproximadamente 10residuos); proteínas tales como seroalbúmina humana, gelatina, dextrano e inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, histidina y lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos como glucosa, manosa, sacarosa y sorbitol; agentes quelantes tales como azúcares EDTA tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; edulcorantes y otros aromatizantes; cargas tales como celulosa microcristalina, lactosa, maíz y otros almidones; agentes aglutinantes; aditivos; agentes colorantes; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos Zn-proteína); tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ y polietilenglicol (PEG); o cualquier combinación de los mismos.

En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos descritos en el presente documento están en una forma soluble en agua, tal como están presentes como sales farmacéuticamente aceptables,

lo que significa que incluye sales de adición de ácido y base. El término "sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica de las bases libres y que no son indeseables de otra manera, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. El término "sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables" incluye las derivadas de bases inorgánicas tales como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Las sales particularmente preferidas son sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina. Las formulaciones que pueden usarse para la administración *in vivo* son preferiblemente estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos.

En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas de la descripción se administran por vía parenteral en forma de formulación inyectable. En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas para inyección se formulan usando una solución estéril o cualquier líquido farmacéuticamente aceptable como un vehículo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, solución salina fisiológica y medios de cultivo celular (p. ej., medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio Eagles α-modificado (a-MEM) y medio F-12). Se encuentran disponibles varios métodos de formulación.

En algunos aspectos, los polipéptidos descritos en el presente documento se formulan como inmunoliposomas. Un liposoma es una pequeña vesícula que comprende varios tipos de lípidos, fosfolípidos o tensioactivos que es útil para la administración de un agente terapéutico a un mamífero. Los liposomas que contienen el anticuerpo o la fusión Fc pueden prepararse mediante varios métodos conocidos en la técnica. En algunos aspectos, los componentes del liposoma están dispuestos en una formación de bicapa, similar a la disposición lipídica de las membranas biológicas. En algunos aspectos, los liposomas se generan mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). En algunos aspectos, los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. En algunos aspectos, el liposoma contiene opcionalmente un agente quimioterapéutico u otro agente terapéuticamente activo.

En algunos aspectos, las construcciones polipeptídicas descritas en el presente documento y otros agentes terapéuticamente activos están atrapados en microcápsulas preparadas mediante métodos que incluyen, entre otros, técnicas de coacervación, polimerización interfacial (por ejemplo, usando hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina, o microcápsulas de poli (metilmetacrilato) , sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) y macroemulsiones.

En algunos aspectos, se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos cuyas matrices se encuentran en forma de artículos moldeados, p. ej., películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietilmetacrilato) o poli (alcohol vinílico)), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables como LUPRON DEPOT™ (que son microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), poli-D-(-)-ácido 3-hidroxibutírico y ProLease® (comercialmente disponible en Alkermes), que es un sistema de administración basado en microesferas compuesto por la molécula bioactiva deseada incorporada en una matriz de poli-DL-lactida-co-glicólico (PLG). Algunas formulaciones de liberación sostenida permiten la liberación de moléculas durante unos pocos meses, p. ej., de uno a seis meses, mientras que otras formulaciones liberan composiciones farmacéuticas de la descripción durante períodos de tiempo más cortos, p. ej., de días a semanas.

En algunos aspectos, la concentración del polipéptido descrito en el presente documento en una formulación farmacéutica varía de aproximadamente 0,1 a 100% en peso. En algunos casos, la concentración del polipéptido descrito en el presente documento está en el intervalo de 0,003 a 1,0 molar. En algunos casos, la concentración del polipéptido en una formulación farmacéutica varía de aproximadamente 5 mg/mL a unos 50 mg/mL (p. ej., de

- 5 aproximadamente 10mg/mL a unos 40 mg/mL o de unos 20 mg/mL a unos 30 mg/mL). En algunos aspectos, para tratar a un paciente, se administra una dosis terapéuticamente eficaz de un polipéptido descrito en el presente documento. El término "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento. En algunos aspectos, las dosis varían entre 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal o más, por ejemplo, 0,1, 1,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 mg/kg de peso corporal.
- 10 En algunos aspectos, los ajustes para la degradación del constructo polipeptídico, la administración sistémica frente a localizada y la tasa de síntesis de nuevas proteasas, así como la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la interacción farmacológica y la gravedad de la afección es necesaria.

En algunos aspectos, las composiciones y formulaciones descritas en el presente documento se administran a un sujeto que las necesita. En algunos aspectos, dicha administración se lleva a cabo *in vivo*. En algunos aspectos, dicha administración se lleva a cabo *ex vivo*. En algunos aspectos, la administración de la composición farmacéutica que comprende un polipéptido descrito en el presente documento se realiza de diversas formas, que incluyen, pero no se limitan a, por vía oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intraótica, transdérmica, tópica (p. ej., geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar (p. ej., tecnología inhalable AERx® disponible comercialmente de Aradigm, o sistema de administración pulmonar Inhance™ disponible comercialmente de Inhale Therapeutics), vaginal, parenteral, rectal o intraocular. En algunos aspectos, la composición farmacéutica se formula en consecuencia dependiendo de la forma de introducción.

En algunos aspectos, la composición farmacéutica para la terapia génica está en un diluyente aceptable o incluye una matriz de liberación lenta en donde está embebido el vehículo de administración del gen. En algunos aspectos, los vectores usados como vehículos de administración de genes *in vivo* incluyen, pero no se limitan a, vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores poxvirales (p. ej., vectores virales de vaccinia, como Vaccinia Ankara modificada), vectores virales adenoasociados y vectores alfavirales.

## XI. Vías, dosificación y administración

En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína α reguladora de señal (SIRP-α) que comprende un dominio D1 de SIRP-α, o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP-α de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP-α de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92.

En el presente documento también se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A.

En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas que incluyen polipéptidos de la descripción como proteínas terapéuticas se formulan para, p. ej., administración intravenosa, administración parenteral, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intraarterial, administración intratecal o administración intraperitoneal. En algunos aspectos, la composición farmacéutica se formula o se administra por vía oral, nasal, spray, aerosol, rectal o vaginal. Para las formulaciones inyectables, se encuentran disponibles varios vehículos farmacéuticos eficaces.

En algunos aspectos, una composición farmacéutica que incluye una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la descripción o un vector que contiene dicha molécula de ácido nucleico se administra mediante administración de genes. Se encuentran disponibles varios métodos de administración de genes. En algunos aspectos, los vectores usados como vehículos de administración de genes *in vivo* incluyen, pero no se limitan a, vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores poxvirales (p. ej., vectores virales de vaccinia, como Vaccinia Ankara modificada (VMA), vectores virales adenoasociados y vectores alfavirales. En algunos aspectos, las moléculas de AR nM que codifican polipéptidos de la descripción se administran directamente a un sujeto.

La dosis de las composiciones farmacéuticas de la descripción depende de factores que incluyen la vía de administración, la enfermedad a tratar y las características físicas, p. ej., edad, peso, salud general del sujeto. En algunos aspectos, la cantidad de un polipéptido de la descripción contenida en una sola dosis es una cantidad que previene, retrasa o trata eficazmente la enfermedad sin inducir una toxicidad significativa. En algunos aspectos, una composición farmacéutica de la descripción incluye una dosis de un polipéptido de la descripción que varía de 0,01 a 500 mg/kg (p. ej., 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o 500 mg/kg) y, en un aspecto más específico, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg y,

en un aspecto más específico, aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mg/kg. En algunos aspectos, el médico puede adaptar la dosificación según factores convencionales, tales como la extensión de la enfermedad y distintos parámetros del sujeto.

5 En algunos aspectos, la toxicidad de los agentes terapéuticos y polipéptidos descritos en el presente documento se determina mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, p. ej., determinando la LD<sub>50</sub> (la dosis letal al 50% para la población) o la LD<sub>100</sub> (la dosis letal al 100% para la población). En algunos aspectos, los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y los estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación a ser usado en seres humanos. La dosificación de las proteínas descritas en el presente documento estarán preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen una dosis eficaz con poca o ninguna toxicidad. En algunos aspectos, la dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. En algunos aspectos, la formulación exacta, la vía de administración y la dosificación son elegidas por un médico individual en vista del estado del paciente.

10 15 En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz para dar como resultado una mejora o remediación de los síntomas de una enfermedad o trastorno. En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas se administran en una variedad de formas de dosificación, p. ej., formas de dosificación intravenosa, formas de dosificación subcutánea y formas de dosificación oral (p. ej., soluciones ingeribles, cápsulas de liberación de fármacos). Generalmente, las proteínas terapéuticas se dosifican a 0,1-100mg/kg, p.ej, 1-50mg/kg. En algunos aspectos, las 20 25 composiciones farmacéuticas que incluyen un polipéptido de la descripción se administran a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, una o más veces (p. ej., 1-10 veces o más) diariamente, semanalmente, mensualmente, bianualmente, anualmente o como médica mente necesario. Las dosificaciones se pueden proporcionar en un régimen de dosificación único o múltiple. En algunos aspectos, el tiempo entre administraciones disminuye a medida que mejora la afección médica o aumenta a medida que disminuye la salud del paciente.

## 25 XII. Métodos de tratamiento

En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo 30 35 seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92.

En el presente documento también se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que 35 40 consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A.

En el presente documento se describen, en algunos aspectos, métodos de tratamiento que comprende administrar 40 45 polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92.

En algunos aspectos, la descripción proporciona composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento que se usan 45 50 para tratar a pacientes que padecen enfermedades y trastornos asociados con SIRP- $\alpha$  o actividad de CD47, tales como cánceres y enfermedades inmunológicas (por ejemplo, enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias). En algunos aspectos, los polipéptidos descritos en el presente documento se administran a un sujeto en un método para aumentar la fagocitosis de una célula diana (p. ej., una célula cancerosa) en el sujeto. En algunos aspectos, los polipéptidos se administran a un sujeto en un método para destruir células cancerosas en el sujeto. En 50 55 algunos aspectos, los polipéptidos se administran a un sujeto en un método para eliminar las células T reguladoras en el sujeto. En algunos aspectos, los polipéptidos descritos en el presente documento se administran a un sujeto en un método para aumentar el injerto de células madre hematopoyéticas en el sujeto, en donde el método incluye modular la interacción entre SIRP- $\alpha$  y CD47 en el sujeto. En algunos aspectos, los polipéptidos descritos en este documento se administran a un sujeto en un método para alterar una respuesta inmune (p. ej., suprimiendo la respuesta inmune) en el sujeto. En algunos aspectos, los métodos anteriores se combinan con otros métodos para tratar una enfermedad. En algunos aspectos, se describen en el presente documento una combinación de un polipéptido (p. ej., una variante de D1 de SIRP- $\alpha$ ) y un segundo agente terapéutico. En algunos aspectos, la combinación comprende un polipéptido (p. ej., una variante de D1 de SIRP- $\alpha$ ) y un segundo agente terapéutico, en donde el segundo agente terapéutico es un anticuerpo. En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un 60

dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92. En algunos aspectos, la combinación comprende un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, o 152-159; o un anticuerpo.

En algunos aspectos, los métodos anteriores se emplean con estrategias para tratar una enfermedad en donde la administración de un polipéptido es una opción terapéutica. Los ejemplos no limitantes de lo anterior incluyen el uso de un anticuerpo o un fragmento de proteína. Por ejemplo, en algunos aspectos, se administra un anticuerpo o fragmento de proteína en combinación con los polipéptidos variantes de Fc descritos en el presente documento. En algunos aspectos, los constructos polipeptídicos descritos en el presente documento se usan para mejorar la fagocitosis de otros agentes.

Los métodos de tratamiento incluyen administrar a un sujeto que tiene una enfermedad (p. ej., cáncer) (i) un polipéptido que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  y opcionalmente (ii) un anticuerpo. En algunos aspectos, antes de tratar una enfermedad (p. ej., cáncer) en un sujeto, la secuencia o secuencias de aminoácidos de SIRP- $\alpha$  en el sujeto se determinan, por ejemplo, a partir de cada uno de los dos alelos que codifican el gen de SIRP- $\alpha$ . En este método de tratamiento, primero se determinan las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos SIRP- $\alpha$  en una muestra biológica del sujeto. A continuación, se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de la descripción. En algunos aspectos, la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad administrada tiene la misma secuencia de aminoácidos que la de los polipéptidos de SIRP- $\alpha$  en la muestra biológica del sujeto, excepto por la introducción de cambios de aminoácidos que aumentan la afinidad del polipéptido SIRP- $\alpha$  a CD47. La variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad en el polipéptido tiene preferiblemente una inmunogenicidad mínima en el sujeto después de la administración del polipéptido.

En algunos aspectos, se administra un anticuerpo además de los polipéptidos descritos en el presente documento. En algunos aspectos, el anticuerpo se coadministra con el polipéptido. En algunos aspectos, el anticuerpo se administra simultáneamente, por ejemplo, en una composición farmacéutica que tiene tanto el polipéptido como el anticuerpo. Alternativamente, el anticuerpo se administra antes o después de la administración del polipéptido. En algunos aspectos, el polipéptido y el anticuerpo se administran sustancialmente de forma simultánea (p. ej., dentro de una semana, 6, 5, 4, 3, 2, 1 día, 12, 6, 3, 2, 1 hora entre sí o sustancialmente simultáneamente), seguido de la administración del anticuerpo solo. En algunos aspectos, el polipéptido y el anticuerpo se administran sustancialmente de forma simultánea (por ejemplo, dentro de una semana, 1 día, 1 hora entre sí o sustancialmente simultáneamente), seguido de la administración del anticuerpo solo 6, 5, 4, 3, 2, 1 días, 12, 6, 3, 2, 1 hora entre sí o sustancialmente simultáneamente.

Un anticuerpo coadministrado o proporcionado en una composición o método descrito en este documento, se refiere a un anticuerpo que se dirige a una célula, como una célula cancerosa o una célula del sistema inmunológico, como una célula T (p. ej., Un regulador Célula T). Un anticuerpo puede ser de cualquier isótipo de anticuerpo de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgA o IgD. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo de isótipo IgG1 humano. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo de isótipo IgG2 humano. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo de isótipo IgG4 humano.

El término "anticuerpo" se usa en la presente en el sentido más amplio y comprende varias estructuras de anticuerpo, que incluyen de modo no taxativo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad deseada de unión al antígeno. Un "fragmento de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente, la región variable y/o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, p. ej., los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos con la excepción de posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades mínimas. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen a un único epítopo antigenógeno (p. ej., un epítopo en un antígeno canceroso). En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único epítopo en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos considerablemente homogénea y no se debe interpretar que requiere la producción del anticuerpo a través de ningún método particular. En algunos aspectos, un anticuerpo en una composición de la presente descripción causa fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los ejemplos no limitantes de enfermedades que se tratan usando tales estrategias incluyen cánceres tales como cánceres hematológicos, por ejemplo leucemias (p. ej., leucemia mieloide aguda); trastornos inmunes (p. ej., para mejorar la respuesta inmunitaria deteriorada o disminuida de un sujeto, o alternativamente para limitar la respuesta inmunitaria hiperactiva de un sujeto); e infecciones patógenas.

En algunos aspectos, los métodos descritos en este documento comprenden administrar un polipéptido descrito en este documento (p. ej., una variante de D1 de SIRP- $\alpha$ ) y un anticuerpo que se dirige a un antígeno canceroso. En algunos aspectos, un antígeno canceroso dirigido por un anticuerpo o una proteína similar a un anticuerpo son péptidos expuestos derivados de antígenos asociados a tumores intracelulares (TAA) en complejo con moléculas de clase I de antígeno leucocitario humano (HLA) en la superficie (también conocidas como complejo MHC/péptido). Los ejemplos no limitantes de dichos antígenos cancerosos, p. ej., péptidos en complejo con moléculas de HLA expuestas en la superficie de las células cancerosas, que son el objetivo de un anticuerpo o proteínas similares a los anticuerpos en una composición de la descripción incluyen: NY-ESO-1/LAGE1, Familia SSX-2, MAGE (MAGE-A3), gp100/ pMel17, Melan-A/MART-1, tirosinasa TRP2, gp75/TRP1, CEA, PSA, TAG-72, Receptor de laminina inmaduro, MOK/RAGE-1, WT-1, Her2/neu, EphA3, SAP-1, BING-4, Ep-CAM, MUC1, PRAME, survivina, mesotelina, BRCA1/2(mutado), CDK4, CML66, MART-2, p53(mutado), Ras (mutado),  $\beta$ -catenina (mutado), TGF- $\beta$ RII (mutado), HPV E6, E7. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen ESK1 (WT-1), RL1B(Her2-E75), Pr20 (PRAME) y 3,2G1 (hCG $\beta$ ).

En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92. En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que comprende una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje dominio; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66, y residuo 92; y un anticuerpo que se dirige a NY-ESO-1/LAGE1, SSX-2, Familia MAGE (MAGE-A3), gp100/ pMel17, Melan-A/MART-1, tirosinasa TRP2, gp75/TRP1, CEA, PSA, TAG-72, Receptor de laminina inmaduro-1, MOK/RAGE-1, WT-1, Her2/neu, EphA3, SAP-1, BING-4, Ep-CAM, MUC1, PRAME, survivina, mesotelina, BRCA1/2(mutado), CDK4, CML66, MART-2, p53(mutado), Ras (mutado),  $\beta$ -catenina (mutado), TGF- $\beta$ RII (mutado), HPV E6, E7. En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66, y residuo 92; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es ESK1 (WT-1). RL1B (Her2-E75), Pr20 (PRAME) y 3,2G1 (hCG $\beta$ ).

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según las SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159 y un anticuerpo que se dirige a un antígeno canceroso. En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, o 152-159; y un anticuerpo que se dirige a la/LAGE1, familia NY-ESO-1 SSX-2, MAGE (MAGE-A3), gp100/ pMel17, Melan-A/MART-1, tirosinasa TRP2, gp75/TRP1, TRP2, CEA, PSA, TAG-72, Receptor de laminina inmaduro, 1, MOK/RAGE-1, HER2/neu, EphA3, SAP-1, BING-4, Ep-CAM, MUC1, PRAME, survivina, mesotelina, BRCA1/2(mutado), CDK4, CML66, MART-2, p53(mutado), Ras (mutado),  $\beta$ -catenina (mutado), TGF- $\beta$ RII (mutado), HPV E6, E7. En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, o 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es ESK1 (WT-1), RL1B(Her2-E75), Pr20 (PRAME) y 3,2G1 (hCG $\beta$ ).

En algunos aspectos, un anticuerpo se dirige a las células cancerosas, por ejemplo, uniéndose a proteínas expresadas por las células cancerosas. Algunas proteínas se expresan en niveles más altos en las células cancerosas que en las células no cancerosas. Por ejemplo, un antígeno canceroso es una proteína que se expresa preferiblemente por células cancerosas (p. ej., se expresa a niveles más altos en células cancerosas que en células no cancerosas) y, en algunos casos, se expresa únicamente por células cancerosas. Los ejemplos no limitantes de proteínas, p. ej., proteínas expresadas por células cancerosas, que son dirigidas por un anticuerpo en una composición de la descripción incluyen: 4-1BB, 5T4, AGS-16, ALK1, ANG-2, B7-H3, B7-H4, c-fms, c-Met, CA6, CCR4, CD123, CD19, CD20, CD22, CD27, EpcAM, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CD74, CD79b, CD98, CEA, CEACAM5, CLDN182, CLDN6, CS1, CTLA-4, CXCR4, DLL-4, EGFR, EGP-1, ENPP3, EphA3, ETBR, FGFR2, fibronectina, FR-alfa, receptor Frizzled, GCC, GD2, glypican-3, GP NMB, HER-2, HER3, HLA-DR, ICAM-1, IGF-1 R, IL-3R, LAG-3, LIV-1, mesotelina, MUC16, MUC1, NaPi2b, Nectin-4, Notch 2, Notch 1, OX40, PD-1, PD-L1, PD-L2, PDGFR- $\alpha$ , PS, PSMA, SLTRK6, STEAP1, TEM1, VEGFR, CD25, CD27L, DKK-1, CSF-1 R, o cualquiera de sus combinaciones. En algunos aspectos, los polipéptidos descritos en el presente documento se administran en combinación con un inhibidor de punto de control, como un inhibidor de anticuerpos de CTLA-4 (p. ej., ipilimumab, tremelimumab), PD-1 (p. ej., nivolumab, Pidilizumab, MK3475 también conocido como pembrolizumab, BMS936559, y MPDL3280A) y LAG-3 (p. ej., BMS986016).

En algunos aspectos, los polipéptidos descritos en el presente documento comprenden una variante de D1 de la proteína reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene

una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92; y un anticuerpo que dirige una proteína expresada por una célula cancerosa. En algunos aspectos, los polipéptidos descritos en el presente documento comprenden una variante de D1 de la proteína reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66, y residuo 92; y un anticuerpo que dirige 4-1BB, 5T4, AGS-16, ALK1, ANG-2, B7-H3, B7-H4, c-fms, c-Met, CA6, CCR4, CD123, CD19, CD20, CD22, CD27, EpCAM, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CD74, CD79b, CD98, CEA, CEACAM5, CLDN18,2, CLDN6, CS1, CTLA-4, CXCR4, DLL-4, EGFR, EGP-1, ENPP3, EphA3, ETBR, FGFR2, fibronectina, FR-alfa, receptor Frizzled, GCC, GD2, glypican-3, GP NMB, HER-2, HER3, HLA-DR, ICAM-1, IGF-1 R, IL-3R, LIV-1, mesotelina, MUC16, MUC1, NaPi2b, Nectin-4, Notch 2, Notch 1, OX40, PD-1, PD-L1, PD-L2, PDGFR- $\alpha$ , PS, PSMA, SLTRK6, STEAP1, TEM1, VEGFR, CD25, CD27L, DKK-1, CSF-1 R o cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que comprende una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje dominio; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66, y residuo 92; y un anticuerpo, donde el anticuerpo es un inhibidor de anticuerpo de CTLA-4 (p. ej., ipilimumab, tremelimumab), PD-1 (p. ej., nivolumab, pidilizumab, MK3475 también conocido como pembrolizumab y MPDL3280A), BMS936559, o LAG-3 (p. ej., BMS986016).

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo que se dirige a una proteína expresada por una célula cancerosa. En algunos aspectos, los métodos descritos en este documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, o 152-159; y un anticuerpo que se dirige a 4-1BB, 5T4, AGS-16, ALK1, ANG-2, B7-H3, B7-H4, c-fms, c-Met, CA6, CCR4, CD123, CD19, CD20, CD22, CD27, EpCAM, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CD74, CD79b, CD98, CEA, CEACAM5, CLDN18,2, CLDN6, CS1, CTLA-4, CXCR4, DLL-4, EGFR, EGP-1, ENPP3, EphA3, ETBR, FGFR2, fibronectin, FR-alpha, Frizzled receptor, GCC, GD2, glypican-3, GP NMB, HER-2, HER3, HLA-DR, ICAM-1, IGF-1 R, IL-3R, LAG-3, LIV-1, mesothelin, MUC16, MUC1, NaPi2b, Nectin-4, Notch 2, Notch 1, OX40, PD-1, PD-L1, PD-L2, PDGFR- $\alpha$ , PS, PSMA, SLTRK6, STEAP1, TEM1, VEGFR, CD25, CD27L, DKK-1, CSF-1 R, o cualquier de sus combinaciones. En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, o 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es un anticuerpo inhibidor de CTLA-4 (p. ej., ipilimumab, tremelimumab), PD-1 (p. ej., nivolumab, pidilizumab, MK3475 también conocido como pembrolizumab, BMS936559, y MPDL3280A) o LAG-3 (p. ej., BMS986016)

En algunos aspectos, los métodos descritos en este documento comprenden administrar un polipéptido descrito en el presente documento (p. ej., una variante de D1 de SIRP- $\alpha$ ) y un anticuerpo inmuno-oncológico. En algunos aspectos, los anticuerpos que se usan en las composiciones de la descripción incluyen, pero no se limitan a: cetuximab, necitumumab, pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, MEDI0680, MED16469, atezolizumab, avelumab, durvalumab, MEDI6383, RG7888, ipilimumab, enomelimumab, urelumab, PF-05082566, vablituzumab, varlilumab, mogamalizumab, SAR650984, daratumumab, trastuzumab, trastuzumab emtansina, pertuzumab, elotuzumab, rituximab, ofatumumab, obinutuzumab, RG7155, FPA008, panitumumab, brentuximab brentuximab, MSB0010718C, belimumab, bevacizumab, denosumab, panitumumab, ramucirumab, necitumumab, nivolumab, pembrolizumab, avelumab, atezolizumab, durvalumab, MEDI0680, pidilizumab, o BMS-93659, anticuerpo anti-HER2, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CS1, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-PD1, anticuerpo anti-RANKL, anticuerpo anti-OX40, anti-PD-1 anticuerpo, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-CD274, anticuerpo anti-CTLA-4, anticuerpo anti-CD137, B7-H3 anticuerpo anti-4-1BB, anti-anticuerpo, anticuerpo anti-FZD7, anticuerpo anti-CD27, anti-Anticuerpo CCR4, antibiótico anti-CD38 ody, anticuerpo anti-CSFIR, anticuerpo anti-CSF, anticuerpo anti-CD30, anticuerpo anti-BAFF, anticuerpo anti-VEGF o anticuerpo anti-VEGFR2. En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que comprende una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje dominio; y al menos una mutación adicional de aminoácidos con relación a una de tipo salvaje SIRP- $\alpha$  dominio D1 en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: el residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es, un anti-HER2 anticuerpo, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-CD 19, anticuerpo anti-CS1, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-PD1, anticuerpo anti-RANKL, anticuerpo anti-OX40, anti-PD-1 anticuerpo, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-CD274, anticuerpo anti-CTLA-4, anticuerpo anti-CD137, anticuerpo anti-4-1BB, anticuerpo anti-B7-H3, anticuerpo anti-FZD7, anticuerpo anti-CD27, anti-CCR4 anticuerpo, anticuerpo anti-CD38, anti-anticuerpo, CSF1R anticuerpo anti-CSF, anticuerpo anti-CD30, anticuerpo anti-BAFF, anticuerpo anti-VEGF o anticuerpo anti-VEGFR2. En algunos

aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que comprende una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje dominio; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es cetuximab, necitumumab, pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, MED10680, MED16469, atezolizumab, avelumab, durvalumab, MED16383, RG7888, ipilimumab, tremelimumab, uralumab, PF-05082566, enoblituzumab, vantictumab, varlilumab, mogamalizumab, SAR650984, daratumumab, RG7155, FPA008, trastumabumabumabuma, pertuzumab de panutuz, MSB0010718C, belimumab, bevacizumab, denosumab, panitumumab, ramucirumab, necitumumab, nivolumab, pembrolizumab, avelumab, atezolizumab, durvalumab, MED10680, pidilizumab o BMS-93659.

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es trastuzumab.

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es rituximab.

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es cetuximab.

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es daratumumab.

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es belimumab.

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es bevacizumab.

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es denosumab.

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es espantimumab.



6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es BMS-93659.

En algunos aspectos, los métodos descritos en este documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo,

5 en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CS1, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-PD1, anticuerpo anti-RANKL, anticuerpo anti-OX40, anticuerpo anti-PD-1, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-CD274, anti-CTLA-4 anticuerpo, anticuerpo anti-CD137, anticuerpo anti-4-1BB, anticuerpo anti- B7-H3, anticuerpo anti-FZD7, anticuerpo anti-CD27, anticuerpo anti-CCR4, anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-CSFIR, anticuerpo anti-CSF, anti- Anticuerpo CD30, anticuerpo anti-BAFF, anticuerpo anti-VEGF o anticuerpo anti-VEGFR2. En algunos aspectos, los métodos descritos en este documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es cetuximab, necitumumab, pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, MEDI0680, MED16469, atezolizumab, avelumab, durvalumab, MEDI6383, RG7888, ipilimumab, tremelimumab, urea, PF-05082566, enoblituzumab, vantictumab, varlilumab, mogamalizumab, SAR650984, daratumumab, trastuzumab, trastuzumab emtansina, pertuzumab, elotuzumab, rituximab, ofatumumab, obinutuzumab, RG7155, FPA008, panitumumab, brentuximab brentuximab, MSB0010718C, belimumab, bevacizumab, denosumab, panitumumab, ramucirumab, necitumumab, nivolumab, pembrolizumab, avelumab, atezolizumab, durvalumab, MEDI0680, pidilizumab o BMS-93659.

10 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es trastuzumab

15 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es rituximab.

20 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es cetuximab.

25 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es daratumumab.

30 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es belimumab.

35 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es bevacizumab.

40 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es denosumab.

45 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es ramucirumab.

50 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es necitumumab.

55 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es nivolumab.

60 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es pembrolizumab.

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es pantumumab.

5 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es atezolizumab.

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es durvalumab,

10 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es MEDI0680.

15 En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es pidilizumab.

En algunos aspectos, los métodos descritos en el presente documento comprenden administrar un polipéptido que tiene una secuencia según cualquiera de SEQ ID NOs: 78-85, 98-104, 107-113, 116-122, 135-137, 152-159; y un anticuerpo, en donde el anticuerpo es BMS- 93659.

20 En algunos aspectos, los polipéptidos descritos en este documento mejoran la actividad antitumoral de rituximab. En algunos aspectos, los polipéptidos descritos en el presente documento mejoran la actividad antitumoral de rituximab en el modelo de xenoinjerto Raji-NSG. En algunos aspectos, los polipéptidos descritos en este documento mejoran el agotamiento de células B mediado por rituximab en primates no humanos (NHP).

25 En algunos aspectos, los polipéptidos y las composiciones farmacéuticas de la descripción se usan en diversas terapias contra el cáncer. Los cánceres susceptibles de tratamiento según la invención incluyen, pero no se limitan a, cáncer de tumor sólido, cáncer hematológico, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cuello de útero, cáncer de endometrio, cáncer de pulmón, cáncer de bronquios, cáncer de hígado, cáncer de ovarios, cáncer de colon y recto, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de vesícula biliar, cáncer de tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de orofaringe, cáncer de esófago, melanoma, cáncer no melanoma de piel, carcinoma de células de Merkel, cáncer inducido por virus, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal, leucemia, linfoma, sarcoma, glioma, tumor cerebral, y carcinoma. En algunos aspectos, las condiciones cancerosas susceptibles de tratamiento según la descripción incluyen cánceres metastásicos. En algunos aspectos, el cáncer susceptible de tratamiento según la descripción es un tumor sólido o cáncer hematológico.

30 35 En algunos aspectos, un anticuerpo se dirige a células del sistema inmunológico, tales como células T, p. ej., células T reguladoras, uniéndose a proteínas expresadas por células del sistema inmunológico. En algunos aspectos, los métodos descritos en este documento comprenden administrar un polipéptido descrito en el presente documento (p. ej., una variante de D1 de SIRP- $\alpha$ ) y un anticuerpo que se dirige a células del sistema inmunológico. Ejemplos de proteínas expresadas por células del sistema inmunológico incluyen, pero no se limitan a, 41BB, CD40, CD40L, CD163, CD206, CTLA4, PD1, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM, CCR4, CD25, CD103, Klrg1, Nrp1, CD278, Gpr83, TIGIT CD154, CD160, y PD1H. En algunos aspectos, un anticuerpo se diseña de manera que tenga una unión preferencial a proteínas (p. ej., receptores) expresadas por células T (p. ej., células T reguladoras) en comparación con otras células del sistema inmunológico. En algunos aspectos, un anticuerpo en una composición de la descripción incluye un dominio Fc de la subclase IgG1, IgG2 o IgG4.

40 45 En algunos aspectos, los métodos de la descripción incluyen alterar una respuesta inmune en un sujeto. Los métodos incluyen administrar al sujeto un polipéptido que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad y un anticuerpo, alterando así la respuesta inmune en el sujeto. En algunos aspectos, alterar la respuesta inmune incluye suprimir la respuesta inmune.

50 55 En algunos aspectos, los polipéptidos y las composiciones farmacéuticas de la descripción se usan en diversas terapias para tratar enfermedades inmunológicas. Enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias para el tratamiento según la descripción incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, una espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, una enfermedad inflamatoria o autoinmunemediada por anticuerpos, enfermedad de injerto contra huésped, sepsis, diabetes, psoriasis, aterosclerosis, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica progresiva, esclerodermia, síndrome coronario agudo, reperfusión isquémica, enfermedad de Crohn, endometriosis, glomerulonefritis, miastenia grave, fibrosis pulmonar idiopática, asma, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), vasculitis o miositis inflamatoria autoinmune.

En algunos aspectos, administrar un polipéptido a una célula implica poner en contacto la célula con una o más de las composiciones descritas en el presente documento.

Las dosis eficaces para tales opciones de tratamiento varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio objetivo, estado fisiológico del sujeto, si el sujeto es humano o un animal, otros

5 medicamentos administra dos y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En algunos aspectos, el paciente es un ser humano, pero también se tratan mamíferos no humanos, p. ej., animales de compañía como perros, gatos, caballos, etc., mamíferos de laboratorio como conejos, ratones, ratas, etc., y similares. En algunos aspectos, las dosis de tratamiento se titulan para optimizar la seguridad y la eficacia.

10 En algunos aspectos, la dosificación terapéutica varía de aproximadamente a 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 30 mg/kg, del peso corporal del huésped. En algunos aspectos, por ejemplo, las

dosificaciones son 1 mg/kg peso corporal o 30 mg/kg peso corporal o dentro del intervalo de 1-30mg/kg. En algunos aspectos, los regímenes de tratamiento ejemplares adicionales comprenden la administración una vez cada dos

15 semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos aspectos, los agentes terapéuticos y los constructos polipeptídicos descritos en el presente documento se administran en múltiples ocasiones. En algunos aspectos, los intervalos entre dosis únicas son semanales, mensuales o anuales. En algunos aspectos, los intervalos

20 también son irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos de la entidad terapéutica en el paciente. Alternativamente, los agentes terapéuticos o los constructos polipeptídicos descritos en el presente documento se administran como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso es posible una administración menos frecuente. En algunos aspectos, la dosificación y frecuencia puede variar dependiendo de la semivida de los

anticuerpos en el paciente.

En aplicaciones profilácticas, en algunos aspectos, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. En algunos aspectos, los pacientes continúan

25 recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En otras aplicaciones terapéuticas, se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, en algunos aspectos, a la patente se le administra un régimen profiláctico.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" y similares, se refieren a la administración de un agente, o la realización de un procedimiento, con el propósito de obtener un efecto. En algunos aspectos, el efecto es profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma. En algunos aspectos, el efecto es terapéutico en términos de afectar una cura parcial o completa de una enfermedad o síntomas de la enfermedad.

### XIII. Kits

En el presente documento se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de D1 de la proteína  $\alpha$  reguladora de señal (SIRP- $\alpha$ ) que comprende un dominio D1 de SIRP- $\alpha$ , o un fragmento del mismo, que

35 tiene una mutación de aminoácido en el residuo 80 con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje; y al menos una mutación de aminoácido adicional con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: residuo 6, residuo 27, residuo 31, residuo 47, residuo 53, residuo 54, residuo 56, residuo 66 y residuo 92;

40 En el presente documento también se describen, en algunos aspectos, polipéptidos que comprenden una variante de Fc, en donde la variante de Fc comprende un dímero de dominio Fc que tiene dos monómeros de dominio Fc, en

donde cada monómero de dominio Fc se selecciona independientemente de (i) una región Fc de IgG1 humana que consiste en mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A; (ii) una región Fc de IgG2 humana que consiste en mutaciones A330S, P331S y N297A; o (iii) una región Fc de IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P, E233P, F234V, L235A, delG236 y N297A.

45 También se proporcionan kits que incluyen polipéptidos descritos en este documento e instrucciones para el uso de los mismos. Opcionalmente, los kits pueden incluir además al menos un reactivo adicional. Como ejemplo no limitante, un agente quimioterapéutico o un anticuerpo antitumoral podría servir como al menos un agente adicional. En algunos aspectos, los kits incluyen una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier escritura o material grabado suministrado en o con el kit, o que de otro modo acompañe al kit.

50 En algunos aspectos, un kit incluye (i) un polipéptido que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad; opcionalmente (ii) un anticuerpo; e (iii) instrucciones para administrar (i) y (ii) (si se proporcionan) a un sujeto que padece una enfermedad. En algunos aspectos, los kits incluyen (i) un polipéptido que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad; e (ii) instrucciones para administrar (i) un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo que no se

55 proporciona en el kit, a un sujeto que padece una enfermedad. En algunos aspectos, los kits incluyen (i) un anticuerpo; e (ii) instrucciones para administrar (i) un polipéptido que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad a un sujeto que padece una enfermedad.

En algunos aspectos, los kits se usan para tratar un sujeto que tiene cáncer, tal como cáncer de tumor sólido, cáncer hematológico, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica

aguda, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, mieloma, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de pulmón, cáncer de bronquios, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de colon y recto, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de vesícula biliar, cáncer de tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cáncer de cuello, cáncer de orofaringe, cáncer de esófago,

5 melanoma, cáncer de piel no melanoma, carcinoma de células de Merkel, cáncer inducido por virus, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal, leucemia, linfoma, sarcoma, glioma, tumor cerebral, carcinoma o cualquier combinación de los mismos.

En algunos aspectos, los kits se usan para tratar a un sujeto que tiene un cáncer de tumor sólido o un cáncer hematológico.

10 En algunos aspectos, los kits se usan para tratar a un sujeto que padece enfermedades inmunológicas. En algunos aspectos, la enfermedad inmunológica es una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria, tal como la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, una espondiloartropatía, lupus eritematoso sistémico, una enfermedad inflamatoria o autoinmune mediada por anticuerpos, enfermedad de injerto contra huésped, sepsis, diabetes, psoriasis, aterosclerosis, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica progresiva, esclerodermia, síndrome coronario agudo, 15 reperfusión isquémica, enfermedad de Crohn, endometriosis, glomerulonefritis, miastenia grave, fibrosis pulmonar idiopática, asma, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), vasculitis, miositis inflamatoria autoinmune, o cualquier combinación de los mismos.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1 - Polipéptidos variantes de D1 de SIRP- $\alpha$

#### 20 Generación de polipéptidos de la descripción

Un polipéptido de la descripción que incluye una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se genera usando técnicas convencionales de clonación molecular y expresión de proteínas. Las posibles sustituciones de aminoácidos en una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  con respecto a un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje se enumeran en las Tablas 2 y 5. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la descripción se clona en un vector optimizado para la expresión en bacterias o células de mamífero que usan técnicas de biología molecular bien conocidas. Después de la inducción de la expresión de la proteína, las células se recogen y los polipéptidos expresados se purifican del sobrenadante del cultivo celular usando cromatografía en columna de afinidad. Los polipéptidos purificados se analizan luego mediante SDS-PAGE, seguido de tinción con azul de Coomassie para confirmar la presencia de bandas de proteínas del tamaño esperado.

25 30 Los polipéptidos purificados se criban para determinar su unión a CD47 usando técnicas disponibles en la técnica, tales como presentación de fagos, presentación de levadura, resonancia de plasmón superficial (SPR), ensayos de centelleo de proximidad, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN), extinción de fluorescencia, transferencia de fluorescencia o cualquier bioensayo. Los polipéptidos deseados se unen a CD47 con mayor afinidad, por ejemplo, CD47, a un ser humano que a un SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje.

#### 35 Afinidad de unión de polipéptidos variantes de D1 de SIRP- $\alpha$

En una serie de experimentos, los polipéptidos de dominios D1 SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje y variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se generaron usando técnicas de clonación y de expresión de proteínas moleculares convencionales. La unión a CD47 humano se determinó usando SPR de la siguiente manera: brevemente, unión de CD47 humano (R y D Systems, número de catálogo 4670-CD o producido internamente como dominio extracelular monomérico, ECD) a SIRP de tipo salvaje- $\alpha$  y SIRP-variantes de polipéptidos variantes  $\alpha$  D1 se analizaron en un T100 instrumento Biacore (GE Healthcare) o Proteon XPR36 (Bio-rad, Hercules, CA) usando solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) complementado con 0,01% Tween -20 (PBST) como báfer de ejecución. 200a 1000RU de ligando se inmovilizaron en tampón de acetato de sodio 10mM (pH 4,5) en un chip Biacore CM4 sensor o chip Proteon GLC mediante acoplamiento de amino estándar siguiendo las recomendaciones del fabricante. Varias concentraciones de analito (o polipéptidos variantes de D1 de SIRP- $\alpha$ ), p. ej., variando desde al menos 0,1x a 10x valor KD, se inyectaron durante dos minutos con una velocidad de flujo 100 $\mu$ L/min, seguido de diez minutos de tiempo de disociación. Después de cada inyección de analito, la superficie se regeneró usando una mezcla 2:1 de tampón de elución Pierce IgG (Life Technologies, número de catálogo 21004) y 4M NaCl inyectado durante 30 segundos. La regeneración completa de la superficie se confirmó mediante análisis de línea base e inyectando el mismo analito al comienzo y al final del experimento. Todos los sensogramas se referenciaron doble usando una superficie de referencia y una inyección de tampón y se ajustaron a 1:1 Langmuir. El analito fue principalmente monomérico, ya sea CD47 ECD o SIRP- $\alpha$  sin Fc. El ligando del chip puede ser monomérico o una fusión Fc. Los datos de unión se proporcionan en la Tabla 16. Todos los ensayos de SPR se realizaron a 25 °C.

**Tabla 16.** Polipéptido variante de SIRP- $\alpha$  y valores de KD asociados

SEQ ID NO:	Humano CD47 K <sub>D</sub> (M)
2	0,5 x 10 <sup>-6</sup>
53	4,5 x 10 <sup>-10</sup>
54	2,7 x 10 <sup>-9</sup>
55	6,2 x 10 <sup>-10</sup>
56	2,0 x 10 <sup>-10</sup>
57	3,6 x 10 <sup>-10</sup>
58	1,6 x 10 <sup>-10</sup>
59	1,4 x 10 <sup>-8</sup>
60	3,8 x 10 <sup>-10</sup>
61	3,8 x 10 <sup>-10</sup>
62	1,3 x 10 <sup>-10</sup>
63	8,9 x 10 <sup>-11</sup>
64	5,45 x 10 <sup>-9</sup>
65	8,00 x 10 <sup>-10</sup>
66	4,70 x 10 <sup>-10</sup>
67	2,06 x 10 <sup>-10</sup>
68	2,51 x 10 <sup>-10</sup>
69	2,40 x 10 <sup>-9</sup>
71	4,94 x 10 <sup>-9</sup>
72	7,38 x 10 <sup>-10</sup>
73	4,48 x 10 <sup>-10</sup>
74	2,76 x 10 <sup>-10</sup>
75	1,33 x 10 <sup>-9</sup>
76	7,41 x 10 <sup>-9</sup>
77	1,14 x 10 <sup>-10</sup>
78	1,44 x 10 <sup>-11</sup>

SEQ ID NO:	Humano CD47 K <sub>D</sub> (M)
79	2,17 x 10 <sup>-10</sup>
80	4,72 x 10 <sup>-11</sup>
85	1,19 x 10 <sup>-10</sup>

5 También se ha determinado que tener un residuo de glutamato o aspartato en la posición 54 mejora la unión de los polipéptidos variantes de D1 de SIRP - α al ratónCD47. Como ejemplo no limitante, los polipéptidos variantes de D1 de SIRP-α identificados en la Tabla 17 a continuación demuestran una unión de alta afinidad al CD47 de ratón. La afinidad de unión al CD47 humano de varios polipéptidos variantes de D1 de SIRP-α se comparó con la afinidad de unión al CD47 de ratón usando SPR como se describió anteriormente, con la proteína CD47 de ratón en lugar del CD47 humano cuando fuera apropiado. Los resultados se muestran en la tabla 18.

**Tabla 17.** Secuencias polipeptídicas variantes de SIRP-α con unión mejorada al ratón CD47

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
195	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTMTSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNNDMDFSIIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVE VEFKSGAGTELSVRAKPS
196	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSKPGVPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNNDMDFSIIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS
197	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSRPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNNDMDFSIIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS
198	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSYPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNNDMDFSIIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS
199	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ RDGPFPRTVTTVSDTTKRNNDMDFSIIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGIPDDVE EFKSGAGTELSVRAKPS
200	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNNDMDFSIIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGIPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS
201	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNNDMDFSIIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGMPDDV EFKSGAGTELSVRAKPS
202	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNNDMDFSIIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDVEF KSGAGTELSVRAKPS

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
203	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNNDMSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSSEPDV EFKSGAGTELSVRAKPS
204	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLRPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ RDGPFPRTTSDTTKRNNDMSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDV EFKSGAGTELSVRAKPS
205	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLRPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNNDMSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGIPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS
206	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLRPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ RDGPFPRTTSDTTKRNNDMSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGIPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS
207	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLYPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ RDGPFPRTTSDTTKRNNDMSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDV EFKSGAGTELSVRAKPS
208	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLYPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ REGPFPRVTTVSDTTKRNNDMSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGIPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS
209	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLYPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ RDGPFPRTTSDTTKRNNDMSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGIPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS
210	EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQ RDGPFPRTTSDTTKRNNDMSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGIPDDVE FKSGAGTELSVRAKPS

**Tabla 18.** Unión de polipéptidos variantes de SIRP- $\alpha$  a humanos y ratones CD47

SEQ ID NO:	K <sub>D</sub> (M) - Humano	K <sub>D</sub> (M) - Ratón
96	1,04 x 10 <sup>-11</sup>	3,32 x 10 <sup>-8</sup>
97	1,55 x 10 <sup>-9</sup>	>100 nM
100	2,69 x 10 <sup>-9</sup>	6,32 x 10 <sup>-8</sup>
104	9,19 x 10 <sup>-11</sup>	8,04 x 10 <sup>-9</sup>
86	1,44 x 10 <sup>-11</sup>	4,30 x 10 <sup>-8</sup>
85	8,23 x 10 <sup>-11</sup>	1,14 x 10 <sup>-8</sup>

SEQ ID NO:	K <sub>D</sub> (M) - Humano	K <sub>D</sub> (M) - Ratón
204	3,49 x 10 <sup>-9</sup>	5,21 x 10 <sup>-9</sup>
206	5,26 x 10 <sup>-9</sup>	3,33 x 10 <sup>-9</sup>
209	4,46 x 10 <sup>-9</sup>	4,11 x 10 <sup>-9</sup>
210	6,79 x 10 <sup>-9</sup>	6,01 x 10 <sup>-9</sup>

También se ha determinado que la mutación N80A, que puede minimizar o anular la glicosilación parcial presente en ciertos polipéptidos variantes de D1 de SIRP- $\alpha$ , confiere un beneficio funcional de aumentar la homogeneidad asociada con polipéptidos variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  que contienen tal mutación. Cuando los polipéptidos variantes

5 de SIRP- $\alpha$  se expresan en *E. coli*, no N80 se producirá la glicosilación de debido a la falta de sistema de glicosilación en *E. coli* en comparación con un sistema de mamíferos. La Tabla 19 muestra que la unión eficaz entre un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  producido en *E. coli* y CD47 humano todavía puede ocurrir, lo que demuestra que la desglicosilación no afecta la afinidad de unión con la que las variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  aún pueden unirse a CD47. Además de la mutación N80A, la desglicosilación se puede lograr mutando N80 a cualquier aminoácido que no sea N 10 o interrumpiendo el motivo N-Xaa1-Xaa2 en donde N = asparagina; Xaa1 = cualquier aminoácido excepto P (prolina); Xaa2 = T (treonina), S (serina) o C (cisteína), en donde el motivo se refiere a residuos 80-82 de un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$ . Al mutar P83 a valina u otro residuo que no sea P, N80 puede producirse un aumento de la glicosilación en y se pueden generar polipéptidos variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  glicosilados de forma homogénea.

15 El aminoácido P83 también puede afectar el grado de glicosilación. Cambiar P83 a cualquier aminoácido puede aumentar la eficacia de la glicosilación en N80. Una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tiene una valina (V) en la posición 83 (SEQ ID NO: 213) se expresó en células de mamífero HEK293FS. El tamaño de la proteína expresada se comparó con una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que tenía el residuo de aminoácido de tipo salvaje (p. ej., prolina, P) en la posición 20 83 (SEQ ID NO: 71). El análisis del peso molecular de la proteína expresada en un gel de proteína (Fig. 18) muestra que la variante que tiene una P83Vmutación (SEQ ID NO: 213, Carril 2) tiene un peso molecular más alto (p. ej., ~22 KDa) en comparación con la variante que es no mutada en la posición 83 (carril 1). Como se muestra en la FIG.18, cuando el residuo 83 se muta a Val, el polipéptido variante SIRP- $\alpha$  expresado en una célula huésped de mamífero es principalmente una molécula de mayor peso molecular (~ 22 KDa), lo que indica que se puede aumentar la eficiencia de la glicosilación en N80.

25 **Tabla 19.** Datos de unión representativos para Secuencias de polipéptidos variantes de SIRP- $\alpha$  que tienen varios perfiles de glicosilación

SEQ ID NO:	K <sub>D</sub> (M)	sistema de expresión
53	4,5 x 10 <sup>-10</sup>	<i>E. coli</i>
58	1,6 x 10 <sup>-10</sup>	<i>E. coli</i>
60	3,8 x 10 <sup>-10</sup>	<i>E. coli</i>
63	8,9 x 10 <sup>-11</sup>	<i>E. coli</i>
55	6,2 x 10 <sup>-10</sup>	<i>E. coli</i>
62	1,3 x 10 <sup>-10</sup>	<i>E. coli</i>
57	3,6 x 10 <sup>-10</sup>	<i>E. coli</i>
56	2,0 x 10 <sup>-10</sup>	<i>E. coli</i>
61	3,8 x 10 <sup>-10</sup>	<i>E. coli</i>

SEQ ID NO:	K <sub>D</sub> (M)	sistema de expresión
54	2,7 x 10 <sup>-9</sup>	E. coli
59	1,4 x 10 <sup>-8</sup>	E. coli
2	0,5 x 10 <sup>-6</sup>	E.coli
53	5,2 x 10 <sup>-10</sup>	células de mamíferos
77	1,14 x 10 <sup>-10</sup>	células de mamíferos
74	2,76 x 10 <sup>-10</sup>	células de mamíferos
73	4,48 x 10 <sup>-10</sup>	células de mamíferos
72	7,38 X <sub>1</sub> 10 <sup>-10</sup>	células de mamíferos
75	1,33 x 10 <sup>-9</sup>	células de mamíferos
71	4,94 x 10 <sup>-9</sup>	células de mamíferos
76	7,41 x 10 <sup>-9</sup>	células de mamíferos

#### Ejemplo 2 - generación de polipéptidos SIRP- $\alpha$ biespecíficos y de un solo brazo

La capacidad de los constructos que comprenden heterodímeros de (i) una proteína de fusión SIRP -  $\alpha$  - Fc y (ii) un monómero de dominio Fc fusionado a un polipéptido, como un dominio de unión a antígeno, para unirse tanto a CD47

5 como un antígeno, p. ej., EGFR, se determinó mediante SPR como se describió previamente en este ejemplo. Las proteínas de fusión Fc para formar heterodímeros se proporcionan en la Tabla 20. Se probaron tres fusiones SIRP - $\alpha$  - Fc monofuncionales (p. ej., que se unen a una diana). Estas proteínas de fusión se representan como A, B, C en la FIG. 6A. Una primera fusión monofuncional SIRP- $\alpha$  - Fc ("A") era un homodímero de SEQ ID NO:136. La segunda y tercera fusión monofuncional SIRP- $\alpha$  - Fc eran heterodímeros de (i) una fusión SIRP- $\alpha$  - Fc y (ii) un dominio Fc

10 monómero sin un polipéptido adicional fusionado a él. Estos fueron generados usando las estrategias de ingeniería de mutaciones ojal & botón representadas en las Figs. 4A y 4B. Se formó una fusión monofuncional de SIRP- $\alpha$  - Fc ("B") a partir de la heterodimerización de SEQ ID NO:139 (una variante de Fc) y SEQ ID NO:142 (una fusión de SIRP- $\alpha$  - Fc). Se formó una fusión monofuncional de SIRP- $\alpha$  - Fc ("C") a partir de la heterodimerización de SEQ ID

15 NO:139 (una variante de Fc) y SEQ ID NO:138 (una fusión de SIRP- $\alpha$  - Fc). La fusión bifuncional (p. ej., Unión de dos dianas) SIRP- $\alpha$  - Fc ("D") se formó a partir de la heterodimerización de SEQ ID NO:127 (una fusión SIRP- $\alpha$  Fc) y SEQ ID NO:144 (una región de unión al antígeno de Erbitux unida a una variante de Fc). SEQ ID NO:220 representa la cadena ligera del anticuerpo Erbitux.

**Tabla 20.** Secuencias de aminoácidos de proteínas de fusión Fc para formar heterodímeros

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
138	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGIQWFRGAGPGRVLIYN QRQGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCIKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ NO:	ID	Secuencia de aminoácidos
139		DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
142		EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
144		QVQLKQSGPGLVQPSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAAIGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCRKHTCPRCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
220		DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYESISGIPSRSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
217		EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSKTHCPECPAPEAAGAPSVLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Brevemente, CD47 se inmovilizó en un chip Proteon GLC mediante química de amina como se describió anteriormente. En una primera inyección, se injectaron analitos (p. ej., A, B, C, D y Erbitux) a 30 uL/min en PBST durante 60 s a 100 nM y la unión a la CD47 superficie se determinó mediante SPR. En una segunda inyección, se

- 5 inyectó 100 nM EGFR-ECD (dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico producido en las células HEK293) y se midió la unión de EGFR-ECD a los analitos unidos a CD47. Erbitux no unió CD47 en el chip y por lo tanto no pudo unir EGFR en la segunda inyección como se muestra por la curva etiquetada "Erbitux" en la FIG. 6B e ilustrado en la FIG. 6A. Las fusiones SIRP- $\alpha$ -Fc (p. ej., A, B y C) se unieron a CD47 pero no se unieron a EGFR en la segunda inyección, como se muestra en las curvas etiquetadas como "A", "B" y "C" que se muestran en la FIG. 10 6B e ilustrado en la FIG. 6A. Las proteínas monoméricas, o proteínas con un dominio D1 de SIRP- $\alpha$  (p. ej., B y C)

unidades de resonancia más altas que la proteína dimérica (p. ej., A) debido a una mayor cantidad de moléculas unidas a los mismos CD47 sitios disponibles en el chip como se muestra por las curvas etiquetadas "B" y "C", que indican unión a CD47 inmovilizado y unión insignificante a EGFR-ECD (p. ej., monofuncionalidad). El SIRP- $\alpha$  - Erbitux-Fc heterodimérico se unió a CD47 en el chip y también fue capaz de unirse a EGFR-ECD en la segunda inyección como se muestra por la curva marcada con "D" en la FIG. 6B, que indica unión a CD47 inmovilizado y unión de EGFR-ECD (p. ej., bifuncionalidad).

**Ejemplo 3 - prueba de polipéptidos con alta afinidad de unión a CD47 en ratones**

Para probar la unión a CD47 de los polipéptidos de la descripción a se usan modelos de ratón modificados genéticamente de varios cánceres, p. ej., tumor sólido y cáncer hematológico. Se inyecta un polipéptido de la descripción en un ratón, que se deseca en el momento posterior para detectar la presencia del complejo del polipéptido y CD47. En la detección se usan anticuerpos específicos de SIRP- $\alpha$  o CD47.

**Ejemplo 4 - prueba de polipéptidos para determinar su inmunogenicidad**

Los polipéptidos que incluyen una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se prueban en ensayos de inmunogenicidad. Los polipéptidos se prueban tanto in silico como in vitro en ensayos de proliferación de células T, algunos de los cuales están disponibles comercialmente. Los polipéptidos que provocan una reacción de inmunogenicidad mínima en un ensayo de proliferación de células T in vitro y muestran una mayor afinidad de unión a CD47 a SIRP- $\alpha$  de tipo salvaje se seleccionan para un desarrollo posterior.

**Ejemplo 5 - prueba de polipéptidos para determinar la toxicidad *in vivo***

Se inyectan diferentes polipéptidos que incluyen diferentes variantes de D1 de SIRP -  $\alpha$  de alta afinidad que muestran varios grados de afinidades de unión a CD47 aumentadas a que el SIRP -  $\alpha$  de tipo salvaje en un modelo de cáncer animal (p. ej., un modelo de cáncer de ratón) para analizar el efecto de diferentes afinidades de unión sobre la toxicidad en el organismo. Los primates no humanos (NHP) también se pueden usar para probar variantes de D1 de SIRP -  $\alpha$  de alta afinidad, ya que el nivel de reactividad cruzada para primates no humanos (NHP) CD47 y ratón CD47 puede ser diferente.

Además de su capacidad para modular la función diana, los anticuerpos monoclonales terapéuticos y las proteínas de fusión que contienen Fc también son capaces de provocar dos mecanismos efectores inmunitarios primarios: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La ADCC está mediada por la unión de la región Fc a los receptores Fc activadores y los constructos polipeptídicos que comprenden las variantes de Fc descritas en el presente documento se ensayaron para determinar la unión al receptor Fc. Como se muestra en la Tabla 21 a continuación, los constructos polipeptídicos demostraron una unión disminuida a uno o más receptores Fc en comparación con una IgG Fc de tipo salvaje correspondiente. Con respecto a IgG1, las mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A de un Fc de IgG1 dieron como resultado una pérdida severa de unión a los receptores Fc CD16a, CD32a, CD32b, CD32c, y CD64 en comparación con una IgG1 de tipo salvaje, o un constructo que carece de una o más de estas mutaciones. En consecuencia, las mutaciones L234A, L235A, G237A (p. ej., IgG1 AAA), junto con la glicosilación o la mutación desglicosilante, N297A dieron como resultado la pérdida completa de la unión a los receptores Fc estudiados. Desde receptor Fc se conoce la unión a ser importante a la fagocitosis, las mutaciones L234A, L235A, G237A y N297A pueden resultar en la reducción de la fagocitosis del constructo que comprende la variante de Fc.

Los siguientes métodos y materiales se usaron en los Ejemplos más adelante: Unión de receptores Fc humanos RI, (CD64) RIIA (CD32a), RIIB/C (CD32b/c) y RIIIA (CD16a) (R & D Systems, los números de catálogo 1257-FC-050, 1330-CD-050, 1875-CD-050 y 4325-FC-050 respectivamente) a constructos variantes de Fc se analizaron en un XPR36 instrumento ProteOn (Bio-Rad, Hercules, CA) usando solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) suplementada con 0,01% Tween-20 como tampón de ejecución. Se inmovilizaron aproximadamente 400 unidades de resonancia (RU) de constructos de Fc mínimamente biotiniladas en celdas de flujo de un chip sensor de NLC (Bio-rad, Hercules, CA) mediante interacción avidina-neutravidina. La biotinilación se realizó según las instrucciones del fabricante usando Pierce EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin y una relación equimolar de enlazador:proteína. Los analitos (hFc $\gamma$ R) se inyectaron en un modo cinético de "un solo disparo" a concentraciones nominales de 0,61, 185, 555, 1666 y 5000 nM. Los tiempos de asociación y disociación se controlaron para 90s y 600s respectivamente. Después de cada inyección, la superficie se regeneró usando una mezcla 2:1 v/v de tampón de elución Pierce IgG (Life Technologies, número de catálogo 21004) y NaCl 4 M. La regeneración completa de la superficie se confirmó inyectando las variantes de Fc al comienzo y al final del experimento. Los datos del biosensor fueron doblemente referenciados sustrayendo los datos entre puntos (que no contenían proteína inmovilizada) de los datos del punto de reacción (proteína inmovilizada) y luego sustrayendo la respuesta de una inyección de analito "en blanco" de tampón de la de una inyección de analito. Los datos de doble referencia se ajustaron a un análisis de equilibrio usando una isoterma de unión simple.  $K_{D, app}$ . Para las moléculas de Fc con fuerte unión a hFc $\gamma$ RI, los datos también se ajustaron

globalmente a un modelo de Langmuir simple y el valor de  $K_{D,app}$  se calculó a partir de la relación de las constantes de velocidad cinética aparente ( $K_{d,app} = K_D,app / k_{a,app}$ )

Como se muestra en la Tabla 21, las mutaciones A330S, P331S y N297A de una región Fc de IgG2 dieron como resultado una pérdida severa de unión a los receptores Fc de CD16a, CD32a, CD32b, CD32c, y CD64 en comparación con una IgG de tipo salvaje o un constructo que carece de estas mutaciones. En consecuencia, las mutaciones A330S, P331S y N297A dan como resultado la pérdida completa de la unión a los receptores Fc estudiados. Dado que se sabe que la unión al receptor Fc es importante para la fagocitosis, A330S, P331S, se prevé que las mutaciones y N297A resulten en una reducción de la fagocitosis de la variante de Fc. También se proporcionan datos de unión para IgG4 y diversas mutaciones.

10 **Tabla 21.** Datos de unión ( $K_D$ ) para la unión del receptor Fc a las variantes de Fc.

Descripción de FC	CD16a	CD32a	CD32b/c	CD64
IgG1	nM370	nM400	nM2000	nM0,004
IgG1_AAA	-	nM2300	-	nM8000
IgG1_N297A	-	-	-	nM150
IgG1_AAA_N297A	-	-	-	-
IgG2	-	nM420	-	nM700
IgG2_A330S, P331S	-	nM390	-	nM900
IgG2_N297A	-	-	-	-
IgG2_A330S, P331S,N297A	-	-	-	-
IgG4	nM4100	nM720	nM710	1 nM
IgG4_S228P	nM3000	nM810	nM850	1 nM
IgG4_S228P, L235E	nM2400	nM1200	nM1100	60 nM
IgG4_S228P, E233P, F234V,L235A,delG236	-	nM1600	-	nM2100
La ausencia de enlace está representada por "-"				

#### Ejemplo 7 - Determinación de unión de C1q de variantes de Fc

La citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) está mediada por la proteína C1q del complemento y la activación de la cascada del complemento. La unión de diversas concentraciones de C1qcomplemento a diversos constructos de SIRP- $\alpha$  Fc se determinó mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se prepararon fusiones SIRP- $\alpha$  Fc a 5  $\mu$ g/mL en PBS pH 7,4 y se usa para recubrir pocillos duplicados de placas de 96 pocillos Nunc Immulon 4HBX ELISA (usando 50  $\mu$ L/pocillo) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron cinco veces con tampón de lavado (PBS y 0,05%Tween-20) y se incubaron con 200 $\mu$ L/pocillo de tampón de bloqueo (PBS y 0,5%BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cinco veces y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con 0, 0,13, 0,41, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3, 100  $\mu$ g/mL C1qen tampón de ensayo (PBS, 0,5% BSA, 0,05% Tween-20, 0,25%CHAPS, EDTA 5 mM y 0,35% NaCl). Las placas se lavaron e incubaron durante 1 hora con 50 $\mu$ L/pocillo HRP conjugado de oveja-anti-C1q-humano en 2,0  $\mu$ g/mL en tampón de ensayo. Las placas se lavaron cinco veces y se incubaron durante ~10minutos con TMB (1-Step Ultra TMB-ELISA, Thermo Sci. Cat. # 34028). Finalmente, se añadieron 50 $\mu$ L/pocillo Pierce/Thermo Sci. Solución de parada (0,16M ácido sulfúrico, cat. # N600) y las placas se leyeron a una absorbancia de 450 nm con una referencia de 570 nm. Los pocillos que carecían de la fusión SIRP- $\alpha$  - Fc se corrieron para controlar la unión no específica de C1qo del anticuerpo de detección conjugado con HRP a la placa. Los pocillos que carecían de la fusión SIRP- $\alpha$  - Fc se corrieron para controlar la unión no específica de C1qo del anticuerpo de detección conjugado con HRP a la placa.

- Como se muestra en la FIG. 14, tanto la IgG1 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 123) como la IgG2 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 126) se unieron a C1q de una manera dependiente de la dosis. Por el contrario, variantes de IgG1 IgG1\_AAA; (SEQ ID NO: 124) IgG1\_N297A (SEQ ID NO: 125); y (SEQ ID NO: 96) IgG1\_AAA\_N297A demostró una actividad de unión a C1q significativamente reducida y mínimamente detectable. Asimismo, las variantes de IgG2 IgG2\_-; A330S, P331S(SEQ ID NO: 127) IgG2\_N297A (SEQ ID NO: 128); e IgG2 N297A, A330S, P331S(SEQ ID NO: 129) también demostró una actividad de unión a C1q significativamente reducida y mínimamente detectable. Esta actividad de unión reducida y mínimamente detectable C1qde las variantes de IgG1 e IgG2 fue comparable a la IgG4 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 130) que no se une C1q.

**Ejemplo 8 - Producción de variantes de Fc y Fc de tipo salvaje**

- 10 Usando los métodos descritos en el presente documento y según aspectos de la descripción, se han producido los polipéptidos Fc de tipo salvaje y las variantes de Fc de la Tabla 7.

**Ejemplo 9 - Producción de polipéptidos variante SIRP- $\alpha$  y variante de Fc**

- 15 Usando los métodos descritos en el presente documento y según aspectos de la descripción, se produjeron los siguientes polipéptidos de variante de SIRP - $\alpha$  D1-variante de Fc como se muestra en la Tabla 22 a continuación. La unión a humanos CD47 se determinó mediante las metodologías descritas en el Ejemplo 1.

**Tabla 22.** Afinidad de unión a CD47 de polipéptidos variantes de Fc variante de SIRP- $\alpha$ .

SEQ ID NO:	$K_D(M)$
96	$3,51 \times 10^{-11}$
97	$1,09 \times 10^{-9}$
98	$8,73 \times 10^{-11}$
99	$8,95 \times 10^{-10}$
100	$1,79 \times 10^{-9}$
101	$8,90 \times 10^{-10}$
102	$3,79 \times 10^{-10}$
103	$2,56 \times 10^{-10}$
104	$9,19 \times 10^{-11}$
105	$3,16 \times 10^{-11}$
106	$8,11 \times 10^{-10}$
107	$2,19 \times 10^{-11}$
108	$4,78 \times 10^{-10}$
109	$2,15 \times 10^{-9}$
110	$6,53 \times 10^{-10}$
111	$3,15 \times 10^{-10}$
112	$2,22 \times 10^{-10}$

SEQ ID NO:	K <sub>D</sub> (M)
113	1,32 x 10 <sup>-10</sup>
114	3,43 X10 <sup>-11</sup>
115	4,98 x 10 <sup>-10</sup>
135	3,46 x 10 <sup>-9</sup>
136	1,19 x 10 <sup>-10</sup>

#### Ejemplo 10- fagocitosis de variantes de Fc de SIRP- $\alpha$

Para obtener medidas cuantitativas de la fagocitosis, se utilizó un ensayo de fagocitosis en donde se cocultivaron 5 macrófagos humanos primarios y células tumorales marcadas con GFP+ o CFSE- con los constructos de polipéptidos variantes de Fc descritas en el presente documento. Se emplearon los siguientes materiales y métodos:

##### **Cultivo de líneas de células tumorales**

Las células DLD-1-GFP-Luciferasa, MM1R y N87 se mantuvieron en medio de crecimiento que comprendía R PMI (Gibco) suplementado con Suero bovino fetal inactivado por calor (Gibco) 10%, penicilina/streptomicina (Gibco) 1 % y Glutamax (Gibco) 1 %. Se cultivaron DLD-1-GFP-Luciferasa y las células N87 como monocapas adherentes y las 10 células MM1R se cultivaron en suspensión.

##### **Derivación y cultivo de macrófagos derivados de monocitos humanos**

Las capas leucocíticas de sangre completa se diluyeron 1:2 con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco). La sangre diluida se dividió en dos tubos y se cubrió con 20 ml de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Los tubos se 15 centrifugaron durante 30 minutos a 400 x g. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la interfaz, se lavaron dos veces mediante la adición de 40 ml de PBS, se centrifugaron durante 10 minutos a 100 x g y se resuspendieron en tampón FACS (PBS con Albúmina de suero bovino (Gibco) 0,5%). los monocitos CD14+ se purificaron mediante selección negativa usando el kit de aislamiento de monocitos II (Miltenyi Biotec) y columnas LS (Miltenyi Biotec) según el protocolo del fabricante. Los monocitos CD14+ se sembraron en placas de cultivo de tejidos 20 de 15 cm (Corning) a 10 millones de células por placa en 25 ml de medio de diferenciación compuesto de IMDM (Gibco) 10% suplementado con suero AB humano (Corning) 1%, penicilina/streptomicina 1%, y Glutamax. Las células se cultivaron durante siete a diez días.

##### **Ensayos de fagocitosis in vitro**

Se separaron DLD-1-GFP-Luciferasa y las células N87 de las placas de cultivo lavando dos veces con 20 ml de PBS 25 e incubando en 10ml de TrypLE Select (Gibco) durante 10 minutos a 37°C. Las células se eliminaron con un raspador de células (Corning), se centrifugaron, se lavaron en PBS y se resuspendieron en IMDM. Las células MM1R y N87 se marcaron con el kit Celltrace CFSE Cell Proliferation (Thermo Fisher) según las instrucciones del fabricante y se resuspendieron en IMDM. Los macrófagos se separaron de las placas de cultivo lavando dos veces con 20 ml de PBS e incubando en 10ml de TrypLE Select durante 20 minutos a 37°C. Las células se eliminaron con un raspador de células (Corning), se lavaron en PBS y se resuspendieron en IMDM.

30 Los ensayos de fagocitosis se ensamblaron en placas de 96 pocillos con fondo en U de unión ultrabaja (Corning) que contenían células 100,000 DLD-1 GFP Luciferasa, MM1R o N87, diluciones en serie de cinco veces de variantes de SIRP -  $\alpha$  - Fc de 1000 nM a 64 pM, y cetuximab (anticuerpo absoluto), daratumumab o anticuerpo de control del mismo isotipo (Southern Biotech) a 1  $\mu$ g/ml. Las placas se preincubaron durante 30 minutos a 37 °C en una incubadora humidificada con dióxido de carbono al 5 por ciento, luego se añadieron 50,000 macrófagos. Las placas se incubaron 35 durante dos horas a 37 °C en una incubadora humidificada con dióxido de carbono al 5 por ciento. Las células se sedimentaron mediante centrifugación durante cinco minutos a 400x g y se lavaron en 250 $\mu$ l de tampón FACS. Los macrófagos se tiñeron en hielo durante 15 minutos en 50  $\mu$ l de tampón FACS que contenía 10 $\mu$ l de reactivo de bloqueo de FcR humano (Miltenyi Biotec), 0,5  $\mu$ l de anti-CD33 BV421 (Biolegend) y 0,5  $\mu$ l de anti-CD206 APC-Cy7 (Biolegend). Las células se lavaron en 200 $\mu$ l de tampón FACS, se lavaron en 250 $\mu$ l de PBS y se tiñeron sobre hielo durante 40 30 minutos en 50  $\mu$ l de tinte de viabilidad fijable eFluor 506 (ebioscience) diluido 1:1000 en PBS. Las células se lavaron dos veces en 250 $\mu$ l de tampón FACS y se fijaron durante 30 minutos en hielo en 75  $\mu$ l de Cytofix (BD Biosciences). Las células se lavaron en 175 $\mu$ l de tampón FACS y se resuspendieron en 75  $\mu$ l de tampón FACS. Las células se analizaron en un FACS Canto II (BD Biosciences), con el posterior análisis de datos por Flowjo 10,7 (Treestar). Las células muertas se excluyeron mediante la activación de la población e506-negativa. Los macrófagos que tenían

células tumorales fagocitadas se identificaron como células positivas para CD33, CD206, y GFP o CFSE. Se probaron cinco constructos polipeptídicos que comprenden variantes del dominio D1 de SIRP- $\alpha$  fusionadas con las respectivas variantes de Fc para determinar la fagocitosis *in vitro*:

1) (SEQ ID NO: 105)

EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTV  
 SDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSVECPPC  
 PAPPVAGPSVFLFPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVQFNWYVDGVEVHNAKTK  
 PREEQFASTFRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPVYTL  
 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPMLSDGSFFLYSKLTV  
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

2) (SEQ ID NO: 127)

EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTV  
 SDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKCCV  
 ECPPCPAPPVAGPSVFLFPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVQFNWYVDGVEVHN  
 AKTKPREEQFNSTFRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQ  
 VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPMLSDGSFFLYS  
 KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3) (SEQ ID NO: 96)

EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTV  
 SDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHC  
 PPCPAPEAAGAPSVFLFPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVQFNWYVDGVEVHN  
 AKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREP  
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPMLSDGSFFLY  
 SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

4) (SEQ ID NO: 124)

EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTV  
 SDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHC  
 PPCPAPEAAGAPSVFLFPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVQFNWYVDGVEVHN  
 AKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREP  
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPMLSDGSFFLY  
 SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5) (SEQ ID NO: 134)

EEELQIIPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTV  
 SDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAAAPPC  
 PPCPAPEFLGGPSVFLFPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN  
 KTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV  
 YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPMLSDGSFFLYSR  
 LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## Resultados

FIG. 7 muestra la fagocitosis de células tumorales DLD-1-GFP-Luciferasa por macrófagos humanos derivados de monocitos en presencia de SEQ ID NO:105 (IgG2\_A330S,P331S,N297A variante de Fc) y SEQ ID NO:127 (IgG2\_A330S, P331S variante de Fc). En particular, la FIG. 7 muestra que SEQ ID NO:105 (IgG2\_A330S, P331S, N297A variante de Fc) (en presencia o ausencia de un anticuerpo de control IgG1, k) tiene fagocitosis ablacionada en el ensayo de fagocitosis como agente único mientras que es capaz de aumentar la fagocitosis de cetuximab (CTX) (SEQ ID NO: 105+CTX). Por el contrario, un polipéptido con IgG2\_ variante de FcA330S, P331S (SEQ ID NO: 127+IgG1, k) tiene actividad de fagocitosis medible como agente único. El porcentaje de macrófagos que fagocitaron células tumorales y son GFP+ se indica en el eje y (Figura 7). La concentración de CD47 sitios de unión a partir de la adición de SEQ ID NO:105y SEQ ID NO:127se indica en el eje x. Se incubaron células DLD-1-GFP-Luciferasa y macrófagos con las concentraciones indicadas de SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:107 y CTX (1ug/mL) y anticuerpo de control (IgG1, k). Las células también se incubaron con PBS más cetuximab (línea marcada con PBS +CTX) o un PBS más un anticuerpo de control del mismo isótipo (línea marcada con PBS +IgG1k).

La FIG. 8 muestra la fagocitosis de células tumorales DLD-1-GFP-Luciferasa por macrófagos humanos derivados de monocitos en presencia de SEQ ID NO: 96 (IgG1\_L234A, L235A, G237A, N297A variante de Fc y SEQ ID NO:124 (IgG1\_L234A, L235A, G237A variante de Fc). En particular, la FIG. La Fig. 8 muestra que IgG1 variante de Fc L234A, L235A, G237A, N297A (SEQ ID NO: 96) y L234A, L235A, G237A (SEQ ID NO: 124) IgG1 variante de Fc tienen fagocitosis ablacionada en el ensayo de fagocitosis como agentes únicos. Estos están representados por líneas etiquetadas como SEQ ID NO:96 +IgG1, k y SEQ ID NO:124+IgG1, k respectivamente. Curiosamente, ambos polipéptidos SEQ ID NO:96 y SEQ ID NO:124aumentaron la fagocitosis de un anticuerpo específico de tumor, CTX. Como se muestra en la FIG. 8, el porcentaje de macrófagos que fagocitaron células tumorales y son GFP se indica en el eje y.+ La concentración de sitios de unión a CD47 partir de la adición de 96 y se indica en el eje x. Las células DLD-1-GFP-Luciferasa y los macrófagos se incubaron con CTX a 1  $\mu$ g/mL y las concentraciones indicadas de SEQ ID NO:96 (línea etiquetada SEQ ID NO:96 +CTX) o SEQ ID NO:124(línea etiquetada SEQ ID NO:124+CTX). Para identificar los efectos inespecíficos de cetuximab sobre la fagocitosis, las células se incubaron con un anticuerpo de control del mismo isótipo que cetuximab y las concentraciones indicadas de SEQ ID NO:96 (línea marcada SEQ ID NO:96 +IgG1, k) o SEQ ID NO:124(línea marcada SEQ ID NO:124+IgG1, k). Las células también se incubaron con PBS más cetuximab (línea marcada con PBS +CTX) o un PBS más un anticuerpo de control del mismo isótipo (línea marcada con PBS +IgG1k).

La FIG. 9 muestra la fagocitosis de células tumorales DLD-1-GFP-Luciferasa por macrófagos humanos derivados de monocitos en presencia de SEQ ID NO:134 (IgG4\_S228P variante de Fc). En particular, la FIG. 9 muestra que el constructo de SEQ ID NO:134 tiene una actividad de fagocitosis considerable como agente único en la fagocitosis *in vitro*. Como se muestra en la FIG. 9, el porcentaje de macrófagos que fagocitaron células tumorales y son GFP se indica en el eje y.+ La concentración de sitios de unión a partir de la adición de se indica en el eje x. CD47SEQ ID NO:134 Se incubaron células y macrófagos de DLD-1-GFP-Luciferasa con las concentraciones indicadas de SEQ ID NO:134(línea marcada SEQ ID NO:134+Medio). Las células también se incubaron con anticuerpo de control (IgG1, k; cuadrado negro).

### Ejemplo 11 - Producción de la variante SIRP- $\alpha$ y polipéptidos HSA

Además, usando los métodos descritos en el presente documento y de acuerdo con aspectos de la descripción, el polipéptido variante de D1 de SIRP - $\alpha$  se expresó mediante fusión con polipéptidos HSA, como se muestra en la Tabla 23 a continuación. La unión a humanos CD47 se determinó mediante las metodologías descritas en el Ejemplo 1.

**Tabla 23.** Afinidad de unión a CD47 de variantes de SIRP- $\alpha$  fusionadas con polipéptidos HSA

SEQ ID NO:	K <sub>D</sub> (M)
150	4,53 x 10 <sup>-10</sup>
151	5,54 x 10 <sup>-9</sup>
152	2,78 x 10 <sup>-10</sup>
153	4,24 x 10 <sup>-9</sup>
154	2,35 x 10 <sup>-10</sup>
155	1,11 x 10 <sup>-8</sup>
157	2,15 x 10 <sup>-9</sup>

SEQ ID NO:	K <sub>D</sub> (M)
158	1,09 x 10 <sup>-9</sup>
159	7,6 x 10 <sup>-10</sup>

**Ejemplo 12 - Vida media extendida asociada con polipéptidos variantes de SIRP- $\alpha$**

Como se muestra en la Tabla 24 y la FIG. 10, Los polipéptidos variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  que comprenden fusiones Fc y HSA pueden tener una vida media prolongada en comparación con una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  única. Por ejemplo, el polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  fusionado a Fc representado por SEQ ID NO:104 y el polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  fusionado a HSA representado por SEQ ID NO:159 tienen una vida media aumentada con respecto a un polipéptido variante de D1 de SIRP- $\alpha$  que no está fusionado a un Fc o HSA representado por SEQ ID NO:85. La extensión de la vida media se puede atribuir a la capacidad de los polipéptidos variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  que se fusionan con Fc y HSA para unirse a FcRn, que puede estar asociado con ciclos prolongados.

10 **Tabla 24.** Mediciones de vida media para tratamientos de dosis única con polipéptidos variantes de SIRP- $\alpha$

SEQ ID NO:	Cantidad de dosificación	Semivida (h)
104	10mg/kg	41,10
159	10mg/kg	24,54
85	10mg/kg	8,20

Las metodologías usadas para este ejemplo son las siguientes. Brevemente, se obtuvieron ratones machos CD-1 que pesaban aproximadamente 25 gramos de Harlan Labs, y se usaron para el estudio PK e dosis única de los compuestos representados por SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:159 y SEQ ID NO:85. Cada compuesto se formuló a una dosis de trabajo de 5 mg/mL.

15 El volumen de la dosis se ajustó en función del peso de cada ratón, asegurándose de que cada ratón recibió una dosis de 1, 3 y 10mg/kg. Los compuestos se administraron por vía intravenosa a través de la vena de la cola del ratón. Se dosificaron tres ratones para cada punto de tiempo en cada nivel de dosis para cada compuesto. Despues de la dosificación, se extrajo sangre a los ratones en los siguientes 8 puntos de tiempo: 0,25, 1, 4, 8, 24, 48, 72 y 120h. Se recogieron 500 $\mu$ l de sangre completa en tubos microtainer mediante sangrado orbital. Las muestras de sangre completa se dejaron en reposo durante 30 minutos para permitir la separación del suero. Las muestras se centrifugaron durante 10min a 4 °C a un RCF de 1000. suero y luego se transfirieron a tubos de 0,5 ml dentro de los 40 min de procesamiento y se mantuvieron congeladas hasta el análisis.

20 Los datos se obtuvieron usando un protocolo de ELISA Fc humano. SEQ ID NO:104 Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos Immulon 4HBX ELISA (Thermo Scientific cat. #3855) con 2  $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ l/pocillo de purificado CD47 durante la noche a temperatura ambiente en tampón de recubrimiento de antígeno 1x (ImmunoChemistry Technologies, cat. 6248#). Los pocillos se lavaron 5 veces con 200-300 $\mu$ l/pocillo 1x TBST (solución salina tamponada con Tres +0,05%Tween-20) (Thermo Scientific, 20x cat. 28360#). Los pocillos fueron bloqueados con 200 $\mu$ L/pocillo BSA 7,5% en PBS (GIBCO, cat. -# 15260-037) durante 1-2 horas. Los pocillos se lavaron 5 veces con 200-300 $\mu$ L/pocillo 1x TBST. Se añadieron 50  $\mu$ L/pocillo de curva estándar, controles de calidad (QC) y muestras desconocidas diluidas 1:4 en suero de ratón CD1 normal en TBS. La curva estándar, los QC y las muestras desconocidas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las concentraciones para la curva estándar fueron las siguientes: 0,2500  $\mu$ g/mL; 0,1250  $\mu$ g/mL, 0,0625  $\mu$ g/mL; 0,0313  $\mu$ g/mL; 0,0156  $\mu$ g/mL; 0,0078 $\mu$ g/mL; 0,0039  $\mu$ g/mL; 0,0020  $\mu$ g/mL; 0,0010 $\mu$ g/mL; 0,0005  $\mu$ g/mL; 0,00025  $\mu$ g/mL; 0,00000  $\mu$ g/mL. Los controles de calidad (QC) se congelaron y se dividieron en alícuotas, y la proteína de la curva estándar en concentraciones "alta", "media" y "baja" en la curva lineal de la curva estándar que sirvió como controles para asegurar que el ensayo estaba funcionando bien, fueron de la siguiente manera: QC alto = 0,125 $\mu$ g/ml; QC medio = 0,016  $\mu$ g/ml; y QC bajo = 0,004  $\mu$ g/ml.

25 Luego, los pocillos se lavaron 5 veces con 200-300 $\mu$ L/pocillo 1x TBST. Se añadieron 50  $\mu$ L/pocillo de 0,25 ug/mL Anticuerpo polyclonal Fc IgG antihumano de cabra Abbexa 0,25 ug/ml (11,6 mg/mL stock, Abbexa cat. # abx023511) diluido en 1x TBST BSA 1% y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 5 veces con 200-300 $\mu$ L/pocillo 1x TBST. Se añadieron 50  $\mu$ L/pocillo de  $\mu$ g/mL ZyMaX81-1620/ Invitrogen conejo anti-IgG de cabra - conjugado con HRP (Thermo Scientific, cat. #), se diluyó en TBST y se añadió BSA 1% y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 6 veces con 200-300 $\mu$ L/pocillo 1x TBST. Las siguientes etapas y reactivos se llevaron a cabo a temperatura ambiente: 0  $\mu$ L/pocillo temperatura ambiente 1-Step Ultra TMB - ELISA

(Thermo Scientific cat. # 34028) y se incubó 2-5minutos a temperatura ambiente hasta que el desarrollo de color fue suficiente. Se añadieron 50  $\mu$ L/pocillo de solución de parada a temperatura ambiente (ácido sulfúrico 0,16M, Thermo Scientific cat. N600#) inmediatamente y se mezcló bien. Las placas se leyeron inmediatamente en un

5 espectrofotómetro a OD 450 y a OD 570. La lectura 570de DO fue una lectura de fondo que se restó de la lectura 450 de DO. Usando un programa de software como Molecular Devices SoftMax Pro o Graph Pad Presm, los valores de la curva estándar se trazaron usando una curva de ajuste de 4 parámetros y las concentraciones de las muestras desconocidas se interpolaron a partir de la curva estándar usando el software.

Los datos de SEQ ID NO: 85 se obtuvieron usando un protocolo de ELISA His Tag. Se recubrieron placas de 96 pocillos

10 Immulon 4HBX ELISA (Thermo Scientific cat. #3855) con 2  $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ l/pocillo de purificado CD47 durante la noche a temperatura ambiente en tampón de recubrimiento de antígeno 1x (ImmunoChemestry Technologies, cat. #6248). Los pocillos se lavaron 5 veces con 200- 300 $\mu$ L/pocillo 1x TBST (solución salina tamponada con Tris + 0,05%Tween-20) (Thermo Scientific,20x cat. 28360#). Los pocillos fueron bloqueados con 200  $\mu$ L/pocillo BSA en PBS 7,5% (GIBCO, cat. #15260-037) durante 1-2horas. Los pocillos se lavaron 5 veces con 200-300 $\mu$ L/pocillo 1x TBST. Se añadieron 50 $\mu$ L/pocillo de curva estándar, controles de calidad (QC) y muestras desconocidas diluidas en CD1 normal suero de

15 ratón 1:4 diluido en TBS. La curva estándar, los QC y las muestras desconocidas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las concentraciones para la curva estándar fueron las siguientes: 0,12500 $\mu$ g/mL; 0,06250 $\mu$ g/mL; 0,03125 $\mu$ g/mL; 0,015630  $\mu$ g/mL; 0,00781 $\mu$ g/mL; 0,00391 $\mu$ g/mL; 0,00195 $\mu$ g/mL; 0,00098 $\mu$ g/mL; y 0,00000  $\mu$ g/mL. Los controles de calidad (QC) se congelaron y se dividieron en alícuotas, y la proteína de la curva estándar en concentraciones "alta", "media" y "baja" en la curva lineal de la curva estándar que sirvió como controles para asegurar que el ensayo estaba funcionando bien, fueron de la siguiente manera: QC alto = 0,02  $\mu$ g/ml; QC medio = 0,01  $\mu$ g/ml; y QC bajo = 0,005  $\mu$ g/ml.

Posteriormente, los pocillos se lavaron 5 veces con 200-300  $\mu$ L/pocillo 1x TBST. Se añadieron 50  $\mu$ L/pocillo de 0,2

10  $\mu$ g/ml de anticuerpo políclonal conjugado anti-6x His Tag -HRP de conejo Abcam (1mg/mL stock, abcam cat. # ab1187) diluido en TBST+BSA 1% y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 6 veces con 200-300  $\mu$ L/pocillo 1xTBST. Las siguientes etapas y reactivos se llevaron a cabo a temperatura ambiente: 50  $\mu$ L/pocillo temperatura ambiente 1-Step Ultra TMB - ELISA (Thermo Scientific cat. # 34028) y se incubó 3-5minutos a temperatura ambiente hasta que el desarrollo de color fue suficiente. SE añadieron 50 $\mu$ L/pocillo de solución de parada a temperatura ambiente (0,16M ácido sulfúrico, Thermo Scientific cat. N600#) inmediatamente y se mezcló bien. Las placas se leyeron inmediatamente en un espectrofotómetro a OD 450y a OD 570. La 570lectura de DO fue una lectura de fondo que se sustraio de la lectura 450 de OD. Usando un programa de software como Molecular Devices SoftMax Pro o Graph Pad Presm, los valores de la curva estándar se trazaron usando una curva de ajuste de 4 parámetros y las concentraciones de las muestras desconocidas se interpolaron a partir de la curva estándar usando el software.

30 Posteriormente, los pocillos se lavaron 5 veces con 200-300  $\mu$ L/pocillo 1x TBST. Se añadieron 50  $\mu$ L/pocillo de 0,2

35  $\mu$ g/ml de anticuerpo políclonal conjugado anti-6x His Tag -HRP de conejo Abcam (1mg/mL stock, abcam cat. # ab1187) diluido en TBST+BSA 1% y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 6 veces con 200-300  $\mu$ L/pocillo 1xTBST. Las siguientes etapas y reactivos se llevaron a cabo a temperatura ambiente: 50  $\mu$ L/pocillo temperatura ambiente 1-Step Ultra TMB - ELISA (Thermo Scientific cat. # 34028) y se incubó 3-5minutos a temperatura ambiente hasta que el desarrollo de color fue suficiente. SE añadieron 50 $\mu$ L/pocillo de solución de parada a temperatura ambiente (0,16M ácido sulfúrico, Thermo Scientific cat. N600#) inmediatamente y se mezcló bien. Las placas se leyeron inmediatamente en un espectrofotómetro a OD 450y a OD 570. La 570lectura de DO fue una lectura de fondo que se sustraio de la lectura 450 de OD. Usando un programa de software como Molecular Devices SoftMax Pro o Graph Pad Presm, los valores de la curva estándar se trazaron usando una curva de ajuste de 4 parámetros y las concentraciones de las muestras desconocidas se interpolaron a partir de la curva estándar usando el software.

40 Los datos de SEQ ID NO:159 se obtuvieron usando un protocolo HSA ELISA. Se recubrieron placas de 96 pocillos

45 Immulon 4HBX ELISA (Thermo Scientific cat. #3855) con 2 ug/ml, 100 $\mu$ l/pocillo de purificado), CD47 Los pocillos se lavaron 5 veces con 200- 300 $\mu$ L/pocillo 1x TBST (solución salina tamponada con Tris +0,05%Tween-20) (Thermo Scientific,20x cat. 28360#). Los pocillos fueron bloqueados con  $\mu$ L/pocillo 200Tampón de bloqueo Li-Cor Odyssey (TBS) (Li-Cor, cat. 927-50000#) durante 2 horas y no se usaron tampones de bloqueo que contenían albúmina. Los pocillos se lavaron 5 veces con 200-300 $\mu$ L/pocillo 1x TBST. Se añadieron 50  $\mu$ L/pocillo de curva estándar, controles de calidad (QC) y muestras desconocidas diluidas en suero de ratón normal 1:4 diluido en TBS. La curva estándar, los QC y las muestras desconocidas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora.

50 Las concentraciones de la curva estándar fueron las siguientes: 3,20  $\mu$ g/ml; 1,60  $\mu$ g/ml; 0,80  $\mu$ g/ml; 0,40  $\mu$ g/ml; 0,20

55  $\mu$ g/ml; 0,10 $\mu$ g/ml; 0,05  $\mu$ g/ml; 0,025  $\mu$ g/ml y 0,00  $\mu$ g/ml.Los controles de calidad (QC) se congelaron y se dividieron en alícuotas, y la proteína de la curva estándar en concentraciones "alta", "media" y "baja" en la curva lineal de la curva estándar que sirvió como controles para asegurar que el ensayo estaba funcionando bien, fueron de la siguiente manera: QC alto = 0,6  $\mu$ g/ml; QC medio = 0,3  $\mu$ g/ml; y QC bajo = 0,15  $\mu$ g/ml y QC bajo = 0,01  $\mu$ g/ml.

Posteriormente, los pocillos se lavaron 5 veces con 200-300  $\mu$ L/pocillo 1x TBST. Se añadieron 50  $\mu$ L/pocillo de 1  $\mu$ g/ml

60 Thermo Scientific/Pierce conejo conjugado anti-HSA-HRP (Thermo Scientific cat. # - PA1-26887) diluido en 1x TBST y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 6 veces con 200-300  $\mu$ L/pocillo 1xTBST. Posteriormente, las siguientes etapas y reactivos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Se añadieron 50  $\mu$ L/pocillo a temperatura ambiente 1-Step Ultra TMB - ELISA (Thermo Scientific cat. # 34028) y se incubaron 3-5minutos a temperatura ambiente hasta que el desarrollo de color fue suficiente. Se añadieron 50 $\mu$ L/pocillo de solución de parada a temperatura ambiente (0,16 ácido sulfúrico, Thermo Scientific cat. #N600) y se mezcló bien. Las placas se leyeron inmediatamente en un espectrofotómetro a O.D. 450 y a O.D. 570. La 570lectura de O.D. fue una lectura de fondo que se sustraio de la 450lectura de O.D. Usando un programa de software como Molecular Devices SoftMax Pro o Graph Pad Presm, los valores de la curva estándar se trazaron usando una curva de ajuste de 4 parámetros y las concentraciones de las muestras desconocidas se interpolaron a partir de la curva estándar usando el software.

#### Ejemplo 13 - Hemaglutinación reducida demostrada por polipéptidos variantes de SIRP- $\alpha$

Como se muestra en la FIG. 11, los polipéptidos variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  demostraron hemaglutinación reducida o ablationada. Específicamente, cuando ocurre la hemaglutinación, está presente una coloración roja difusa en lugar

de un punto rojo, como se muestra para el control positivo B6H12. Para los polipéptidos variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  ensayados en la FIG. 11, hubo una reducción o ablación de la hemaglutinación.

Las metodologías usadas para este Ejemplo fueron las siguientes: se recibieron capas leucocíticas de sangre completa humana del Centro de Sangre de la Universidad de Stanford y se diluyeron con solución salina tamponada 5 con fosfato 1:2 (PBS, Gibco). La sangre diluida se dividió en dos tubos y se cubrió con 20 ml de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Los tubos se centrifugaron durante 30 minutos a 400x g. Se eliminaron los sobrenadantes y los 10 sedimentos de eritrocitos se lavaron dos veces mediante la adición de 30 ml de PBS y centrifugación a 3500R PM. A continuación, se llevó a cabo un ensayo de hemaglutinación como sigue: se diluyeron eritrocitos humanos en PBS y se transfirieron a placas de poliestireno de 96 pocillos (Corning) a 4 millones de células por pocillo en un volumen de 15 75  $\mu$ l. Se añadieron diluciones seriadas de cinco veces de las proteínas indicadas a los pocillos en un volumen de 75  $\mu$ l de PBS, con una concentración final de 1000 nM a 0,488 nM. Como control negativo, se añadió PBS solo a una fila de pocillos. Los eritrocitos se depositaron en el fondo del pozo, formando un sedimento pequeño y bien definido. Como control positivo, las células se trataron con el anticuerpo anti-CD47 B6H12 (ebioscience). Este anticuerpo provocó hemaglutinación a concentraciones entre 8 y 63 nM, indicado por la formación de un sedimento celular grande y difuso. 15 Entre los constructos probadas, los polipéptidos basados en IgG2 (SEQ ID NO: 109 y SEQ ID NO:113) causaron una ligera hemaglutinación a 4 y 8 nM. No se observó hemaglutinación para todos los demás constructos polipeptídicos (basados en IgG1 y basados en HSA).

#### Ejemplo 14 - Actividad antitumoral de SEQ ID NO:211 en un modelo de tumor singénico de ratón

Se usaron C57BL/6 ratones (hembras de 7 a 10semanas de edad) obtenidos del Laboratorio Charles River. La línea 20 celular de adenocarcinoma de colon de ratón MC38 se recuperó de las reservas congeladas y se cultivó en RPMI que 1640 contenía 10%suero bovino fetal, penicilina-estreptomicina y L-glutamina. Las células se centrifugaron y se resuspendieron a una concentración de 2E+07 células/mL en medio sin suero sin aditivos. El día -7 (es decir, 7 días 25 antes del día de estadificación proyectado), los ratones se implantaron mediante inyección subcutánea en el flanco izquierdo con 100 $\mu$ l (2,0 X10<sup>6</sup>células) por ratón de la recién preparada MC38 en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de aproximadamente 50 mm<sup>3</sup>, se aleatorizaron cincuenta 30 animales con tumores establecidos y pesos corporales moderados en 5 grupos de tratamiento (Grupo 1-5, n=10ratones cada uno). A partir del día 1, los ratones de los grupos 1 a 5 se trataron con vehículo (PBS), anti-mPD-L1 (clon 10F,9G2, 200 $\mu$ g), SEQ ID NO: 211(200  $\mu$ g), anti-mPD-L1 (200  $\mu$ g) +SEQ ID NO:211(100  $\mu$ g) o anti-mPD-L1 (200  $\mu$ g) +SEQ ID NO: 211(200  $\mu$ g), respectivamente. Las dosis se administraron mediante inyección intraperitoneal (IP) de 0,05 mL/ratón los días 1, 4 y 7.

SEQ ID NO: 211 se generó fusionando genéticamente SEQ ID NO:206 a un monómero de dominio Fc. SEQ ID NO:206 contiene mutaciones que se ha demostrado que mejoran la unión al ratón CD47. Los datos vinculantes se presentan en la Tabla 18.

SEQ ID NO: 211

EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCITSLRPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRDGPFPRTTV  
 SDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGIPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHT  
 CPPCPAPEAAGAPSVFLPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQP  
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFL  
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Las observaciones clínicas y los pesos corporales se controlaron durante todo el estudio hasta el día 42. Los tamaños 35 de los tumores se midieron dos veces por semana y, al finalizar el estudio, se midieron las dimensiones perpendiculares menores (anchura, W, y altura, H) y mayores (longitud, L) usando microcaliper (Mitutoyo, Aurora, Illinois). El volumen del tumor (mm<sup>3</sup>) se calculó usando la fórmula para el volumen de una esfera elíptica (L x W<sup>2</sup>H / 2). Los animales del estudio se sometieron a un sacrificio humanitario durante el estudio cuando los volúmenes tumorales en animales individuales excedieron (o se acercaron) 2,500mm<sup>3</sup>. El número de animales que permanecieron 40 en el estudio hasta el día 42 se usó para un análisis de supervivencia.

Los tumores crecieron en diversos grados en los cinco grupos. Entre los ratones dosificados con vehículo o con SEQ 45 ID NO:211 (Grupos 1 y,3, respectivamente), los sacrificios comenzó durante la 4<sup>a</sup> semana (desde el día 25) y todos los animales en estos grupos estaban muertos al final de la 5<sup>a</sup> semana (Día 35). Entre los ratones a los que se les administró anti-mPD-L1 (solo o en combinación con SEQ ID NO:211; Grupos 2, 4 y 5), los sacrificios comenzaron durante la 5<sup>a</sup> semana (desde el día 29 o 32) pero un subconjunto (40-70%) de estos animales sobrevivió hasta el final del estudio programado (día 42). La FIG. 12 muestra las curvas de supervivencia para cada grupo de tratamiento durante el período de estudio. Numéricamente, el grupo de tratamiento anti-mPD-L1 más 200 $\mu$ g SEQ ID NO:211 tuvo

el mayor número de animales supervivientes, seguido por el grupo de tratamiento anti-mPD-L1 más 100 $\mu$ g SEQ ID NO:211y el grupo de anti-mPD-L1 solo, con 7 de cada 10(70%), 5 de cada 10(50%) y 4 de cada 10(40%) ratones restantes en el día 42, respectivamente (Tabla 25). La mediana de supervivencia fue de 29 y 30,5 días respectivamente para los tratamientos con vehículo (Grupo 1) y SEQ ID NO:211 solo (Grupo 3). La mediana de supervivencia aumentó a 42 días para el tratamiento con anti-mPD-L1 solo (Grupo 2) y anti-PD-L1 más 100 $\mu$ g SEQ ID NO:211 (Grupo 4). La mediana de supervivencia para el tratamiento con anti-mPD-L1 más 200 $\mu$ g SEQ ID NO:211(Grupo 5) no se determinó ya que más de 50% de los animales permanecieron al final del estudio (Día 42).

Tabla 25. Datos de supervivencia animal

Grupo	Tratamiento (3 dosis IP – en días 1, 4 and 7)	Número de animales vivos en el día indicado												
		1	4	7	11	14	18	22	25	29	32	35	39	42
1	PBS	10	10	10	10	10	10	10	6	1	0	0	0	0
2	anti-mPD-L1 (200 $\mu$ g)	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	7	5	4
3	SEQ ID NO: 211 (200 $\mu$ g)	10	10	10	10	10	10	10	9	5	1	0	0	0
4	anti-mPD-L1 (200 $\mu$ g) + SEQ ID NO: 211 (100 $\mu$ g)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	7	6	5
5	anti-mPD-L1 (200 $\mu$ g) + SEQ ID NO: 211 (200 $\mu$ g)	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	8	7	7

10 Los tumores presentaron un crecimiento rápido en el grupo tratado con vehículo, lo que indica un crecimiento tumoral en curso en ausencia de un tratamiento eficaz. La dosificación con 200 $\mu$ g SEQ ID NO:211(Grupo 3) produjo una atenuación significativa del crecimiento tumoral solo en puntos de tiempo intermitentes (Día 7 y 14, para el volumen tumoral tanto crudo como normalizado) en comparación con la dosificación con vehículo. La dosificación con 200 $\mu$ g de anti-mPD-L1, solo o en combinación con SEQ ID NO:211(Grupos 2, 4 y 5), proporcionó una atenuación significativa del crecimiento tumoral desde el Día 4 o 7 (para el volumen tumoral sin procesar o normalizado, respectivamente) en comparación con la dosificación con vehículo (Figura 13). y Tabla 26). La adición de SEQ ID NO:211 al régimen anti-mPD-L1 (Grupo 2 frente a 4 o Grupo 2 frente a 5) produjo una inhibición adicional del crecimiento tumoral sobre el tratamiento anti-mPD-L1 solo. Los volúmenes de tumor el día 22, incluyendo la inhibición del crecimiento tumoral (% TGI), se proporcionan en la Tabla 26. El día 22 se usa para la comparación porque este día es el último momento en el que todos los animales estaban todavía vivos. Inhibición del crecimiento tumoral (% TGI) el día 22 frente al día 1 fueron 83%, 81% y 77% para el grupo anti-mPD-L1 más 200 $\mu$ g SEQ ID NO: 211 el grupo anti-mPD-L1 más 100 $\mu$ g SEQ ID NO:211 y el grupo anti-mPD-L1 solo, respectivamente (Tabla 26).

Tabla 26. Análisis del volumen tumoral

Grupo	Agente (tres dosis el día 1, 4 y 7, IP)	Volumen del tumor día 1 (B, mm <sup>3</sup> )	Volumen del tumor Día-22^(T, mm <sup>3</sup> )	Día 22 * vs. Día 1		Volumen medio normalizado del día-22 ^
				T-B (mm <sup>3</sup> )	%TGI	
1	Vehículo	52 ± 13	2126 ± 599	2074,2	0%	4380%
2	anti-mPD-L1 (200 $\mu$ g)	52 ± 12	537 ± 464	484,6	77%	1062%

Grupo	Agente (tres dosis el día 1, 4 y 7, IP)	Volumen del tumor día 1 (B, mm <sup>3</sup> )	Volumen del tumor Día-22 <sup>A</sup> (T, mm <sup>3</sup> )	Día 22 * vs. Día 1		Volumen medio normalizado del día-22 <sup>A</sup>
		Media ± DE	Media ± DE	Δ volumen tumoral	% Grupo 1 Δ	
3	SEQ ID NO: 211(200 µg)	51 ± 12	1697 ± 679	1645,4	21%	3384%
4	anti-mPD-L1 ( µg) 200 µg +SEQ ID NO:211 (100 µg)	52 ± 13	456 ± 368	404,3	81%	959%
5	anti-mPD-L1 ( µg)200+SEQ ID NO:211 (200 µg)	52 ± 11	399 ± 497	347,9	83%	728%

\* El día 22 es el último día en donde todos los animales de todos los grupos permanecieron vivos.

#### Ejemplo 15 - optimización de la terapia combinada para tratar el cáncer

Los polipéptidos que incluyen una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad se coadministran con inhibidores de puntos de control para tratar modelos de ratón de varios cánceres, p. ej., tumor sólido y cáncer hematológico. Los cánceres pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico y, bajo algunas circunstancias, el sistema inmunológico puede estar implicado en la eliminación de tumores. El bloqueo de moléculas co-inhibidoras, como CTLA-4, PD-1, y LAG-3, puede estar implicado en la amplificación de las respuestas de las células T contra los tumores. Los polipéptidos descritos en el presente documento se administran en combinación con un inhibidor de punto de control, tal como un inhibidor de anticuerpos de CTLA-4 (p. ej., ipilimumab, tremelimumab), PD-1 (p. ej., nivolumab, Pidilizumab, MK3475 también conocido como pembrolizumab, BMS936559, y MPDL3280A) y LAG-3 (p. ej., BMS986016).

Los tumores A20 establecidos en ratones BALB/c (p. ej., modelos de linfoma) se tratan con un anticuerpo inhibidor de CTLA-4 y una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad fusionada con una variante de IgG Fc proporcionada en el presente documento (p. ej., un constructo de SIRP- $\alpha$ ). A partir del día 1, los ratones se tratan con vehículo (PBS), tremelimumab (200 +constructo de SIRP- $\alpha$  (100 µg) o tremelimumab (200 +constructo de SIRP- $\alpha$  (200 µg). Las dosis se administran mediante inyección intraperitoneal (IP) a 0,05 mL/ratón los días 1, 4 y la 7. La respuesta del tumor a la terapia de combinación se determina diariamente midiendo el volumen del tumor. Si el día 4, el volumen tumoral de los ratones tratados con terapia combinada no muestra una mejoría significativa, tremelimumab se reemplaza por ipilimumab. De forma similar, si el día 7, el volumen tumoral de los ratones tratados con terapia combinada no muestra una mejoría significativa, tremelimumab se reemplaza por ipilimumab. Se espera que, si bien tremelimumab e ipilimumab se dirigen a la misma proteína de punto de control, tienen diferentes eficacias terapéuticas y efectos sinérgicos con el constructo SIRP- $\alpha$  debido a sus diferentes regiones Fc. Tremelimumab es un anticuerpo IgG2 que puede ser más eficaz para fijar el complemento, mientras que ipilimumab es un anticuerpo IgG1 que puede ser útil para prevenir la eliminación de células T activadas.

#### Ejemplo 16 - Método de tratamiento de un cáncer que expresa un marcador epitelial

Los constructos polipeptídicos de SIRP- $\alpha$ , tales como una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad (p. ej., cualquier variante proporcionada en las Tablas 2, 5 y 6) fusionada con una variante de IgG Fc, se administran para tratar un cáncer que expresa un marcador de células epiteliales. El aumento de la fagocitosis resultante del bloqueo de señalización de CD47, por ejemplo, mediante un constructo de D1 de SIRP- $\alpha$ , puede depender de la presencia de macrófagos. Por lo tanto, la administración de un constructo de polipéptido D1 de SIRP- $\alpha$  en combinación con un anticuerpo dirigido a un marcador epitelial que se expresa en o sobre una célula cancerosa se usa para tratar el cáncer y reducir el riesgo de efectos secundarios, p. ej., fagocitosis de células epiteliales, debido a una baja abundancia de macrófagos en la periferia de la piel.

A los modelos de ratón de un cáncer que expresa un marcador epitelial, por ejemplo EGFR o EpCAM, se les administra un constructo de SIRP- $\alpha$  en combinación con un anticuerpo que se dirige al marcador epitelial, p. ej., un anticuerpo anti-EGFR o un anticuerpo anti-EpCAM. Los anticuerpos que se dirigen a marcadores epiteliales pueden reconocer tanto células cancerosas como células no cancerosas, por ejemplo, células no cancerosas en la periferia de la piel.

Sin embargo, se espera que las células no cancerosas en la periferia de la piel no sean susceptibles a la fagocitosis debido a una baja abundancia de macrófagos cerca de la piel.

**Ejemplo 17 - Fagocitosis mediante fusiones de SIRP- $\alpha$  - Fc de un solo brazo**

Para obtener mediciones cuantitativas de la fagocitosis inducida por fusiones de SIRP- $\alpha$ -Fc que tienen una sola molécula de SIRP- $\alpha$  (p. ej., una molécula de un solo brazo) (representada en las FIGs 1,4A y 4B), se realizó un ensayo de fagocitosis con diferentes tipos de células MM1R y N87 usando métodos como se describe en el Ejemplo 8.

Se probaron seis constructos de un solo brazo para determinar la fagocitosis *in vitro*. Estos constructos de un solo brazo se generan usando estrategias ojal & botón. Se usó la fusión de homodímero SIRP- $\alpha$  Fc de SEQ ID NO:136 como comparación de dos brazos (control). Se formó una primera fusión de SIRP- $\alpha$  Fc de un solo brazo (p. ej., A) a partir de un heterodímero de SEQ ID NO:139 (una variante de Fc) y SEQ ID NO:138 (una fusión de SIRP- $\alpha$  Fc). Se formó una segunda fusión de SIRP- $\alpha$  Fc de un solo brazo (p. ej., B) a partir de un heterodímero de SEQ ID NO:141 (una variante de Fc) y SEQ ID NO:140 (una fusión de SIRP- $\alpha$  Fc). Se formó una tercera fusión de SIRP- $\alpha$  Fc de un solo brazo (p. ej., C) a partir de un heterodímero de SEQ ID NO:139 (una variante de Fc) y SEQ ID NO:142 (una fusión de SIRP- $\alpha$  Fc). Se formó una cuarta fusión de SIRP- $\alpha$  Fc de un solo brazo (p. ej., D) a partir de un heterodímero de SEQ ID NO:141 (una variante de Fc) y SEQ ID NO:143 (una fusión de SIRP- $\alpha$  Fc). Se formó una quinta fusión de SIRP- $\alpha$  Fc de un solo brazo (p. ej., E) a partir de un heterodímero de SEQ ID NO:147 (una variante de Fc) y SEQ ID NO:146 (una fusión de SIRP- $\alpha$  Fc). Se formó una sexta fusión de SIRP- $\alpha$  Fc de un solo brazo (p. ej., F) a partir de un heterodímero de SEQ ID NO:149 (una variante de Fc) y SEQ ID NO:148 (una fusión de SIRP- $\alpha$  Fc). Las afinidades de unión CD47( $K_D$ ) de SIRP- $\alpha$  de un solo brazo cuando se prueba como monómero son las siguientes: ~ 10 pM (A, B), ~ 100 pM (C, D) y ~5 nM (E, F). Las secuencias se proporcionan en la Tabla 27 a continuación.

**Tabla 27.** Secuencias de aminoácidos de las fusiones SIRP $\alpha$ -Fc para el constructo de heterodímeros

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
138	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYN QRQGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCIKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSDKHTCPCPAPEAAGAPSFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
139	DKTHTCPCPAPEAAGAPSFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
140	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYN QRQGPFPRTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCIKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSDKHTCPCPAPEAAGAPSFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
141	DKTHTCPCPAPEAAGAPSFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
142	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYN QREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
143	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYN QREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYYCVKFRKGSPDD VEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYT LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
146	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIY NQRQGPFPRTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPD DVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY YTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
147	DKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
148	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIY NQRQGPFPRTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPD DVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY YTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
149	DKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLSC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Las Figs. 15-17 muestran la fagocitosis de la línea 1R de mieloma múltiple (MM1R) y la línea de carcinoma gástrico por macrófagos no polarizados N87 derivados de monocitos humanos. "+" y "-" denota la adición o ausencia de Daratumumab (Dara) respectivamente en las FIGs. 15-16. En la Fig. 17,"+" y "-" denota adición y ausencia de Herceptin/trastuzumab (Her) respectivamente.

La FIG. 15 muestra el constructo A en presencia de un anticuerpo de control (IgG1, k), p. ej., "A-" tiene fagocitosis ablacionada como agente único mientras que es capaz de aumentar la fagocitosis de Daratumumab (Dara), p. ej., "A+". De forma similar, el constructo B en presencia de un anticuerpo de control (IgG1, k), p. ej., "B-" tiene fagocitosis ablacionada como agente único mientras que es capaz de aumentar la fagocitosis de Daratumumab (Dara), p. ej., "B+". El porcentaje de macrófagos que fagocitaron MM1R y son CFSE+ se indica en el eje y. La concentración de los sitios de unión de CD47a partir de la adición del constructo A, B o el constructo de control se indica en el eje x. Los niveles de fagocitosis son comparables a los del constructo de control (que es un SIRP- $\alpha$  de doble brazo). El nivel de fagocitosis resultante de la incubación con un anticuerpo anti-CD47, p. ej. B6H12 (100 nM), es en comparación con la incubación con Dara, p. ej., PBS+. Como se muestra, las fusiones de SIRP- $\alpha$ -Fc de un solo brazo pueden aumentar la fagocitosis de Dara de forma en comparación con las fusiones de SIRP- $\alpha$ -Fc de dos brazos.

La FIG. 16 muestra el constructo C en presencia de un anticuerpo de control (IgG1, k), p. ej., "C-" tiene fagocitosis ablacionada en el ensayo de fagocitosis como agente único mientras que es capaz de aumentar la fagocitosis de Daratumumab (Dara), p. ej., "C+". De forma similar, el constructo D en presencia de un anticuerpo de control (IgG1, k), p. ej., "D-" tiene fagocitosis ablacionada en el ensayo de fagocitosis como agente único mientras que es capaz de aumentar la fagocitosis de Daratumumab (Dara), p. ej., "D+". El porcentaje de macrófagos que fagocitaron MM1R y son CFSE+ se indica en el eje y. La concentración de los sitios de unión de CD47a partir de la adición del constructo C, D o el constructo de control se indica en el eje x. Los niveles de fagocitosis son comparables a los del constructo de control (que es un SIRP- $\alpha$  de doble brazo). El nivel de fagocitosis resultante de la incubación con un anticuerpo anti-CD47, p. ej. B6H12 (100 nM), es comparable al de la incubación con Dara, p. ej., PBS+. Como se muestra, las fusiones de SIRP- $\alpha$ -Fc de un solo brazo pueden aumentar la fagocitosis de Dara de forma en comparación con las fusiones de SIRP- $\alpha$ -Fc de dos brazos. Como se muestra, las fusiones SIRP- $\alpha$ -Fc de un solo brazo pueden aumentar la fagocitosis de Dara de forma en comparación con las fusiones SIRP- $\alpha$ -Fc de dos brazos.

La FIG. 17 muestra fagocitosis en presencia de constructos SIRP- $\alpha$  de un solo brazo de baja afinidad (E, F) realizadas de manera similar a los ejemplos anteriores. Como se muestra, estos constructos de SIRP- $\alpha$  de un solo brazo de baja afinidad (E, F) en combinación con Herceptin mostraron una fagocitosis de N87 células en comparación con la de Herceptin solo (PBS+). Por lo tanto, la afinidad 5 nM por CD47 no es suficiente para la fusión SIRP- $\alpha$ -Fc de un solo brazo para mejorar aún más la fagocitosis *in vitro* en combinación con Herceptin.

#### Ejemplo 17 - Reactividad cruzada de variantes de D1 de SIRP- $\alpha$ de alta afinidad

Se generaron polipéptidos de variantes de D1 de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad como se describió previamente. La unión a humanos, ratones y ratas CD47 se determinó usando SPR medido por un T100 instrumento Biacore (GE Healthcare) y Proteon XPR36 (Bio-rad, Hercules, CA) como se describe en el Ejemplo 1. SEQ ID NO:215 es una variante de D1 de SIRP- $\alpha$  diseñada que no se une a humano, ratón o rata CD47 y se utilizó como control negativo.

**Tabla 28.** Afinidad de unión de especies cruzadas representativa CD47 para variantes de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad

SEQ ID NO:	K <sub>D</sub> (M)		
	Humano	Ratón	Rata
85	2,03 x 10 <sup>-10</sup>	2,16 x 10 <sup>-9</sup>	1,96 x 10 <sup>-8</sup>
198	1,55 x 10 <sup>-10</sup>	1,41 x 10 <sup>-9</sup>	9,88 x 10 <sup>-9</sup>
199	1,26 x 10 <sup>-9</sup>	1,25 x 10 <sup>-9</sup>	1,07 x 10 <sup>-8</sup>
200	3,04 x 10 <sup>-10</sup>	1,17 x 10 <sup>-9</sup>	1,42 x 10 <sup>-8</sup>
204	6,53 x 10 <sup>-10</sup>	4,48 x 10 <sup>-10</sup>	3,42 x 10 <sup>-9</sup>
205	2,48 x 10 <sup>-10</sup>	5,69 x 10 <sup>-10</sup>	4,28 x 10 <sup>-9</sup>
206	9,67 x 10 <sup>-10</sup>	2,88 x 10 <sup>-10</sup>	1,49 x 10 <sup>-9</sup>
207	1,04 x 10 <sup>-9</sup>	8,80 x 10 <sup>-10</sup>	5,90 x 10 <sup>-9</sup>
208	2,19 x 10 <sup>-10</sup>	8,32 x 10 <sup>-10</sup>	5,17 x 10 <sup>-9</sup>

	K <sub>D</sub> (M)		
SEQ ID NO:	Humano	Ratón	Rata
209	1,01 x 10 <sup>-9</sup>	3,71 x 10 <sup>-10</sup>	2,26 x 10 <sup>-9</sup>
210	1,65 x 10 <sup>-9</sup>	6,12 x 10 <sup>-10</sup>	4,59 x 10 <sup>-9</sup>
136	1,3904 x 10 <sup>-10</sup>	1,1407 x 10 <sup>-8</sup>	6,43 x 10 <sup>-9</sup>
214	2,00 x 10 <sup>-9</sup>	6,30 x 10 <sup>-8</sup>	8,00 x 10 <sup>-8</sup>
215	No se une	No se une	No se une

SEQ ID NO: 215:

EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPRGPIQWFRGAGPGRELIYNKEGHFPRVTT  
 VSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTH  
 TCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFL  
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**Ejemplo 18 - Actividad antitumoral de constructos de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad en un modelo de tumor de xenoinjerto de ratón**

5 Ratones inmunodeficientes NOD scid gamma (NSG) (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>-tm1Wjl</sup> /SzJ; 50 hembras, más repuestos) se compraron como animales de 6 a 10semanas de edad. Se cultivaron células de la línea celular de linfoma humano GFP-Luc-Raji en R PMI 1640que contenía 10%suero fetal bovino, penicilina, estreptomicina y L-glutamina. Luego, las células se centrifugaron y se resuspendieron a una concentración de 1,0 x 10<sup>7</sup>células/mL en medio libre de suero sin aditivos y combinado 1:1 con Matrigel™ (Trevigen, Gaithersburg, MD). El día -11 (es decir, 11 días antes del día de estadificación proyectado), los ratones se implantaron mediante inyección subcutánea en el flanco izquierdo con 200 $\mu$ L (1,0 X10<sup>6</sup> células) por ratón de la mezcla recién preparada GFP-Luc-Raji:Matrigel. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de aproximadamente 55 mm<sup>3</sup>, se aleatorizaron cincuenta animales con tumores establecidos y pesos corporales moderados en 5 grupos de tratamiento (Grupo 1-5, n=10ratones cada uno). A partir del día 1,Los grupos 1 a 5 se trajeron con (1) SEQ ID NO:215 [10mg/kg (mpk), 3x/semana]; (2) SEQ ID NO:104 (10mpk, 3x/semana); (3) rituximab (5 mpk, 2x/semana) + SEQ ID NO:100 (10mpk, 3x/semana); (4) rituximab (5 mpk, 2x/semana) + SEQ ID NO:104(10mpk, 3x/semana); o (5) rituximab (5 mpk, 2x/semana) +SEQ ID NO:215 (10mpk, 3x/semana), respectivamente. Las dosis se administraron mediante inyección intraperitoneal (IP) a 0,05 mL/ratón. Para todos los animales, las dosis se administraron comenzando el día de estadificación y continuando durante un total de 31 días (Días 1-31).

20 Las observaciones clínicas se registraron dos veces al día (mañana y tarde). Los hallazgos adicionales se registraron como se observaron. Los pesos corporales se midieron tres veces por semana usando una balanza electrónica (Ohaus SCOUT® PRO). Los tamaños de los tumores se midieron tres veces por semana, y al finalizar el estudio, usando microcalibradores (Mitutoyo, Aurora, Illinoes) para medir las dimensiones perpendiculares menores (anchura, W, altura, H) y mayores (longitud, L). El volumen del tumor (mm<sup>3</sup>) se calculó usando la fórmula para el volumen de una esfera elíptope (L x W<sup>2</sup>H / 2). Se extrajeron muestras de sangre de 20 animales el día 1 (línea de base; antes de la asignación del grupo) y de todos los animales el Día 8 (semana 1) y el Día 31 (al finalizar). Las muestras de sangre se enviaron para el recuento sanguíneo completo (CBC) el día respectivo de la extracción.

25 El constructo de SIRP- $\alpha$  de la SEQ ID NO:215 no presenta unión medible a CD47 (véase Tabla 28). Los tumores en el SEQ ID NO:215-grupo de dosificación (Grupo 1) crecieron linealmente hasta el Día 31 (FIG. 19A), similar a los tumores observados en el grupo de vehículo de PBS del mismo modelo (datos no mostrados). Esta observación demuestra un crecimiento tumoral continuo en ausencia de un tratamiento eficaz.

30 Las comparaciones entre los grupos 1 y 5 (SEQ ID NO:215 con o sin rituximab) y entre los grupos 2 y 4 (SEQ ID NO:104 con o sin rituximab) revelan que los tratamientos combinados produjeron una atenuación significativa del volumen tumoral, tanto como valores brutos (desde el Día 9) como valores normalizados (desde Día 7). Al día 16, la

5 mayoría de los ratones del Grupo 3 (SEQ ID NO: 100+rituximab) y del Grupo 4 (SEQ ID NO: 104 + rituximab) ya no albergaban tumores detectables; estos dos tratamientos combinados mostraron una eficacia similar. Por el contrario, el crecimiento tumoral pareció recuperarse en los animales del Grupo 5 (SEQ ID NO: 215 + rituximab) a partir del día 18. Los volúmenes tumorales de los cinco grupos durante el período de estudio (media +/- SEM y gráficos de dispersión individuales) se presentan en la FIG. 19A y FIG 19B respectivamente.

10 Valores de hemograma completo (CBC) (glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, plaquetas, etc.) medidos antes de la dosis (Día 1), 1 semana después de la dosis (Día 9) y 4 semanas después de la dosis (Día 31). Los parámetros no difirieron significativamente en la Semana 1 o la Semana 4 entre los cinco grupos. Los valores de hemoglobina (HGB) se muestran en la FIG. 19C. Estos resultados demuestran que los constructos de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad pueden atenuar eficazmente el crecimiento tumoral y sinergizar con rituximab en un modelo de cáncer de ratón *in vivo*. Además, a diferencia de los tratamientos con anticuerpos basados en anti-CD47, no se observaron episodios agudos de anemia en ninguno de los grupos de prueba tratados con los constructos de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad.

Ejemplo 19: Los constructos variantes de SIRP- $\alpha$  Fc muestran una disminución de la toxicidad de los glóbulos rojos

15 La pérdida de glóbulos rojos es una preocupación se dirige a CD47. Para examinar los efectos de un constructo variante de SIRP- $\alpha$  Fc sobre la toxicidad de los glóbulos rojos, se trajeron ratones con un constructo variante de SIRP- $\alpha$  de alta afinidad que contenía un constructo IgG1 Fc de tipo salvaje (SEQ ID NO: 216) o un constructo variante Fc de IgG1 (SEQ ID NO:96) con mutaciones de IgG1L234A, L235A, G237A y N297A (IgG1\_AAA\_N297A). Los ratones se asignaron a cinco grupos de seis y se trajeron los días 1 y 7 (véanse flechas continuas en la FIG. 20) con: (1) PBS; (2)10mg/kg SEQ ID NO:216 (IgG1 Fc de tipo salvaje); (3) 30 mg/kg SEQ ID NO:216; (4) 10mg/kg SEQ ID NO: 96 (IgG1\_AAA\_N297A); o (5) 30 mg/kg SEQ ID NO: 96. Se tomaron mediciones de recuento sanguíneo completo (CBC) de referencia de todos los animales el día -7 y de tres de seis animales el día 1. Las extracciones de sangre (véase la FIG. 20) rotaron entre tres ratones de cada grupo para no exceder la cantidad de extracción de sangre permitida por semana. Como se demuestra en la FIG. 20, el tratamiento con una IgG1 de tipo salvaje que contiene la variante de D1 de SIRP- $\alpha$  dio como resultado una disminución dependiente de la dosis en los recuentos de glóbulos rojos. Por el contrario, el tratamiento con un IgG1\_AAA\_N297A que contenía el constructo variante de D1 de SIRP- $\alpha$  dio como resultado recuentos de glóbulos rojos similares al grupo de control tratado con PBS.

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido, que comprende una variante de proteína reguladora de señal  $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) D1 y una variante de Fc, en donde el polipéptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NOs: 98-104,107-113,116-122 y 135-136.
- 5    2. Un dímero que consiste en dos copias del polipéptido de la reivindicación 1.
3. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de cualquiera de la reivindicación 1.
4. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 3.
5. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 3 o el vector de la reivindicación 4.
- 10    6. Un método para producir un polipéptido de la reivindicación 1 que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 5 en condiciones apropiadas para provocar la expresión del polipéptido y recuperar el polipéptido.
7. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la reivindicación 1, o el dímero de la reivindicación 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7 para su uso en un método para tratar el cáncer.
- 15    9. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 8, el cáncer se selecciona entre cáncer de tumor sólido, cáncer hematológico, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cuello de útero, cáncer de endometrio, cáncer de pulmón, cáncer de bronquios, cáncer de hígado, cáncer de ovarios, cáncer de colon y recto, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de vesícula biliar, cáncer de tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de orofaringe, cáncer de esófago, melanoma, cáncer no melanoma de piel, carcinoma de células de Merkel, cáncer inducido por virus, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal, leucemia, linfoma, sarcoma, glioma, tumor cerebral, o carcinoma.
- 20    10. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8 o 9, en donde el método comprende administrar la composición farmacéutica y un anticuerpo terapéutico.
- 25    11. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en donde el anticuerpo terapéutico se une a 4-1BB, 5T4, ALK1, ANG-2, B7-H3, B7-H4, c-Met, CA6, CCR4, CD123, CD19, CD20, CD22, CD27, EpCAM, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CD74, CD79b, CD98, CEA, CEACAM5, CLDN18.2, CLDN6, CS1, CTLA-4, CXCR4, DLL-4, EGFR, EGP-1, ENPP3, EphA3, ETBR, FGFR2, fibronectina, FR-alfa, receptor Frizzled, GCC, GD2, glypican-3, GP NMB, HER2, HER3, HLA-DR, ICAM-1, IGF-1R, IL-3R, LIV-1, mesotelina, MUC16, MUC1, NaPi2b, Nectin-4, Notch 2, Notch 1, OX-40, PD-1, PD-L1, PD-L2, PDGFR- $\alpha$ , PS, PSMA, SLTRK6, STEAP1, TEM1, VEGFR, CD25, DKK-1, o CSF-1R.
- 30    12. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en donde el anticuerpo terapéutico es cetuximab, necitumumab, pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, MEDI0680, atezolizumab, avelumab, durvalumab, MEDI6383, MEDI6469, RG7888, ipilimumab, tremelimumab, urelumab, PF-05082566, enoblituzumab, vantictumab, varilimumab, mogamulizumab, SAR650984, daratumumab, trastuzumab, trastuzumab emtansine, pertuzumab, elotuzumab, rituximab, ofatumumab, obinutuzumab, RG7155, FPA008, panitumumab, o brentuximab vedotin.
- 35

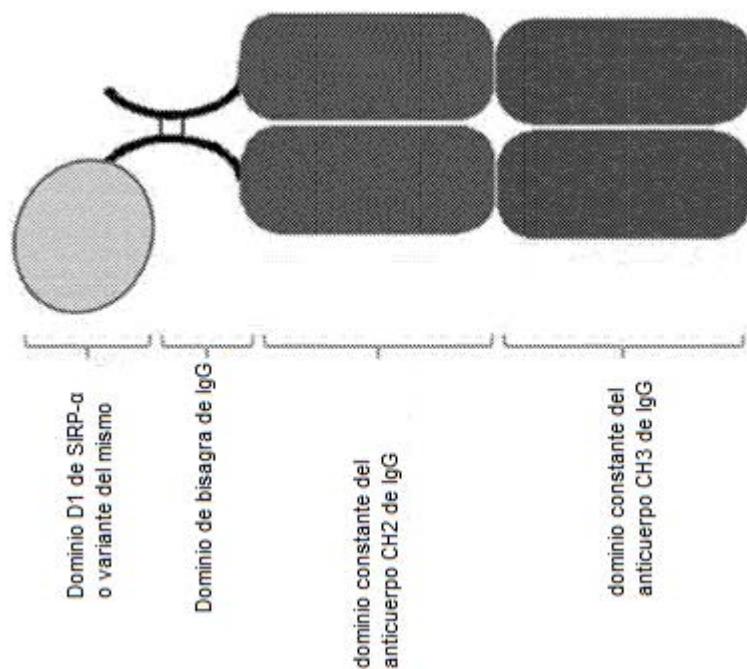


FIG. 1

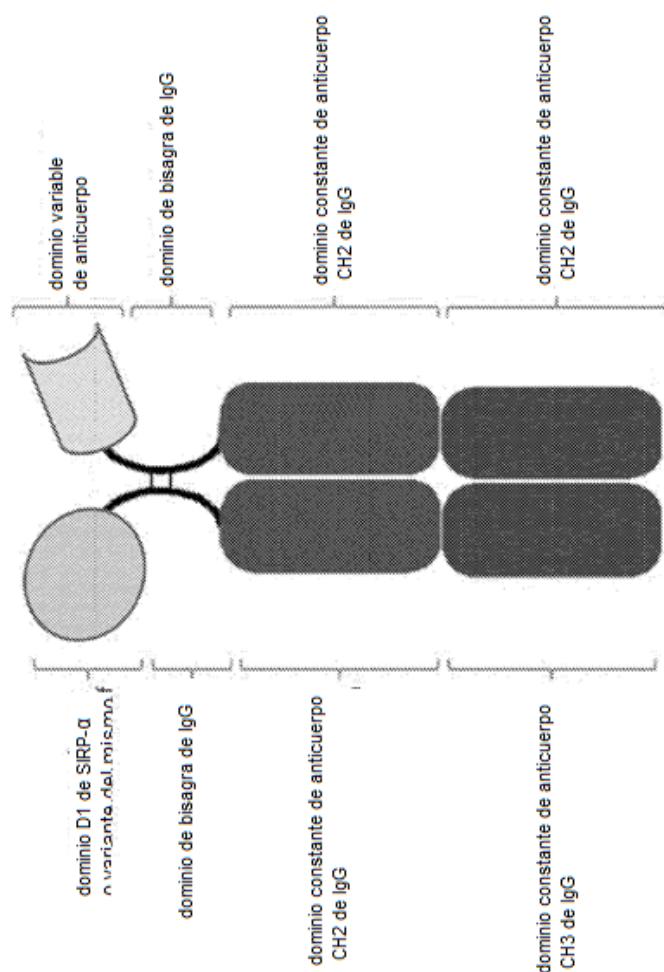
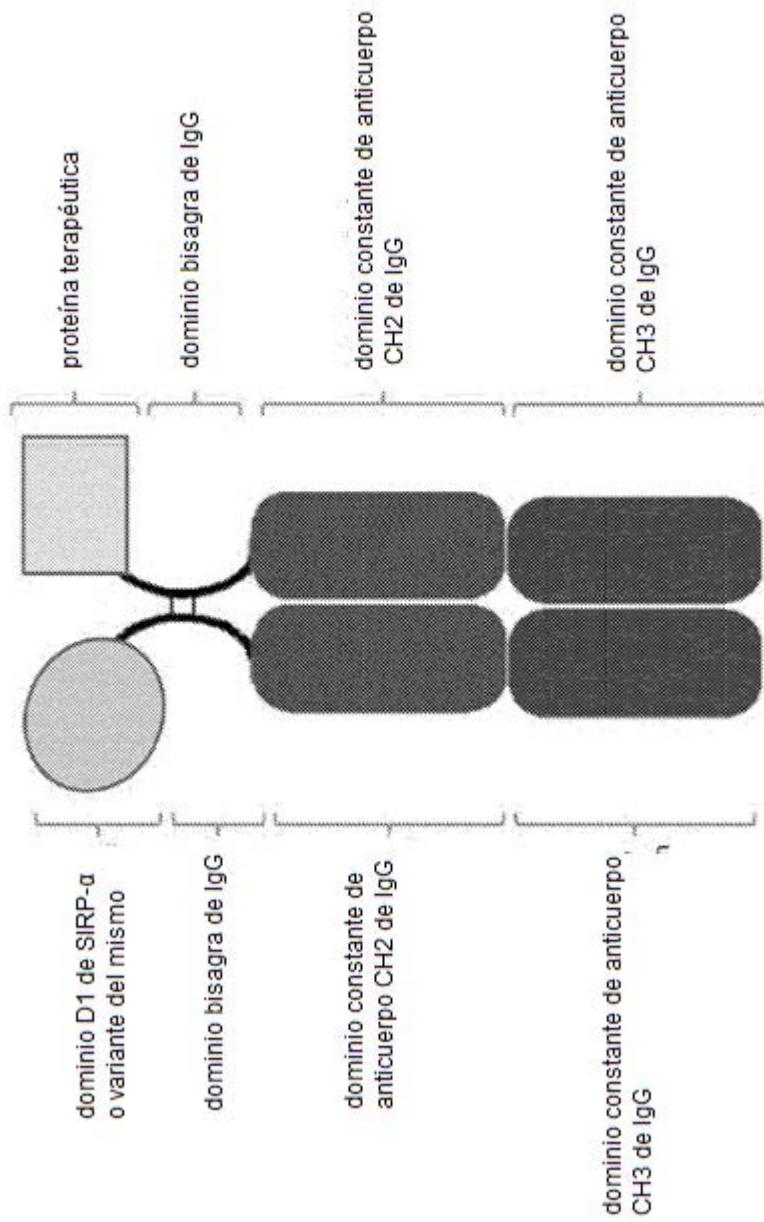


FIG. 2



*FIG. 3*

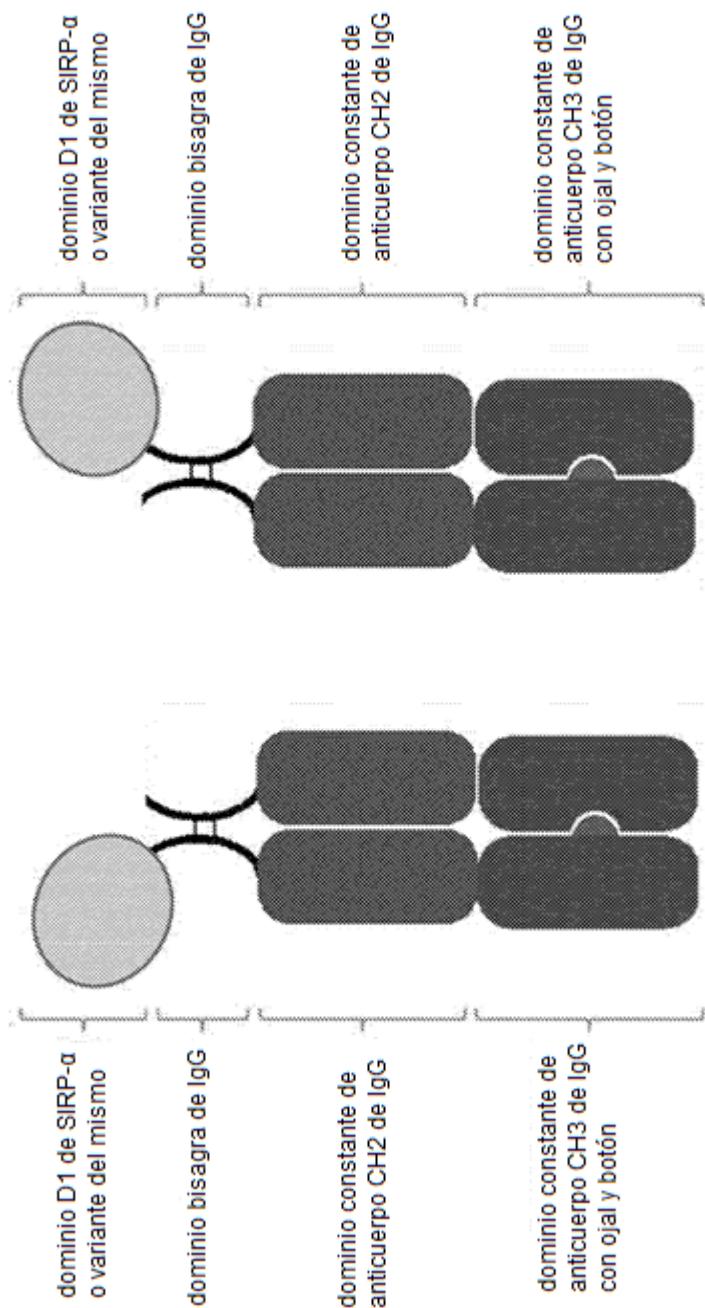
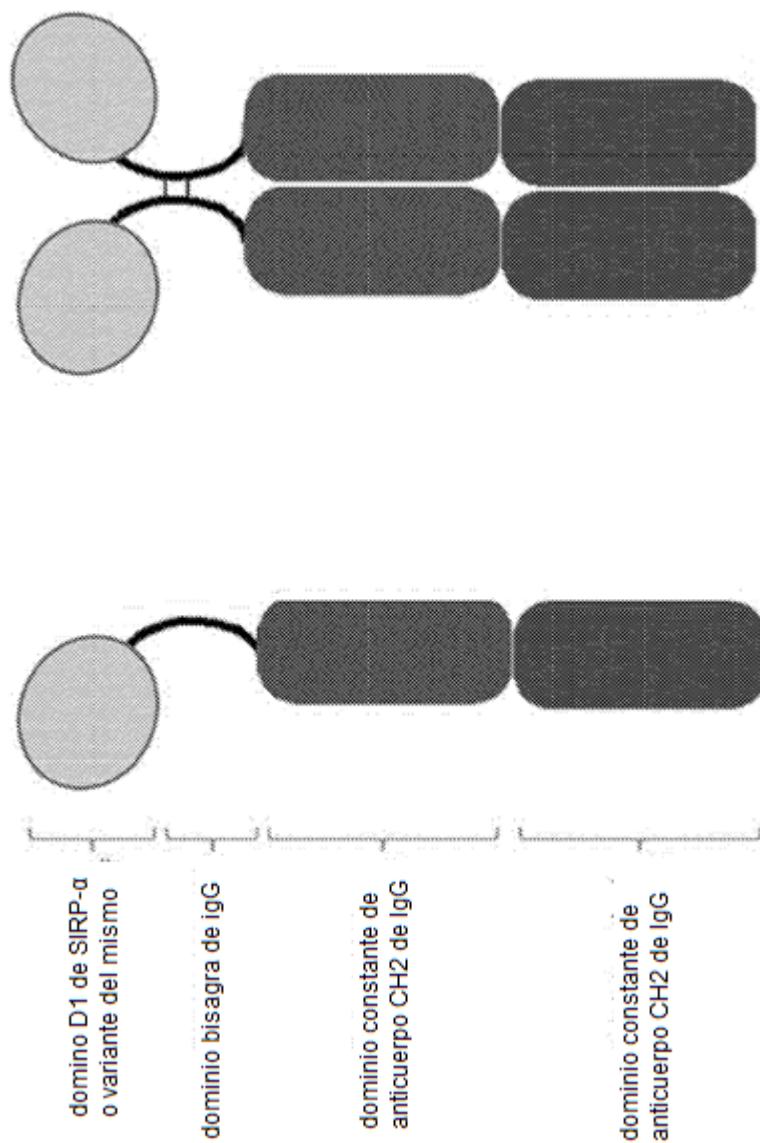


FIG. 4B

FIG. 4A



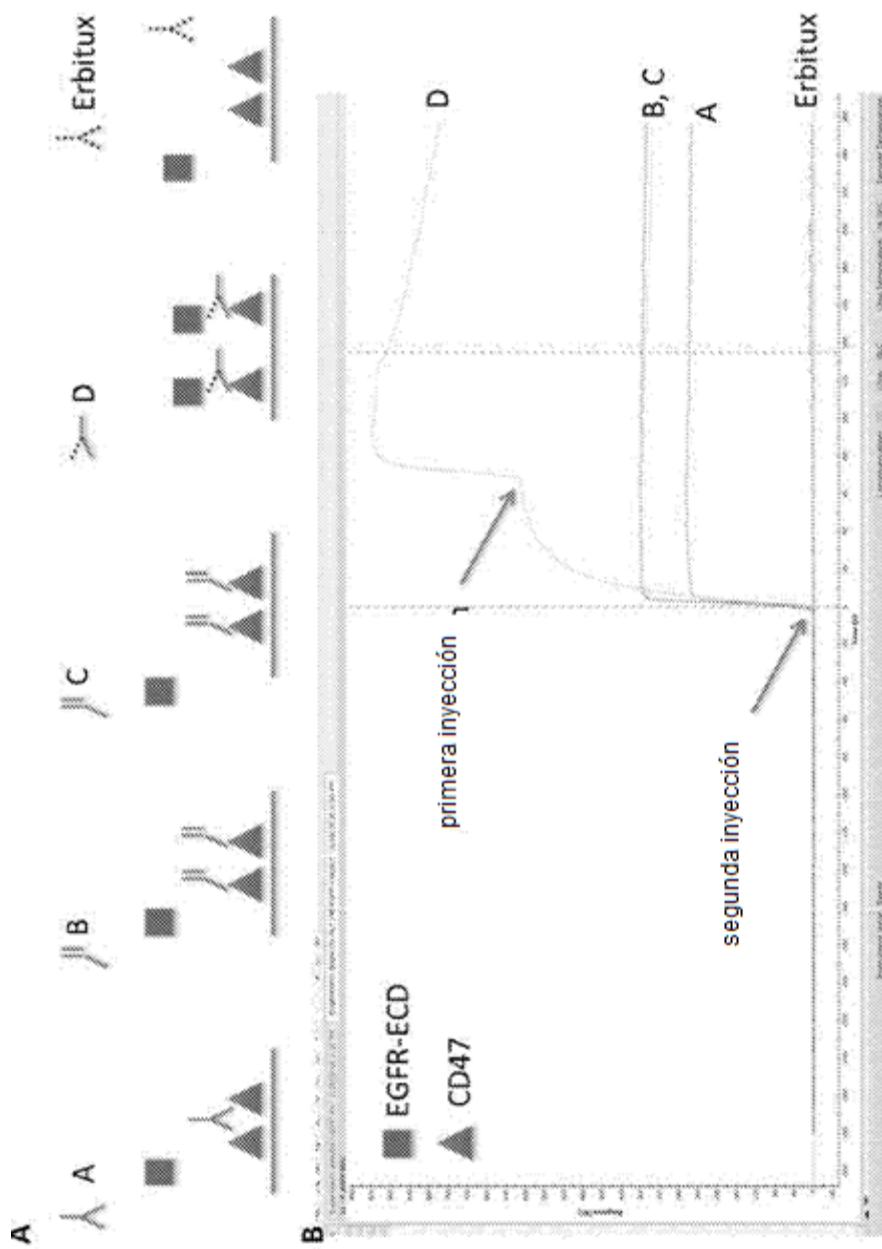


FIG. 6

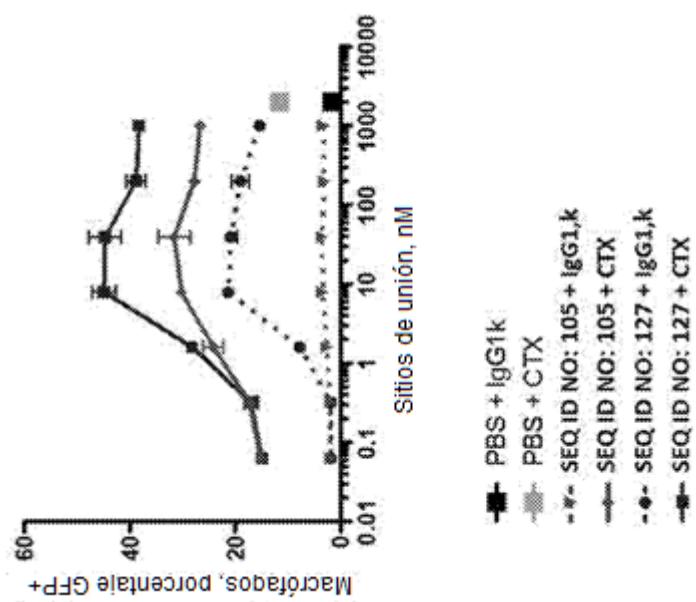


FIG. 7

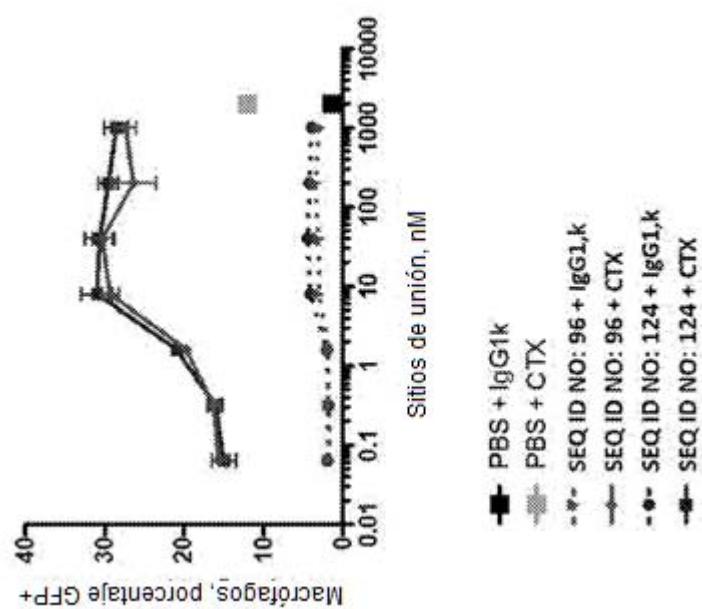


FIG. 8

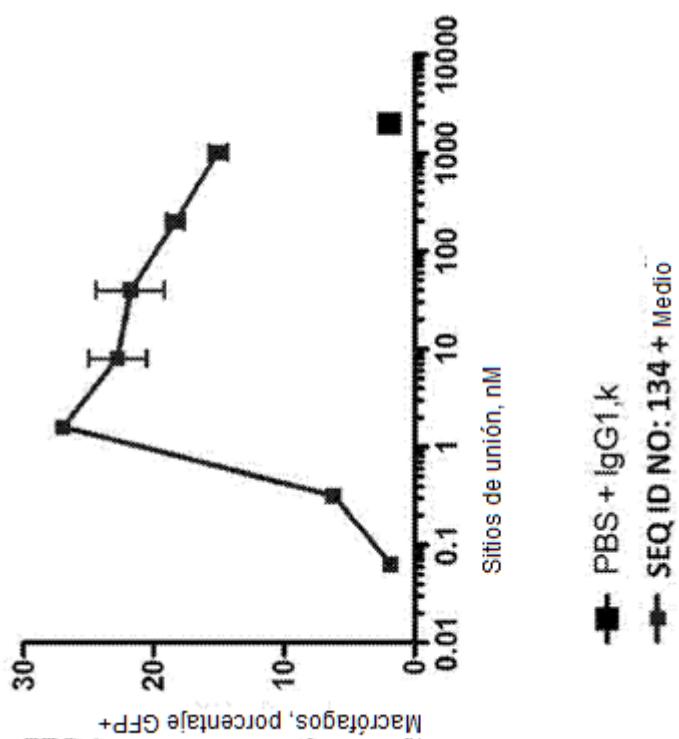


FIG. 9

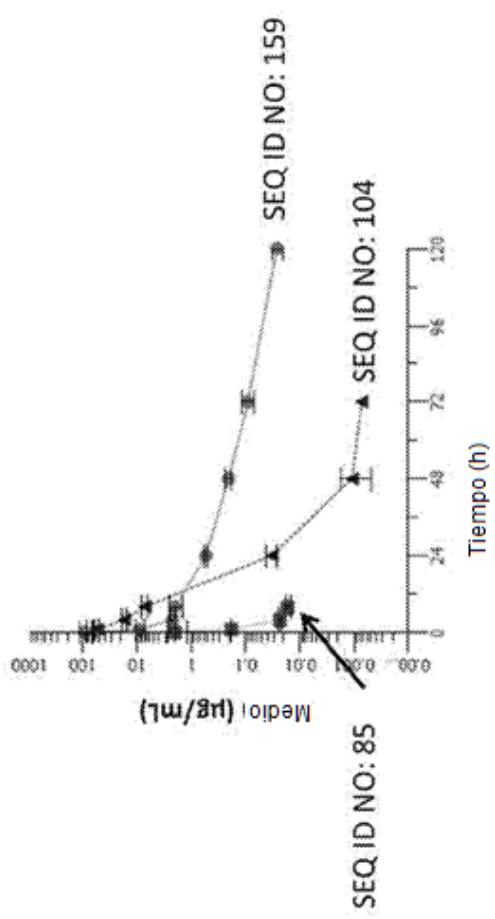


FIG. 10

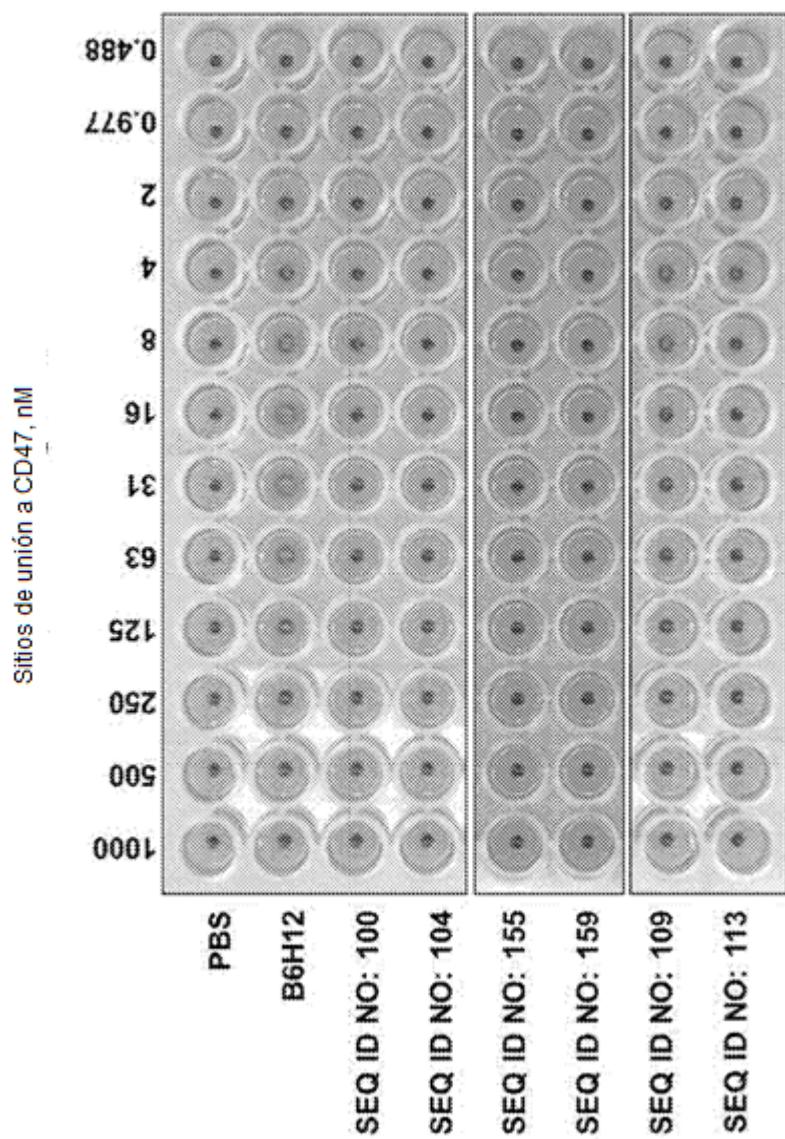


FIG. 11

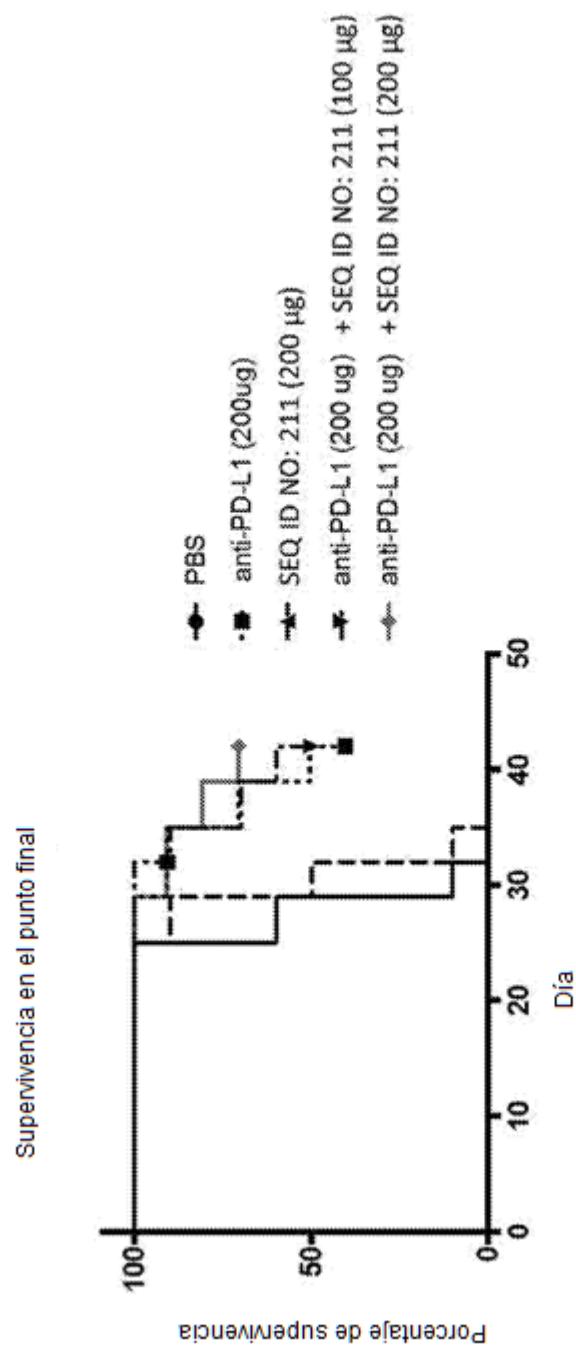


FIG. 12

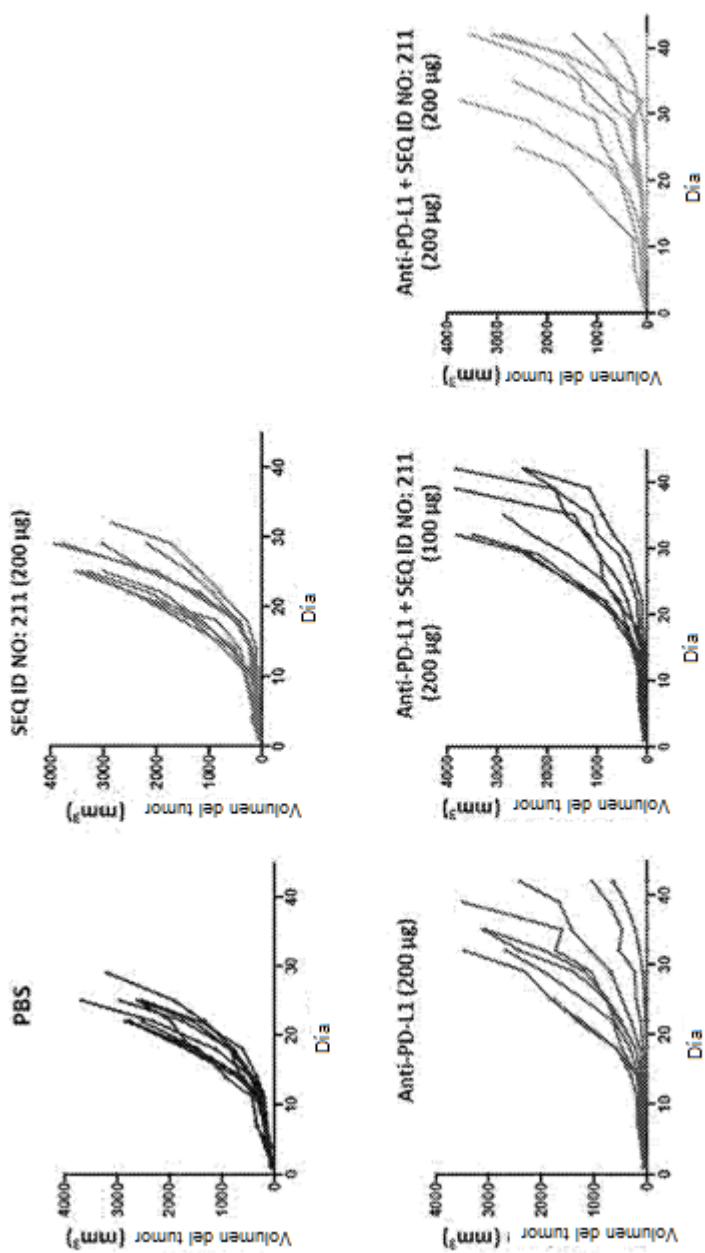


FIG. 13

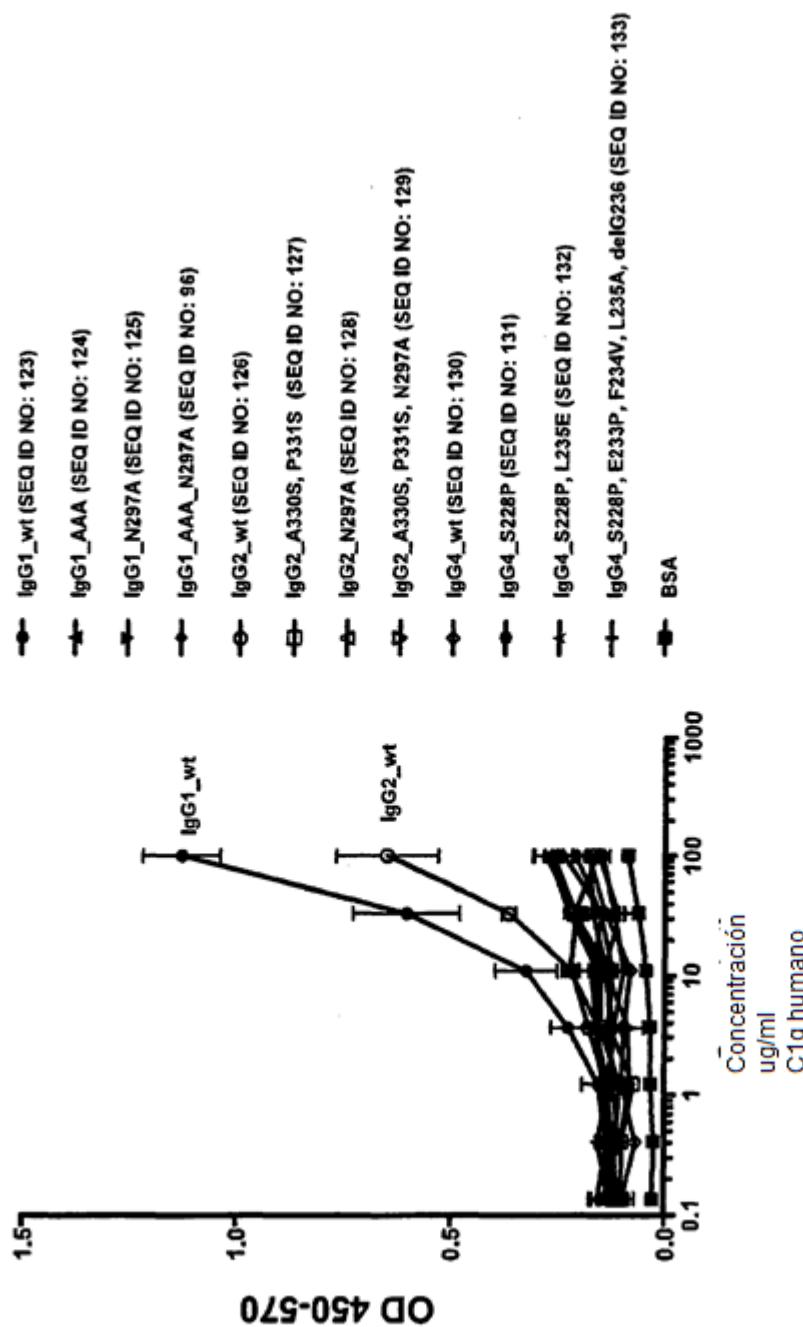


FIG. 14

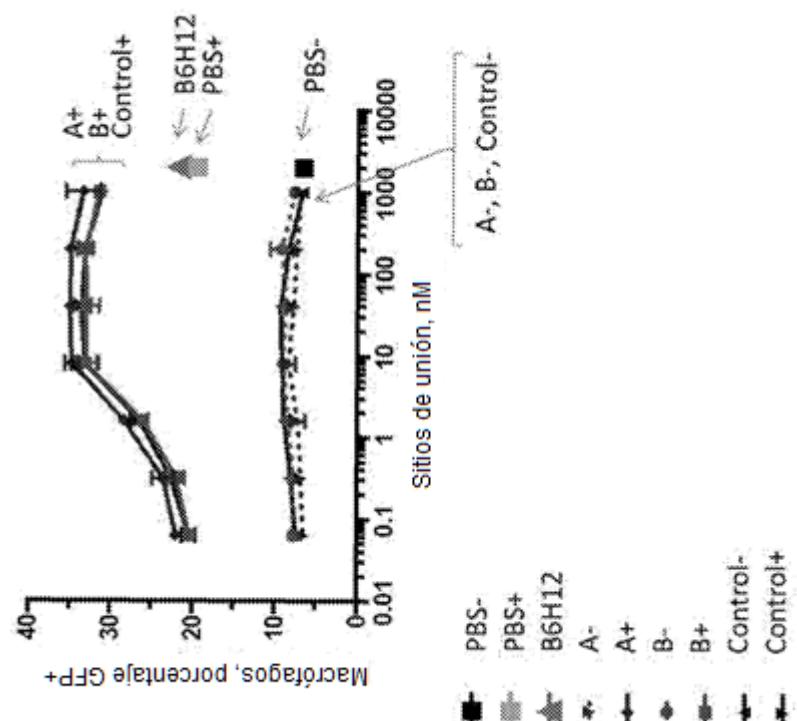


FIG. 15

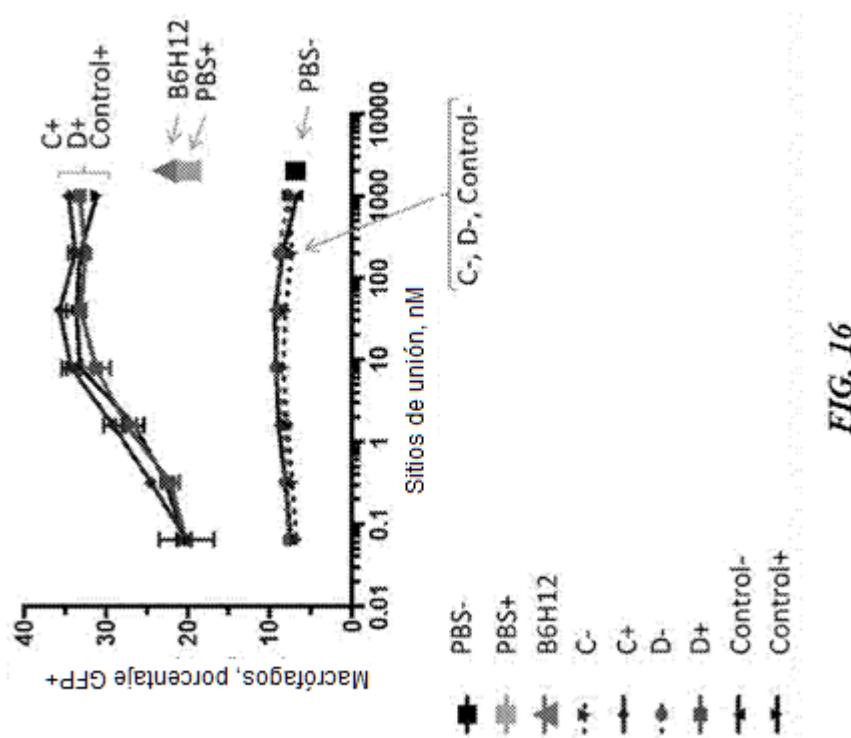


FIG. 16

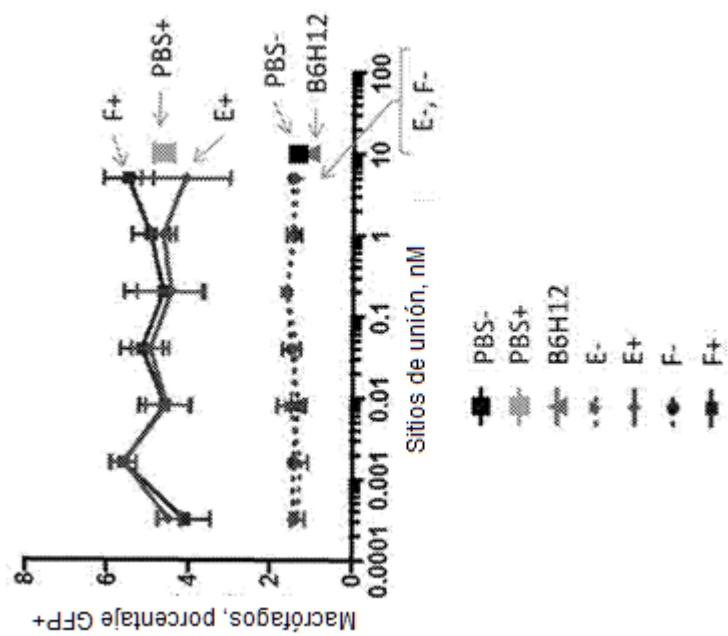
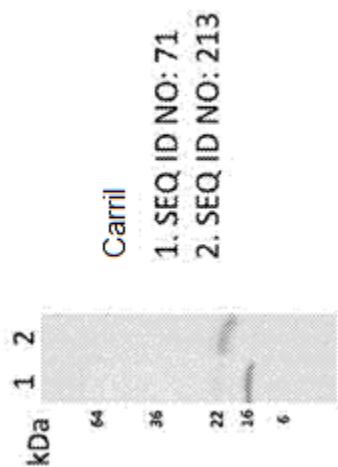


FIG. 17



*FIG. 18*

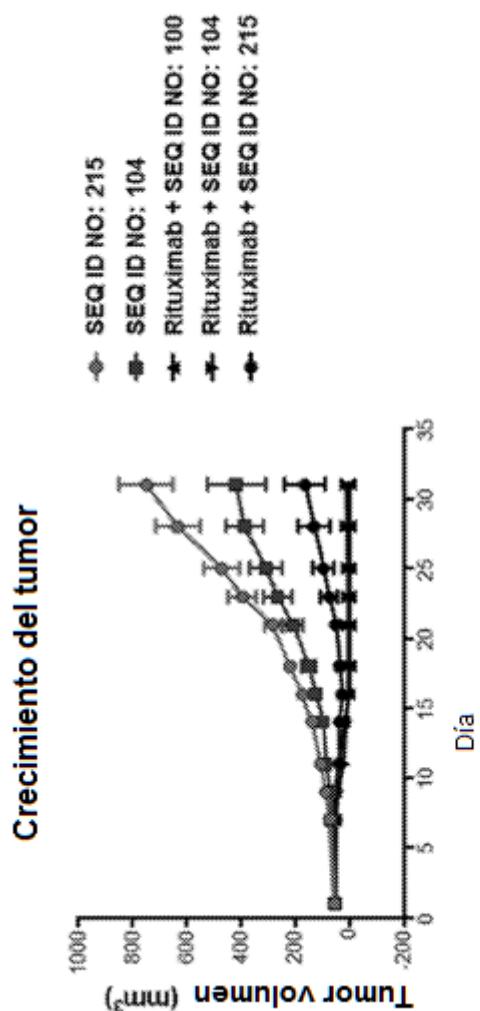


FIG. 19A

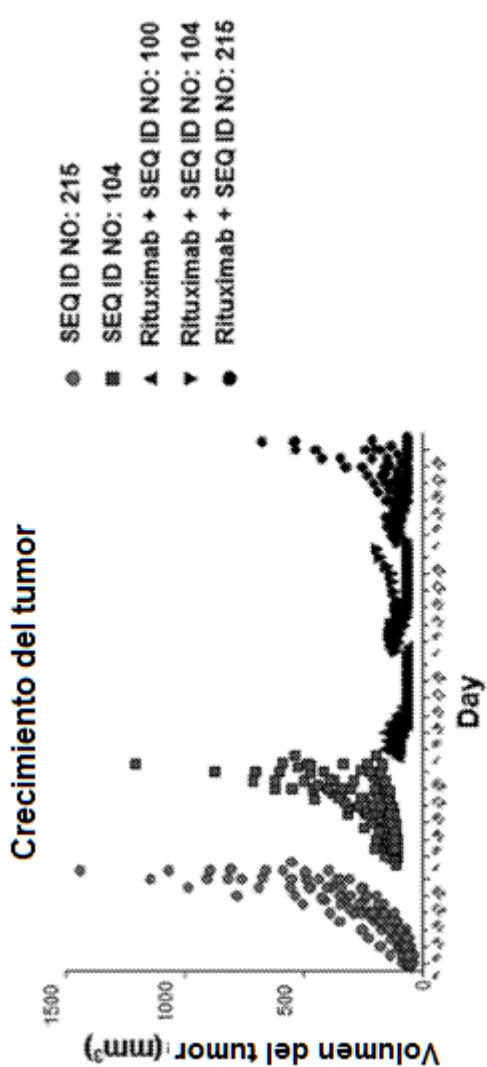


FIG. 19B

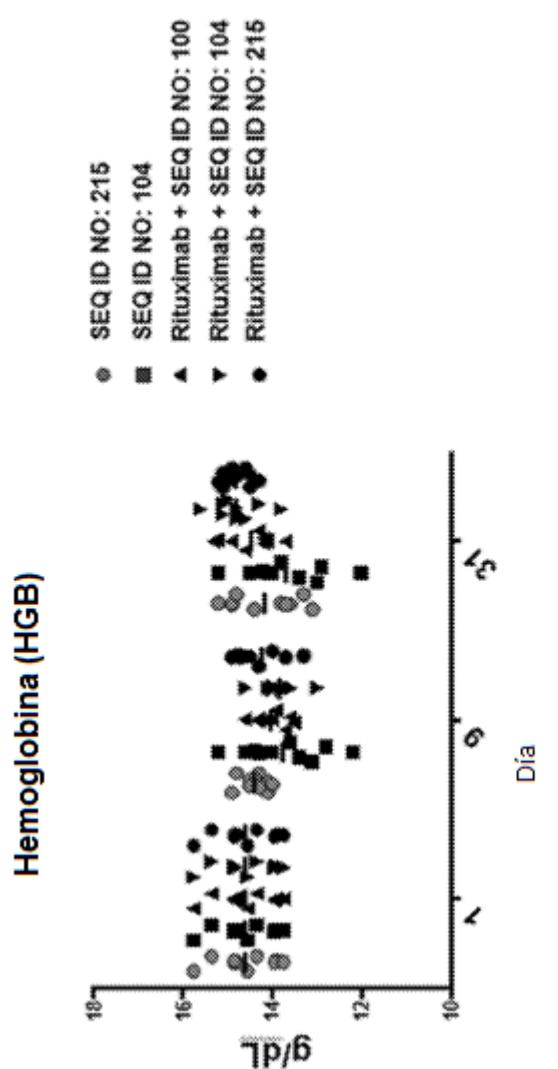


FIG. 19C

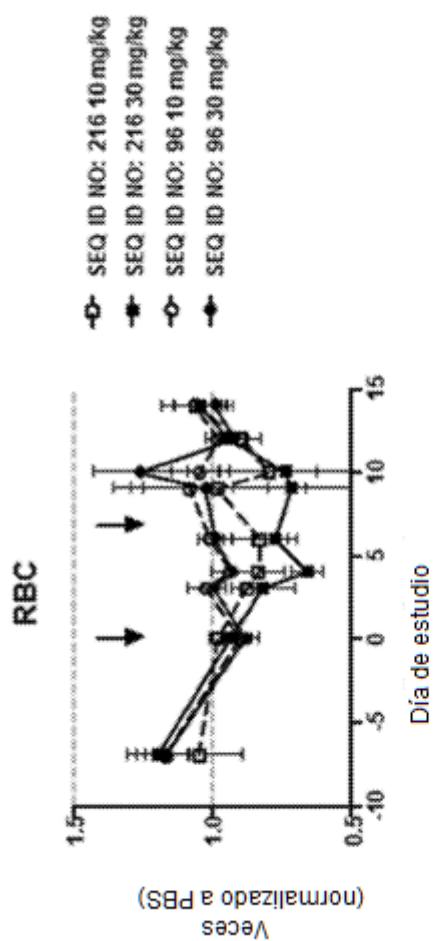


FIG. 20